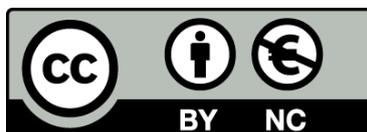




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Influencia de las auxinas giberelina GA3 y fenobarbital sobre la síntesis de cardenólidos en cultivos de callo de *Digitalis Purpurea* L.

M^a Mercedes Bonfill Baldrich



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License**.

TESIS DOCTORAL

M^a MERCEDES BONFILL BALDRICH

**INFLUENCIA DE LAS AUXINAS, GIBERELINA GA₃ Y FENOBARBITAL
SOBRE LA SINTESIS DE CARDENOLIDOS EN CULTIVOS DE CALLO
DE *DIGITALIS PURPUREA* L.**



Barcelona, 1993

"BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA"



0700084097

x

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,37967	0,37967	
Residuo	406	0,19949	0,49134	77,3
Total	407	0,23745		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,52815	0,52815	
Residuo	406	0,19949	0,49134	1,07
Total	407	0,20001		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA GbPb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,16042	0,16042	
Residuo	406	0,19949	0,49134	32,6
Total	407	0,21553		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,35251	0,35251	
Residuo	406	0,19949	0,49134	0,717
Total	407	0,19984		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr.med.	F
Hipótesis	1	0,38726	0,38726	
Residuo	406	0,19949	0,49134	78,8
Total	407	0,23821		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,27777	0,27777	
Residuo	406	0,19949	0,49134	5,65
Total	407	0,20226		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,45363	0,45363	
Residuo	406	0,19949	0,49134	92,3
Total	407	0,24485		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,50385	0,50385	
Residuo	406	0,19949	0,49134	10,3
Total	407	0,20452		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,21550	0,21550	
Residuo	406	0,19949	0,49134	43,9
Total	407	0,22103		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

La aplicación del método Bonferroni para contrastar los medios indica:

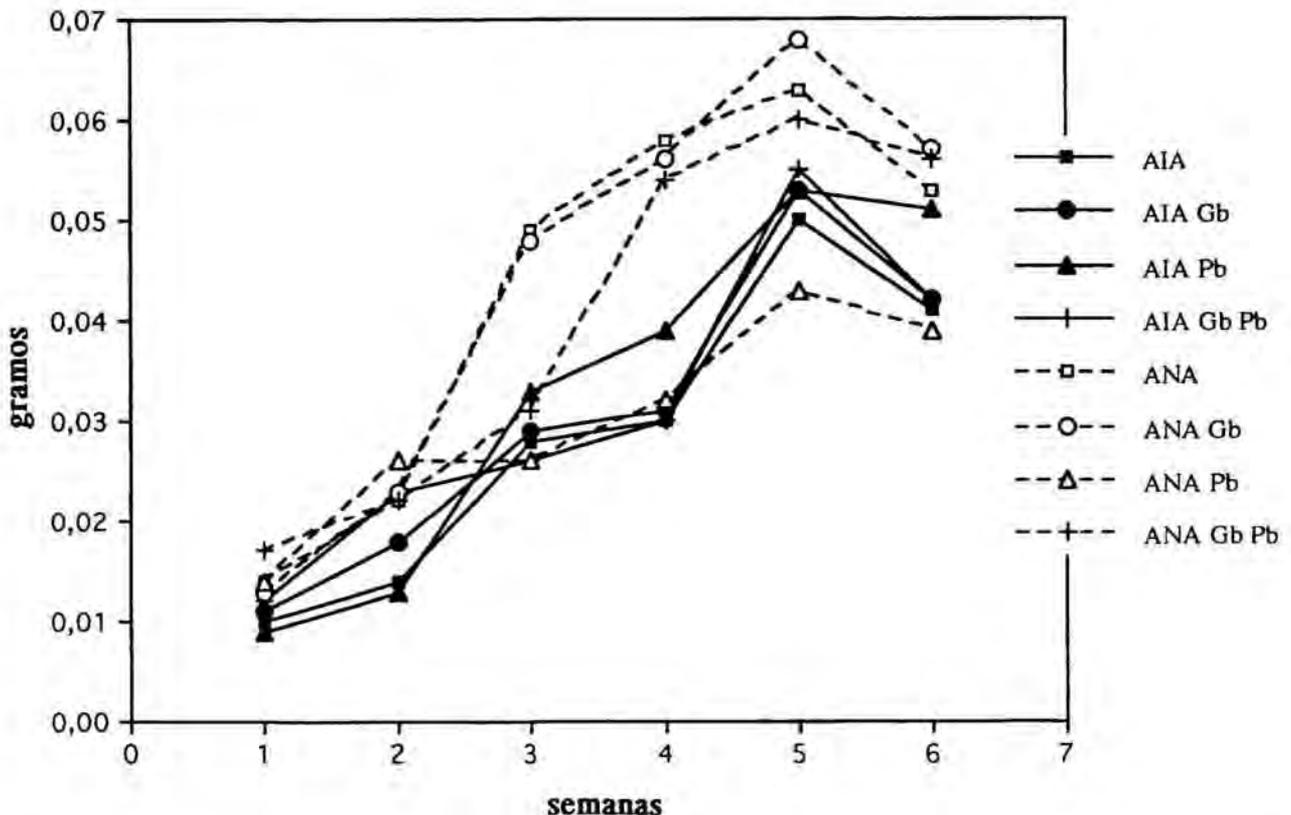
- Estadísticamente se observa esta igualdad:
 $AIA = AIA\ Gb = AIA\ Pb = AIA\ Gb\ Pb = ANA\ Pb$
- Hay cierta semejanza estadística entre los siguientes medios:
 $ANA-ANA\ Gb \quad ANA-ANA\ Gb\ Pb$

Los medios que aparecen en la igualdad estadística actúan del mismo modo sobre el Peso seco en los callos estudiados, y son los medios que poseen los valores más bajos.

Así pues se podría decir que sobre el crecimiento medido como Peso seco influye sobretodo la auxina (AIA o ANA), pero la interacción negativa, ya mencionada, entre ANA y Pb hace que este medio actúe como si fuera un medio con base AIA.

FIGURA R-29

Peso seco expresado en gramos (g).



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-5: Peso seco (g)¹

Medios

Semanas

	AIA	AIA Gb	AIA Pb	AIA Gb Pb
1^a	0,0099 ± 0,00	0,0118 ± 0,00	0,0096 ± 0,00	0,0121 ± 0,00
2^a	0,0144 ± 0,00	0,0181 ± 0,00	0,0130 ± 0,00	0,0237 ± 0,00
3^a	0,0287 ± 0,00	0,0299 ± 0,00	0,0330 ± 0,00	0,0267 ± 0,00
4^a	0,0304 ± 0,00	0,0316 ± 0,00	0,0390 ± 0,00	0,0302 ± 0,00
5^a	0,0506 ± 0,00	0,0539 ± 0,00	0,0534 ± 0,00	0,0550 ± 0,00
6^a	0,0418 ± 0,00	0,0420 ± 0,00	0,0512 ± 0,00	0,0420 ± 0,00

ANA

ANA Gb

ANA Pb

ANA Gb Pb

1^a	0,0140 ± 0,00	0,0133 ± 0,00	0,0146 ± 0,00	0,0171 ± 0,00
2^a	0,0227 ± 0,00	0,0234 ± 0,00	0,0268 ± 0,00	0,0228 ± 0,00
3^a	0,0490 ± 0,00	0,0488 ± 0,00	0,0264 ± 0,00	0,0311 ± 0,00
4^a	0,0585 ± 0,01	0,0561 ± 0,01	0,0321 ± 0,00	0,0542 ± 0,00
5^a	0,0631 ± 0,00	0,0681 ± 0,00	0,0434 ± 0,00	0,0601 ± 0,00
6^a	0,0530 ± 0,01	0,0577 ± 0,01	0,0390 ± 0,00	0,0567 ± 0,00

¹ Cada valor es la media de 12 determinaciones ± S.D.

RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-6: Relaciones de Peso seco entre los medios AIA y los medios ANA durante las 6 semanas de cultivo.

<u>Relaciones entre medios</u>				
<u>Semanas</u>	<u>AIA</u> <u>ANA</u>	<u>AIA Gb</u> <u>ANA Gb</u>	<u>AIA Pb</u> <u>ANA Pb</u>	<u>AIA Gb Pb</u> <u>ANA Gb Pb</u>
1 ^a	0,707	0,887	0,650	0,707
2 ^a	0,634	0,773	0,485	1,039
3 ^a	0,585	0,612	0,676	0,858
4 ^a	0,519	0,563	1,214	0,557
5 ^a	0,801	0,791	1,230	0,915
6 ^a	0,788	0,727	1,312	0,740

RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-7: % Peso seco

Medios

Semanas

	AIA	AIA Gb	AIA Pb	AIA GbPb
1ª	6,36±0,37	6,44±0,33	7,25±0,44	6,94±0,23
2ª	7,82±0,20	7,03±0,37	8,03±0,20	8,27±0,13
3ª	9,39±0,13	6,16±0,43	12,14±0,31	7,82±0,37
4ª	6,97±0,14	6,34±0,18	10,31±0,24	7,49±0,44
5ª	6,59±0,25	6,33±0,15	8,13±0,26	7,40±0,31
6ª	7,04±0,10	6,97±0,23	11,18±0,30	7,07±0,25

	ANA	ANA Gb	ANA Pb	ANA GbPb
1ª	7,00±0,36	5,73±0,30	7,27±0,17	6,37±0,18
2ª	7,62±0,12	6,04±0,29	8,50±0,31	7,09±0,20
3ª	6,80±0,16	5,20±0,21	7,91±0,25	4,06±0,19
4ª	6,46±0,23	5,96±0,33	8,39±0,31	6,42±0,13
5ª	5,41±0,39	6,01±0,28	8,49±0,22	5,73±0,29
6ª	5,70±0,26	5,27±0,15	8,30±0,42	5,74±0,27

RESULTADOS Y DISCUSION

2.2.6.DISCUSION :

Según los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza sobre los datos de Peso seco que resumimos en la Tabla R-5, podemos concluir que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Analizando las diferentes semanas de crecimiento por el método de Bonferroni vemos que todas ellas afectan de forma diferente al aumento de Peso seco de los callos estudiados.

Al contrastar los diferentes medios estudiados, también utilizando el método de Bonferroni, se obtiene que para el Peso seco los medios AIA, AIA Gb, AIA Pb, AIA Gb Pb y ANA Pb son iguales; existiendo además cierta relación entre los restantes medios, aunque sus efectos, en este caso, no sean idénticos (ver sección III.2.2.5.).

Además también se puede observar estudiando la Tablas R-6 y R-7 lo siguiente:

1) Los callos crecidos en los medios con base ANA presentan valores de Peso seco superiores a los correspondientes a los callos crecidos en los medios con base AIA, exceptuando el medio ANA Pb cuyos valores son inferiores a partir de la tercera semana de crecimiento (Figura R-29).

2) Los % de agua también son superiores en todos los casos respecto a los medios AIA.

3) Entre los medios AIA:

Los valores más altos de Peso seco corresponden a AIA Pb y AIA Gb Pb, y los % de agua más altos corresponden a AIA Gb y AIA Gb Pb.

4) Entre los medios ANA:

Los valores más altos de Peso seco corresponden a ANA y ANA Gb (a partir de la tercera semana de crecimiento), y los % de agua más altos corresponden a ANA Gb y ANA Gb Pb. Estos valores de Peso seco y % de agua son los más elevados de los 8 medios estudiados.

Esto nos indica que el medio ANA, además de ejercer un aumento en la toma de agua provoca también un incremento en el crecimiento real (ver Tabla R-6).

Este mismo efecto se hace patente en los callos crecidos en medio AIA Gb respecto a los crecidos en ANA Gb; en cambio, la adición de Pb al medio suplementado con la hormona natural AIA no provoca prácticamente efectos nocivos sobre el crecimiento, mientras que los efectos negativos del Pb se manifiestan cuando se adiciona a un medio que contiene la auxina de síntesis ANA, hecho que ya habíamos comprobado con la adición de Pb a un medio suplementado con la auxina de síntesis 2,4-D en trabajos realizados anteriormente con callos de *Digitalis purpurea*.

3. CONTENIDO EN PROTEINAS Y CITOCROMO P450

3.1. PROTEINAS DE LA FRACCION MITOCONDRIAL

Los valores de proteínas de la fracción mitocondrial, expresados en mg/g PF, descienden lentamente a lo largo de todo el experimento en todos los medios ensayados.

3.1.1. OBSERVACIONES SOBRE LOS DISTINTOS MEDIOS:

La adición de Gb al medio de cultivo ejerce, en general, un ligero efecto estimulante sobre los niveles de proteínas mitocondriales, aunque este estímulo es superior en los callos crecidos sobre medio adicionado con la auxina natural AIA, que en aquellos crecidos en presencia de la auxina sintética ANA (Figura R-30).

El Pb ejerce un elevado estímulo de los niveles de proteínas mitocondriales en los callos crecidos en el medio AIA, y también incrementa aunque en menor proporción los valores de proteínas mitocondriales en los callos crecidos en el medio ANA.

La adición conjunta de Gb y Pb produce valores de proteínas mitocondriales inferiores a los correspondientes a los callos crecidos en el medio Pb, pero superiores a los de los callos crecidos en el medio Gb, es decir, el efecto estimulante de Gb y Pb sobre los niveles de proteínas mitocondriales tiene lugar por diferentes mecanismos que se interfieren enmascarando el efecto del Pb.

3.1.2. ANALISIS DE LA VARIANZA DE LAS PROTEINAS DE LA FRACCION MITOCONDRIAL:

Estudio de la significación del factor tiempo :

Ho: no hay diferencias entre semanas/contras H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	5	7,0838	1,4168	
Residuo	121	4,1584	0,34367	41,2
Total	126	11,242		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,2892. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio de la significación del factor medio :

Ho: no hay diferencias entre medios/contra H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	7	14,820	2,1171	
Residuo	121	4,1584	0,34367	61,6
<hr/>				
Total	128	18,978		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0861. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Considerando que no hay interacción entre los dos factores estudiados (tiempos y medios) y según los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza, con un nivel de significación de 0,05, sobre los datos de proteínas contenidas en la fracción mitocondrial que resumimos en la Tabla R-8, podemos afirmar que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos, es decir, hay diferencias entre las semanas de crecimiento y hay diferencias entre los medios considerados, en relación al contenido en proteínas mitocondriales de los callos estudiados.

Una vez sabido que las semanas y los medios son diferentes estadísticamente respecto a este parámetro, es necesario conocer, para las semanas y para los medios, cuales entre ellos difieren estadísticamente de los demás y si hay algunos iguales estadísticamente. Para ello realizamos comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, es decir, comparamos los factores dos a dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global continúe siendo 0,05.

Se obtuvo que en las comparaciones entre semanas el nivel de significación individual para cada ensayo era de 0,003 y en las comparaciones entre los medios el nivel de significación individual aplicado era de 0,002.

3.1.3. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI) :

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,67635	0,67635	
Residuo	121	4,1584	0,34367	19,7
<hr/>				
Total	122	4,8347		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,5484	1,5484	
Residuo	121	4,1584	0,34367	45,1
Total	122	5,7068		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,7012	2,7012	
Residuo	121	4,1584	0,34367	78,6
Total	122	6,8595		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. md.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,7460	3,7460	
Residuo	121	4,1584	0,34367	109
Total	122	7,9044		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

1ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	5,5358	5,5358	
Residuo	121	4,1584	0,34367	161
Total	122	9,6942		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuy F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,17093	0,17093	
Residuo	121	4,1584	0,34367	4,97
Total	122	4,3293		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

2ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,67424	0,67424	
Residuo	121	4,1584	0,34367	19,6
Total	122	4,8326		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	1,2389	1,2389	
Residuo	121	4,1584	0,34367	36
Total	122	5,3973		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	2,3162	2,3162	
Residuo	121	4,1584	0,34367	67,4
Total	122	6,4746		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,17320	0,17320	
Residuo	121	4,1584	0,34367	5,04
Total	122	4,3316		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,50571	0,50571	
Residuo	121	4,1584	0,34367	14,7
<hr/>				
Total	122	4,6641		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,2584	1,2584	
Residuo	121	4,1584	0,34367	36,6
<hr/>				
Total	122	5,4168		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

4ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,85228	0,85228	
Residuo	121	4,1584	0,34367	2,48
<hr/>				
Total	122	4,2436		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

4ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,47929	0,47929	
Residuo	121	4,1584	0,34367	13,9
Total	122	4,6377		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

5ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 5ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,15789	0,15789	
Residuo	121	4,1584	0,34367	4,59
Total	122	4,3163		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1749. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La aplicación del método Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento indica:

-- Se da cierta semejanza entre las semanas 2ª y 3ª, 3ª y 4ª, 4ª y 5ª, 5ª y 6ª.

-- Sin embargo, no hay igualdad, es decir, cada semana difiere estadísticamente de las demás.

3.1.4. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIOS (BONFERRONI):

Medio AIA/Medio AIA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,11915	0,11915	
Residuo	121	4,1584	0,34367	3,47
Total	122	4,2775		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	6,4322	6,4322	
Residuo	121	4,1584	0,34367	187
Total	122	10,591		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,7649	1,7649	
Residuo	121	4,1584	0,34367	51,4
Total	122	5,9233		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,99485	0,99485	
Residuo	121	4,1584	0,34367	2,89
Total	122	4,2579		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,14236	0,14236	
Residuo	121	4,1584	0,34367	4,14
<hr/>				
Total	122	4,3007		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,18412	0,18412	
Residuo	121	4,1584	0,34367	0,536
<hr/>				
Total	122	4,1602		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,21590	0,21590	
Residuo	121	4,1584	0,34367	6,28
<hr/>				
Total	122	4,3743		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	4,8005	4,8005	
Residuo	121	4,1584	0,34367	140
Total	122	8,9588		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuy F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,96691	0,96691	
Residuo	121	4,1584	0,34367	28,1
Total	122	5,1253		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,38957	0,38957	
Residuo	121	4,1584	0,34367	11,3
Total	122	4,5479		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entremedio AIA Gb y medio ANA Gb/H1:hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,52198	0,52198	
Residuo	121	4,1584	0,34367	15,2
<hr/>				
Total	122	4,6803		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,78175	0,78175	
Residuo	121	4,1584	0,34367	2,27
<hr/>				
Total	122	4,2365		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1:hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,98499	0,98499	
Residuo	121	4,1584	0,34367	28,7
<hr/>				
Total	122	5,1434		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb /Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,4585	1,4585	
Residuo	121	4,1584	0,34367	42,2
<hr/>				
Total	122	5,6169		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	6,6762	6,6762	
Residuo	121	4,1584	0,34367	194
<hr/>				
Total	122	10,835		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	8,4884	8,4884	
Residuo	121	4,1584	0,34367	247
<hr/>				
Total	122	12,647		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	5,4134	5,4134	
Residuo	121	4,1584	0,34367	158
Total	122	9,5717		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	9,0050	9,0050	
Residuo	121	4,1584	0,34367	262
Total	122	13,163		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,2610	2,2610	
Residuo	121	4,1584	0,34367	65,8
Total	122	6,4194		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	2,9098	2,9098	
Residuo	121	4,1584	0,34367	84,7
Total	122	7,0681		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	1,4360	1,4360	
Residuo	121	4,1584	0,34367	41,8
Total	122	5,5943		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	3,2154	3,2154	
Residuo	121	4,1584	0,34367	93,6
Total	122	7,3738		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,48643	0,48643	
Residuo	121	4,1584	0,34367	0,142
<hr/>				
Total	122	4,1589		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,11383	0,11383	
Residuo	121	4,1484	0,34367	3,31
<hr/>				
Total	122	4,2722		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,10037	0,10037	
Residuo	121	4,1584	0,34367	0,292
<hr/>				
Total	122	4,1684		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,15636	0,15636	
Residuo	121	4,1584	0,34367	4,55
Total	122	4,3147		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,76300	0,76300	
Residuo	121	4,1484	0,34367	0,222
Total	122	4,1660		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,22756	0,22756	
Residuo	121	4,1584	0,34367	6,62
Total	122	4,3859		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9790. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

La aplicación del método Bonferroni, a los datos de "Proteínas de la fracción mitocondrial" que se resumen en la Tabla R-8, para contrastar los medios indica:

-- Se observa esta igualdad estadística:

$$AIA = ANA = ANA Gb = ANA Pb = ANA Gb Pb$$

-- Hay cierta semejanza estadística entre distintos medios (ver esta sección), si embargo no son iguales.

3.1.5. DISCUSION

Con los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza sobre los datos de Proteínas mitocondriales que aparecen en la Tabla R-8, podemos decir que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

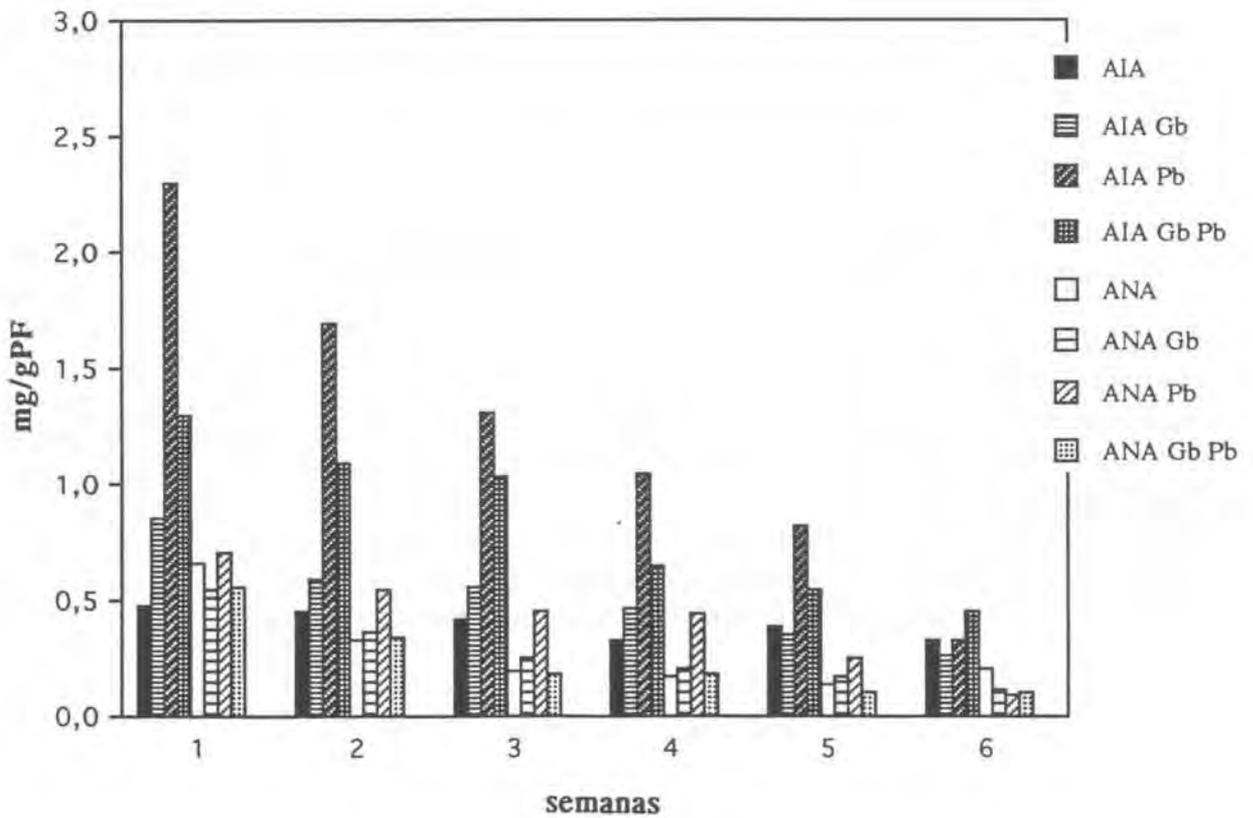
El análisis de la varianza para las semanas de crecimiento (Bonferroni) indica que en ninguna de ellas hay igualdad.

Los medios que aparecen en la igualdad estadística, al utilizar el método de Bonferroni para contrastar los medios, actúan del mismo modo sobre las proteínas mitocondriales, se puede observar (ver sección III.5.1.5. y III.5.2.5.) que estos medios coinciden con los de la igualdad estadística obtenida para los Cardenólidos totales y para la Digitoxina, a excepción del medio ANA Pb y AIA Gb respectivamente. Dada la intensa relación que existe entre proteínas mitocondriales y producción de cardenólidos en el metabolismo, y además, ya que se confirma estadísticamente para estos medios, podemos decir que todos ellos actuarían sobre las proteínas mitocondriales induciéndolas hacia la síntesis de cardenólidos, y el Fenobarbital además de actuar sobre ellas del mismo modo, las induciría también hacia la síntesis de otros metabolitos secundarios. Sin embargo no podemos afirmar que exista una relación directa entre la cantidad de proteínas y el contenido en cardenólidos y Digitoxina.

RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-30

Proteínas mitocondriales expresadas en mg/g Peso fresco.



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-8: Proteínas mitocondriales (mg/gPF)¹

Medios

Semanas	AIA	AIA Gb	AIA Pb	AIA Gb Pb
1 ^a	0,4800±0,0100	0,8500±0,0520	2,2985±0,0530	1,2920±0,0040
2 ^a	0,4500±0,0150	0,5950±0,0210	1,6918±0,0270	1,0860±0,0020
3 ^a	0,4250±0,0200	0,5600±0,0250	1,3071±0,036	1,0300±0,0130
4 ^a	0,3254±0,0083	0,4680±0,0120	1,0500±0,0098	0,6500±0,1070
5 ^a	0,3910±0,0055	0,3560±0,0140	0,8234±0,0222	0,5450±0,0550
6 ^a	0,3284±0,0057	0,2560±0,0120	0,3307±0,0063	0,4570±0,0390

	ANA	ANA Gb	ANA Pb	ANA Gb Pb
1 ^a	0,6604±0,0320	0,5510±0,0230	0,7090±0,0240	0,5540±0,0100
2 ^a	0,3312±0,0110	0,3580±0,0160	0,5435±0,0110	0,3440±0,0200
3 ^a	0,1985±0,0220	0,2530±0,0028	0,4573±0,0190	0,1870±0,0190
4 ^a	0,1700±0,0090	0,2040±0,0090	0,4448±0,0240	0,1850±0,0170
5 ^a	0,1310±0,0001	0,1740±0,0180	0,2530±0,0062	0,1020±0,0140
6 ^a	0,2092±0,0046	0,1100±0,0180	0,0936±0,0002	0,1010±0,0060

¹ Cada valor es la media de 6 determinaciones ± S.D.

3.2. CITOCROMO P450 MITOCONDRIAL

3.2.1. MEDIO AIA:

Los niveles de citocromo P450 mitocondrial de los callos crecidos en el medio AIA aumentan hasta la cuarta semana de crecimiento para disminuir hasta el final del experimento (Figura R-31).

3.2.1.1. Adición de Giberelina.

La adición de Giberelina al medio de cultivo cambia la pauta seguida por este complejo proteico ya que los callos crecidos en el medio AIA Gb presentan valores de citocromo P450 mitocondrial que incrementan durante todo su ciclo de crecimiento. Se puede observar también que la Giberelina estimula significativamente la síntesis de citocromo P450 a partir de la 5^a semana de crecimiento.

3.2.1.2. Adición de Fenobarbital.

Al adicionar Fenobarbital al medio AIA no se observa ningún cambio en la pauta seguida por el citocromo P450 mitocondrial de los callos crecidos en él, pero sí que provoca un significativo estímulo de su síntesis (Tabla R-9).

3.2.1.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital.

Las piezas de callo crecidas en el medio AIA Gb Pb presentan valores de citocromo P450 mitocondrial que durante la primera mitad del experimento son superiores a los alcanzados por los callos crecidos en AIA Gb y muy inferiores a los correspondientes a los callos crecidos en AIA Pb, mientras que al final del experimento son superiores a ambos.

Parece pues, que Gb y Pb ejercen acciones estimulantes sobre la síntesis de citocromo P450 mitocondrial por mecanismos diferentes que se interfieren, sin embargo, parece claro que cuantitativamente la acción del Pb predomina sobre la de la Gb en la primera parte del experimento, mientras que en la segunda parte es la Gb la que muestra su efecto predominante; pero el curso seguido por el citocromo P450 queda afectado esencialmente por la Gb ya que sigue un comportamiento similar al AIA Gb.

3.2.2. MEDIO ANA:

Los valores de citocromo P450 mitocondrial de las piezas de callo crecidas en el medio ANA aumentan a lo largo de todo el experimento, alcanzando niveles muy superiores, especialmente en la segunda mitad del mismo, a los observados para los callos crecidos en el medio AIA (Figura R-31).

3.2.2.1. Adición de Giberelina.

La adición de Giberelina al medio ANA estimula muy claramente la síntesis de este citocromo y cambia el comportamiento seguido por los niveles de dicho complejo proteico, ya que aumentan hasta la 5ª semana de crecimiento para descender en la última semana.

3.2.2.2. Adición de Fenobarbital.

El Pb, cuando se adiciona al medio ANA, no varía la pauta seguida por el citocromo P450, pero ejerce un efecto muy estimulante de su síntesis, especialmente en la segunda mitad del experimento (Figura R-31).

3.2.2.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital.

Los callos crecidos en el medio ANA Gb Pb presentan valores superiores de citocromo P450 mitocondrial a los alcanzados por los callos crecidos en los medios ANA Gb y ANA Pb, lo cual demuestra que ambas sustancias Gb y Pb, suman sus efectos positivos sobre la síntesis de citocromo P450 mitocondrial, cuando se adicionan simultaneamente al medio de cultivo, aunque parece dominar e efecto de la Gb sobre el del Pb como se ha mencionado anteriormente.

Es de destacar el hecho de que el citocromo P450 mitocondrial se encuentra siempre en valores considerablemente superiores en los callos crecidos en cualquiera de los cuatro medios suplementados con ANA que en aquellos suplementados con AIA, lo cual indica que no puede considerarse aisladamente el efecto de la Gb o del Pb, sino que debe tenerse en cuenta su interacción con el tipo de auxina existente en el medio de cultivo.

3.2.3. ANALISIS DE LA VARIANZA DEL CONTENIDO EN CITOCROMO P450 MITOCONDRIAL:

Estudio de la significación del factor tiempo :

Ho: no hay diferencias entre semanas/contra H1:hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	5	507,29	101,46	
Residuo	131	367,92	2,8086	36,1
Total	136	875,21		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,2362. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio de la significación del factor medio :

Ho: ni hay diferencias entre medios/contra H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	7	470,03	67,148	
Residuo	131	367,92	2,8086	23,9
Total	138	837,96		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0802. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Considerando que no hay interacción entre los dos factores estudiados (tiempo y medios) y según los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza, con un nivel de significación de 0,05, sobre los datos resumidos en la Tabla R-9, podemos decir que ambos factores tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos, es decir, hay diferencias entre las semanas de crecimiento y hay diferencias entre los medios considerados, en cuanto al contenido en citocromo P450 mitocondrial de los callos estudiados.

Una vez conocido que cada uno de los dos factores son diferentes estadísticamente respecto a esta medida, necesitamos saber, para cada uno de ellos, cuales entre ellos difieren estadísticamente de los demás y si algunos se comportan de igual modo sobre el parámetro considerado. Para ello realizamos un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, es decir, comparamos cada factor de dos en dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global continúe siendo 0,05.

El nivel de significación individual para cada ensayo en las comparaciones entre semanas es de 0,003; y en las comparaciones entre los medios es 0,001.

3.2.4. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI)

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	40,359	40,359	
Residuo	131	367,92	2,8086	14,4
Total	132	408,28		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	139,36	139,36	
Residuo	131	367,92	2,8086	49,6
Total	132	507,29		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	255,88	255,88	
Residuo	131	367,92	2,8086	91,1
Total	132	623,80		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	322,69	322,69	
Residuo	131	367,92	2,8086	115
Total	132	690,61		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

1ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	296,88	296,88	
Residuo	131	367,92	2,8086	106
Total	132	664,80		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	29,729	29,729	
Residuo	131	367,92	367,92	10,6
Total	132	397,65		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	92,994	92,994	
Residuo	131	367,92	2,8086	33,1
Total	132	460,92		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	26,137	26,137	
Residuo	131	367,92	2,8086	9,31
Total	132	394,06		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	118,32	118,32	
Residuo	131	367,92	2,8086	42,1
Total	132	486,24		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	17,564	17,564	
Residuo	131	367,92	2,8086	6,25
Total	132	385,49		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	37,925	37,925	
Residuo	131	367,92	2,8086	13,5
Total	132	405,85		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	29,429	29,429	
Residuo	131	367,92	2,8086	10,5
Total	132	397,35		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

4ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencia

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,8708	3,8708	
Residuo	131	367,92	2,8086	1,38
Total	132	371,79		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

4ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,5227	1,5227	
Residuo	131	367,92	2,8086	0,542
Total	132	369,44		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

5ª semana/6ª semana:

Ho: hay diferencias entre la 5ª y la 6ª semana/ H1: no hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,53797	0,53797	
Residuo	131	367,92	2,8086	0,192
Total	132	368,46		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La aplicación del método de Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento en relación al contenido en citocromo P450 mitocondrial indica:

- Las semanas 4ª, 5ª y 6ª son iguales en cuanto a la acción y cantidad de este citocromo.

Esto significa que el citocromo P450 actúa principalmente durante las tres primeras semanas de crecimiento; y podemos observar que el contenido en cardenólicos totales (Baljet) refleja también una igualdad en las semanas 4ª y 5ª del experimento (ver sección III.5.1.4).

3.2.5.COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIOS (BONFERRONI)

Medio AIA/Medio AIA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	10,480	10,480	
Residuo	131	367,92	2,8086	3,73
Total	132	378,40		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto d la muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	191,27	191,27	
Residuo	131	367,92	2,8086	68,1
Total	132	559,19		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	50,361	50,361	
Residuo	131	367,92	2,8086	17,9
Total	132	418,28		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	37,023	37,023	
Residuo	131	367,92	2,8086	13,2
Total	132	404,95		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	147,06	147,06	
Residuo	131	367,92	2,8086	52,4
<hr/>				
Total	132	514,98		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	141,96	141,96	
Residuo	131	367,92	2,8086	50,5
<hr/>				
Total	132	509,88		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	295,59	295,59	
Residuo	131	367,92	2,8086	105
<hr/>				
Total	132	663,51		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	112,20	112,20	
Residuo	131	367,92	2,8086	39,9
<hr/>				
Total	132	480,12		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	14,893	14,893	
Residuo	131	367,92	2,8086	5,30
<hr/>				
Total	132	382,82		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	8,1074	8,1074	
Residuo	131	367,92	2,8086	2,89
<hr/>				
Total	132	376,03		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	79,025	79,025	
Residuo	131	367,92	2,8086	28,1
<hr/>				
Total	132	446,95		

La región crítica, con un nivel de significación d 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	75,295	75,295	
Residuo	131	367,92	2,8086	26,8
<hr/>				
Total	132	443,22		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	17,531	17,531	
Residuo	131	367,92	2,8086	6,24
<hr/>				
Total	132	385,45		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	45,338	45,338	
Residuo	131	367,92	2,8086	16,1
<hr/>				
Total	132	413,26		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	59,988	59,988	
Residuo	131	367,92	2,8086	21,4
<hr/>				
Total	132	427,91		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb /Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,9000	2,9000	
Residuo	131	367,92	2,8086	1,03
<hr/>				
Total	132	370,82		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA PB/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1 hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,6683	3,6683	
Residuo	131	367,92	2,8086	1,31
Total	132	371,59		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	11,309	11,309	
Residuo	131	367,92	2,8086	4,03
Total	132	379,23		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,0238	1,0238	
Residuo	131	367,92	2,8086	0,365
Total	132	368,95		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	25,305	25,305	
Residuo	131	367,92	2,8086	9,01
<hr/>				
Total	132	393,23		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	23,214	23,214	
Residuo	131	367,92	2,8086	8,27
<hr/>				
Total	132	391,14		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	101,93	101,93	
Residuo	131	367,92	2,8086	36,3
<hr/>				
Total	132	469,85		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA/ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	36,509	36,509	
Residuo	131	367,92	2,8086	13
Total	132	404,43		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	33,988	33,988	
Residuo	131	367,92	2,8086	12,1
Total	132	401,91		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	123,39	123,39	
Residuo	131	367,92	2,8086	43,9
Total	132	491,31		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,45085	0,45085	
Residuo	131	367,92	2,8086	0,161
Total	132	367,97		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	25,662	25,662	
Residuo	131	367,92	2,8086	9,14
Total	132	393,58		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	27,858	27,858	
Residuo	131	367,92	2,8086	9,92
Total	132	395,78		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al aplicar el método de Bonferroni para contrastar los medios obtenemos estas dos igualdades estadísticas:

$$\begin{aligned} \text{AIA Gb} &= \text{AIA Gb Pb} = \text{ANA} \\ \text{AIA Pb} &= \text{ANA Gb} = \text{ANA Pb} \end{aligned}$$

3.2.6. DISCUSION

Según los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza sobre los datos de cantidades de citocromo P450 mitocondrial que resumimos en la Tabla R-9, podemos concluir que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Analizando las semanas de crecimiento por el método de Bonferroni observamos que a partir de la 4ª semana el comportamiento de este citocromo no varía, y además ocurre esto mismo al contrastar las semanas en relación al contenido en cardenólidos totales (sección III.5.1.4.). Esto indica la estrecha relación que existe entre este citocromo y la síntesis de cardenólidos respecto al tiempo de cultivo.

Contrastando los diferentes medios estudiados (Bonferroni) vemos que aparece la misma igualdad que se da en los cardenólidos totales al realizar también este análisis estadístico, con excepción del medio AIA; lo cual vuelve a indicar que estos dos parámetros tienen un comportamiento muy similar no solo en cuanto al tiempo de cultivo sino también en cuanto a los medios ensayados.

Sin embargo no podemos deducir que esta estrecha relación signifique que el citocromo P450 mitocondrial influye en gran medida en la síntesis de cardenólidos. De hecho hemos comprobado, por el análisis del coeficiente de correlación de cada parámetro respecto al contenido en cardenólidos totales (Baljet), que este citocromo tiene una influencia positiva pero no muy grande sobre dicha síntesis (ver sección 6. de Resultados y Discusión).

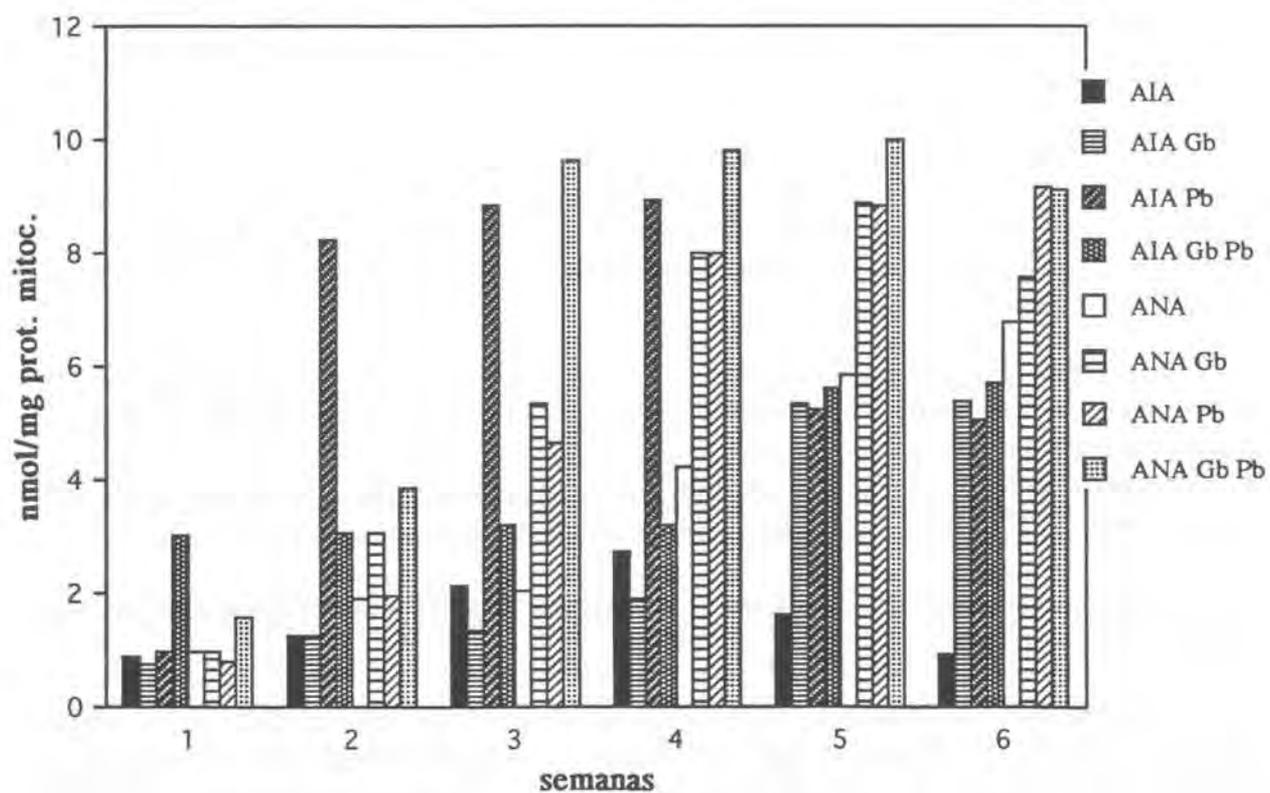
Uniéndolos estos resultados estadísticos con los que se observan en la Tabla R-9 podemos decir:

El contenido en citocromo P450 mitocondrial se ve más incrementado con la auxina sintética ANA que con la natural AIA y en general tanto la Giberelina como el Fenobarbital incrementan los niveles de este citocromo de modo más o menos significativo, no obstante su relación con la síntesis de cardenólidos, aunque es positiva, no es directa y así se observa en el análisis de regresión efectuado sobre este parámetro (ver Tabla R-19).

RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-31

Citocromo P450 mitocondrial expresado en nmoles/mg de proteína mitocondrial.



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-9: Citocromo P450 mitocondrial (nmol/mg protefna mitocondrial)¹

Medios

Semanas	AIA	AIA Gb	AIA Pb	AIA Gb Pb
1 ^a	0,8785±0,0530	0,7468±0,0330	0,9543±0,0480	3,0287±0,0730
2 ^a	1,2771±0,0280	1,2786±0,0610	8,2317±0,0880	3,0580±0,0850
3 ^a	2,1456±0,0440	1,3547±0,0740	8,8411±0,0600	3,1954±0,0540
4 ^a	2,7639±0,0750	1,9263±0,0550	8,9353±0,0710	3,2087±0,0500
5 ^a	1,6099±0,0370	5,3530±0,0880	5,2452±0,0120	5,6070±0,1000
6 ^a	0,9384±0,0440	5,3987±0,0860	5,0653±0,0740	5,7087±0,0850

	ANA	ANA Gb	ANA Pb	ANA Gb Pb
1 ^a	0,9738±0,0070	0,9811±0,0600	0,7913±0,0630	1,5987±0,0850
2 ^a	1,8972±0,0810	3,0513±0,0620	1,9642±0,0910	3,8687±0,0190
3 ^a	2,0379±0,1029	5,3653±0,0940	4,6691±0,0890	9,6072±0,1110
4 ^a	4,2109±0,1070	8,0168±0,1520	8,0061±0,1507	9,8268±0,1756
5 ^a	5,8572±0,1100	8,8868±0,1520	8,8572±0,1110	9,9921±0,1370
6 ^a	6,8056±0,1110	7,5658±0,0930	9,1568±0,1750	9,1052±0,1660

¹ Cada valor es la media de 6 determinaciones ± S.D.

3.3. PROTEINAS DE LA FRACCION MICROSOMAL

3.3.1. MEDIO AIA:

Los niveles de proteínas, expresados en mg/g PF, de la fracción microsomal de los callos crecidos en medio de cultivo suplementado con AIA experimentan un incremento hasta la 2ª semana de crecimiento, descendiendo después lentamente hasta la 5ª semana y de forma más drástica hasta el final del mismo. Esta misma conducta presentan las proteínas microsomales de los callos crecidos en medio AIA Pb (Figura R-32), aunque sus valores son significativamente superiores a los alcanzados por los callos crecidos sobre medio AIA.

La adición de Gb al medio de cultivo suplementado con AIA varía el comportamiento de estas proteínas, puesto que provoca un lento descenso de los niveles de las mismas hasta la 4ª semana de crecimiento, para disminuir drásticamente hasta el final del experimento. La adición de Gb y Pb al medio de cultivo suplementado con AIA ocasiona un descenso regular de los niveles de proteínas microsomales a lo largo de todo el experimento.

3.3.2. MEDIO ANA:

Los niveles de proteínas de la fracción microsomal de los callos crecidos en medio suplementado con ANA aumentan hasta la 3ª semana de crecimiento para disminuir hasta el final del mismo. La adición de Gb al medio de cultivo no varía la pauta seguida por las proteínas microsomales de los callos crecidos sobre medio ANA, aunque ejerce un ligero estímulo de sus niveles durante la segunda mitad del experimento.

La adición de Pb al medio de cultivo varía claramente el comportamiento de las proteínas microsomales de los callos crecidos en él, ya que sus niveles se mantienen hasta la 5ª semana de crecimiento disminuyendo drásticamente hasta el final del experimento. Se observa un ligero estímulo en la síntesis de proteínas microsomales especialmente en la segunda mitad del experimento, aunque este estímulo es muy inferior al ejercido por la misma concentración de Pb cuando se añade a un medio de cultivo suplementado con la auxina natural AIA.

La adición simultánea de Gb y Pb provoca una pauta de comportamiento de las proteínas microsomales muy similar a la observada en los callos crecidos únicamente sobre Pb, aunque sus niveles son muy inferiores.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.3.3. ANALISIS DE LA VARIANZA DE LAS PROTEINAS DE LA FRACCION MICROSOMAL:

Estudio de la significación del factor tiempo :

Ho: no hay diferencias entre semanas/contr H1:hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				

Hipótesis	5	3,0561	0,61123	
Residuo	129	1,8932	0,14676	41,6

Total	134	4,9494		
-------	-----	--------	--	--

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de lasmuestras cuya F es mayor que 2,2845. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Estudio de la significación del factor medio:

Ho: no hay diferencias entre medios/contr H1:hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				

Hipótesis	7	6,4001	0,91431	
Residuo	129	1,9832	0,14676	62,3

Total	136	8,2934		
-------	-----	--------	--	--

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0813. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Considerando que no hay interacción entre los dos factores estudiados (tiempo y medios) y según los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza, con un nivel de significación de 0,05, sobre los datos de "Proteínas de la fracción microsomal" que se resumen en la Tabla R-10, podemos afirmar que hay diferencias entre las semanas de crecimiento y hay diferencias entre los medios considerados, en relación a este parámetro.

Una vez sabido que las semanas y los medios son diferentes estadísticamente respecto al contenido en proteínas microsomales, debemos saber, para las semanas y para los medios, cuales entre ellos difieren estadísticamente de los demás y si algunos producen los mismos efectos sobre la medida considerada.

Para ello realizamos comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, así

RESULTADOS Y DISCUSION

comparamos los factores dos a dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global continúe siendo 0,05.

Se obtuvo que en las comparaciones entre semanas el nivel de significación individual para cada ensayo era de 0,003; y en las comparaciones entre los medios era de 0,002.

3.3.4. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI):

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,18376	0,18376	
Residuo	129	1,8932	0,14676	1,25
<hr/>				
Total	130	1,9116		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª semana y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,10265	0,10265	
Residuo	129	1,8932	0,14676	0,699
<hr/>				
Total	130	1,8943		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª semana y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,12512	0,12512	
Residuo	129	1,8932	0,14676	8,53
<hr/>				
Total	130	2,0184		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

1ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª semana y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,32104	0,32104	
Residuo	129	1,8932	0,14676	21,9
Total	130	2,2143		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,7655	1,7655	
Residuo	129	1,8932	0,14676	120
Total	130	3,6587		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,10998	0,10998	
Residuo	129	1,8932	0,14676	0,749
Total	130	1,9042		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,24073	0,24073	
Residuo	129	1,8932	0,14676	16,4
Total	130	2,1340		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,49494	0,49494	
Residuo	129	1,8932	0,14676	33,7
Total	130	2,3882		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/ h1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,1481	2,1481	
Residuo	129	1,8932	0,14676	146
Total	130	4,0413		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,15224	0,15224	
Residuo	129	1,8932	0,14676	10,4
Total	130	2,0455		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª semana y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,36661	0,36661	
Residuo	129	1,8932	0,14676	25
Total	130	2,2598		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	1,8942	1,8942	
Residuo	129	1,8932	0,14676	129
Total	130	3,7874		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

4ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,46358	0,46358	
Residuo	129	1,8932	0,14676	3,16
<hr/>				
Total	130	1,9396		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

4ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,97245	0,97245	
Residuo	129	1,8932	0,14676	66,3
<hr/>				
Total	130	2,8657		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

5ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 5ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,59416	0,59416	
Residuo	129	1,8932	0,14676	40,5
<hr/>				
Total	130	2,4874		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1515. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

La aplicación del método Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento indica:

-- Se dan las siguientes igualdades

$$1^{\text{a}} \text{ sem.} = 2^{\text{a}} \text{ sem.} = 3^{\text{a}} \text{ sem.} \quad 4^{\text{a}} \text{ sem.} = 5^{\text{a}} \text{ sem.}$$

-- Así pues, estadísticamente se demuestra que sobre el contenido en proteínas microsomales no hay diferencias hasta la 4ª semana de crecimiento.

3.3.5. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIOS (BONFERRONI):

Medio AIA/Medio AIA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,87005	0,87005	
Residuo	129	1,8932	0,14676	5,93
Total	130	1,9802		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor qu 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,6181	3,6181	
Residuo	129	1,8932	0,14676	247
Total	130	5,5113		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencia entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,16398	0,16398	
Residuo	129	1,8932	0,14676	11,2
Total	130	2,0572		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,49432	0,49432	
Residuo	129	1,8932	0,14676	0,337
Total	130	1,8937		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,17358	0,17358	
Residuo	129	1,8932	0,14676	1,18
Total	130	1,9106		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,58798	0,58798	
Residuo	129	1,8932	0,14676	4,01
Total	130	1,9520		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,89910	0,89910	
Residuo	129	1,8932	0,14676	6,13
Total	130	1,9831		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,6122	2,6122	
Residuo	129	1,8932	0,14676	178
Total	130	4,5055		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,12096	0,12096	
Residuo	129	1,8932	0,14676	0,824
Total	130	1,9053		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,10062	0,10062	
Residuo	129	1,8932	0,14676	6,86
Total	130	1,9939		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,18209	0,18209	
Residuo	129	1,8932	0,14676	12,4
Total	130	2,0753		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,27545	0,27545	
Residuo	129	1,8932	0,14676	0,188
<hr/>				
Total	130	1,8960		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,56459	0,56459	
Residuo	129	1,8932	0,14676	38,5
<hr/>				
Total	130	2,4578		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,2790	2,2790	
Residuo	129	1,8932	0,14676	155
<hr/>				
Total	130	4,1722		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,7005	3,7005	
Residuo	129	1,8932	0,14676	252
<hr/>				
Total	130	5,5938		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	4,1202	4,1202	
Residuo	129	1,8932	0,14676	281
<hr/>				
Total	130	6,0134		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,7792	2,7792	
Residuo	129	1,8932	0,14676	189
<hr/>				
Total	130	4,6725		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	4,8081	4,8081	
Residuo	129	1,8932	0,14676	328
Total	130	6,7014		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,18249	0,18249	
Residuo	129	1,8932	0,14676	12,4
Total	130	2,0757		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,28805	0,28805	
Residuo	129	1,8932	0,14676	19,6
Total	130	2,1813		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,26395	0,26395	
Residuo	129	1,8932	0,14676	1,8
Total	130	1,9196		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,49674	0,49674	
Residuo	129	1,8932	0,14676	33,8
Total	130	2,3900		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,11994	0,11994	
Residuo	129	1,8932	0,14676	0,817
Total	130	1,9052		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,70075	0,70075	
Residuo	129	1,8932	0,14676	4,77
Total	130	1,9633		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,77071	0,77071	
Residuo	129	1,8932	0,14676	5,25
Total	130	1,9703		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,14005	0,14005	
Residuo	129	1,8932	0,14676	9,54
Total	130	2,0333		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,28258	0,28258	
Residuo	129	1,8932	0,14676	1,93
<hr/>				
Total	130	1,9215		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Pb /Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,29413	0,29413	
Residuo	129	1,8932	0,14676	20
<hr/>				
Total	130	2,1874		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9516. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

La aplicación del método Bonferroni para contrastar los medios sobre los datos de proteínas microsomales indica:

-- Existe esta igualdad estadística

$$AIA = AIA \text{ Gb} = ANA = ANA \text{ Pb}$$

Si comparamos estos resultados con los obtenidos al contrastar los medios para las proteínas mitocondriales observamos que para ambos tipos de proteínas se cumple esta igualdad

$$AIA = ANA = ANA \text{ Pb}$$

es decir, estos tres medios se comportan del mismo modo sobre ambos tipos de proteínas; en cuanto a la Gb, si se adiciona al medio AIA su comportamiento se iguala al de los tres anteriores respecto a las proteínas microsomales, y adicionada al medio ANA se iguala a estos tres medios respecto a las proteínas mitocondriales.

En cuanto a los cardenólidos totales (ver sección III.5.1.5.) la igualdad se mantiene sólo para los medios básicos (AIA y ANA).

3.3.6. DISCUSION

Los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza sobre los datos de proteínas microsomales recogidos en la Tabla R-10 indican que el factor tiempo y el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Analizando después las semanas de crecimiento por el método de Bonferroni se observan dos comportamientos, uno en la primera mitad del experimento (semanas 1^a, 2^a y 3^a) y otro al final del mismo (semanas 4^a y 5^a), cosa que no ocurre con las proteínas mitocondriales (Figura R-32).

Contrastando los diferentes medios estudiados, también por el método de Bonferroni, vemos que son iguales respecto a las proteínas mitocondriales los medios básicos (AIA y ANA) y el medio ANA Pb. Lo cual indica que la adición de Pb al medio ANA no varía el contenido en proteínas microsomales o mitocondriales; lo mismo ocurre al añadir Gb al AIA para las proteínas microsomales y al añadir Gb al ANA para las mitocondriales, además en este último caso vuelve a verse claramente que en la adición conjunta de Gb y Pb sobre ANA tiene mayor efecto la Gb.

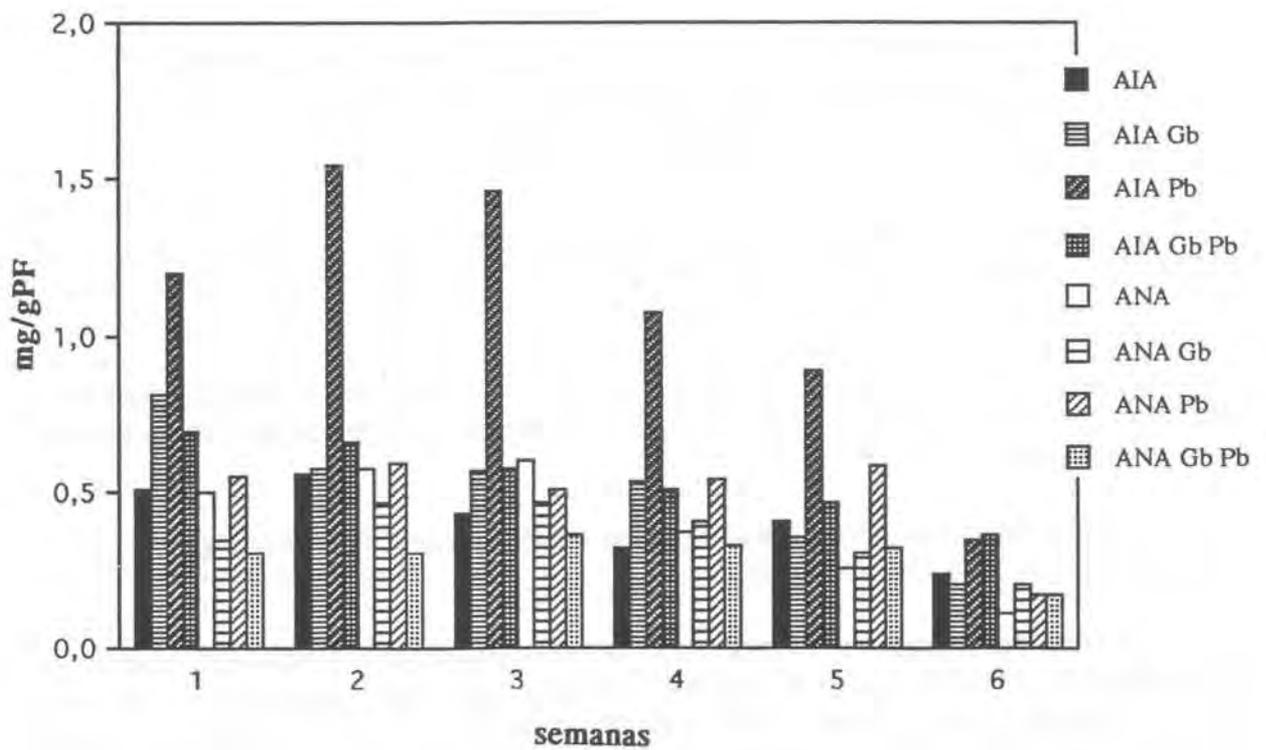
Uniendo estos resultados estadísticos con los de la Tabla R-10 podemos concluir lo siguiente para las proteínas microsomales:

El Pb ejerce una acción estimulante sobre la síntesis de dichas proteínas durante todo el experimento, mientras que la Gb tan solo estimula ligeramente dicha síntesis durante la primera mitad del mismo. Es destacable el hecho de que al adicionar simultáneamente Gb y Pb al medio de cultivo AIA, la presencia de Gb interfiere sobre el efecto estimulante del Pb, lo que lleva a pensar que ambas sustancias activan la síntesis de proteínas de la fracción microsomal, pero por mecanismos distintos que se interfieren. Además, cuando actúan en un medio suplementado con la auxina sintética ANA la Gb anula el efecto estimulante del Pb por ejercer una influencia mayor como hemos comentado anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-32

Proteínas microsomales expresadas en mg/g de Peso fresco.



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-10: Proteínas microsomales (mg/gPF)¹

Medios

Semanas	AIA	AIA Gb	AIA Pb	AIA Gb Pb
1 ^a	0,5080±0,0250	0,8080±0,0200	1,2000±0,1179	0,6920±0,0450
2 ^a	0,5540±0,0150	0,5750±0,0360	1,5474±0,0760	0,6590±0,0350
3 ^a	0,4290±0,0120	0,5690±0,0590	1,4570±0,0170	0,5780±0,0180
4 ^a	0,3203±0,0087	0,5350±0,0440	1,0682±0,0147	0,5040±0,0160
5 ^a	0,4060±0,0150	0,3510±0,0190	0,8830±0,0175	0,4660±0,0080
6 ^a	0,2340±0,0020	0,2010±0,0070	0,3483±0,0025	0,3600±0,0120

	ANA	ANA Gb	ANA Pb	ANA Gb Pb
1 ^a	0,4980±0,0490	0,3470±0,0190	0,5480±0,0350	0,3040±0,0480
2 ^a	0,5730±0,0160	0,4600±0,0230	0,5940±0,0400	0,3070±0,0070
3 ^a	0,6030±0,0520	0,4680±0,0080	0,5080±0,0270	0,3590±0,0060
4 ^a	0,3710±0,0190	0,4053±0,0060	0,5360±0,0220	0,3280±0,0090
5 ^a	0,2520±0,0120	0,3080±0,0050	0,5820±0,0090	0,3200±0,0040
6 ^a	0,1080±0,0090	0,1990±0,0170	0,1660±0,0060	0,1680±0,0070

¹ Cada valor es la media de 6 determinaciones ± S.D.

3.4. CITOCROMO P450 MICROSOMAL

3.4.1. MEDIO AIA

Los niveles de citocromo P450 microsomal de los callos crecidos en el medio AIA aumentan hasta la 3ª semana de cultivo, manteniéndose estables hasta el final del experimento (Figura R-33).

3.4.1.1. Adición de Giberelina.

Al adicionar Gb al medio de cultivo se observa un marcado incremento en dichos niveles hasta la 5ª semana de crecimiento, llegándose a obtener en este tiempo valores que duplican a los encontrados en los callos crecidos en el medio AIA; sin embargo a partir de este momento, los niveles de citocromo P450 de los callos crecidos en AIA Gb descienden hasta valores muy similares a los de los callos crecidos unicamente en AIA.

3.4.1.2. Adición de Fenobarbital.

La adición de Pb al medio de cultivo parece inhibir la formación de citocromo P450 microsomal de las piezas de callo, especialmente al principio del experimento, observándose siempre valores inferiores a los de los callos crecidos en medio AIA.

3.4.1.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital.

Los callos crecidos en el medio AIA Gb Pb presentan valores de citocromo P450 superiores a los observados para los callos crecidos en los medios AIA y AIA Pb, lo cual indica que para este complejo enzimático la Gb predomina en su efecto sobre el Pb.

3.4.2. MEDIO ANA

Los niveles de citocromo P450 microsomal de los callos crecidos en el medio ANA aumentan claramente hasta la 3ª semana de crecimiento, para descender hasta el final del experimento, sin embargo estos niveles se muestran siempre superiores a los alcanzados por las piezas de callo crecidas en cualquiera de los medios suplementados con la auxina natural AIA (Figura R-33).

3.4.2.1. Adición de Giberelina.

La Giberelina adicionada al medio ANA provoca un incremento en la síntesis de citocromo P450 microsomal a lo largo de todo el experimento (Tabla R-11).

RESULTADOS Y DISCUSION

3.4.2.2. Adición de Fenobarbital.

Este mismo efecto estimulante se observa en los callos crecidos en el medio ANA Pb, aunque el efecto es ligeramente superior durante la primera mitad del experimento en los callos crecidos en el medio ANA Gb, mientras que en las últimas muestras es superior en los callos crecidos en el medio ANA Pb. Estos hechos demuestran claramente que ambas sustancias (Gb y Pb) actúan estimulando la formación de citocromo P450 microsomal, pero por distintos caminos metabólicos.

3.4.2.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital.

Los callos crecidos en el medio de cultivo ANA Gb Pb presentan valores de citocromo P450 microsomal que siguen el mismo comportamiento que los de los callos crecidos en medio ANA Gb sin embargo son ligeramente inferiores a lo largo de todo el experimento, lo cual indica que de algún modo ambos compuestos, Gb y Pb, interfieren en sus acciones positivas sobre la síntesis de citocromo P450 microsomal.

3.4.3. ANALISIS DE LA VARIANZA DEL CONTENIDO EN CITOCROMO P450 MICROSOMAL

Estudio de la significación del factor tiempo:

Ho: no hay diferencias entre semanas/contr H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	5	210,73	42,146	
Residuo	131	110,41	0,8428	50
<hr/>				
Total	132	321,14		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,2834. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Estudio de la significación del factor medio:

Ho: no hay diferencias entre medios/contr H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	7	387,70	55,385	
Residuo	131	110,41	0,8428	65,7
<hr/>				
Total	132	498,10		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0802. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Considerando que no hay interacción entre los dos factores estudiados (tiempo y medios) y de acuerdo con los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza, con un nivel de significación de 0,05, sobre los datos de citocromo P450 microsomal (Tabla R-11), podemos afirmar que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Una vez sabido que las semanas y los medios son diferentes estadísticamente respecto al contenido en citocromo P450 microsomal, es preciso conocer, para las semanas y para los medios, cuales entre ellos difieren de los demás y si algunos se comportan igual sobre esta medida que consideramos. Para ello realizamos un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, es decir, comparamos los factores dos a dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global continúe siendo 0,05.

Se obtuvo que en las comparaciones entre semanas el nivel de significación individual para cada ensayo era de 0,003, y en las comparaciones entre los medios el nivel de significación individual aplicado era de 0,001.

3.4.4. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI)

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	34,261	34,261	
Residuo	131	110,41	0,8428	40,7
<hr/>				
Total	132	144,67		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	121,70	121,70	
Residuo	131	110,41	0,8428	144
<hr/>				
Total	132	232,11		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	116,56	116,56	
Residuo	131	110,41	0,8428	138
Total	132	226,96		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	132,90	132,90	
Residuo	131	110,41	0,8428	158
Total	132	243,31		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	23,597	23,597	
Residuo	131	110,41	0,8428	28
Total	132	134,00		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	26,817	26,817	
Residuo	131	110,41	0,8428	31,8
<hr/>				
Total	132	137,22		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	24,432	24,432	
Residuo	131	110,41	0,8428	29
<hr/>				
Total	132	134,84		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	32,207	32,207	
Residuo	131	110,41	0,8428	38,2
<hr/>				
Total	132	142,61		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suam de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,99113	0,99113	
Residuo	131	110,41	0,8428	1,18
Total	132	111,40		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

3ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,55542	0,55542	
Residuo	131	110,41	0,8428	0,659
Total	132	110,46		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

3ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,24656	0,24656	
Residuo	131	110,41	0,8428	0,293
Total	132	110,65		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	38,119	38,119	
Residuo	131	110,41	0,8428	45,2
<hr/>				
Total	132	148,53		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

4ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,53615	0,53615	
Residuo	131	110,41	0,8428	0,636
<hr/>				
Total	132	110,94		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

4ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 6ª semana7 H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	35,265	35,265	
Residuo	131	110,41	0,8428	41,8
<hr/>				
Total	132	145,67		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

5ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 5ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	44,497	44,497	
Residuo	131	110,41	0,8428	52,8
Total	132	154,90		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

La aplicación del método Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento indica:

- Las semanas 2ª y 6ª son iguales.
- También son iguales las semanas 3ª, 4ª y 5ª.

3.3.5. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIOS (BONFERRONI)

Medio AIA/Medio AIA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	25,758	25,758	
Residuo	131	110,41	0,8428	30,6
Total	132	136,17		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	6,4622	6,4622	
Residuo	131	110,41	0,8428	7,67
Total	132	116,87		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	33,110	33,110	
Residuo	131	110,41	0,8428	39,3
Total	132	143,52		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	31,801	31,801	
Residuo	131	110,41	0,8428	37,7
Total	132	142,21		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	95,863	95,863	
Residuo	131	110,41	0,8428	114
Total	132	206,27		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Pb/H1:hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	186,88	186,88	
Residuo	131	110,41	0,8428	222
Total	132	297,29		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb Pb/H1:hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	86,369	86,369	
Residuo	131	110,41	0,8428	102
Total	132	196,78		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1:hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	58,023	58,023	
Residuo	131	110,41	0,8428	68,8
Total	132	168,43		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,46095	0,46095	
Residuo	131	110,41	0,8428	0,547
Total	132	110,87		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,31815	0,31815	
Residuo	131	110,41	0,8428	0,377
Total	132	110,73		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto d las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	22,238	22,238	
Residuo	131	110,41	0,8428	26,4
Total	132	132,65		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	73,876	73,876	
Residuo	131	110,41	0,8428	87,7
<hr/>				
Total	132	184,28		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,8187	1,8187	
Residuo	131	110,41	0,8428	2,16
<hr/>				
Total	132	112,23		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	68,827	68,827	
Residuo	131	110,41	0,8428	81,7
<hr/>				
Total	132	179,23		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	66,934	66,934	
Residuo	131	110,41	0,8428	79,4
Total	132	177,34		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	152,10	152,10	
Residuo	131	110,41	0,8428	180
Total	132	262,51		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	262,84	262,84	
Residuo	131	110,41	0,8428	312
Total	132	373,25		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	140,08	140,08	
Residuo	131	110,41	0,8428	166
<hr/>				
Total	132	250,49		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,13198	0,13198	
Residuo	131	110,41	0,8428	0,157
<hr/>				
Total	132	110,42		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	16,296	16,296	
Residuo	131	110,41	0,8428	19,3
<hr/>				
Total	132	126,70		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	62,666	62,666	
Residuo	131	110,41	0,8428	74,4
<hr/>				
Total	132	173,07		

La región crítica, con un nivel de isgnificación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	12,527	12,527	
Residuo	131	110,41	0,8428	14,9
<hr/>				
Total	132	122,93		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	17,236	17,236	
Residuo	131	110,41	0,8428	20,5
<hr/>				
Total	132	127,64		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	64,498	64,498	
Residuo	131	110,41	0,8428	76,5
Total	132	174,91		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre emdio ANA y medio ANA Gb Pb/H1:hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	13,353	13,353	
Residuo	131	110,41	0,8428	15,8
Total	132	123,76		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1:hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	15,050	15,050	
Residuo	131	110,41	0,8428	17,9
Total	132	125,46		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,24747	0,24747	
Residuo	131	110,41	0,8428	0,294
Total	132	110,65		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	19,157	19,157	
Residuo	131	110,41	0,8428	22,7
Total	132	129,56		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

La aplicación del método Bonferroni para contrastar los medios indica:

-Existen las siguientes tres igualdades

$$\begin{aligned} AIA &= AIA \text{ Pb} \\ AIA \text{ Gb} &= AIA \text{ Gb Pb} = ANA \\ ANA \text{ Gb} &= ANA \text{ Gb Pb} \end{aligned}$$

3.4.6. DISCUSION

Según los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza sobre los datos de contenido en citocromo P450 microsomal que resumimos en la Tabla R-11, podemos decir que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Analizando las semanas de crecimiento por el método de Bonferroni encontramos dos comportamientos distintos, uno al principio y final del cultivo (semanas 2^a y 6^a) y otro en mitad del experimento (semanas 3^a, 4^a y 5^a).

Contrastando los medios estudiados (Bonferroni) se observa un claro predominio de la Gb sobre el Pb, tanto en el medio AIA como en el ANA cuando actúan conjuntamente, y una acción nula del Pb al adicionarlo en un medio AIA.

Uniando los resultados estadísticos con los de la Tabla R-11 podemos concluir:

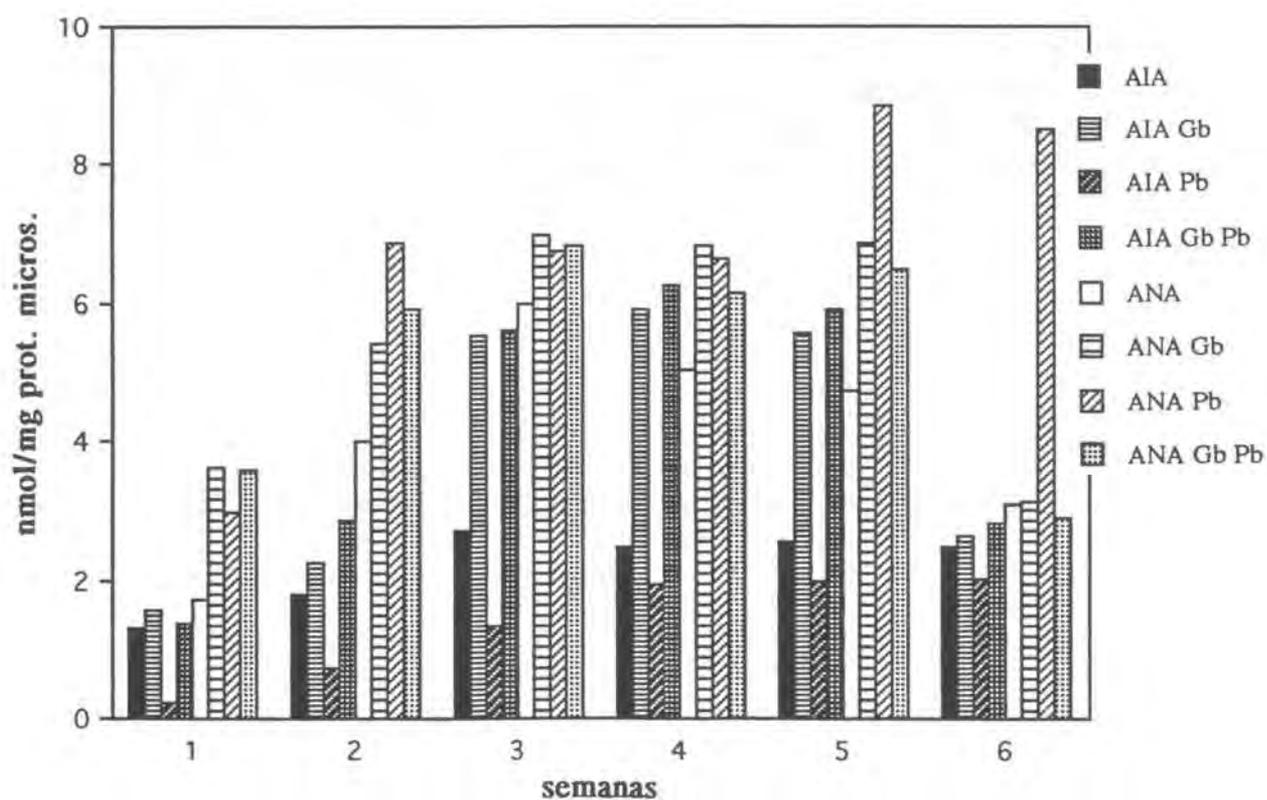
El Pb adicionado al medio de cultivo ANA provoca un estímulo de la síntesis de citocromo P450 microsomal, mientras que si se adiciona al medio AIA su acción es nula. Este hecho demuestra claramente que es la interacción entre el Pb y la auxina natural AIA o la de síntesis ANA lo que produce los efectos descritos.

En cuanto a la Gb, tiene un marcado efecto estimulante sobre este citocromo en ambos medios básicos.

Por el análisis del coeficiente de correlación de este parámetro respecto a la síntesis de cardenólidos hemos encontrado que este citocromo es la única medida de las analizadas que no guarda relación sobre dicha síntesis, es decir, el contenido en citocromo P450 microsomal es independiente de la síntesis de cardenólidos.

FIGURA R-33

Citocromo P450 microsomal expresado en nmoles/mg de proteína microsomal.



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-11: Citocromo P450 microsomal (nmol/mg proteína microsomal)¹

Medios

Semanas	AIA	AIA Gb	AIA Pb	AIA Gb Pb
1 ^a	1,2813 ± 0,0620	1,5813 ± 0,0620	0,2152 ± 0,0120	1,3606 ± 0,0470
2 ^a	1,7953 ± 0,0740	2,2555 ± 0,0970	0,7256 ± 0,044	2,8539 ± 0,0770
3 ^a	2,7187 ± 0,0850	5,5512 ± 0,0270	1,3439 ± 0,0770	5,6187 ± 0,0859
4 ^a	2,4958 ± 0,0930	5,8972 ± 0,1110	1,9486 ± 0,0610	6,2576 ± 0,1130
5 ^a	2,5439 ± 0,0750	5,5655 ± 0,0970	1,9972 ± 0,0810	5,9079 ± 0,1020
6 ^a	2,4872 ± 0,0810	2,6187 ± 0,0850	2,0042 ± 0,0910	2,8287 ± 0,0730

	ANA	ANA Gb	ANA Pb	ANA Gb Pb
1 ^a	1,7242 ± 0,0910	3,6370 ± 0,0260	2,9858 ± 0,0930	3,5721 ± 0,2050
2 ^a	4,0072 ± 0,1110	5,4388 ± 0,0730	6,8666 ± 0,2250	5,9321 ± 0,0900
3 ^a	6,0000 ± 0,2530	6,9968 ± 0,1756	6,7719 ± 0,2240	6,8366 ± 0,0400
4 ^a	5,0354 ± 0,0880	6,8168 ± 0,1750	6,6519 ± 0,0510	6,1568 ± 0,1750
5 ^a	4,7388 ± 0,0690	6,8572 ± 0,1100	8,8666 ± 0,2250	6,5040 ± 0,2260
6 ^a	3,0918 ± 0,0800	3,1243 ± 0,0780	8,5168 ± 0,1750	2,9043 ± 0,0780

¹ Cada valor es la media de 6 determinaciones ± S.D.

4. ACTIVIDADES ENZIMATICAS

4.1. ACTIVIDAD NADPH-CITOCROMO P450 REDUCTASA

4.1.1. MEDIO AIA:

La actividad del complejo NADPH citocromo P450 reductasa microsomal de los callos crecidos en medio AIA aumenta durante las dos primeras semanas para disminuir paulatinamente hasta el final del experimento (Figura R-34).

4.1.1.1. Adición de Giberelina.

La adición de Giberelina al medio de cultivo no varía la pauta seguida por la actividad de dicho complejo enzimático a lo largo del crecimiento de los callos, pero sí la estimula significativamente.

4.1.1.2. Adición de Fenobarbital.

Los callos crecidos en medio AIA Pb presentan una actividad reductasa microsomal que se incrementa hasta la 4ª semana de cultivo para disminuir a continuación.

Esta acción del Pb se traduce en una mayor actividad NADPH citocromo P450 reductasa, a partir de la 3ª semana de crecimiento, en los callos crecidos en el medio AIA Pb que en los crecidos en el medio AIA; en todas las semanas los valores AIA Pb se mantienen inferiores a los correspondientes al medio AIA Gb.

4.1.1.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital.

La adición simultánea de Gb y Pb al medio de cultivo provoca una actividad NADPH citocromo P450 reductasa microsomal que aumenta durante las tres primeras semanas para disminuir hasta el final del experimento; sin embargo, estimula significativamente la actividad de este complejo enzimático, alcanzando los máximos valores de todos los ensayos, lo cual parece indicar que la Gb y el Pb actúan de manera activa estimulando la actividad del complejo NADPH citocromo P450 reductasa microsomal (Figura R-34).

4.1.2. MEDIO ANA

La actividad NADPH citocromo P450 reductasa microsomal de los callos crecidos en el medio ANA aumenta durante las primeras dos semanas de crecimiento para disminuir a continuación (Figura R-34).

4.1.2.1. Adición de Giberelina.

La adición de Giberelina al medio de cultivo produce un incremento en la actividad reductasa, que alcanza valores significativamente superiores a los correspondientes a los de los callos crecidos en medio ANA, practicamente a lo largo de todo el experimento; sin embargo, en este medio la máxima actividad reductasa se logra en la 3ª semana de crecimiento.

4.1.2.2. Adición de Fenobarbital.

La adición de Fenobarbital al medio ANA tiene escasa repercusión sobre la actividad NADPH citocromo P450 reductasa microsomal ya que los callos crecidos en medio ANA Pb presentan su máxima actividad reductasa en la 2ª semana de cultivo y los valores alcanzados son muy parecidos a los obtenidos para los callos crecidos en medio ANA (Figura R-34).

4.1.2.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital.

Los callos crecidos en el medio ANA Gb Pb presentan una actividad NADPH citocromo P450 reductasa que en general es superior a la observada en los callos crecidos en el medio ANA Pb, pero inferior a la alcanzada por los callos crecidos en el medio ANA Gb, y la pauta que sigue dicha actividad es muy similar a la observada en los callos cultivados en el medio ANA Gb, de lo expuesto podríamos deducir que el Pb interfiere claramente la acción de la Gb cuando el medio de cultivo está suplementado con la auxina sintética ANA.

4.1.3. ANALISIS DE LA VARIANZA DE LA ACTIVIDAD NADPH-CITOCROMO P450 REDUCTASA:

Estudio de la significación del factor tiempo:

Ho: no hay diferencias entre semanas/contra H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	5	0,44131	0,88262	
Residuo	128	0,61093	0,47729	18,5
Total	133	1,0522		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,2850. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Estudio de la significación del factor medio:

Ho: no hay diferencias entre medios/contra H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	7	1,3107	0,18724	
Residuo	128	0,61093	0,47729	39,2
Total	135	1,9216		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0819. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Considerando que no hay interacción entre los dos factores estudiados (tiempo y medios) y según los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza, con un nivel de significación de 0,05, sobre los datos de la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa que se resumen en la Tabla R-12, podemos afirmar que tanto el factor medio como el factor tiempo tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos, en relación a la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa de los callos estudiados.

Ahora nos interesa conocer, para las semanas y para los medios, si hay diferencias estadísticas y si algunos producen los mismos efectos sobre este parámetro. Para ello realizamos comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, así comparamos los factores dos a dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global continúe siendo 0,05.

Para las semanas el nivel de significación individual para cada ensayo resulta ser 0,003; y para los medios 0,002.

4.1.4. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI):

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,61657	0,61657	
Residuo	128	0,61093	0,47729	12,9
Total	129	0,67259		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,77693	0,77693	
Residuo	128	0,61093	0,47729	16,3
Total	129	0,68862		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,18297	0,18297	
Residuo	128	0,61093	0,47729	0,383
Total	129	0,61276		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

1ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,59607	0,59607	
Residuo	128	0,61093	0,47729	1,25
Total	129	0,61689		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

1ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,78593	0,78593	
Residuo	128	0,61093	0,47729	16,5
Total	129	0,68952		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,94696	0,94696	
Residuo	128	0,61093	0,47729	0,198
Total	129	0,61188		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

2ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª semana y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,42042	0,42042	
Residuo	128	0,61093	0,47729	8,81
Total	129	0,65297		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,10839	0,10839	
Residuo	128	0,61093	0,47729	22,7
Total	129	0,71931		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,28283	0,28283	
Residuo	128	0,61093	0,47729	59,3
Total	129	0,89376		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,55445	0,55445	
Residuo	128	0,61093	0,47729	11,6
Total	129	0,66637		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,12959	0,12959	
Residuo	128	0,61093	0,47729	27,2
<hr/>				
Total	129	0,74052		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,31611	0,31611	
Residuo	128	0,61093	0,47729	66,2
<hr/>				
Total	129	0,92704		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

4ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,14511	0,14511	
Residuo	128	0,61093	0,47729	3,04
<hr/>				
Total	129	0,62544		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

4ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,10468	0,10468	
Residuo	128	0,61093	0,47729	21,9
Total	129	0,71561		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

5ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 5ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,42565	0,42565	
Residuo	128	0,61093	0,47729	8,92
Total	129	0,65349		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1543. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Después de aplicar el método Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento se concluye:

-- Obtenemos esta igualdad estadística

$$1^{\text{a}} \text{ sem.} = 4^{\text{a}} \text{ sem.} = 5^{\text{a}} \text{ sem.}$$

-- Por tanto, la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa es la misma en la 1ª, 4ª y 5ª semanas de crecimiento.

4.1.5. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIOS (BONFERRONI)

Medio AIA/Medio AIA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,61579	0,61579	
Residuo	128	0,61093	0,47729	129
Total	129	1,2267		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,42525	0,42525	
Residuo	128	0,61093	0,47729	8,91
Total	129	0,65345		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,56328	0,56328	
Residuo	128	0,61093	0,47729	118
Total	129	1,1742		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,27092	0,27092	
Residuo	128	0,61093	0,47729	0,568
Total	129	0,61364		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,11752	0,11752	
Residuo	128	0,61093	0,47729	24,6
Total	129	0,72845		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,20665	0,20665	
Residuo	128	0,61093	0,47729	0,433
Total	129	0,61299		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,67003	0,67003	
Residuo	128	0,61093	0,47729	14
Total	129	0,67793		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,33824	0,33824	
Residuo	128	0,61093	0,47729	70,9
Total	129	0,94917		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,20620	0,20620	
Residuo	128	0,61093	0,47729	0,432
Total	129	0,61299		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,53795	0,53795	
Residuo	128	0,61093	0,47729	113
Total	129	1,1489		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,19983	0,19983	
Residuo	128	0,61093	0,47729	41,9
Total	129	0,81076		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,51281	0,51281	
Residuo	128	0,61093	0,47729	107
Total	129	1,1237		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/ Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,48286	0,48286	
Residuo	128	0,61093	0,47729	101
Total	129	1,0938		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,29626	0,29626	
Residuo	128	0,61093	0,47729	62,1
<hr/>				
Total	129	0,90719		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,23767	0,23767	
Residuo	128	0,61093	0,47729	4,98
<hr/>				
Total	129	0,63470		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,18660	0,18660	
Residuo	128	0,61093	0,47729	3,91
<hr/>				
Total	129	0,62959		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,23843	0,23843	
Residuo	128	0,61093	0,47729	5
Total	129	0,63477		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,27703	0,27703	
Residuo	128	0,61093	0,47729	0,58
Total	129	0,61370		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,48786	0,48786	
Residuo	128	0,61093	0,47729	102
Total	129	1,0988		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,16622	0,16622	
Residuo	128	0,61093	0,47729	34,8
Total	129	0,77715		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
hipótesis	1	0,46507	0,46507	
Residuo	128	0,61093	0,47729	97,4
Total	129	1,0760		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,24174	0,24174	
Residuo	128	0,61093	0,47729	50,6
Total	129	0,85266		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,84545	0,84545	
Residuo	128	0,61093	0,47729	17,7
Total	129	0,69547		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestra cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,24894	0,24894	
Residuo	128	0,61093	0,47729	0,522
Total	129	0,61095		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb Pb/H1. ahy diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,42766	0,42766	
Residuo	128	0,61093	0,47729	8,96
Total	129	0,65369		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,82258	0,82258	
Residuo	128	0,61093	0,47729	17,2
Total	129	0,69319		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,70504	0,70504	
Residuo	128	0,61093	0,47729	1,48
Total	129	0,61798		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,42199	0,42199	
Residuo	128	0,61093	0,47729	8,84
Total	129	0,65313		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9548. Por lo tanto, de acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

La aplicación del método Bonferroni para contrastar los medios sobre los datos de la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa que se resumen en la Tabla R-12 indica:

-- Existe esta igualdad estadística

$$AIA = AIA \text{ Pb} = ANA = ANA \text{ Pb}$$

-- Podemos pues afirmar que el Pb añadido a los medios básicos (AIA y ANA) no varía el comportamiento de los mismos sobre la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa, y además ambos medios básicos se comportan del mismo modo en relación a esta actividad enzimática.

4.1.6. DISCUSION

Los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza sobre los datos de la actividad NADPH citocromo P450 reductasa microsomal recogidos en la Tabla R-12 indican que tanto el factor medio como el factor tiempo tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Analizando las semanas de crecimiento por el método de Bonferroni observamos el mismo comportamiento para esta actividad en las semanas 1^a, 4^a y 5^a.

Contrastando los medios estudiados, por el método de Bonferroni, se observa que el Pb no varía el comportamiento básico AIA o ANA, pero en cambio sí que influye la Gb que tiene un efecto mayor que el Pb cuando se adicionan conjuntamente, tanto en medio AIA como en medio ANA.

Al unir estos datos estadísticos con los observados en la Tabla R-13 se puede concluir:

La acción del Pb es escasamente significativa respecto a la actividad NADPH citocromo P450 reductasa microsomal sobre el medio ANA, en cambio sobre AIA disminuye la actividad de este enzima respecto al medio básico hasta la segunda muestra, incrementandola a continuación. La acción de la Gb viene condicionada por el tipo de auxina existente en el medio de cultivo pero en ambos casos su efecto es, en mayor o menor grado, estimulante. Esto mismo se observa cuando actúan juntos Gb y Pb, y en este caso la estimulación es todavía mayor, lo que podría deberse a la acción estimulante de la Giberelina por una parte, o a una interacción entre el Fenobarbital y la Giberelina que activaría directamente al enzima.

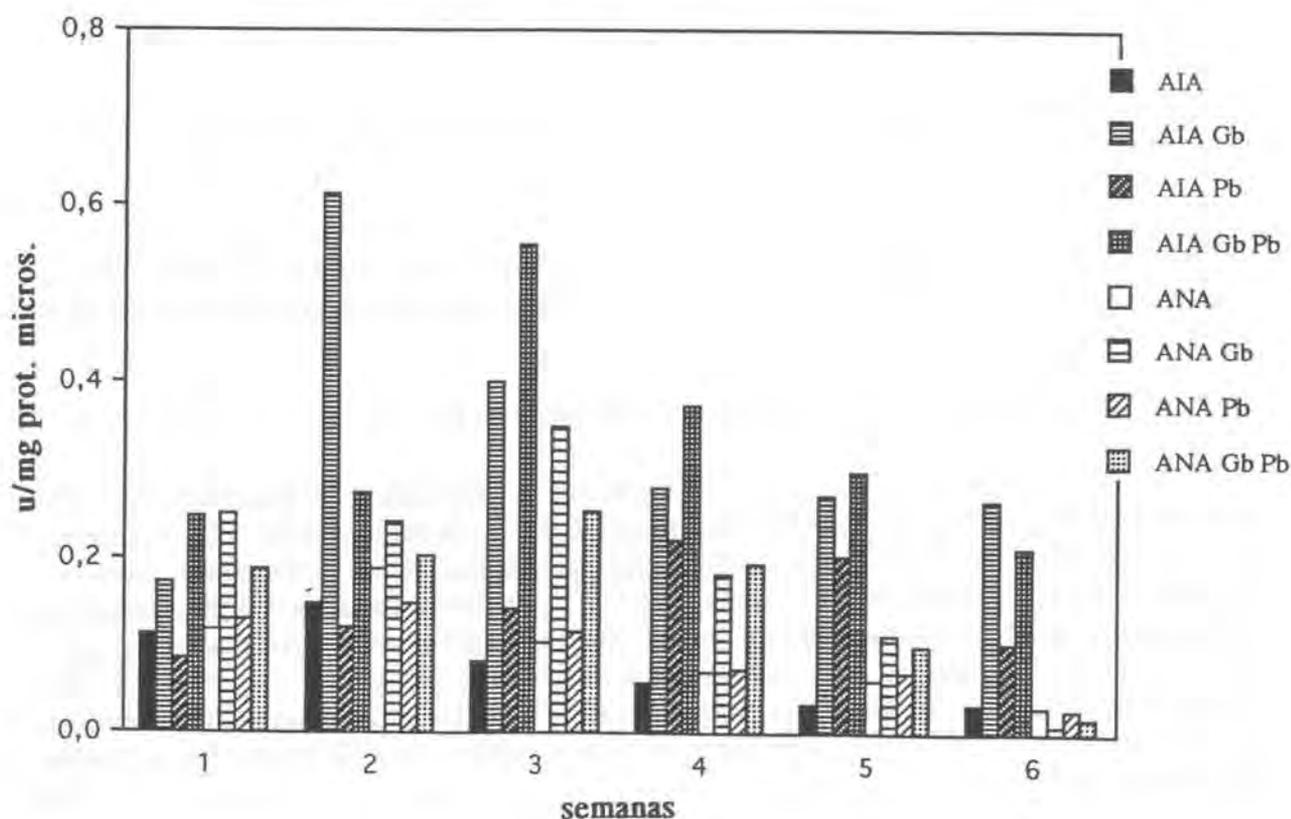
Comparando las Tablas R-12 y R-13 se observa que la actividad NADPH citocromo P450 reductasa no guarda una relación directamente proporcional con la cantidad de citocromo P450 microsomal.

RESULTADOS Y DISCUSION

Hemos de recordar aquí, como se menciona en la Introducción (sección I.4.5.2.H), la opinión de varios autores sobre la existencia de múltiples formas de NADPH citocromo P450 reductasa microsomal en las plantas (Benveniste y col, 1991), este hecho contrasta con lo que ocurre en los sistemas animales donde se conoce la existencia de una única reductasa; en este caso, en nuestro trabajo, no tenemos la seguridad de estar determinando una única forma de reductasa. Sin embargo, otros autores sugieren que como en los sistemas animales, los diferentes citocromos P450 utilizan una misma reductasa, y que la especificidad para las diversas reacciones es debida al citocromo P450 individual y no a la reductasa (ver Figura I-23 de la Introducción).

FIGURA R-34

Actividad NADPH-citocromo P450 reductasa expresada en unidades enzimáticas/mg de proteína microsomal.



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-12: Actividad de la NADPH-citocromo P450 reductasa (u/mg protefna microsomal)¹

Medios

Semanas	AIA	AIA Gb	AIA Pb	AIA Gb Pb
1ª	0,1100±0,0070	0,1718±0,0030	0,0850±0,0020	0,2480±0,0060
2ª	0,1460±0,0060	0,6140±0,0170	0,1200±0,0040	0,2747±0,0050
3ª	0,0820±0,0060	0,3990±0,0040	0,1420±0,0050	0,5550±0,0100
4ª	0,0570±0,0050	0,2800±0,0050	0,2210±0,0070	0,3740±0,0130
5ª	0,0320±0,0040	0,2700±0,0070	0,2010±0,0040	0,2970±0,0040
6ª	0,0320±0,0030	0,2643±0,0060	0,1020±0,0060	0,2110±0,0090

	ANA	ANA Gb	ANA Pb	ANA Gb Pb
1ª	0,1180±0,0070	0,2500±0,0400	0,1280±0,0030	0,1860±0,0070
2ª	0,1860±0,0330	0,2400±0,0010	0,1460±0,0070	0,2010±0,0120
3ª	0,1010±0,0030	0,3500±0,0120	0,1135±0,0160	0,2520±0,0090
4ª	0,0680±0,0040	0,1814±0,0020	0,0710±0,0008	0,1930±0,0020
5ª	0,0590±0,0030	0,1100±0,0580	0,0690±0,0070	0,0990±0,0050
6ª	0,0310±0,0040	0,0100±0,0010	0,0270±0,0050	0,0190±0,0010

¹ Cada valor es la media de 6 determinaciones ± S.D.

RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-13: Relación de la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa y la cantidad de citocromo P450 microsomal.

<u>Medios</u>				
<u>Semanas</u>	<u>AIA</u>	<u>AIA Gb</u>	<u>AIA Pb</u>	<u>AIA Gb Pb</u>
1ª	0,0858	0,1086	0,3949	0,1822
2ª	0,0813	0,2722	0,1653	0,0962
3ª	0,0301	0,0718	0,1056	0,0987
4ª	0,0228	0,0474	0,1134	0,0597
5ª	0,0128	0,0485	0,1006	0,0502
6ª	0,0129	0,1009	0,0508	0,0745
	<u>ANA</u>	<u>ANA Gb</u>	<u>ANA Pb</u>	<u>ANA Gb Pb</u>
1ª	0,0684	0,0687	0,0428	0,0520
2ª	0,0464	0,0441	0,0212	0,0338
3ª	0,0168	0,0500	0,0167	0,0368
4ª	0,0135	0,0266	0,0106	0,0313
5ª	0,0124	0,0160	0,0077	0,0152
6ª	0,0100	0,0032	0,0031	0,0065

4.2. ACTIVIDAD DEL COMPLEJO ENZIMATICO RESPONSABLE DE LA ROTURA DE LA CADENA LATERAL DEL COLESTEROL

4.2.1. MEDIO AIA

La actividad del complejo que rompe la cadena lateral del colesterol, expresada en u/mg proteínas mitocondriales, aumenta durante las tres primeras semanas en los callos crecidos en el medio AIA, para descender hasta el final del experimento (Figura R-35).

4.2.1.1. Adición de Giberelina.

La presencia de Gb en el medio AIA provoca un aumento en la actividad de dicho complejo enzimático en los callos, especialmente en la segunda mitad del experimento, alcanzando su máximo en la 4ª semana de crecimiento.

4.2.1.2. Adición de Fenobarbital.

El Pb se muestra más estimulante que la Gb sobre la actividad del complejo que rompe la cadena lateral del colesterol a lo largo de todo el cultivo, alcanzando el máximo en la 3ª semana de crecimiento.

4.2.1.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital.

Aunque tanto la Gb como el Pb se muestran estimulantes de la actividad del complejo enzimático mencionado, al añadirlos simultáneamente al medio de cultivo se observan valores de la actividad enzimática generalmente intermedios a los obtenidos en los callos crecidos en los medios AIA Gb y AIA Pb, de lo que se deduce que ambas sustancias actúan activando por distintos caminos metabólicos la actividad del complejo enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol, y que dichas acciones estimulantes no son aditivas.

4.2.2. MEDIO ANA

Al sustituir el AIA por el ANA en el medio de cultivo, se observa que la actividad del complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol en los callos crecidos en él aumenta hasta la 3ª semana de crecimiento para decrecer hasta el final, presentando valores ligeramente inferiores a los de los callos crecidos en AIA durante la primera mitad del experimento y prácticamente iguales a lo largo de la segunda mitad.

4.2.2.1. Adición de Giberelina.

La adición de Giberelina no varía la pauta seguida por la actividad del complejo enzimático mencionado, pero sí la estimula muy significativamente a partir de la 4ª semana de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

4.2.2.2. Adición de Fenobarbital.

El Pb también se muestra estimulante de la actividad enzimática del complejo que rompe la cadena lateral del colesterol a lo largo de todo el experimento, alcanzando su máximo en la tercera semana de crecimiento, sin embargo, a partir de este momento los valores se muestran ligeramente inferiores a los observados en los callos crecidos en ANA Gb.

4.2.2.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital.

Al adicionar simultáneamente Gb y Pb al medio de cultivo, se obtienen valores, de la actividad del complejo enzimático estudiado, que durante la primera mitad del experimento son inferiores a los obtenidos en los callos crecidos en el medio ANA Pb, pero superiores a los de los callos crecidos en ANA Gb; mientras que en la 2ª mitad del experimento son muy similares a los de los callos cultivados en ANA Gb (Figura R-35).

4.2.3. ANALISIS DE LA VARIANZA DEL COMPLEJO ENZIMATICO RESPONSABLE DE LA ROTURA DE LA CADENA LATERAL DEL COLESTEROL

Estudio de la significación del factor tiempo:

Ho: no hay diferencias entre semanas/contr H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	5	0,82616	0,16523	
Residuo	131	0,16239	0,12396	13,3
Total	132	0,24500		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,2834. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Estudio de la significación del factor medio:

Ho: no hay diferencias entre medios/contr H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	7	0,47288	0,67555	
Residuo	131	0,16239	0,12396	54,5
Total	132	0,63527		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0802. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Considerando que no hay interacción entre los dos factores estudiados (tiempo y medios), y según los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza, con un nivel de significación de 0,05, sobre los resultados obtenidos en la Tabla R-14 podemos afirmar que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Ahora debemos saber, para las semanas y para los medios, si hay diferencias e igualdades estadísticas. Para ello realizamos comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, es decir, comparamos los factores dos a dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global sea 0,05.

Se obtuvo que en las comparaciones entre semanas el nivel de significación individual para cada ensayo era de 0,003; y en las comparaciones entre los medios el nivel de significación individual aplicado era de 0,002.

4.2.4. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI)

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,18925	0,18925	
Residuo	131	0,16239	0,12396	15,3
Total	132	0,18131		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,40571	0,40571	
Residuo	131	0,16239	0,12396	32,7
Total	132	0,20296		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana:

Ho: hay diferencias entre la 1ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,81354	0,81354	
Residuo	131	0,16239	0,12396	6,56
Total	132	0,17052		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

1ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,12000	0,12000	
Residuo	131	0,16239	0,12396	0,968
Total	132	0,16359		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

1ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,19039	0,19039	
Residuo	131	0,16239	0,12396	1,54
Total	132	0,16429		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,40775	0,40775	
Residuo	131	0,16239	0,12396	3,29
<hr/>				
Total	132	0,16646		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

2ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,22441	0,22441	
Residuo	131	0,16239	0,12396	1,81
<hr/>				
Total	132	0,16463		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

2ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,10594	0,10594	
Residuo	131	0,16239	0,12396	8,55
<hr/>				
Total	132	0,17298		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,32834	0,32834	
Residuo	131	0,16239	0,12396	26,5
Total	132	0,19522		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 4ª semana: H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,12371	0,12371	
Residuo	131	0,16239	0,12396	9,98
Total	132	0,17476		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,27816	0,27816	
Residuo	131	0,16239	0,12396	22,4
Total	132	0,19020		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,60053	0,60053	
Residuo	131	0,16239	0,12396	48,4
Total	132	0,22244		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

4ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,30864	0,30864	
Residuo	131	0,16239	0,12396	2,49
Total	132	0,16547		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

4ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,17910	0,17910	
Residuo	131	0,16239	0,12396	14,4
Total	132	0,18030		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

5ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 5ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,61269	0,61269	
Residuo	131	0,16239	0,12396	4,94
Total	132	0,16851		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La aplicación del método de Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento indica:

- La 2ª y 3ª semanas son iguales.
- La 4ª y la 5ª semanas son iguales.

4.2.5. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIO(BONFERRONI)

Medio AIA/Medio AIA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,12100	0,12100	
Residuo	131	0,16239	0,12396	97,6
Total	132	0,28338		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,18750	0,18750	
Residuo	131	0,16239	0,12396	151
Total	132	0,34989		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,14155	0,14155	
Residuo	131	0,16239	0,12396	114
Total	132	0,30394		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,14784	0,14784	
Residuo	131	0,16239	0,12396	1,19
Total	132	0,16386		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,59547	0,59547	
Residuo	131	0,16239	0,12396	4,8
Total	132	0,16834		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Pb/H1: hay dieferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,13164	0,13164	
Residuo	131	0,16239	0,12396	10,6
Total	132	0,17555		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,55230	0,55230	
Residuo	131	0,16239	0,12396	4,46
Total	132	0,16791		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,72534	0,72534	
Residuo	131	0,16239	0,12396	5,85
Total	132	0,16964		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb /Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,80561	0,80561	
Residuo	131	0,16239	0,12396	0,65
Total	132	0,16319		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,14923	0,14923	
Residuo	131	0,16239	0,12396	120
Total	132	0,31161		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,73269	0,73269	
Residuo	131	0,16239	0,12396	59,1
Total	132	0,23565		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,54343	0,54343	
Residuo	131	0,16239	0,12396	43,8
Total	132	0,21673		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb /Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,13877	0,13877	
Residuo	131	0,16239	0,12396	112
Total	132	0,16239		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,32243	0,32243	
Residuo	131	0,16239	0,12396	2,6
Total	132	0,16561		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,22228	0,22228	
Residuo	131	0,16239	0,12396	179
Total	132	0,38467		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,12663	0,12663	
Residuo	131	0,16239	0,12396	102
Total	132	0,28901		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,10130	0,10130	
Residuo	131	0,16239	0,12396	81,7
Total	132	0,26369		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,12867	0,12867	
Residuo	131	0,16239	0,12396	104
Total	132	0,29105		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,17196	0,17196	
Residuo	131	0,16239	0,12396	139
Total	132	0,33435		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 1,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,89441	0,89441	
Residuo	131	0,16239	0,12396	72,2
Total	132	0,25183		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,68382	0,68382	
Residuo	131	0,16239	0,12396	55,2
Total	132	0,23077		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,91154	0,91154	
Residuo	131	0,16239	0,12396	73,5
Total	132	0,25354		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,13367	0,13367	
Residuo	131	0,16239	0,12396	10,8
Total	132	0,17575		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA /Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,23465	0,23465	
Residuo	131	0,16239	0,12396	18,9
Total	132	0,18585		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,12716	0,12716	
Residuo	131	0,16239	0,12396	10,3
Total	132	0,17510		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadr.	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,14113	0,14113	
Residuo	131	0,16239	0,12396	1,14
Total	132	0,16380		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,81225	0,81225	
Residuo	131	0,16239	0,12396	0,655
Total	132	0,16239		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,16335	0,16335	
Residuo	131	0,16239	0,12396	1,32
Total	132	0,16402		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,001, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 11,3323. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Con la aplicación del método Bonferroni para contrastar los medios obtenemos la siguiente igualdad:

$$AIA = ANA = ANA Gb = ANA Gb Pb$$

Esta igualdad es idéntica a la obtenida para los cardenólidos totales; además por el estudio del coeficiente de correlación se observa que este parámetro es el que más influye, y de modo positivo, sobre la biosíntesis de cardenólidos.

4.2.6. DISCUSION

Con los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza sobre los datos de actividad del complejo responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol que se observan en la Tabla R-14, podemos concluir que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

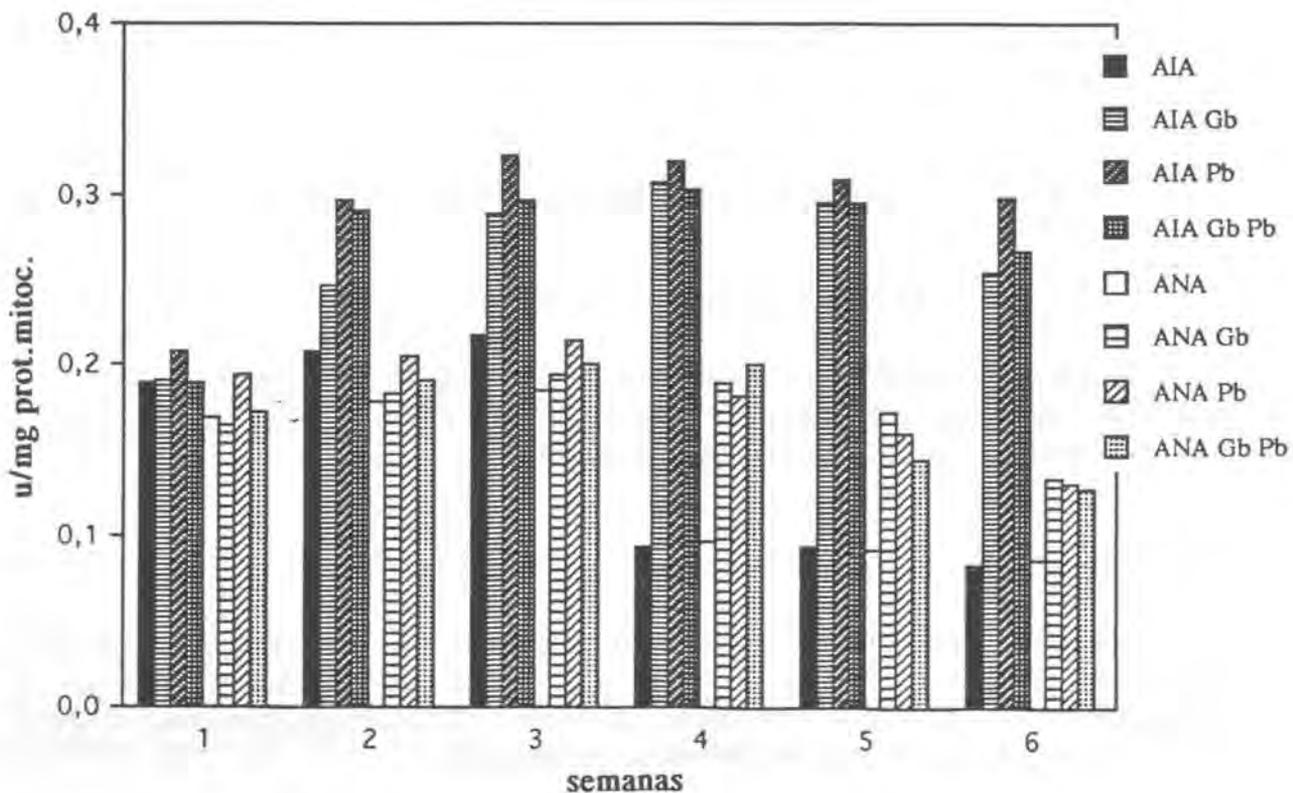
Analizando las semanas de crecimiento por el método de Bonferroni vemos que hay cuatro fases para esta actividad enzimática (ver sección III.4.2.4).

Contrastando los diferentes medios estudiados, también por el método de Bonferroni, se observa la misma igualdad que la obtenida para los cardenóidos totales, lo cual indica la estrecha relación de este parámetro con la biosíntesis de cardenóidos; además esto se ve confirmado al realizar el estudio del coeficiente de correlación de todas las medidas estudiadas respecto al contenido en cardenóidos ya que este parámetro resulta ser el que más influye de modo positivo sobre dicha síntesis.

Uniendo estos resultados estadísticos con los que se observan en las Tablas R-14 y R-15, podemos concluir que existe una relación directa entre la actividad P450_{scc} y la síntesis de cardenóidos; que la acción estimulante del Pb predomina a lo largo de la primera mitad del experimento y la de la Gb durante la segunda, lo cual demuestra que ambas sustancias actúan sobre la actividad P450_{scc} por distintos caminos metabólicos, que sus acciones no son aditivas y que como hemos comentado anteriormente, dependen de su interacción con la auxina presente en el medio de cultivo.

FIGURA R-35

Actividad del complejo responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}) expresada en unidades enzimáticas/mg de proteína mitocondrial.



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-14: Actividad del complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol (u/mg proteína mitocondrial)¹

Medios

<u>Semanas</u>	<u>AIA</u>	<u>AIA Gb</u>	<u>AIA Pb</u>	<u>AIA Gb Pb</u>
1 ^a	0,1905 ± 0,0020	0,1921 ± 0,0050	0,2091 ± 0,0120	0,1907 ± 0,0020
2 ^a	0,2087 ± 0,0190	0,2470 ± 0,0260	0,2966 ± 0,0260	0,2905 ± 0,0060
3 ^a	0,2170 ± 0,0260	0,2887 ± 0,0190	0,3231 ± 0,0100	0,2970 ± 0,0120
4 ^a	0,0945 ± 0,0007	0,3067 ± 0,0260	0,3191 ± 0,0120	0,3020 ± 0,0240
5 ^a	0,0946 ± 0,0003	0,2952 ± 0,0120	0,3085 ± 0,0190	0,2946 ± 0,0150
6 ^a	0,0840 ± 0,0010	0,2552 ± 0,0120	0,2987 ± 0,0190	0,2668 ± 0,0070

	<u>ANA</u>	<u>ANA Gb</u>	<u>ANA Pb</u>	<u>ANA Gb Pb</u>
1 ^a	0,1702 ± 0,0090	0,1656 ± 0,0160	0,1946 ± 0,0040	0,1726 ± 0,0030
2 ^a	0,1794 ± 0,0130	0,1844 ± 0,0120	0,2050 ± 0,0140	0,1915 ± 0,0110
3 ^a	0,1857 ± 0,0070	0,1943 ± 0,0130	0,2144 ± 0,0270	0,2004 ± 0,0100
4 ^a	0,0980 ± 0,0009	0,1907 ± 0,0070	0,1816 ± 0,0090	0,2007 ± 0,0010
5 ^a	0,0928 ± 0,0008	0,1736 ± 0,0040	0,1610 ± 0,0090	0,1451 ± 0,0170
6 ^a	0,0862 ± 0,0004	0,1348 ± 0,0100	0,1320 ± 0,0010	0,1275 ± 0,0090

¹ Cada valor es la media de 6 determinaciones ± S.D.

RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-15: Relación de la actividad citocromo P450sc y la cantidad de citocromo P450 mitocondrial.

<u>Medios</u>				
<u>Semanas</u>	<u>AIA</u>	<u>AIA Gb</u>	<u>AIA Pb</u>	<u>AIA Gb Pb</u>
1ª	0,2168	0,2572	0,2191	0,0629
2ª	0,1728	0,1931	0,0360	0,0949
3ª	0,1011	0,2131	0,0365	0,0929
4ª	0,0341	0,1592	0,0357	0,0941
5ª	0,0587	0,0551	0,0588	0,0525
6ª	0,0895	0,0472	0,0589	0,0467
	<u>ANA</u>	<u>ANA Gb</u>	<u>ANA Pb</u>	<u>ANA Gb Pb</u>
1ª	0,1747	0,1687	0,2459	0,1079
2ª	0,0945	0,0604	0,1043	0,0494
3ª	0,0911	0,0362	0,0459	0,0208
4ª	0,0232	0,0235	0,0226	0,0204
5ª	0,0158	0,0195	0,0181	0,0145
6ª	0,0126	0,0178	0,0144	0,0140

5. CARDENOLIDOS

5.1. CARDENOLIDOS TOTALES

Al transferir las piezas de callo desde el medio de inducción (C_2) a los medios de diferenciación ensayados se observa en todos los casos un elevado estímulo en la síntesis de cardenólidos totales, puesto que los valores de los mismos son de tres a seis veces superiores a los encontrados para los callos crecidos en el medio C_2 ⁽¹⁾.

5.1.1. MEDIO AIA :

Los valores de cardenólidos totales, expresados en $\mu\text{g/g}$ PS de los callos crecidos en el medio AIA aumentan durante las dos primeras semanas de crecimiento, alcanzando en la segunda semana el nivel máximo entre todos los medios ensayados (Figura R-36).

5.1.1.1. Adición de Fenobarbital

Los callos crecidos en el medio AIA Pb tienen su máximo en la tercera semana, para disminuir, como ocurre en el medio AIA, hasta el final del experimento. La presencia de Pb en el medio de cultivo produce valores de cardenólidos inferiores a los observados en los callos crecidos en el medio AIA durante las dos primeras semanas de cultivo, pero en la tercera semana se observa una mayor acumulación de cardenólidos en el medio Pb, puesto que los valores de cardenólidos encontrados en los callos crecidos en este medio son significativamente superiores a los observados a partir de la tercera semana en los callos crecidos en el medio AIA para después disminuir ligeramente hasta el final del experimento (como hemos mencionado anteriormente), siendo la degradación de los cardenólidos más lenta en AIA Pb que en AIA.

5.1.1.2. Adición de Giberelina. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital.

Las piezas de callo crecidas en los medios adicionados de Gb y Gb Pb, mantienen los niveles de cardenólidos hasta la cuarta semana de crecimiento, descendiendo a continuación en una proporción similar respectivamente a los medios AIA y AIA Pb en el momento que inician el descenso en la acumulación de cardenólidos (tercera y cuarta semana respectivamente).

⁽¹⁾ Se efectuó la determinación de cardenólidos totales en 12 piezas de callo crecidas en el medio de inducción C_2 , obteniéndose un valor medio \pm SD de $3,6 \pm 0,30 \mu\text{g/gPS}$. Además, se comprobó que los sucesivos repicajes de los callos en el medio C_2 no influían sobre el contenido en cardenólidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Es destacable que los valores de cardenólidos en los callos AIA Gb Pb son, en la primera parte del experimento, similares a los AIA Gb, mientras que en la segunda parte se muestran intermedios entre los obtenidos en los medios AIA Gb y AIA Pb, es decir, los niveles de cardenólidos en los callos AIA Gb Pb son significativamente más altos en la segunda mitad del experimento que los del AIA Gb. Esto demuestra que estas dos sustancias actúan incrementando la acumulación de cardenólidos totales durante la segunda mitad del experimento pero por caminos metabólicos distintos.

Sin embargo, los valores de cardenólidos obtenidos en los callos crecidos en el medio AIA Gb Pb son inferiores a los correspondientes para el medio AIA Pb, por tanto, el probable efecto retardante de la degradación de cardenólidos observado para el Pb durante la segunda mitad del ciclo de crecimiento, se da también si se adiciona a un medio con Gb.

5.1.2.MEDIO ANA (ANA, ANA Gb, ANA Pb, ANA Gb Pb) :

Las observaciones de los resultados obtenidos para los niveles de cardenólidos en los medios adicionados de ANA sustituyendo a AIA nos llevan a la conclusión de que las pautas seguidas con esta auxina son las mismas descritas para los medios con AIA, pero los valores en todos los casos son muy bajos (Figura R-36).

Además destaca una diferencia con respecto a los resultados obtenidos en los medios AIA. Los niveles de cardenólidos en los medios añadidos de Gb son inferiores a los obtenidos para los callos crecidos en el medio adicionado de Pb, y en la primera parte del experimento los valores de los callos crecidos en el medio Gb Pb son más altos que los crecidos en los medios Gb o Pb, lo cual parece indicar un efecto sinérgico de estas dos sustancias al añadirlas al medio ANA. Por el contrario, en la segunda parte del experimento los valores son inferiores, de lo cual inferimos que en la segunda mitad los efectos de estas dos sustancias se hacen antagónicos.

5.1.3.ANALISIS DE LA VARIANZA DE LOS CARDENOLIDOS TOTALES :

Estudio de la significación del factor tiempo :

Ho: no hay diferencias entre semanas/contr H1:hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	5	1251,4	250,27	
Residuo	130	602,24	4,6326	54,0
Total	135	1853,6		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,2839. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Estudio de la significación del factor medio :

Ho: no hay diferencias entre medios/contra H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	7	505,59	72,227	
Residuo	130	602,24	4,6326	15,6
<hr/>				
Total	137	1107,8		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0807. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Considerando que no hay interacción entre los dos factores estudiados (tiempo y medios) y según los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza, con un nivel de significación de 0,05, sobre los datos de Cardenólidos totales, que resumimos en la Tabla R-36, podemos afirmar que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos, es decir, hay diferencias entre las semanas de crecimiento y hay diferencias entre los medios considerados, en relación al contenido en cardenólidos totales de los callos estudiados.

Una vez conocido que las semanas y los medios son diferentes estadísticamente respecto al contenido en cardenólidos totales, es necesario saber, para las semanas y para los medios, cuales entre ellos difieren estadísticamente de los demás y si hay algunos que producen los mismos efectos sobre la medida considerada. Para ello realizamos un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, es decir, comparamos los factores dos a dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global continúe siendo 0,05.

Se obtuvo que en las comparaciones entre semanas el nivel de significación individual para cada ensayo era de 0,003, y en las comparaciones entre los medios el nivel de significación individual aplicado era de 0,002.

5.1.4.COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI)

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	7,3031	7,3031	
Residuo	130	602,24	4,6326	1,58
<hr/>				
Total	131	609,54		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	16,435	16,435	
Residuo	130	602,24	4,6326	3,55
Total	131	618,67		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 4ª semana/H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	103,55	103,55	
Residuo	130	602,24	4,6326	22,4
Total	131	705,78		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/5ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 5ª semana/H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med	F
Desviación				
Hipótesis	1	440,61	440,61	
Residuo	130	602,24	4,6326	95,1
Total	131	1042,8		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

1ª semana/6ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semanas/H1 : hay diferencias

	Grd. lib	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	599,01	599,01	
Residuo	130	602,24	4,6326	129
<hr/>				
Total	131	1201,2		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/3ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	45,650	45,650	
Residuo	130	602,24	4,6326	9,85
<hr/>				
Total	131	647,89		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/4ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 4ª semana/H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	165,07	165,07	
Residuo	130	602,24	4,6326	35,6
<hr/>				
Total	131	767,30		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/5ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 5ª semana/H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	561,36	561,36	
Residuo	130	602,24	4,6326	121
<hr/>				
Total	131	1163,6		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/6ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/ H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	738,59	738,59	
Residuo	130	602,24	4,6326	159
<hr/>				
Total	131	1340,8		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/4ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 4ª semana/ H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	38,037	38,037	
Residuo	130	602,24	4,6326	8,21
<hr/>				
Total	131	640,27		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/5ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 5ª semana/ H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	286,85	286,85	
Residuo	130	602,24	4,6326	61,9
Total	131	889,08		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/6ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 6ª semana/ H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	417,00	417,00	
Residuo	130	602,24	4,6326	90
Total	131	1019,2		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

4ª semana/5ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 5ª semana/ H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	111,91	111,91	
Residuo	130	602,24	4,6326	24,2
Total	131	714,14		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

4ª semana/6ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 6ª semana/ H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	196,65	196,65	
Residuo	130	602,24	4,6326	42,4
<hr/>				
Total	131	798,89		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

5ª semana/6ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 5ª y la 6ª semana/ H1 : hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	12,138	12,138	
Residuo	130	602,24	4,6326	2,62
<hr/>				
Total	131	614,37		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1488. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La aplicación del método Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento indica:

-- Hay cierta semejanza estadística entre las semanas 1ª y 2ª; 1ª y 3ª; 3ª y 4ª; sin embargo no son totalmente iguales.

-- Sí podemos concluir que las semanas 5ª y 6ª son idénticas en cuanto a la producción de cardenóidos.

5.1.5.COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIOS (BONFERRONI):

Medio AIA/Medio AIA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	90,336	90,336	
Residuo	130	602,24	4,6326	19,5
<hr/>				
Total	131	692,57		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	157,1	157,21	
Residuo	130	602,24	4,6326	33,9
<hr/>				
Total	131	759,44		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	141,86	141,86	
Residuo	130	602,24	4,6326	30,6
<hr/>				
Total	131	744,10		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,3335	3,3335	
Residuo	130	602,24	4,6326	0,720
<hr/>				
Total	131	695,57		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,52621	0,52621	
Residuo	130	602,24	4,6326	0,114
Total	131	602,76		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	43,180	43,180	
Residuo	130	602,24	4,6326	9,32
Total	131	645,42		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,88496	0,88496	
Residuo	130	602,24	4,6326	0,191
Total	131	602,32		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	10,084	10,084	
Residuo	130	602,24	4,6326	2,18
Total	131	612,32		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	5,7892	5,7892	
Residuo	130	602,24	4,6326	1,25
Total	131	608,02		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	128,38	128,38	
Residuo	130	602,24	4,6326	27,7
Total	131	730,61		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb/H1:hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	104,65	104,65	
Residuo	130	602,24	4,6326	22,6
<hr/>				
Total	131	706,89		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1:hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	8,6048	8,6048	
Residuo	130	602,24	4,6326	1,86
<hr/>				
Total	131	610,84		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	136,59	136,59	
Residuo	130	602,24	4,6326	29,5
<hr/>				
Total	131	738,82		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio AIA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,64865	0,64865	
Residuo	130	602,24	4,6326	0,140
<hr/>				
Total	131	602,88		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	205,54	205,54	
Residuo	130	602,24	4,6326	44,4
<hr/>				
Total	131	807,78		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	175,64	175,64	
Residuo	130	602,24	4,6326	37,9
<hr/>				
Total	131	777,87		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	36,786	36,786	
Residuo	130	602,24	4,6326	7,94
<hr/>				
Total	131	639,02		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	149,94	149,94	
Residuo	130	602,24	4,6326	32,4
<hr/>				
Total	131	752,18		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	188,69	188,69	
Residuo	130	602,24	4,6326	40,7
<hr/>				
Total	131	790,92		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1:hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	159,67	159,67	
Residuo	130	602,24	4,6326	34,5
Total	131	761,90		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1:hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	28,510	28,510	
Residuo	130	602,24	4,6326	6,15
Total	131	630,75		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	134,87	134,87	
Residuo	130	602,24	4,6326	29,1
Total	131	737,10		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,2108	1,2108	
Residuo	130	602,24	4,6326	0,261
Total	131	603,45		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	70,508	70,508	
Residuo	130	602,24	4,6326	15,2
Total	131	672,74		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA GbPb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	4,5083	4,5083	
Residuo	130	602,24	4,6326	0,973
Total	131	606,74		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	53,240	53,240	
Residuo	130	602,24	4,6326	11,5
Total	131	655,47		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	1,0463	1,0463	
Residuo	130	602,24	4,6326	0,226
Total	131	603,28		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Pb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Pb y Medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	39,359	39,359	
Residuo	130	602,24	4,6326	8,5
Total	131	641,59		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9484. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

La aplicación del método Bonferroni para contrastar los medios indica:

-- Estadísticamente se observan estas igualdades:

$$AIA = ANA = ANA Gb = ANA Gb Pb$$

$$AIA Pb = AIA Gb Pb = ANA Pb$$

Esto nos indica que los medios comprendidos en cada una de las dos igualdades estadísticas actúan del mismo modo sobre la producción de cardenólidos totales considerando en conjunto todo el experimento. El medio AIA Gb forma un grupo aparte.

5.1.6. ANALISIS DE LA VARIANZA PARA CONOCER EL MEDIO MAS PRODUCTIVO EN CARDENOLIDOS

A partir de los resultados obtenidos al contrastar los medios de cultivo por el método de Bonferroni realizamos otro análisis de la varianza (ANOVA) para saber, de las igualdades obtenidas, qué grupo de medios era el más productivo:

- 1) El grupo de medios AIA, ANA, ANA Gb, ANA Gb Pb.
- 2) El medio AIA Gb.
- 3) Los medios AIA Pb, AIA Gb Pb, ANA Pb.

Si no se tiene en cuenta el factor tiempo, es decir, si se considera la producción de cardenólidos en conjunto, a lo largo de todo el experimento, se obtiene que el primer grupo es el de elección; pero si consideramos las semanas de cultivo encontramos como mejor grupo el tercero.

Analizando los medios del grupo 1^o por semanas se obtiene que el medio AIA se separa de los otros tres medios incrementando la producción de cardenólidos durante las dos primeras semanas de cultivo. Efectuando el mismo análisis para el tercer grupo se pone de manifiesto que los medios AIA Pb y AIA Gb Pb son algo superiores en relación al medio ANA Pb, respecto a la producción, de cardenólidos durante la primera mitad del experimento.

Estos resultados nos indican la estrecha relación positiva que existe entre la auxina natural AIA y las acciones del Fenobarbital especialmente, y también de la Giberelina, que por otra parte no llegan a destacar en valores absolutos de producción de cardenólidos sobre el medio control AIA; todo esto nos sugiere que no podemos considerar como mejor un único medio, sino más bien tener presentes estos tres medios (AIA, AIA Pb y AIA Gb Pb) y sus acciones puntuales en cada semana de cultivo.

5.1.7.DISCUSION

Según los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza sobre los datos de Cardenólidos totales que resumimos en la Tabla R-16, podemos concluir que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Analizando las semanas de crecimiento por el método de Bonferroni vemos que hay igualdad entre la 5^a y la 6^a, lo cual indica que en ellas la producción de cardenólidos es la misma, aunque por los datos de estas semanas mostrados en la Tabla R-16 parezca que en la 6^a disminuyen; como sabemos valores absolutos distintos aunque cercanos entre sí muchas veces no representan diferencias reales, y es precisamente el análisis estadístico el que aclara estos hechos.

Por lo tanto, y para estudios posteriores, se podría realizar el experimento durante las cinco primeras semanas de crecimiento.

Contrastando los diferentes medios estudiados, también utilizando el método de Bonferroni, se observa que los medios AIA, ANA, ANA Gb y ANA Gb Pb se comportan del mismo modo sobre la producción de cardenólidos totales; a su vez, los medios AIA Pb, AIA Gb Pb y ANA Pb también se comportan del mismo modo sobre la producción de cardenólidos totales; el medio AIA Gb guarda relación con algunos pero sus efectos son distintos a los de los restantes medios.

Efectuando el análisis de la varianza y considerando las semanas individualmente se obtiene que los mejores medios para la producción de cardenólidos son los medios AIA, AIA Pb y AIA Gb Pb, no destacando ninguno de ellos en valores absolutos de cardenólidos pero favoreciendo de un modo complementario la síntesis de cardenólidos.

Uniendo estos resultados estadísticos con los que se observan en las Tablas R-16 y R-17, podemos concluir:

La sustitución de la auxina natural AIA por la auxina sintética ANA en el medio de cultivo no varía la pauta seguida por los valores de cardenólidos totales observados para los medios AIA, AIA Gb, AIA Pb y AIA Gb Pb. Si se relacionan los niveles de cardenólidos de los callos crecidos en los medios suplementados con la auxina AIA con los crecidos en los medios suplementados con la auxina ANA (Tabla R-17) se puede observar que en general los valores de cardenólidos son más altos en los callos crecidos en cualquiera de los medios AIA que en los crecidos en los medios de cultivo en los que se sustituye AIA por ANA. Estadísticamente se observa que este efecto es mayor al adicionar Gb al medio AIA, haciendo que se separe del comportamiento habitual del AIA; no ocurre lo mismo al añadir Gb sobre ANA pues se mantiene el comportamiento básico. Este hecho podría imputarse a que la auxina sintética ANA provoca, como hemos visto anteriormente, un mayor crecimiento de los callos, medido en Peso fresco y Peso seco. Por lo cual, debemos suponer que utiliza los intermediarios metabólicos para la formación de sustancias primarias y por esta circunstancia retardaría el metabolismo secundario. Es probable que el retraso en la diferenciación que

RESULTADOS Y DISCUSION

experimentan estos callos afecte inhibiendo el metabolismo secundario.

Sin embargo, los valores absolutos observados en la Tabla R-16 para los medios del primer grupo no son significativos estadísticamente como se demuestra por el estudio del ANOVA al considerar globalmente el tiempo, y sólo debemos interpretarlos como datos útiles para cada semana.

Los resultados obtenidos al añadir Gb al medio AIA, pues sobre el medio ANA no ejerce influencia, deberíamos atribuirlos también al efecto de esta fitohormona sobre el metabolismo primario de las células vegetales, que dirige los metabolitos intermediarios hacia la síntesis de sustancias relacionadas con el crecimiento lo cual retarda en parte la formación de metabolitos secundarios, por ello los niveles de cardenólidos en AIA Gb son inferiores a los alcanzados en el medio AIA, y permanecen estacionarios durante cuatro semanas por este efecto activador del metabolismo. Es decir, no aumenta la síntesis de cardenólidos pero mantiene las condiciones celulares necesarias para su acumulación. En el momento en que los tejidos inician la senescencia se produce una degradación similar a la existente en los tejidos AIA o ANA.

El efecto del Pb podríamos interpretarlo como un retardo en la síntesis de cardenólidos, ya que su máximo nivel se alcanza en la 3ª muestra, aunque es inferior al valor más alto de los medios control AIA y ANA, o también podríamos decir que ejerce una inhibición en la degradación de los cardenólidos, pues a partir de la tercera semana el descenso en los niveles de cardenólidos es significativamente inferior al de los callos crecidos en los referidos medios básicos.

Es destacable que en el estudio de la ultraestructura hemos encontrado que el Fenobarbital incrementa el número de mitocondrias y principalmente de plastoglóbulos en las células de los callos, orgánulos relacionados directamente con la síntesis de cardenólidos según Berggren y Ohlsson (1991) en cuanto a los plastoglóbulos y Solsona (1992) en cuanto a las mitocondrias.

Al adicionar simultáneamente Gb y Pb al medio AIA observamos que la Gb ejerce su acción esencialmente hasta la cuarta semana manteniendo la integridad de los tejidos y a partir de la quinta semana predomina la acción del Pb incrementando la síntesis o retardando la degradación de los cardenólidos; mientras que si se adicionan simultáneamente ambas sustancias al medio ANA, la Gb parece ejercer su efecto predominante hasta la tercera muestra y después se da una acción degradatoria mucho más rápida. Lo cual parece indicar que la acción simultánea de Gb y Pb no puede considerarse aisladamente sino en interacción con la clase de auxina existente en el medio; lo mismo ocurriría con la actividad P450_{scc}. Esto puede completarse con los datos estadísticos diciendo que la adición conjunta de Gb y Pb al medio ANA induce a un comportamiento con predominio de la Gb, igual al de los medios básicos (AIA y ANA); en cambio, si estas dos sustancias se adicionan al medio AIA se origina un comportamiento igual al que ocasiona el Pb.

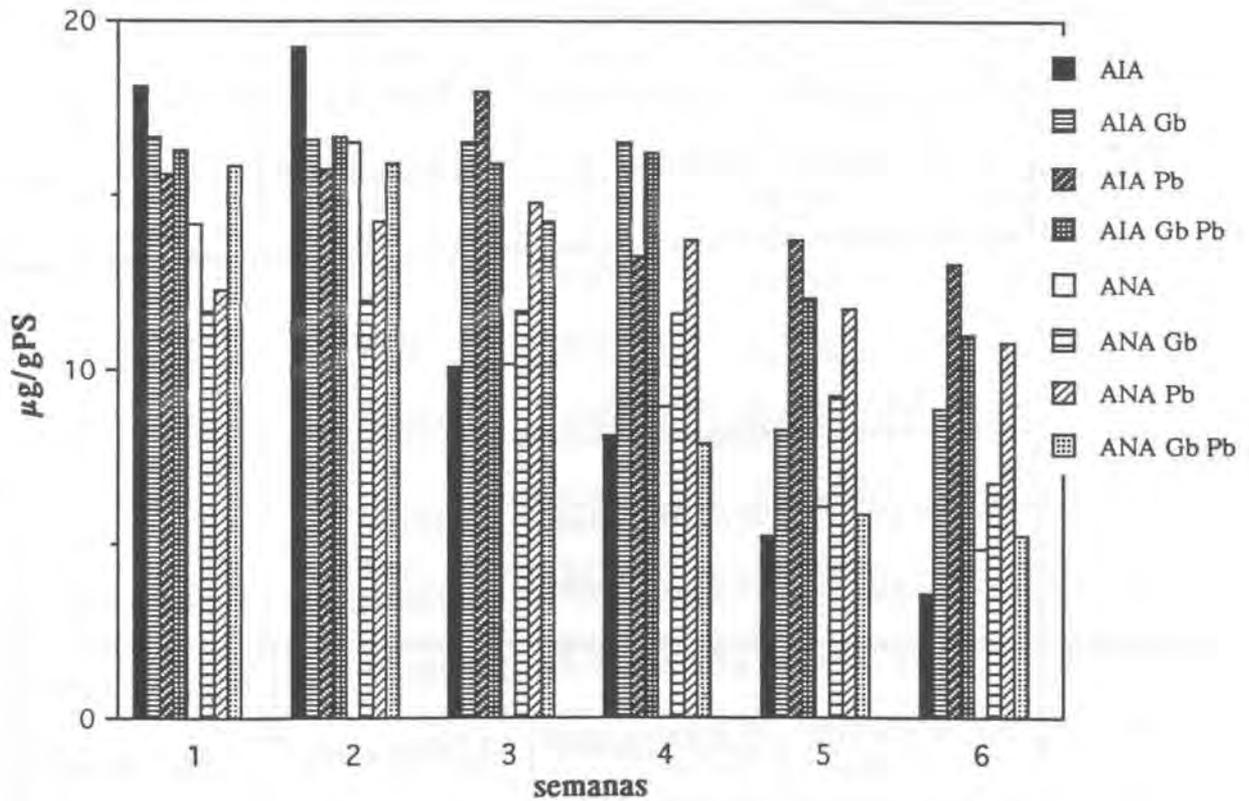
También podemos decir que cualquiera de las dos sustancias (Gb y Pb) adicionadas

RESULTADOS Y DISCUSION

juntas o separadamente al medio AIA varían el comportamiento de este medio básico sobre la producción de cardenóidos totales, en cambio sobre el medio ANA no varían su comportamiento, con excepción del Pb.

FIGURA R-36

Cardenóidos totales expresados en $\mu\text{g/g}$ de Peso seco.



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-16: Cardenólidos totales ($\mu\text{g/gPS}$)¹

Medios

Semanas	AIA	AIA Gb	AIA Pb	AIA Gb Pb
1 ^a	18,1342 \pm 0,3260	16,6382 \pm 0,3852	15,6381 \pm 0,3524	16,2924 \pm 0,2510
2 ^a	19,2300 \pm 0,2649	16,5703 \pm 0,0724	15,7233 \pm 0,5567	16,6721 \pm 0,2122
3 ^a	10,0567 \pm 0,1523	16,4882 \pm 0,1348	17,9409 \pm 0,2314	15,9400 \pm 0,2370
4 ^a	8,1254 \pm 0,4952	16,5583 \pm 0,6145	13,2832 \pm 0,2030	16,2185 \pm 0,8022
5 ^a	5,2232 \pm 0,0512	8,2691 \pm 0,3872	13,7088 \pm 0,6160	12,0800 \pm 0,8930
6 ^a	3,5702 \pm 0,0713	8,8513 \pm 0,1527	13,0611 \pm 0,3890	10,9723 \pm 0,2240

	ANA	ANA Gb	ANA Pb	ANA Gb Pb
1 ^a	14,1562 \pm 0,4093	11,6385 \pm 0,3520	12,3080 \pm 0,1112	15,8103 \pm 0,7160
2 ^a	16,5142 \pm 0,0219	11,9434 \pm 0,5921	14,2333 \pm 0,1780	15,9433 \pm 0,1940
3 ^a	10,1624 \pm 0,5142	11,6762 \pm 0,4197	14,7700 \pm 0,3754	14,2176 \pm 0,1670
4 ^a	8,9760 \pm 0,3122	11,6054 \pm 0,0840	13,7210 \pm 0,6526	7,9038 \pm 0,0832
5 ^a	6,0345 \pm 0,0512	9,2659 \pm 0,3081	11,7146 \pm 0,5491	5,8374 \pm 0,1792
6 ^a	4,8560 \pm 0,1561	6,7770 \pm 0,0751	10,7540 \pm 0,1528	5,2381 \pm 0,0428

¹ Cada valor es la media de 6 determinaciones \pm S.D.

RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-17: Relación de cardenólidos totales entre los medios AIA y los medios ANA.

<u>Semanas</u>	<u>Medios</u>			
	<u>AIA</u>	<u>AIA Gb</u>	<u>AIA Pb</u>	<u>AIA Gb Pb</u>
	<u>ANA</u>	<u>ANA Gb</u>	<u>ANA Pb</u>	<u>ANA Gb Pb</u>
1 ^a	1,2812	1,4299	1,2707	1,0303
2 ^a	1,1647	1,3877	1,1047	1,0457
3 ^a	0,9891	1,4121	1,2146	1,1217
4 ^a	0,9052	1,4267	0,9697	2,0518
5 ^a	0,8656	0,8920	1,1699	2,0720
6 ^a	0,7360	1,3072	1,2148	2,0975

5.2. DIGITOXINA

La digitoxina, al igual que los cardenólidos totales, incrementa significativamente cuando se transfieren las piezas de callo desde el medio de inducción C₂ a los medios de diferenciación ensayados, en distintas proporciones según la composición de los mismos.

5.2.1. MEDIO AIA

Las piezas de callo transferidas al medio AIA incrementan la síntesis de digitoxina durante la primera semana de crecimiento para descender a niveles estables desde la tercera semana hasta el final del experimento.

5.2.1.1. Adición de Giberelina

La adición de Giberelina también provoca un extraordinario incremento en la biosíntesis de digitoxina a lo largo de la primera semana de cultivo, mientras que a partir de este momento descienden sus niveles a valores inferiores a los observados para los callos crecidos en el medio AIA. Sin embargo analizando los datos estadísticamente (Bonferroni) ambos medios se comportan igual respecto a la producción de digitoxina, por lo que este efecto puntual se pierde si tenemos en cuenta el tiempo del experimento globalmente.

5.2.1.2. Adición de Fenobarbital

Los valores de digitoxina de los callos crecidos en medio AIA Pb muestran una pauta diferente ya que aumentan hasta la tercera muestra para descender hasta el final del cultivo pero manteniéndose superiores a los niveles obtenidos para los callos crecidos en cualquiera de los cuatro medios suplementados con la auxina natural AIA. No obstante es necesario un análisis estadístico para decidir si este es el medio más productivo en cuanto a la digitoxina dentro del grupo básico AIA (Figura R-37).

5.2.1.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital

La adición simultánea de Gb y Pb al medio AIA provoca un comportamiento para la digitoxina similar al observado en los callos crecidos en AIA Gb, pero con valores significativamente superiores. Al observar dichos valores podemos decir que al principio del experimento las acciones de la Gb y el Pb se suman, mientras que a partir de la tercera semana de crecimiento la acción de la Giberelina y el Fenobarbital interfieren, y los valores de AIA Gb Pb son intermedios pero similares a los del AIA Gb.

La determinación de Digitoxina en callos crecidos en el medio C₂ dió un valor medio de 25 ± 2,2 ng/gPS, como resultado de 12 determinaciones + SD.

5.2.2. MEDIO ANA

5.2.2.1. Medio ANA y adición de Giberelina

Los niveles de digitoxina de los callos crecidos sobre los medios ANA y ANA Gb presentan su máximo en la primera semana de crecimiento, descendiendo a continuación hasta el final del experimento. El comportamiento es parecido al observado en los medio AIA y AIA Gb aunque con valores algo inferiores (Figura R-37).

5.2.2.2. Adición de Fenobarbital

Los callos crecidos en el medio de cultivo ANA Pb también presentan una pauta descendente para sus contenidos de digitoxina, sin embargo, si se exceptúa la primera semana de crecimiento, sus valores son superiores a los obtenidos en los callos crecidos en los medios ANA y ANA Gb por lo que podemos deducir que el Pb estimula la síntesis de digitoxina y/o inhibe su degradación.

5.2.2.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital

La adición simultánea de Gb y Pb al medio de cultivo induce niveles de digitoxina altos durante la primera semana de cultivo que descienden lentamente hasta la tercera semana para disminuir drásticamente hasta el final del experimento; podemos deducir por tanto que durante la primera mitad del experimento la presencia de la Gb en el medio activa la acción positiva del Pb sobre la acumulación de digitoxina, mientras que durante la segunda mitad la inhibe.

5.2.3. ANALISIS DE LA VARIANZA DE LA DIGITOXINA

Estudio de la significación del factor tiempo:

Ho: no hay diferencias entre semanas/contra H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	5	0,31072	62145	
Residuo	131	0,56698	4328,1	14,4
Total	136	0,87771		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,2834. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio de la significación del factor medio:

Ho: no hay diferencias entre medios/contra H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	7	0,23391	33415	
Residuo	131	0,56698	4328,1	7,72
Total	138	0,80089		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0802. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Considerando que no hay interacción entre los dos factores estudiados (tiempo y medios) y según los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza, con un nivel de significación de 0,05, sobre los datos de Digitoxina que se resumen en la Tabla R-18, podemos afirmar que tanto el factor tiempo como el factor medio tiene un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Ahora conviene saber, para las semanas y para los medios, si hay diferencias e igualdades estadísticas. Para ello realizamos comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, es decir, comparamos los factores dos a dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global sea 0,05.

Se obtuvo que en las comparaciones entre semanas el nivel de significación individual para cada ensayo era de 0,003; y en las comparaciones entre los medios el nivel de significación individual aplicado era de 0,002.

5.2.4. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI)

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,11727	0,11727	
Residuo	131	0,56698	4328,1	27,1
Total	132	0,68425		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,12394	0,12394	
Residuo	131	0,56698	4328,1	28,6
Total	132	0,69092		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,17550	0,17550	
Residuo	131	0,56698	4328,1	40,5
Total	132	0,74248		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,21769	0,21769	
Residuo	131	0,56698	4328,1	50,3
Total	132	0,78467		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

1ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,22264	0,22264	
Residuo	131	0,56698	4328,1	51,4
Total	132	0,78962		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	92,413	92,413	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,214
Total	132	0,56707		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

2ª semana/4ª semana:

Ho: ni hay diferencias entre la 2ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	5850,2	5850,2	
Residuo	131	0,56698	4328,1	1,35
Total	132	0,57283		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	15408	15408	
Residuo	131	0,56698	4328,1	3,56
Total	132	0,58239		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

2ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	16746	16746	
Residuo	131	0,56698	4328,1	3,87
Total	132	0,58373		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

3ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	4472,1	4472,1	
Residuo	131	0,56698	4328,1	1,03
Total	132	0,57145		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	13114	13114	
Residuo	131	0,56698	4328,1	3,03
<hr/>				
Total	132	0,58010		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

3ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª semana y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	14350	14350	
Residuo	131	0,56698	4328,1	3,23
<hr/>				
Total	132	0,58133		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

4ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2269,9	2269,9	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,524
<hr/>				
Total	132	0,56925		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

4ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	2800,3	2800,3	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,647
Total	132	0,56978		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

5ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 5ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	27,819	27,819	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,643
Total	132	0,56701		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,1461. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

La aplicación del método Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento indica:

- Se puede afirmar que la 2ª y 4ª semanas son distintas.
- Todas las semanas son, además, distintas de la 1ª.

5.2.5. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIOS (BONFERRONI)

Medio AIA/Medio AIA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	10954	10954	
Residuo	131	0,56698	4328,1	2,53
Total	132	0,57794		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	55053	55053	
Residuo	131	0,56698	4328,1	12,7
Total	132	0,62204		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	83233	83233	
Residuo	131	0,56698	4328,1	19,2
Total	132	0,65021		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3022,5	3022,5	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,698
Total	132	0,57000		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencia

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2174,7	2174,7	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,502
<hr/>				
Total	132	0,56916		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencia sentre medio AIA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	90,230	90,230	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,208
<hr/>				
Total	132	0,56707		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2344,9	2344,9	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,542
<hr/>				
Total	132	0,56933		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	16893	16893	
Residuo	131	0,56698	4328,1	3,9
Total	132	0,58388		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	33797	33797	
Residuo	131	0,56698	4328,1	7,81
Total	132	0,60078		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	25484	25484	
Residuo	131	0,56698	4328,1	5,89
Total	132	0,59247		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	22890	22890	
Residuo	131	0,56698	4328,1	5,29
Total	132	0,58987		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	13032	13032	
Residuo	131	0,56698	4328,1	3,01
Total	132	0,58001		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	11198	11198	
Residuo	131	0,56698	4328,1	2,59
Total	132	0,57818		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2901,5	2901,5	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,67
<hr/>				
Total	132	0,56988		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	83875	83875	
Residuo	131	0,56698	4328,1	19,4
<hr/>				
Total	132	0,65086		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb /Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	79112	79112	
Residuo	131	0,56698	4328,1	18,3
<hr/>				
Total	132	0,64609		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	59601	59601	
Residuo	131	0,56698	4328,1	13,8
Total	132	0,62658		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	34674	34674	
Residuo	131	0,56698	4328,1	8,01
Total	132	0,60166		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,11798	0,11798	
Residuo	131	0,56698	4328,1	27,3
Total	132	0,68496		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,11231	0,11231	
Residuo	131	0,56698	4328,1	26
Total	132	0,67930		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	88804	88804	
residuo	131	0,56698	4328,1	20,5
Total	132	0,65579		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	57637	57637	
Residuo	131	0,56698	4328,1	13,3
Total	132	0,62462		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	69,616	69,616	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,161
Total	132	0,56705		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	2068,3	2068,3	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,478
Total	132	0,56905		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	10692	10692	
Residuo	131	0,56698	4328,1	2,47
Total	132	0,57767		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1379	1379	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,319
<hr/>				
Total	132	0,56836		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	9036	9036	
Residuo	131	0,56698	4328,1	2,09
<hr/>				
Total	132	0,57602		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio ANA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3355,1	3355,1	
Residuo	131	0,56698	4328,1	0,775
<hr/>				
Total	132	0,57034		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,9453. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con la aplicación del método Bonferroni para contrastar los medios se llega a la siguiente igualdad estadística:

$$AIA = AIA Gb = ANA = ANA Gb = ANA Pb = ANA Gb Pb$$

Esto significa que para la biosíntesis de Digitoxina el comportamiento de estos medios es el mismo; los valores de cardenólidos tan destacados que produce la Giberelina en la primera semana de cultivo no se han podido relacionar con ninguno de los parámetros estudiados, y además quedan enmascarados al considerara el análisis estadístico globalmente respecto al tiempo. Podemos observar que sólo se separan de este modo de actuar los medios AIA Pb y AIA Gb Pb (conviene recordar que el medio AIA Gb Pb se comporta como un medio AIA Pb, tal como vimos anteriormente para los cardenólidos totales).

5.2.6. ANALISIS DE LA VARIANZA PARA CONOCER EL MEDIO MAS PRODUCTIVO EN DIGITOXINA

A partir de los resultados obtenidos al contrastar los medios de cultivo por el método de Bonferroni realizamos también como en el caso anterior un análisis de la varianza (ANOVA) para saber, de las igualdades obtenidas, qué grupo de medios producía más Digitoxina:

- 1) El grupo de medios AIA, AIA Gb, ANA, ANA Gb, ANA Pb, ANA Gb Pb.
- 2) El medio AIA Pb.
- 3) El medio AIA Gb Pb.

Sin tener en cuenta el tiempo (semanas) el primer grupo resulta el mejor, igual que ocurría para los cardenólidos totales. Si se tienen en cuenta las semanas se tiene que para las dos primeras el mejor medio es el AIA Gb Pb, y para el resto de semanas el AIA Pb.

El efecto de la primera y segunda semanas, al considerarlas todas juntas, se pierde. El medio AIA Gb Pb da buenos resultados y de forma rápida, pero luego se aminora al alargar el tiempo del experimento.

5.2.7. DISCUSION

Según los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza sobre los datos de Digitoxina que resumimos en la Tabla R-18, podemos concluir que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Analizando las semanas de crecimiento por el método de Bonferroni vemos que todas las semanas son distintas de la primera en cuanto a la producción de Digitoxina y a su vez la

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª y la 4ª son distintas entre sí, pero no podemos afirmar que haya igualdades entre las demás (ver sección III.5.2.4).

Contrastando los diferentes medios estudiados, también por el método de Bonferroni, se observa que los medio AIA, AIA Gb, ANA, ANA Gb, ANA Pb y ANA Gb Pb se comportan del mismo modo sobre la producción de Digitoxina y por tanto en cualquiera de ellos la producción es la misma; los medios AIA Pb y AIA Gb Pb son distintos entre sí y respecto a los medios anteriores.

Además por el estudio del ANOVA conocemos que los seis medios que recoge la igualdad son los que producen más cantidad de Digitoxina durante las 6 semanas de cultivo; sin embargo teniendo en cuenta las semanas los mejores medios son el AIA Gb PB para la dos primeras y el AIA Pb para las siguientes.

Uniendo estos resultados estadísticos con los que se observan en la Tabla R-18 podemos concluir:

En el medio ANA no influye la adición de Gb, Pb, y Gb+Pb en cuanto a la producción de Digitoxina, diríamos que el medio básico no se modifica en su comportamiento por las cantidades adicionadas de estas sustancias; además, el comportamiento, siempre en relación a la producción de Digitoxina, es igual al del medio AIA y éste tampoco se ve influido por la adición de Gb (con excepción de la primera semana de cultivo, hecho ya comentado en el apartado III.5.2.5.); en cambio el medio AIA sí que se comporta de modo diferente al añadirle Pb y Gb+Pb.

De todo lo anterior podemos decir que para la producción de Digitoxina los mejores medios son el AIA Gb Pb y el AIA Pb. Que la Giberelina tiene un efecto puntual muy marcado durante la primera semana de cultivo y que este efecto no logra que se aparte del comportamiento de otros medios si se considera el experimento globalmente.

También se puede destacar que el Pb potencia la acción de la Gb durante la primera mitad del experimento mientras que la Gb inhibe claramente la acción estimulante del Pb sobre la acumulación de Digitoxina durante la segunda mitad del experimento sobre el medio AIA.

Es de destacar el hecho de que al sustituir la hormona natural AIA por la de síntesis ANA disminuye significativamente la acción positiva del Pb sobre la biosíntesis de cardenólidos, lo que llevaría a concluir que la acción del Pb no se puede considerar aisladamente sino que debe relacionarse siempre con el tipo de auxina presente en el medio de cultivo.

La Figura R-38 muestra la relación que existe entre los cardenólidos totales y la Digitoxina durante las cinco primeras semanas de cultivo (ya que la 6ª semana es igual a la 5ª para esta medida, según los resultados obtenidos del análisis estadístico efectuado para contrastar las semanas de cultivo). Se puede observar que los medios más idóneos para la

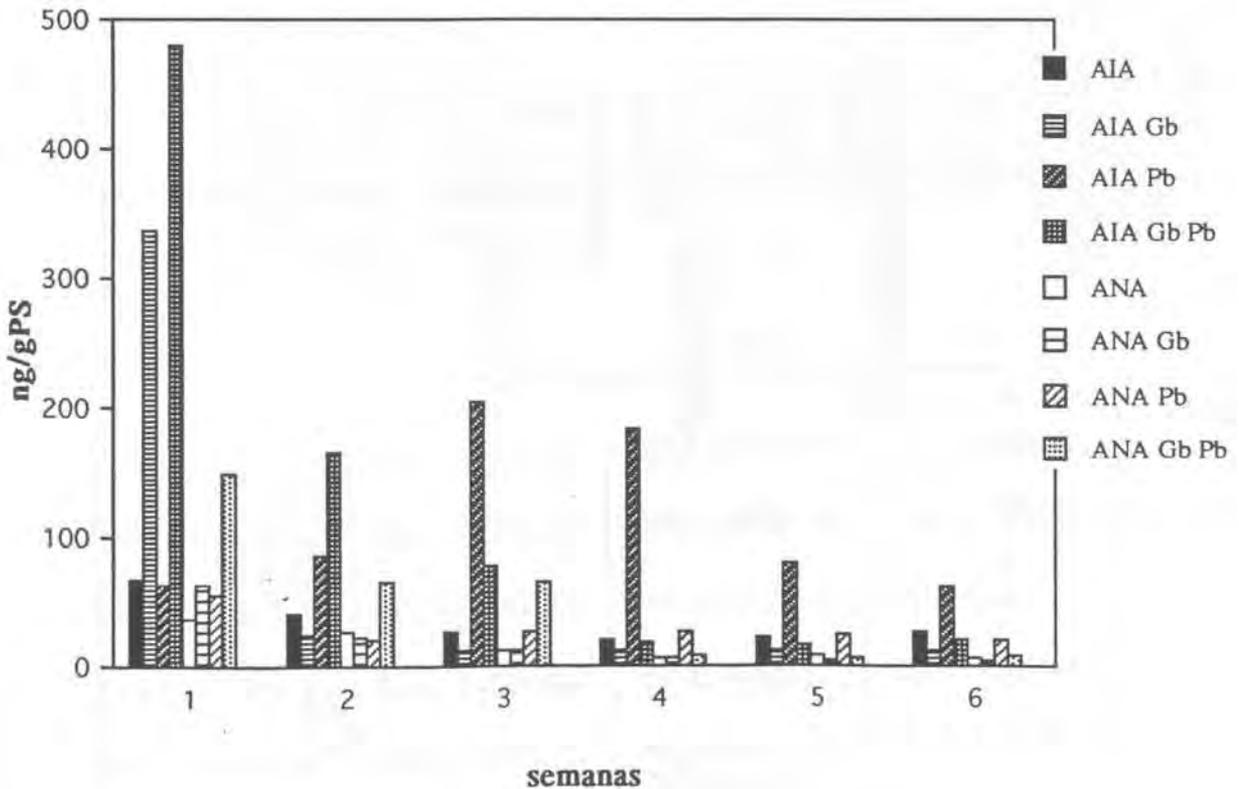
RESULTADOS Y DISCUSION

síntesis de cardenólidos (AIA Pb y AIA Gb Pb) coinciden con los medios de elección para la síntesis de Digitoxina, ya que en dichos medios los niveles de Digitoxina se mantienen más o menos paralelamente a los niveles de cardenólidos totales.

El medio AIA muestra altos valores de cardenólidos pero en cambio una escasa producción de Digitoxina, lo mismo ocurre con el medio AIA Gb (exceptuando la 1ª semana).

FIGURA R-37

Contenido en Digitoxina expresado en ng/g de Peso seco.



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-18: Contenido en Digitoxina (ng/gPS)¹

Medios

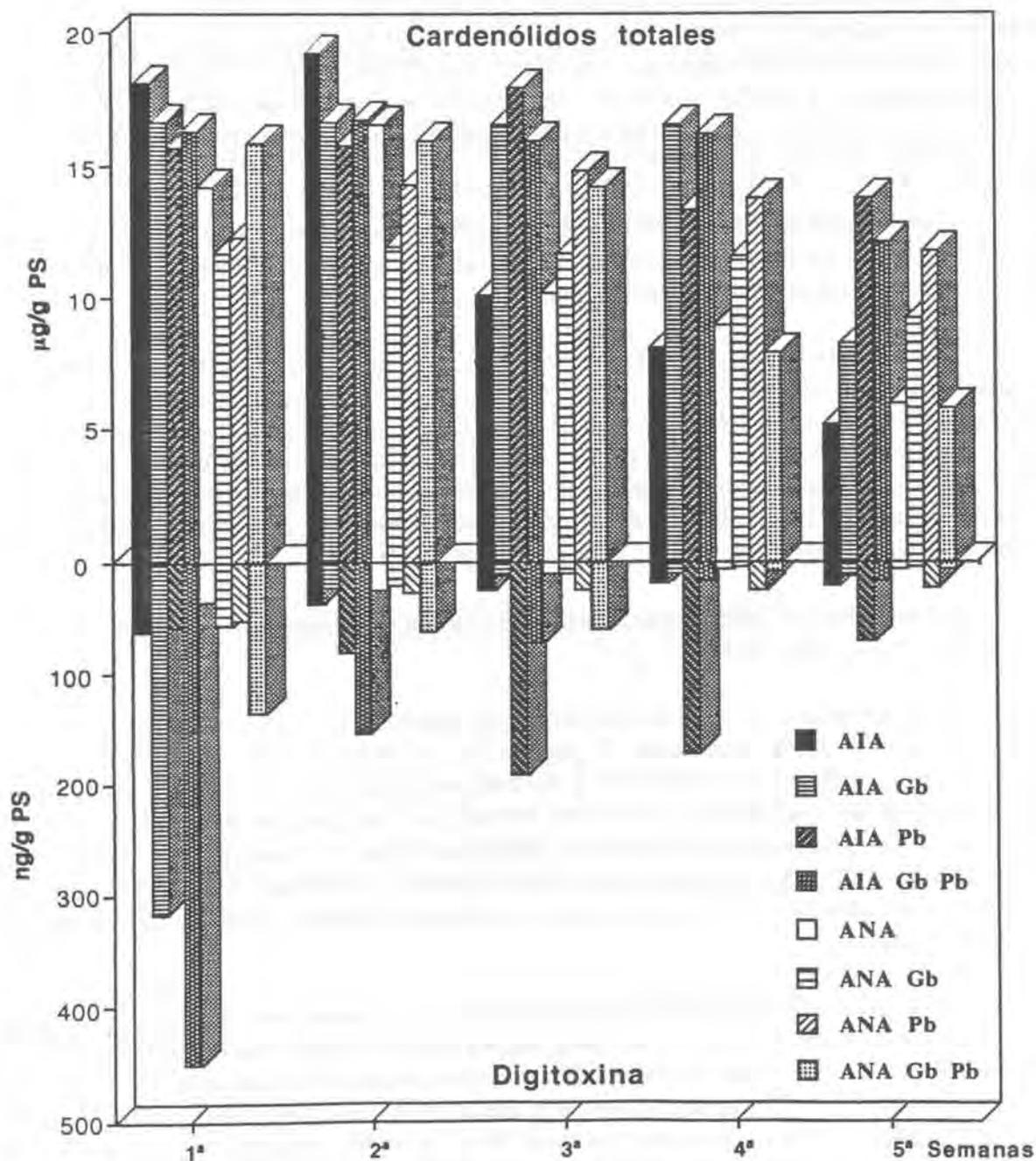
<u>Semanas</u>	<u>AIA</u>	<u>AIA Gb</u>	<u>AIA Pb</u>	<u>AIA Gb Pb</u>
1 ^a	66,5021±2,7240	337,0641±4,338	62,3140±0,703	480,3784±6,082
2 ^a	39,8100±0,7123	24,9231±1,278	85,4527±1,990	165,6972±5,618
3 ^a	26,8791±1,0142	12,2502±0,612	204,0237±3,858	77,1782±4,207
4 ^a	20,6931±0,7528	12,1670±0,431	184,4902±1,639	18,4802±1,630
5 ^a	23,0381±1,1985	13,1690±0,518	75,8049±2,836	17,3398±0,926
6 ^a	26,5671±1,1642	13,2495±0,295	60,6892±2,815	20,9172±1,133

	<u>ANA</u>	<u>ANA Gb</u>	<u>ANA Pb</u>	<u>ANA Gb Pb</u>
1 ^a	37,0827±1,289	63,0172±3,958	55,0182±3,694	148,0782±4,390
2 ^a	25,8701±2,017	21,4820±1,753	29,4829±1,639	65,8802±2,289
3 ^a	11,7702±1,012	11,5937±1,037	27,3302±0,916	64,8739±1,017
4 ^a	6,2182±0,703	5,1682±0,403	26,9073±1,128	7,8593±0,153
5 ^a	7,2192±0,996	4,0273±0,218	25,1462±1,490	6,2391±0,218
6 ^a	5,3892±0,741	4,9472±0,196	20,2781±1,907	7,4312±0,352

¹Cada valor es la media de 6 determinaciones ± S.D.

FIGURA R-38

Comparación entre el contenido en cardenólidos totales y Digitoxina durante las 5 primeras semanas de cultivo.



6. REGRESION LINEAL MULTIPLE

Finalmente, para intentar relacionar todos los datos obtenidos en el presente trabajo, se hizo un estudio conjunto con todas las medidas analizadas.

Previamente, al aplicar el análisis de la varianza para cada medida se encontró que en aquella que nosotros consideramos como principal, la producción de cardenólidos (objeto de nuestro estudio), el factor medio tenía un efecto significativo sobre los resultados obtenidos; y al contrastar los 8 medios estudiados (Bonferroni) se encontró que dichos medios podían dividirse en tres grupos, cada uno de ellos con una influencia distinta sobre la producción de cardenólidos.

A continuación se efectuó un análisis estadístico para conocer qué grupo era el mejor para la síntesis de cardenólidos considerando por una parte el experimento globalmente y por otra teniendo en cuenta las semanas de cultivo.

Una vez sabido qué grupo de los tres era el mejor para la producción de cardenólidos se consideraron conjuntamente los datos del grupo elegido teniendo en cuenta las 6 semanas de cultivo también en conjunto. Elegimos este grupo y no el tercero porque el estudio se había realizado sin tener en cuenta las semanas individualmente; sin embargo esto no afecta a la interpretación de los resultados de este trabajo, ya que el análisis de la regresión lineal múltiple señala cómo se relacionan las medidas estudiadas con la síntesis de cardenólidos según la base de una mayor productividad de estos metabolitos.

Así se obtuvo el hiperplano de regresión, con su coeficiente de correlación múltiple, que aparece en la Tabla R-19.

Si observamos el coeficiente de correlación múltiple al cuadrado obtenido deducimos que se produce un buen ajuste entre la producción de cardenólidos por parte de los callos crecidos en los medios más productivos y las medidas estudiadas. Por tanto, podemos decir que la síntesis de cardenólidos realmente depende de las medidas estudiadas. Además, observando el hiperplano de regresión deducimos que la medida que influye más positivamente, y de modo destacado con respecto al resto de medidas, sobre dicha síntesis es el enzima responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol, cuyo coeficiente positivo es el más elevado.

En las Figuras R-39 y R-40 se pueden comparar los valores obtenidos para la actividad del complejo enzimático P450_{scc} y los cardenólidos totales y Digitoxina respectivamente. En la Figura R-39 se observa que el efecto del Fenobarbital sobre los cardenólidos totales alcanza su máximo nivel en la 3ª muestra, tanto en el medio AIA como en el ANA; si comparamos con la actividad P450_{scc} en los medios AIA Pb y ANA Pb, observamos que la máxima actividad de este complejo enzimático se da también en la 3ª muestra en ambos medios, y se mantiene durante todo el experimento, lo cual podría hacernos pensar que estos altos niveles de cardenólidos no serían consecuencia de un retardo en la degradación sino de una

RESULTADOS Y DISCUSION

activación de su síntesis debida al Fenobarbital.

También observamos que poseen coeficiente positivo alto la actividad de la NADPH-citocromo P450 reductasa microsomal seguida por las Proteínas microsomales y mitocondriales y el citocromo P450 mitocondrial, implicado en la rotura de la cadena lateral del colesterol. En cuanto al citocromo P450 microsomal es el único parámetro con signo negativo; esto podría interpretarse diciendo que los niveles de citocromo P450 microsomal, y también mitocondrial, no actuarían como limitantes, y que el parámetro decisivo es la actividad enzimática.

Como resumen de este análisis de la regresión lineal múltiple podemos afirmar que existe una relación directa entre la actividad del complejo enzimático P450_{scc} y la síntesis de cardenólidos, y que las demás medidas están relacionadas aunque no directamente con dicha síntesis.

TABLA R-19

Ecuación del hiperplano de regresión

$$Y = -0,85892 + 5,8792X_1 + 10,110X_2 + 14,469X_3 + 0,11194X_4 - 0,64216X_5 + 38,932X_6$$

Valor del coeficiente de correlación al cuadrado

$$R^2 = 0,71731$$

Medios : AIA = ANA = ANA Gb = ANA Gb Pb
Semanas: 1ª - 6ª

Abreviaturas:

Y = Contenido en cardenólidos

X₁ = Contenido en proteínas mitocondriales

X₂ = Contenido en proteínas microsomales

X₃ = Actividad NADPH citocromo P450 reductasa

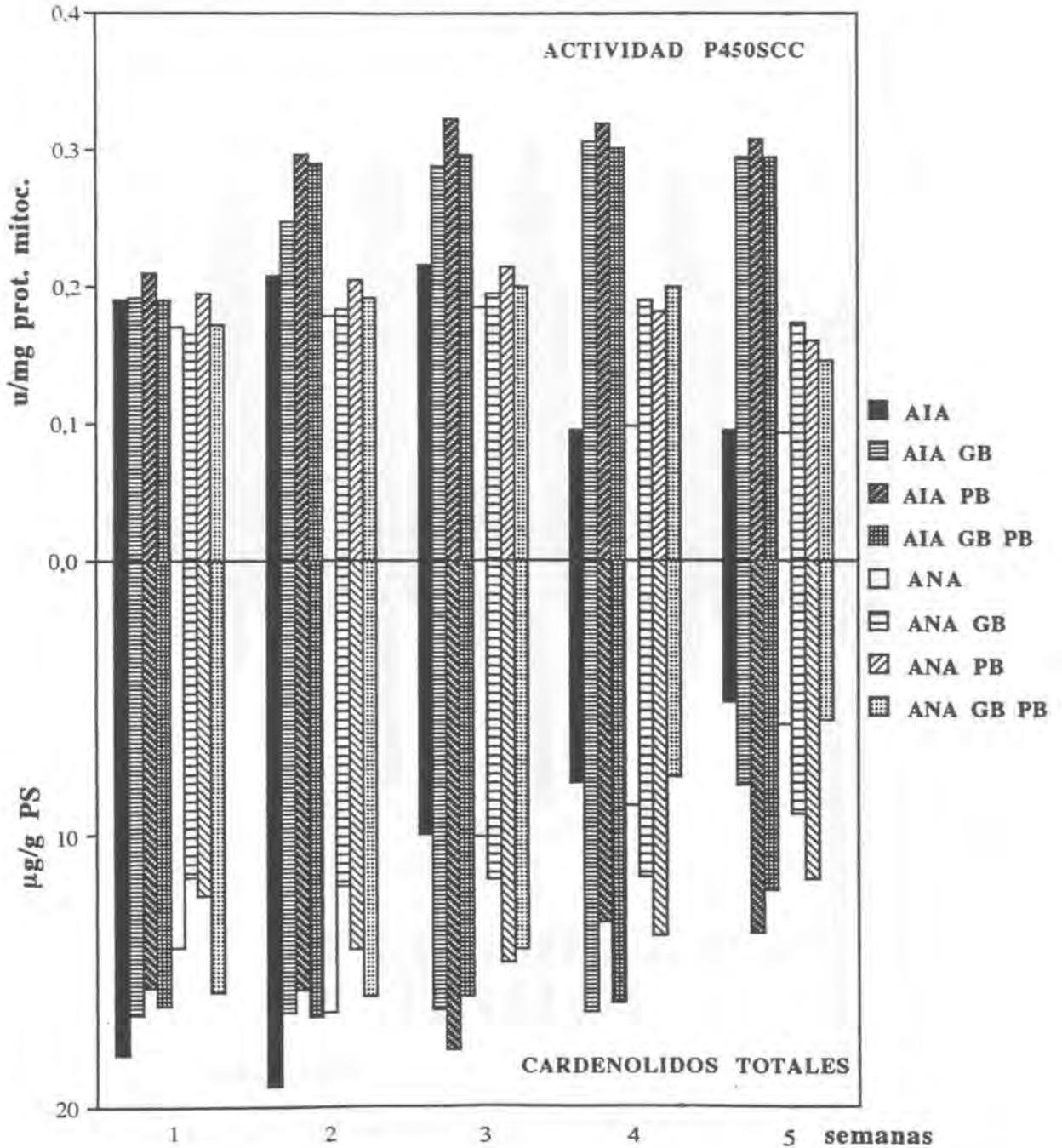
X₄ = Contenido en citocromo P450 mitocondrial

X₅ = Contenido en citocromo P450 microsomal

X₆ = Actividad del complejo responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol

FIGURA R-39

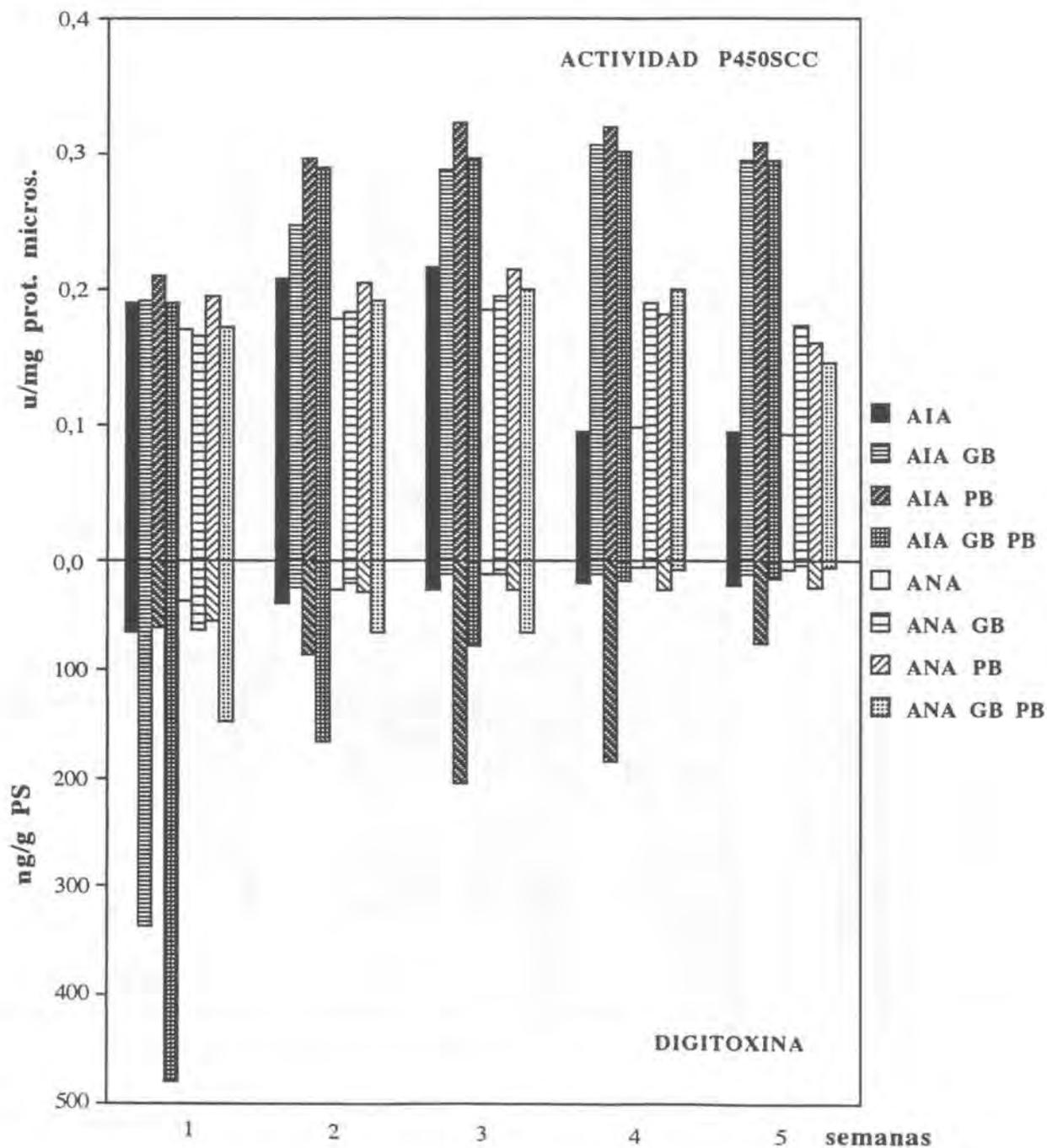
Comparación entre la actividad del complejo enzimático P450_{scc} y el contenido en cardenólidos totales durante las 5 primeras de cultivo.



RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-40

Comparación entre la actividad del complejo enzimático P450_{sc} y el contenido en Digitoxina durante las 5 primeras semanas de cultivo.



IV. CONSIDERACIONES FINALES

IV. CONSIDERACIONES FINALES

1º) En cuanto a la morfología, crecimiento y diferenciación de los callos podemos deducir:

a) La auxina de síntesis ANA produce un mayor crecimiento y una menor diferenciación que el AIA en los callos de *Digitalis purpurea*.

b) La Gb añadida a los medios básicos utilizados (AIA o ANA) produce un aumento del tamaño de los callos y su acción sobre la diferenciación depende de su interacción con la auxina del medio.

c) El Pb reduce el crecimiento de los callos al adicionarlo a los medios AIA o ANA y su acción sobre la diferenciación interacciona con la clase de auxina, ya que, reduce el número de callos con organogénesis al adicionarlo al medio AIA y lo aumenta al adicionarlo al medio ANA.

d) La adición conjunta de GB y Pb disminuye la necrosación de los callos (acción Gb) y aumenta el índice de organogénesis (acción Pb) en ambos medios, es decir, la Gb no permite la inactivación por necrosación de los callos y el Pb provoca la diferenciación.

2º) De la observación de la histología y la ultraestructura de los callos podemos deducir:

a) La auxina sintética ANA provoca la formación de grandes espacios intercelulares en los tejidos de callo lo cual significa que los tejidos son comparativamente más adultos que los de los callos crecidos en AIA con menores espacios intercelulares.

CONSIDERACIONES FINALES

b) La adición de Gb a ambos medios produce un aumento del tamaño de las células dando lugar a la formación de grandes vacuolas, e inhibe la diferenciación manteniendo el estado juvenil de los tejidos; incrementa la cantidad de RE y mantiene la organización de los cloroplastos.

c) La adición de Pb a los medios básicos en las cantidades utilizadas en este trabajo reduce el tamaño de las células cuyas vacuolas son notablemente menores, provoca la formación de áreas meristemáticas y el desarrollo de tejido conductor, aunque también produce la necrosación más temprana de los callos. Posee una acción positiva sobre la formación de RE, mitocondrias y microcuerpos, mientras que desorganiza los cloroplastos en los cuales no se observa almidón pero sí gran cantidad de plastoglobulos.

d) La adición conjunta de Gb y Pb produce la formación de grandes zonas meristemáticas, es decir, que la Gb potencia en este sentido la acción del Pb, pero ambos interaccionan con el tipo de auxina, ya que al adicionarlos sobre ANA se potencian los efectos que la Gb ejerce sobre los orgánulos, mientras que al adicionarlos sobre AIA se potencian los efectos del Pb sobre la ultraestructura.

3º) De la comparación entre los callos crecidos en los medios AIA y ANA se deduce:

a) Las auxinas AIA y ANA estadísticamente tienen la misma influencia sobre los niveles de proteínas mitocondriales y microsomales, pero el ANA incrementa mucho más significativamente que el AIA el contenido de los citocromos P450 mitocondrial y microsomal; la actividad de la NADPH-citocromo P450 reductasa es ligeramente superior en ANA mientras que la actividad del complejo enzimático P450_{scc} es ligeramente inferior en este medio respecto a la de los callos crecidos en AIA. Los cardenólidos siguen exactamente la misma pauta que la actividad del complejo enzimático P450_{scc} en ambos medios, mientras que la digitoxina es significativamente inferior en ANA; de ello se puede deducir que existe relación directa entre la actividad del complejo enzimático P450_{scc} y la síntesis de cardenólidos en ambos medios.

b) La adición de Gb incrementa las proteínas mitocondriales y microsomales, el citocromo P450 microsomal y el mitocondrial; también se incrementa la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa y la del complejo enzimático P450_{scc} especialmente en la segunda mitad del experimento. Los niveles de cardenólidos no superan el máximo contenido hallado en la prueba control, pero son muy superiores a los de los callos AIA en la segunda mitad del experimento; los niveles de digitoxina, excepto en la primera muestra, no alcanzan los

CONSIDERACIONES FINALES

niveles de los callos control. Es decir, los niveles de cardenólidos y la actividad del complejo enzimático P450_{scc} siguen la misma pauta, lo cual nos indica de nuevo una relación entre estos parámetros.

c) La adición de Pb interacciona con la auxina del medio; si se adiciona al medio AIA incrementa muy significativamente los niveles de proteínas mitocondriales y microsomales y de citocromo P450 mitocondrial, mientras que disminuye los niveles de citocromo P450 microsomal. La actividad del complejo enzimático P450_{scc} y de la NADPH-citocromo P450 reductasa se incrementan en la segunda mitad del experimento. Los cardenólidos y la digitoxina se incrementan también siguiendo la pauta de la actividad del complejo enzimático P450_{scc}. De lo cual podemos deducir que las actividades del complejo enzimático P450_{scc} y de la NADPH-citocromo P450 reductasa parecen estar directamente relacionadas con la cantidad de cardenólidos totales y de digitoxina en particular.

El Pb adicionado al medio ANA aumenta ligeramente las cantidades de proteínas mitocondriales y microsomales, y aumenta extraordinariamente los citocromos P450 mitocondrial y microsomal; en cuanto a la actividad del complejo enzimático P450_{scc} se muestra ligeramente superior respecto al control y no afecta significativamente a la de la NADPH-citocromo P450 reductasa. Los cardenólidos, aunque no alcanzan los niveles del control excepto en la segunda semana, siguen la misma pauta de activación del complejo P450_{scc}. De lo cual podemos deducir también que la actividad del complejo enzimático P450_{scc} está directamente relacionada con la síntesis de cardenólidos y de digitoxina.

d) La adición conjunta de Gb y Pb también interfiere con la auxina del medio, si se adicionan sobre AIA incrementan significativamente las proteínas mitocondriales y microsomales y también los citocromos P450 mitocondrial y microsomal; la actividad del complejo P450_{scc} en general está incrementada, y la de la NADPH-citocromo P450 reductasa también. Los cardenólidos no alcanzan los valores control pero siguen las pautas del complejo P450_{scc}, la digitoxina es considerablemente más alta en las primeras muestras lo cual parece indicar que los efectos del Gb y Pb se adicionan al principio del experimento, y remarcan la relación entre la actividad del complejo P450_{scc} y la formación de cardenólidos.

Si se adicionan sobre ANA, la Gb y el Pb producen una disminución de las proteínas microsomales y apenas tienen efecto sobre las mitocondriales. Aumentan extraordinariamente el citocromo P450 mitocondrial y en general también el microsomal. Se incrementan las actividades NADPH-citocromo P450 reductasa y del complejo enzimático P450_{scc} y los cardenólidos siguen la pauta de la actividad de este último enzima. En cuanto a la digitoxina es extraordinariamente superior a la del control durante las tres primeras semanas y ligeramente inferior después. Se puede deducir un paralelismo entre la actividad del complejo P450_{scc} y la síntesis de cardenólidos.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- 1^a De las dos auxinas ensayadas, la natural AIA da mayor diferenciación en yemas de raíz y parte aérea y también mayores contenidos en cardenólidos.
- 2^a La Giberelina GA₃ aumenta el crecimiento de los callos. Su acción sobre la diferenciación depende de la auxina del medio. Incrementa muy ligeramente la actividad del complejo P450_{scc} y se evidencia un paralelismo entre esta actividad y el contenido en cardenólidos, aunque no existe estadísticamente una acción directa de la Giberelina sobre la síntesis de estas sustancias.
- 3^a El Fenobarbital disminuye el crecimiento pero incrementa la organogénesis. Influye positivamente sobre el número de mitocondrias y retículo endoplasmático, activa los enzimas NADPH-citocromo P450 reductasa y el complejo P450_{scc} y paralelamente al incremento de actividad de este último enzima se potencia la síntesis de cardenólidos. Estos efectos se manifiestan con mayor intensidad en el medio AIA que en el ANA.
- 4^a Los efectos de la Giberelina GA₃ y el Fenobarbital son, en general, aditivos, la Giberelina impide la necrosación de los tejidos incrementando las propiedades organogenéticas del Fenobarbital. Se incrementa el número de mitocondrias y se evita la degradación de estructuras. Aumenta la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa y la del complejo P450_{scc} y paralelamente a esta última actividad se incrementan los niveles de cardenólidos, especialmente en la primera mitad del experimento. El efecto es más evidente en el medio AIA que en el ANA.

CONCLUSIONES

- 5^a La Giberelina posee un gran efecto sobre el nivel de digitoxina durante la primera semana del cultivo de callo, aunque no se ha podido relacionar con ninguno de los parámetros estudiados.
- 6^a Las cantidades de proteínas mitocondriales y microsomales, de citocromo P450 mitocondrial y microsomal, y la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa no están directamente relacionadas con la síntesis de cardenólidos.
- 7^a Se evidencia una relación directa entre la actividad del complejo enzimático P450_{scc} y la síntesis de cardenólidos en el cultivo de callo de *Digitalis purpurea*.

VI. BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

ABERHART, D.J.; LLOYD-JONES, J.G. (1973)

Biosynthesis of cardenolides in *Digitalis lanata*.

Phytochemistry 12, 1065-1071

ADELE, P.; REICHHART, D.; SALAÜN, J.P.; BENVENISTE, I.; DURST, F. (1981)

Induction of cytochrome P-450 and monooxygenase activity by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in higher plant tissue.

Plant Sci. Lett. 22: 39-46

ADES, I.Z. (1990)

Heme production in animal tissues: the regulation of biogenesis of δ -aminolevulinate synthase.

Int. J. Biochem. 22, 565-578

ALANI, A.A.; LUSTER, D.G.; DONALDSON, R.F. (1990)

Development of endoplasmic reticulum and glyoxisomal membrane redox activities during Castor Bean germination.

Plant. Physiol. 94: 1842-1848

ALFERMANN, A.W.; BOY, H.M.; DÖLLER, P.C.; HAGEDORN, W.; HEINS, M.; WALH, J.; REINHARD, E. (1977)

Biotransformation of cardiac glycosides by plant cell cultures.

En: Plant tissue culture and its biotechnological application. Barz, W.; Reinhard, E.; Zenk, M.H. eds. Springer. pp. 125-141

ALFERMANN, A.W.; SCHULLER, I.; REINHARD, E. (1980a)

Biotransformation of digitoxin and β -methyldigitoxin by immobilized cells of *Digitalis lanata*.

Planta Med. 39, 281

ALFERMANN, A.W.; SCHULLER, I.; REINHARD, E. (1980b)

Biotransformation of cardiac glycosides by immobilized cells of *Digitalis lanata*.

Planta Med. 40, 218-223

BIBLIOGRAFIA

ALTHAUS, F.R.; MEYER, U.A. (1981)

Effects of Phenobarbital, β -naphthoflavone, dexamethasone, and formamidoxime on the turnover of inducible microsomal proteins in cultured hepatocytes.

The journal of biological chemistry vd. 256, n^o 24, pp. 13079-13084

AMMIRATO, P.V. (1983)

Embryogenesis

En: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. y Yamada, Y. (ed): *Handbook of Plant Cell Culture, vol. I. Techniques for propagation and breeding*, pp. 82-123, MacMilln, Neww York.

ANASTASIA, M. (1977)

Mechanism of 14 β -hydroxylation in the biosynthesis of cardenolides: The role of 14 β -cholest-5-en-3 β -ol.

Phytochemistry 16, 1082-1083

ANDERS, M.W. (1985)

Bioactivation of foreign compounds

Academic Press. New York, pp. 540

ARCHAOV, A.I.; BACHMANOVA, G.I.; UVAROV, V.Y. (1980)

Interactions of cytochrome P-450 and regulation phospholipid bilayer.

En: *Biochemistry, Biophysics and regulation of cytochrome P-450*. Gustafsson, J.A.; Carls-
tedt-Duke, J.; Mode, A.; Rafter, J. eds.

pp. 551-558. Elsevier/North-Holland. Amsterdam

BABU, K.N.; SAMSUDDEN, K.; RATNAMBAL, M.J. (1992)

In vitro plant regeneration from leaf derived callus in Ginger (*Zingiber officinale* Rosc).

Plant cell tissue and organ culture, vol.29, 2, pp.71-74

BAJAJ, Y.P.S. (1974)

Protoplast isolation, culture and somatic hybridization.

En: *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Capitulo IV*.
Editado por J.Reinert y Y.P.S.Bajaj. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. Neww York. 1977.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A. (1988)

Medicinal, aromatic and industrial materials from plants.

Biotechnology in agriculture and forestry 4. Springer-Verlag.

BENNET ,R.D.; HEFTMANN, E. (1965a)

In vivo conversion of squalene to β -sitosterol

Phytochemistry 4: 475-479

BENNETT, R.D.; HEFTMANN, E. (1965b)

Progesterone: Biosynthesis from pregnenolona in *Hollarrhena floribunda*.

Science vol. 149, pp. 652-653

- BENNET, R.D.; SAUER, H.H.; HEFTMANN, E. (1968)
Progesterone metabolism in *Digitalis lanata*
Phytochemistry 7: 41-50
- BENVENISTE, P. (1986)
Sterol biosynthesis
Ann. Rev. Plant Physiol. 37: 275-308
- BENVENISTE, I.; GABRIAC, B.; DURST, F. (1986)
Purification and characterization of the NADPH-cytochrome P-450 (cytochrome c) reductase from higher plant microsomal fraction.
Biochem. J. 235: 365-373
- BENVENISTE, P.; HIRTH, L.; OURISSON, G. (1966)
La biosynthèse des sterols dans les tissus de tabac cultivés in vitro.
I. Isolement des sterols et de triterpènes.
Phytochemistry 5: 31-44
- BENVENISTE, I.; LESOT, A.; HASENFRATZ, M.P.; DURST, F. (1989)
Immunochemical characterization of NADPH-cytochrome P-450 reductase from Jerusalem artichoke and other higher plants.
Biochem. J. 259, 847-853
- BENVENISTE, I.; LESOT, A.; HASENFRATZ, M.P.; KOCHS, G.; DURST, F. (1991)
Multiple forms of NADPH-cytochrome P-450 reductase in higher plants.
Biochem. and Biophys. research communications. Vol 177, n° 1, pp. 105-112
- BENVENISTE, I.; SALAÜN, J.P.; DURST, F. (1977)
Wounding induced cinnamic acid hydroxylase in Jerusalem artichoke tubers.
Phytochemistry 16: 69-73
- BENVENISTE, I.; SALAÜN, J.P.; DURST, F. (1978)
Phytochrome mediated regulation of a monooxygenase hydroxylating cinnamic acid in etiolated pea seedlings.
Phytochemistry 17: 359-363
- BENVENISTE, I.; SALAÜN, J.P.; SIMON, A.; REICHHART, D.; DURST, F. (1982)
Cytochrome P-450 dependent ω -hydroxylation of lauric acid by microsomes from pea seedlings.
Plant. Physiol. 70, 122-126
- BERA, T.K.; ROY, S.C. (1993)
Micropropagation of *Tylophora indica* (Burm F) Merr. by multiple bud formation from mature leaf explants without callus intervention.
Botanical bulletin of Academia Sinica, vol.34, 1, pp.83-87

BIBLIOGRAFIA

- BERGGREN ,B.; OHLSSON, A.B. (1991)
Ultrastructure of *Digitalis lanata* tissue cultures.Effect of gibberellic acid ad SAN 9789.
Protoplasma 161: 58-69
- BHOJWANI, S.; COHEN, D.; FRY, P. (1992)
Production of virus free garlic and field performance of micropropagated plants.
Science Hort. 18, 39-43
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. (1983)
Clonal propagation.
En: *Developments in crop science (5). Plant tissue culture: Theory and practice. Ch.15, pp.326. Elsevier. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.*
- BLACK, S.D. (1992)
Membrane topology of the mammalian P-450 cytochromes.
Faseb,J. 6, 674-679
- BLACK, S.D.; FRENCH, J.S.; WILLIAMS,C.H.; COON, M.J.(1979)
Role of a hydrophobic polypeptide in the N-terminal region of NADPH-cytochrome P-450 reductase in complex formation with P-450LM.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 91: 1528-1535
- BOADA, M. (1988)
Obtenció de principis amb activitat teraèutica mitjançant cultius vegetals *in vitro*.
Tesina. Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal Sanitaria i Edafologia. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.
- BOHM, H. (1980)
The formation of secondary metabolites in plant tissue and cell cultures.
Intern. Rev. Cytol. Suppl. 116: 183-208
- BOLOGNESI, R.; TSIALTAS, D.; MANCA, C. (1992)
Digitalis and heart failure. Does *Digitalis* really produce beneficial effects through a positive inotropic action?
Cardiovascular drugs and therapy vol.6, 5, pp.459-464
- BORCHERT, R. (1965)
Gibberellic acid and rejuvenation of apical meristems in *Acacia melanaxylon*
Naturwissenschaften 52: 6568
- BORNHEIM,M.; CORREIA, M.A. (1986)
Fractionation and purification of hepatic microsomal cytochrome P-450 isoenzymes from phenobarbital-pretreated rats by HPLC.
Biochem. J. 239, 661-669

BIBLIOGRAFIA

- BOZAK, K.R.; YU, H.; SIREVAG, R.; CHRISTOFFERSEN, R.E. (1990)
Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3904-3908
- BRADFORD, M.M. (1976)
A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72: 248-254
- BRISA, M.C.; PEREZ-BERMUDEZ, P.; FALCO, J.M.; SEGURA, J. (1991)
Morphogenesis and cardenolide formation in *Digitalis obscura*.
J. Plant. Physiol. 137 (5) 635-637
- BROCKENBROUGH, J.S.; MEYER, S.A.; LI, CH.; JIRTLE, R.L. (1991)
Reversible and phorbol ester specific defect of protein kinase C translocation in hepatocytes isolated from phenobarbital treated rats.
Cancer Res. 51, 130-136
- BROWN, R.E.; CUNNINGHAM C.C. (1982)
Negatively charged phospholipid requirement of the oligomycin-sensitive mitochondrial ATPase.
Biochem. Biophys. Acta 684: 141-145
- BÜCHNER, S.A.; STABA, E.J. (1964)
Preliminary chemical examination of *Digitalis* tissue cultures for cardenolides.
J. Pharm. Pharmacol. 16, 733-737
- BURSTEIN, S.; MIDDLEDITCH, B.S.; GUT, M. (1975)
Mass spectrometric study of the enzymatic conversion of cholesterol to (22R)-22-hydroxycholesterol, (20R-22R)-20,22-dihydroxycholesterol and of (22R)-22-hydroxycholesterol to the glycol and pregnenolone in bovine adrenocortical preparations: Mode of oxygen incorporation.
J. Biol. Chem. 250: 9028-9037
- BUTLER, J.E.; PETERMAN, J.H.; SUTER, M.; DIERKS, S.E. (1987)
The immunochemistry of solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assays.
Federation Proc. 46: 2548-2556
- BUTTERWORTH, P.J. (1983)
Different kinds of enzyme determination.
En: Methods of enzymatic analysis. vol. III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases. Ed. Bergmeyer H.V. 3^a ed. Verlag Chemie. Weinheim. pp.2-17
- CAPDEVILA, J.H.; FALCK, J.R.; ESTABROOK, R.W. (1992)
Cytochrome P450 and the arachidonate cascade.

FASEB J. 6, 731-736

CASPI, E.; HORNBY, G.M. (1968)

Biosynthesis of plant sterols. III. mechanism of saturation of ring B in pregnenolone during its conversion to digitoxigenin in *Digitalis lanata*.

Phytochemistry 7: 423-427

CASPI, E.; LEWIS, D.O. (1967)

Progesterone: its possible role in the biosynthesis of cardenolides in *Digitalis lanata*.

Science, 156, 519-520

CASPI, E.; LEWIS, D.O. (1968)

Biosynthesis of plant sterols-IV: An investigation of a possible mode of 14 β -hydroxylation in digitoxigenin.

Phytochemistry 7: 683-691

CASPI, E.; LEWIS, D.O.; PIATAK, D.M.; THIMANN, K.V.; WINTER, A. (1966)

Biosynthesis of plant sterols. Conversion of cholesterol to pregnenolone in *Digitalis purpurea*.

Experientia 8: 506-507

CASPI, E.; WICKRAMASINGHE, J.A.; LEWIS, D.O. (1968)

The role of deoxycorticosterone in the biosynthesis of cardenolides in *Digitalis Lanata*.

Biochem. J. 108, 499

CELLAROVA, E.; HONCARIV, R. (1991)

The influence of N⁶-[2-isopentenyl]adenine on shoot differentiation in *Digitalis purpurea* L. tissue cultures.

Acta Biotechnologica 11, 4, 331-334

CLARKE, C.J.; COBB, P.H. (1979)

Two-dimensional thin layer chromatography of *Digitalis* cardenolides using a continuous development technique.

Journal of chromatography, 168, 541-549

COLEMAN, R. (1973)

Membrane-bound enzymes and membrane ultrastructure.

Biochem. Biophys. Acta. 300: 1-30

COON, M.J.; DING, X.; PERNECKY, S.J.; VAZ, A.D.N. (1992)

Cytochrome P450: progress and predictions.

The FASEB journal, vol. 6, pp. 669-673

CORCHETE, M.P.; JIMENEZ, M.A.; MORAN, M.; CACHO, M. (1991)

Effect of calcium, manganese and lithium on growth and cardenolide content in cell-suspension cultures of *Digitalis thapsi* L.

Plant cell reports, vol.10, 8, pp. 394-396

CORCHETE, M.P.; SANCHEZ, J.M.; CACHO, M.; MORAN, M.; FERNANDEZ, J. (1990)
Cardenolide content in suspension cell cultures derived from root and leaf of *Digitalis thapsi*.
J. Plant Physiol. 137:196-200

CORDUAN, G. (1975)
Produktion von tropanalkaloides in Gewebekulturen
Planta Med. suppl. n^o 22

CZYGAN, F.C. (1975)
Möglichkeiten zur produktion von arzneistoffen durch pflanzliche gewerkulturen.
Planta Medica Suppl. 169-185

CHARLES, H.; WILLIAMS, J.R. (1976)
Flavin-containing dehydrogenases.
En: The enzymes. Vol. XIII 3rd. ed. P.D. Boyer ed. Acad. Press. New York. pp.: 165-173.

CHASAN R. (1991)
Shedding lighth on phytochrome
Plant Cell. 4: 551-552

CHAUAN, V.P.; BROCKERHOFF, H. (1987)
Phenobarbital competes with diacylglycerol for protein kinase C.
Life Sci. 40, 1, 89-93

CHILTON, M.D. (1983)
A vector for introducing new genes into plants.
Sci. Am. 248, 50-59

CHRISTOU, M.; WILSON, N.M.; JEFCOATE, C.R. (1987)
Expression and function of three cytochrome P-450 isozymes in rat extrahepatic tissues.
Arch. Biochem. Biophys. 258, 519-534

DANNAN, G.A.; GUENGERICH, F.P.; KAMINSKY, L.S.; AUST, S.D. (1983)
Regulation of cytochrome P-450. Immunochemical quantitation of eight isozymes in liver microsomes of rats treated with polybrominated biphenyl congeners.
J. Biol. Chem. 258, 1282-1288

DAVIES, K.L.; DAVIES, M.S.; FRANCIS, D. (1992)
Vacuolar development in the root meristem of *Festuca rubra* L.
New. Phytol. 121, 581-585

DEAN, W.L.; COON, M.J. (1977)
Immunochemical studes on two electrophoretically homogeneous forms of rabbit liver

BIBLIOGRAFIA

microsomal cytochrome P-450: P-450 LM₂ and P-450 LM₄.
J. Biol. chem. 252: 3255

DELUCA, M.E.; SELDES, A.M.; GROS, E.G. (1989)
Biosynthesis of digitoxin in *Digitalis purpurea*.
Phytochemistry 28, 1, 109-111

DESTA, B.; KWONG, E.; McERLANE, K.M. (1982)
Separation of digoxin, digitoxin and their potential metabolites, impurities or degradation products by HPLC.
J. of Chrom. 240, 137-143

DEVYS, M.; BARBIER, M. (1967)
Isolement du pollinastanol et d'une série de delta-7-stéroïdes des pollens et deux composées.
Bull. Soc. Chim. Biol. 49: 865-871

DIETRICH, B.; ASTER, U.; GREIDZIAK, N.; ROOS, W.; LUCKNER, M. (1987a)
Glucosylation of digitoxin and other cardenolides in cell cultures of *Digitalis lanata*.
Biochem. Physiol. Pflanz. 182, 245-255

DIETRICH, B.; HAACK, U.; POPOV, A.S.; BUTENKO, R.G.; LUCKNER, M. (1985)
Long term storage in liquid nitrogen of an embryogenic strain of *Digitalis lanata*.
Biochem. Physiol. Pflanzen 180: 33-43

DIETRICH, B.; MERTINAT, H., LUCKNER, M. (1990)
Formation of *Digitalis lanata* clone lines by shoot tip culture.
Planta Médica v. 56 (1): pp. 53-58

DIETRICH, B.; MERTINAT, H.; LUCKNER, M.; BREUEL, K.; DAUTH, C. (1987b)
Die Gewinnung von klonlinien aus *Digitalis lanata*.
Hochleistungspflanzen durch Sproßspitzenkultur. Wiss.Z.Univ.Halle 36M5,90-120

DIETRICH, B.; NEUMANN, D.; LUCKNER, M. (1980)
Protoplast-derived clones from cell cultures of *Digitalis purpurea*.
Planta Med. 38: 375-382

DIETRICH, B.; NEUMANN, D.; LUCKNER, M. (1982a)
Clonation of protoplast-derived cells of *Digitalis lanata* suspension cultures.
Biochem. Physiol. Pflanzen 177: 176-183

DIETRICH, B.; STEUP, C.; NEUMANN, D.; SCHEIBNER, H.; REINBOTHE, C.; LUCKNER, M. (1986)
Morphogenetic capacity of cell strains derived from filament, leaf and root explants of *Digitalis lanata*.
J. Plant. Physiol. 124, 441-453

- DIMITRIADIS, V.K. (1993)
Cytochrome P-450 immunocytochemical characterization in liver cells of rabbit. Induction with phenobarbital.
European Journal of Histochemistry, vol.37, 1, pp.65-73
- DONALDSON, R.P.; LUSTER, D.G. (1991)
Multiple forms of plant cytochromes P-450.
Plant. Physiol. 96, 669-674
- DOUGALL, D.K. (1980)
Nutrition and metabolism in plant tissue culture as a source of biochemicals.
Academic Press, New York
- DRAKENBERG, T.; BRODELIUS, P.; McINTYRE, D.D.; VOGEL, H.J. (1990)
Structural studies of digitoxin and related cardenolides by two-dimensional NMR.
Can. J. Chem. 68, 272
- DUCHÊNE MARULLAZ, P. (1991)
Digitalis: is there a future for this classical ethnopharmacological remedy?.
J. of Ethnopharmacol. 32, 111-111
- DUNN, T.J.; KOLESKE, A.J.; LINDHAL, R.; PITOT, H.C. (1989)
Phenobarbital inducible aldehyde dehydrogenase in the rat.
J. Biol. Chem. 264, 13057-13065
- DURST, I.; BENVENISTE, I.; SALAÛN, J.P.; WERCK-REICHHART, D. (1992)
Function, mechanism and regulation of cytochrome P-450 enzymes in plants.
Biochem. Soc. Trans. Vol 20, pp.353-357
- DWARKI, V.J.; FRANCIS, V.N.K.; BHAT, G.J.; PADMANABAN, G. (1987)
Regulation of cytochrome P-450 messenger RNA and apoprotein levels by heme.
J. Biol. Chem. 262, 16958-16962
- ECKL, P.M.; MEYER, S.A.; WHITCOMBE, W.R.; JIRTLE, R.L. (1988)
Phenobarbital reduces EGF receptors and the ability of physiological concentrations of calcium to suppress hepatocyte proliferation.
Carcinogenesis 9, 479-483
- EDWARDS, R.J.; MURRAY, B.P.; BOOBIS, A.R.; DAVIES, D.S. (1989)
Identification and location of α -helices in mammalian cytochromes P-450.
Biochemistry 28, 3762-3770
- ELIAS, H.; HENNIG, A.; SCHWARTZ, D.E. (1971)
Stereology: applications to biomedical research.
Physiological Reviews, 51, 158-200

BIBLIOGRAFIA

- ELIASSON, E.; JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. (1990)
Substrate, hormone and cAMP regulated cytochrome P-450 degradation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3225-3229
- EUW, J.V.; REICHSTEIN, T. (1964)
Die Biosynthese des Digitoxigenins, Herkunft des C-20.
Helv. chim. Acta 47, 711-724
- EUW, J.V.; REICHSTEIN, T. (1966)
Biosynthese der Digitoxose in *Digitalis lanata* EHRH.
Helv. chim. Acta 49, 1477-1483
- EVANS, F.J. (1973)
Alkanes of *Digitalis purpurea* leaves.
Planta Médica 24,2, 101-106
- EVANS, F.J.; COWLEY, P.S. (1972a)
Variation in cardenolides and saponinogenins in *Digitalis purpurea* during germination.
Phytochemistry 11, pp. 2729-2733
- EVANS, F.J.; COWLEY, P.S. (1972b)
Cardenolides and spirostanols in *Digitalis purpurea* at various stages of development.
Phytochemistry 11, pp. 2971-2975
- EVERETT N.P.; WANG, T.L.; GOULD, A.R.; STREET, M.E. (1981)
Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells.2. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).
Protoplasma 106: 15-22
- FISCHER, R.T.; TRZASKOS, J.M.; MAGOLDA, L.R.; KO, S.S.; BROSZ, C.S.; LARSEN, B. (1991)
Lanosterol 14 α -methyl demethylase: isolation and characterization of the third metabolically generated oxidative demethylation intermediate.
J. Biol. Chem. 266, 6124-6132
- FITCH, M.M. (1993)
High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from Papaya hypocotyl callus.
Plant cell tissue and organ culture, vol.32, 2, pp.205-212
- FONNE, R. (1985)
Intervention du cytochrome P450 des végétaux supérieurs dans l'oxydation de composés exogènes: l'aminopyrine et le chlortoluron.
Thesis Université Louis Pasteur, Strasbourg.

- FONNE-PFISTER, R.; SIMON, A.; SALAUM, J.P., DURST, F. (1988)
Xenobiotic metabolism in higher plants. Involvement of microsomal cytochrome P-450 by the drug methoxsalen.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 236: 237-247
- FONT QUER, P. (1962)
Digitalis purpurea L.
Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado. Pag. 619
- FOUIN-FORTUNET, H.; TINEL, M.; DESCARTOIRE, V.; LETTERON, P.; LARREY, D.; GENEVE, J.; PESSAYRE, D. (1986)
Inactivation of cytochrome P-450 by the drug methoxsalen.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 236: 237-247
- FOWLER, M.W. (1982)
Substrate utilisation by plant cell cultures.
J. Chemical Technology and Biotechnology 32: 338-348.
- FRANKLIN, M.R. (1977)
Inhibition of mixed function oxidations by substrates forming reduced cytochrome P-450 metabolic intermediate complexes.
Pharmacol. Ther. 2:227-245
- FRANZ, G.; HASSID, W.Z. (1967)
Biosynthesis of digitoxose and glucose in the purpurea glycosides of *Digitalis purpurea*.
Phytochemistry 6, 841-844
- FREAR D.S.; SWANSON, H.R.; TANAKA, F.S. (1969)
N-demethylation of substituted 3-[phenyl]-1-methyl ureas: Isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton.
Phytochemistry 8: 2157-2169
- FUENTE, J.A. (1992)
Producción de cardenólidos en cultivos *in vitro* de *Digitalis*. Acción de las auxinas y el Fenobarbital.
Tesina. Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal Sanitaria y Edafología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- FUJII, Y.; FUJII, H.; YAMAZAKI, M. (1983)
Separation and determination of cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves by micro HPLC.
J. of Chrom. 258, 147-153
- FUJII, Y.; FUKUDA, H.; SAITO, Y.; YAMAZAKI, M. (1980)
Separation of digitalis glycosides by micro HPLC.

BIBLIOGRAFIA

J. of chrom. 202. 139-143

FUJITA, M.; OBA, K.; URITANI, I. (1982)

Properties of mixed function oxygenase catalyzing ipomeamarone 15-hydroxylation in microsomes from cut-injured and *Ceratocystis fimbriata* infected sweet potato root tissue. *Plant. Physiol.* 70: 573-578

FULLERTON, D.S. (1977)

Steroids and therapeutically related compounds.

En: Wilson, C.O.; Giswold, O. *Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry* 7th. ed., J.B. Lippincot Ed., Philadelphia.

FUNK, C.; GUGLER, K.; BRODELIUS, P (1987)

Increases secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor).

Phytochemistry 26, 2, pp.401-405

FURUYA, T.; KAWAGUCHI, K.; HIROTANI, M. (1973)

Biotransformation of progesterone by suspension cultures of *Digitalis purpurea* cultured cells. *Phytochemistry* vol. 12, pp. 1621-1626

FURUYA, T.; KAWAGUCHI, K.; HIROTANI, M. (1988)

Biotransformation of digitoxigenina by cell suspension cultures of *Strophantus gratus*. *Phytochemistry* 27, 7, pp.2129-2133

GABRIAC, B.; WERCK-REICHHART, D.; TEUTSCH, H.; DURST, F. (1991)

Purification and immunocharacterization of a plant cytochrome P-450: The cinamic acid 4-hydroxylase.

Arch. Biochem. Biophys. Vol. 288, n^o 1, pp. 302-309

GAMBORG, O.L., SHYULUK, J.P. (1981)

Nutrition media and characteristics of plant cell and tissue cultures.

En: *Plant tissue culture. Methods and Applications in Agriculture.* Ed. Trevor. A. Thorpe. Acad. Press. New York

GARVE, L.; LUCKNER, M.; VOGEL, E.; TEWES, A.; NOVER, L. (1980)

Growth, morphogenesis and cardenolide formation in long term cultures of *Digitalis lanata*. *Planta med.* 40: 92-103

GHEYSEN, G.; DAESE, P.; VAN MONTAQUE, M.; SCHELL, S. (1985)

DNA flux across genetic barriers: The crown gall phenomenon.

En: Hohn B, Denis ES, eds. *Genetic flux in plants. Plant gene research*, Springer Vienna New York, pp.12-47

BIBLIOGRAFIA

- GIBBONS, G.F.; GOAD, L.J.; GOODWIN, T.W. (1967)
The sterols of some marine red algae.
Phytochemistry 6: 677-683
- GIFFORD, E.M.; NITSCH, J.P. (1969)
Responses of tobacco Pith Undei to growth substances.
Planta 85, 1-10
- GIRI, A.; AHUJA, P.S.; KUMAR, P.V.A. (1993)
Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* wall.
Plant cell tissue and organ culture, vol.32, 2, pp.213-218
- GOAD, L.J. (1967)
Terpenoids in plants.
Ed. J.B. Pridham, Academic Press. London
- GOLDSMITH, S.R.; SIMON, A.B.; MILLER, E. (1992)
Effect of *Digitalis* on norepinephrine kinetics in congestive heart failure.
Journal of the american College of Cardiology, vol.20, 4, pp.858-863
- GOODWIN, T.W. (1974)
Prochirality in biochemistry.
Essays Biochem. 9: 104-60
- GOODWIN, T.W. (1979)
Biosynthesis of terpenoids
Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 369-404
- GOTOH, O.; TAGASHIRA, Y.; IKSUKA, T.; FUJI-KURIYAMA, Y. (1983)
Structural characteristics of cytochrome P-450. Possible location of the heme-binding cysteine in determined aminoacid sequences.
J. Biochem. 93: 807
- GRAVES, J.M.H.; SMITH, W.K. (1967)
Transformation of pregnenolone and progesterone by cultured plant cells.
Nature 214, 1248
- GRAND, C. (1984)
Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P-450 dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis.
FEBS Lett. 169: 7-11

- GREIDZIAK, N.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M. (1990)
Batch cultures of somatic embryos of *Digitalis lanata* in gaslift fermenters. Development and cardenolide accumulation.
Planta Med. 56(2): 175-178
- GROENEVELD, H.W.; VAN TEGELEN, L.J.P.; VERSLUIS, K. (1992)
Cardenolide and neutral lipid biosynthesis from malonate in *Digitalis lanata*.
Planta Med. 58, 239-244
- GROENEVELD, H.W.; VAN DEN BERG, B.; ELINGS, J.C.; SEYRENS, D.(1990)
Cardenolide biosynthesis from malonate in *Asclepias curassavica*.
Phytochemistry 29, 11, 3479-3486
- GROENEVELD, H.W.; BINNEKAMP, A.; SEYKENS, D. (1991)
Cardenolide biosynthesis from acetate in *Asclepias curassavica*.
Phytochemistry 30, 8, 2577-2585
- GROS, E.G.; LEETE, E. (1965)
Biosynthesis of plant steroids II. The distribution of activity in digitogenin derived from mevalonic acid-2-C¹⁴.
J. An. Chem. Soc. 87: 15
- GRUNWALD, C. (1975)
Plant sterols.
Ann. Rew. Plant Physiol. 26: 209-236
- GRUNWALD, C. (1980)
Secondary plant products.
Encyclopedia of plant physiology. New series. Vol. 8. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York
- GUENGERICH, F.P. (1992a)
Cytochrome P-450: advances and prospects.
The FASEB Journal vol. 6, pp. 667-668
- GUENGERICH, F.P. (1992b)
Characterization of human cytochrome P-450 enzymes.
FASEB J. 6, 745-748
- GUENGERICH, F.P. (1991)
Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes.
J. Biol. Chem. 266(16): 10019-10022

GUENGERICH, F.P.; MACDONALD, T.L. (1984)

Chemical mechanisms of catalysis by cytochromes P-450: A unified view.

Acc. Chem. Res. 17: 9-16

GUENGERICH, F.P.; DANNAN, G.A.; WRIGHT, S.T.; MARTIN, M.V.; KAMINSKY, L.S. (1982)

Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or β -naphthoflavone.

Biochemistry 21, 6019-6030

GUPTA, R.P.; LAPADULA, D.M.; ABOU-DONIA, M.B. (1990)

Purification and characterization of cytochrome P-450 isozymes from β -Naphthoflavone-induced adult hen liver.

Arch. Biochem Biophys. vol. 282, n^o 1, pp. 170-182

GURNY, L.; TABACCHI, R.; BAUD, C.; KAPETANIDIS, I. (1981)

Culture des calls de *Digitalis purpurea* II: Etude des métabolites dérivés du stérane.

Pharm. Acta Helv. 56, 49-54

GUTKINA, W.I.; MISHIM, V.M. (1986)

Immunochemical evidences that hexachlorobenzene induces two forms of cytochrome P-450 in the rat liver microsomes.

Chem. Biol. Interactions, 58: 57-68

HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; KISAKI, T. (1980)

Determination of digitoxin and digoxin contents in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several *Digitalis* species by radioimmunoassay.

Plant cell Physiol. 21: 1391-1404

HAGIMORI, M.; MATSUSOTO, T.; MIKAMI, Y. (1984a)

Digitoxin biosynthesis in isolated mesophyll cells and cultured cells of *Digitalis*.

Plant. Cell Physiol. 25: 947-953

HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; MIKAMI, Y. (1984b)

Jar fermenter culture of shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. using a revised medium.

Agric. Biol. Chem. 48: 965-970

HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; OBI, Y. (1982a)

Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture: effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media.

Plant. Physiol. 69, 653-656

BIBLIOGRAFIA

- HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; OBI, Y. (1982b)
Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot forming cultures of *Digitalis purpurea* grown in liquid media.
Plant cell. Physiol. 23: 1205-1211
- HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; OBI, Y. (1982c)
Effects of cultural conditions on digitoxin formation by shoot forming cultures of *Digitalis purpurea* grown in liquid media.
En: *Plant tissue culture. Fujiwara, A. Ed. Maruzen. Tokio, pp. 349-350*
- HAGIMORI M.; MATSUMOTO, T.; OBI, Y. (1983)
Effects of mineral salts, initial pH and precursors on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media.
Agric. Biol. Chem. 47: 565-571
- HAGMANN, M.L.; HELLER, W.; GRISEBACH, H. (1984)
Induction of phytoalexyn synthesis in soybean. Stereospecific 3,9-dihydroxypterocarpan 6 α -hydroxylase from elicitor induced soybean cell culture.
Eur. J. Biochem. 142: 127-131
- HALVORSON, M.; GREENWAY, D.; EBERHART, D.; FITZGERALD, K.; PARKINSON, A. (1990)
Reconstitution of testosterone oxidation by purified rat cytochrome P-450p (III A1).
Arch. Biochem. Biophys. 277, 166-180
- HALL, P.F.; WATANUKI, M.; HAMKALO, B.A. (1979)
Adrenocortical cytochrome P-450 scc. Preparation of membrane-bound side chain cleavage system from purified components.
J. Biol. Chem. 254: 547-652
- HANUKOGLU, I.; SUH, B.S.; HIMMELHOCH, S.; AMSTERDAM, A. (1990)
Induction and mitochondrial localization of cytochrome P-450scc system enzymes in normal and transformed ovarian granulosa cells.
The journal of cell biology, Vol. 111, pp. 1373-1381
- HARDWICK, J.P.; GONZALEZ, F.J.; KASPER, C.B. (1983)
Transcriptional regulation of rat liver epoxide hydratase, NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase, and cytochrome P-450b genes by phenobarbital.
J. Biol. Chem. 258, 8081-8085
- HASSON, E.P.; WEST, C.A. (1976)
Properties of the system for the mixed function oxidation of Kaurene and Kaurene derivatives in microsomes of the immature seed of *Marah macrocarpus*.
Plant. Physiol. 58: 473-484

HEBBLE, M.R. (1985)

Multiple shoot cultures: a viable alternative in vitro system for the production of known and new biologically active plant constituents.

En: Neumann KH, Barz W, Reinhard E, (eds.). *Primary and secondary metabolism of Plant Cell Cultures* (pp.281-289). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

HEINS, M. (1978)

Screening of *Digitalis lanata* plants and cell cultures for hydroxylation capacity.

En: Alfermann AW, Reinhard E, eds. *Production of natural compounds by cell culture methods. Ges Strahlen Umweltforsch, Munchen*, pp.39-47

HEINTZ, R.; BENVENISTE, P.; ROBINSON, W.H.; COATES, R.M. (1972)

Demonstration and identification of a biosynthetic intermediate between farnesyl PP and squalene in a higher plant.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 49: 1547-1553

HEINTZ, R.; BENVENISTE, P. (1974)

Plant sterol metabolism. Enzymatic cleavage of the 9 β -19 β -cyclopropane ring of cyclopropyl sterols in bramble tissue cultures.

J. Biol. Chem. 249: 4264-4274

HELMBOLD, H.; VOELTER, W.; REINHARD, E. (1978)

Sterols in cell cultures of *Digitalis lanata*.

Planta Médica. Vol. 33. pp. 185-187

HELLER, M. (1990)

Cardiac glycosides; New/old ideas about old drugs.

Biochem. Pharmacol. 40:5, 919-925

HERRERA, M.T.; CACHO, M.; CORCHETE, M.P.; FERNANDEZ-TARRAGO, J. (1990)

One step shoot tip multiplication and rooting of *Digitalis thapsi* L.

Plant cell, tissue and organ culture, 00:000-000.TICU E/89/174

HINDS, J.A.; PINCOMBE, CH.F.; MORRIS, H.; DUFFY, P. (1986)

Competitive solid-phase enzyme immunoassay for measuring digoxin in serum.

Clin. Chem. 32/1, 16-21

HIRAOKA, N.; OYANAGI, M. (1988)

In vitro propagation of *Glenia littoralis* from shoot tips

Plant Cell Rep. 7: 39-42

HIROTANI, M.; FURUYA, T. (1975)

Metabolism of 5 β -pregnane-3,20-dione and 3 β -hydroxy-5 β -pregnan-20-one by *Digitalis* suspension cultures.

Phytochemistry 14, 2601-2606

BIBLIOGRAFIA

HIROTANI, M.; FURUYA, T. (1977)

Restoration of cardenolide synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of *Digitalis purpurea*.

Phytochemistry 19: 531-534

HIROTANI, M.; FURUYA, T. (1980)

Biotransformation of digitoxigenin by cell suspension cultures of *Digitalis purpurea*.

Phytochemistry 19, 531-534

HOCHBERG, R.B.; HOENVEN, T.A.; WELCH, M.; LIEBERMAN, S. (1974)

A simple and precise assay of the enzymatic conversion by cholesterol into pregnenolone.

Biochemistry, 13: 603-609

HOELZ, H.; KREIS, W.; HAUG, B.; REINHARD, E. (1992)

Storage of cardiac glycosides in vacuoles of *Digitalis lanata* mesophyll cells.

Phytochemistry 31, 4, 1167-1171

HOFFSUMMER, B.; HUBBUCH, A.; JILEK, F.; MATTERSBERGER, J.; SCHALLER, G. (1986)

Clinical evaluation of a new Digitoxin enzyme-immunoassay.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. vol.24, pp.589-595

HOLLENBERG, P.F. (1992)

Mechanisms of cytochrome P-450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism.

FASEB J. 6, 686-694

HORST, H.; RAYMOND, D.; HEFTMANN, E. (1967)

Pregnenolone metabolism in *Digitalis lanata*.

Phytochemistry 6: 1521-1526

HU, C.Y.; WANG, P.J. (1983)

Meristem, shoot tip, and bud cultures.

En: Evans DA, Williams RS, Ammirato PV, Yamada Y (eds.). *Handbook of Plant Cell Culture*, vol.1, pp.177-227. MacMillan Publishing Co., New York.

HUANG, C.X.; VAN STEVENICK, F.M. (1990)

Salinity induced structural changes in meristematic cells of barley roots.

New. Phytol. 115, 17-22

IKEDA, Y.; FUJII, Y.; YAMAZAKI, M. (1992)

Determination of Lanatoside C and digoxin in *Digitalis lanata* by HPLC and its application to analysis of the fermented leaf powder.

Journal of natural products Lloydia vol.5, 6, pp.748-752

IMAOKA, S.; TERANO, Y.; FUNAE, Y. (1988)
Constitutive testosterone 6 β -hydroxylase in rat liver
J. Biochem. 104, 481-487

IMAI, Y.; SATO, R. (1974)
A gel electrophoretically homogeneous preparation of cytochrome P-450 from liver microsomes of phenobarbital-pretreated rabbits.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 60:8

IMTIAZ-UL-HAQ (1991)
The effect of different soil conditions on germination, growth behaviour and by products of *Digitalis purpurea* Linn., and *Foeniculum vulgure* Mill.
Hamdard Medicus, v. 34 (1): pp. 89-96

INDEX MERCK (1989)
The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals. 11^a ed. Budavari S, (ed). Merck y Co., Inc. Rahway, N.J., USA p.439

INGELMAN-SUNBERG, M. (1977)
Phospolipids and detergents as effectors in the liver microsomal hydroxylase system.
Biochem. Biophys. Acta. 488: 225-234

JACOBSON, G.M.; FREY, M.J. (1967)
Biosynthesis of cholesterol by seedlings of *Digitalis purpurea*.
J. Amer. Chem. Soc. 89, 3338

JACOBSON, M.K.; ORKWISZEWSKI, J.A.J.; JACOBSON, G.M. (1978)
Annual variation in the effect of red light on styerol biosynthesis in *Digitalis purpurea*.
Plant Physiol. 62: 1000-1004

JAMES, M.O. (1990)
Isolation of cytochrome P-450 from hepatopancreas microsomes of the spiny lobster, *Panulirus argus*, and determination of catalytic activity with NADPH cytochrome P-450 reductase from vertebrate liver.
Archives of Biochem. and Biophys. Vol. 282, 1, pp. 8-17

JEFCOATE, C.R. (1986)
Cytocrome P-450 enzymes in sterol biosynthesis and metabolism.
En: cytochrome P-450: Structure, mechanisms and biochemistry. Ortiz de Montellano, P.R. Plenum press. New York.

JOHNSON, E.F.; KRONBACK, T.; HUS, M.H. (1992)
Analysis of the catalytic specificity of cytochrome P-450 through site-directed mutagenesis.
FASEB, J., 6, 700-705

BIBLIOGRAFIA

- JUNTILLA, O. (1982)
Gibberellins-like activity in shoots of *Salix pentandra* as related to elongation growth.
Can. J. Bot. 60, 1231-1234
- KAISER, F. (1966)
Chromatographische analyse der herzwirksamen glykoside von *Digitalis*-arten.
Arch. der Pharmazie 299, 263-274
- KAROLY, A.; SZELECZKY, Z.; UDVARDY-NAGY, E.; HERPAY, M; SZABO, I. (1981)
Herstellung von 12 β -hydroxy-cardenolidderivaten auf mikrobiologischem.
GDR Pat. DD 147, 113
- KARTNIG, T. (1977)
Cardiac glycosides in cell cultures of *Digitalis*.
En: Barz W, Reinhard E, Zenk MH, (eds.). Plant tissue culture and its bio-technological application. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp.44-51
- KARTNIG, T.; KUMMER-FUSTINIONI, G.; HEYDEL B. (1983)
Der Einfluß des Alters auf die Sekundärstoffbildung in Gewerkulturen aus *Digitalis purpurea*.
Planta Med. 47, 247-248
- KATO, I. (1955)
Responses of plant cells to giberillin.
Bot. Gaz. 11: 16-24
- KATSUMI, M.; ISHIDA, K. (1991)
The Gibberillin control cell elongation.
En: Gibberillin Symp. (Pub 1991). Takahashi ed. pp.241-248. Springer. New York.
- KAWAGUCHI, K.; HIROTANI, M.; FURUYA, T. (1989)
Biotransformation of digitoxigenin by cell suspension cultures of *Strophantus intermedius*.
Phytochemistry 28, 4, 1093-1097
- KAZUHIKO, I.; MOTONARI, T.; AKIRA, M.; SHIGETOSHI, M.; KIYOSHI, M.; YOSHIYUKI, I. (1991)
Catalytic properties of cytochrome P-450sc from bovine and porcine adrenocortical mitochondria: Effect of tween 20 concentration.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 38(6): 727-731
- KELLY, R.A.; SMITH, T.W. (1992)
Recognition and management of *Digitalis* toxicity.
American Journal of Cardiology, vol.69, 18, pp.G108-G119

KHAFAGY, S.M.; GIRGIS, A.N. (1974)

A micro method for the estimation of the individual glycosides in *Digitalis* leaves and pharmaceutical preparations.

Planta Médica vol. 25, pp. 350-360

KITTO, S.; JANICK, J. (1985)

Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot.

J. Americ. Soc. Hort. Sci. 110, 277-282

KNAPP, F.F.; NICHOLAS, H.J. (1970)

Phytosterol biosynthesis in banana peel. Initial removal of the 4 α -methyl group of 24-methylenecycloartenol during its conversion into cycloeucalenol in *Musa sapientum*.

J. Chem. Soc. Commun. 7:399-400

KNAPP, F.F.; NICHOLAS, H.J. (1971)

The biosynthesis of 31-norcyclolaudenone in *Musa sapientum*.

Phytochemistry 10: 97-102

KOCHS, G.; GRISEBACH, H. (1989)

Phytoalexin synthesis in soybean: Purification and reconstitution of cytochrome P-450, 3,9-dihydroperoxy-pterocarpan 6 α -hydroxylase and separation from cytochrome P-450 cinnamate 4-hydroxylase.

Arch. Biochem. Biophys. 273, 545-553

KOCHS, G.; GRISEBACH, H. (1986)

Enzymic synthesis of isoflavones.

Eur. J. Biochem. 155, 311-318

KOLATTUKUDY, P.E. (1980)

Poliester membranes of plants: cutin and suberin.

Science 208: 990-1000

KOOP, D.R. (1992)

Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P-450 2E1.

FASEB J. 6, 724-730

KRASNYANSKI, S.; POLGAR, Z.; NEMETH, G.; MENCZEL, L. (1992)

Plant regeneration from callus and protoplast culture of *Helianthus giganteus* L.

Plant Cell Reports 11, 1, pp. 7-10

KRAUSPE, R. (1982)

Cell differentiation and tumor state-plant crown gall tumors.

En: Cell Differentiation. L. Nover, M. Luckner, B. Parthier, eds. pp. 569-596

BIBLIOGRAFIA

- KREIS, W.; REINHARD, E. (1985a)
Characterization of habituated *Digitalis lanata* cell cultures.
En: Haaß D, Blaschek W, (eds) 33rd Annu Congr Soc Medicinal plant research, Univ. Regensburg. Acta Agron 34 (Suppl): 16
- KREIS, W.; REINHARD, E. (1985b)
Rapid isolation of vacuoles from suspension-cultured *Digitalis lanata* cells.
J. Plant. Physiol. 121, 385-390
- KREIS, W.; REINHARD, E. (1987)
Selective uptake and vacuolar storage of primary cardiac glycosides by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells.
J. Plant Physiol. 128: 311-326
- KRTINA, P. (1973)
Beitrage zur Gewebekultur von *Digitalis purpurea* L., *Digitalis lanata* EHR und *Datura innoxia* Mill.
Diss. Univ. Wien
- KUBERSKI, C.H.; SCHEIBNER, H.; STEUP, M.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M.- (1984)
Embryogenesis and cardenolide formation in tissue cultures of *Digitalis lanata*.
Phytochemistry 23: 1407-1412
- KUMAMOTO, T.; MOROHASHI, K.; ITO, A.; OMURA, T. (1987)
Site directed mutagenesis of basic amino acid residues in the extension peptide of P-450scc precursor: Effects on the import of the precursor into mitochondria.
J. Biochem. (Tokio), 102, 833-838
- KUMARI, N.; SARADHI, P.P. (1992)
Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare* L.
Plant Cell Reports, vol.11, 9, pp.476-479
- KUTHAN, H.; ULLRICH, V. (1982)
Oxidase and oxygenases function of the microsomal cytochrome P-450 monooxygenase system.
Eur. J. Biochem. 126: 583-588
- LABBE, D.; JEAN, A.; ANDERSON, A. (1988)
A constitutive member of the rat cytochrome P-450IIB subfamily: full-length coding sequence of the P-450IIB3 cDNA.
DNA 7, 253-260

- LAGER, G.A. (1983)
The sodium pump lag revisited.
J.Mol. Cell. Cardiol. 15: 647-651
- LAMBETH, J.D.; KAMIN, J.; SEYBERT, D.W. (1980)
Phosphatidilcholine vesicle reconstituted cytochrome P-450_{scc}: Role of the membrane in control of activity and spin state of the cytochrome.
J. Biol. Chem. 255: 8282-8288
- LANG, M.A.; GIELEN, J.E.; NEBERT, D.W. (1981)
Genetic evidence for many unique liver microsomal P-450 mediated monooxygenase activities in heterogeneic stock mice.
J. Biol. Chem. 256: 12068-12075
- LARROQUE, CH.; LANGE, R.; MAURIN, L.; BIENVENUE, A.; VAN LIER J.E.- (1990)
On the nature of the cytochrome P-450_{scc} "ultimate oxidant": characterization of a productive radical intermediate.
Archives of biochemistry and biophysics, 282, n^o 1, 198-201
- LATIES, C.G. (1974)
Isolation of mitochondria from plant material.
En: S.P. Colowick; N.O. Kaplan eds. Methods in Enzymology, vol.XXXI. Academic Press, N.Y. pp.589-600
- LAU, S.M.C.; HARDER, P.A.; OKEEFE, D.P. (1993)
Low carbon monoxide affinity allene oxide synthase is the predominant cytochrome P-450 in many plant tissues.
Biochemistry 32, 8, pp.1945-1950
- LEETE, E.; GREGORY, H.; GROS, E.G. (1965)
Biosynthesis of plant steroids. I. The origin of the butenolide ring of digitoxigenin.
J. Amer. Chem. Soc. 87: 15
- LESOT, A.; BENVENISTE, I.; HASENFRATZ, M.P.; DURST, F. (1990)
Induction of NADPH-cytochrome P-450(c) Reductase in wounded tissues from *Helianthus tuberosus* tubers.
Plant Cell. Physiol. 31(8): 1177-1182
- LIDNER, W.; FREI, R.W. (1976)
Partition HPLC systems for the separation of *Digitalis* glycosides of the cardenolide group.
J. of Chrom. 117, 81-86

BIBLIOGRAFIA

LINLEY, P.A. (1973)

The evaluation of *Digitalis purpurea* by direct densitometry from paper chromatograms.
Planta Medica 23 (3) 272-280

LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.J.; FARR, A.; RANDALL, R.J. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

LU, A.Y.H.; MIWA, G.T. (1980)

Molecular properties and biological functions of microsomal epoxide hidrase.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20: 513-531

LUCKNER, M.; DIETRICH, B. (1987)

Biosynthesis of cardenolides in cell cultures of *Digitalis lanata*. The result of a new strategy.
Plant tissue and cell culture, 187-197

LUCKNER, M. (1984)

Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals.
2nd. ed. Springer Verlag. Berlin.

LUCKNER, M. (1980)

Expression and control of secondary metabolism.
En: *Encyclopaedia of Plant Physiology. New series, vol. 8. Secondary Plant Products* (E.A. Bell, B.V. Charlwood, eds.) pp. 23-63. Springer. Berlin.

LUCKNER, M.; DIETRICH, B. (1985)

Formation of cardenolides in cell and organ cultures of *Digitalis lanata*.
En: *Neumann K.H.; Barz, W.; Reinhard, E., eds.*
Primary and secondary metabolism of plant cell cultures.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, pp. 154-163

LUCKNER, M.; DIETRICH, B. (1988)

Cardenolides.
Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 5, cap. 11, pp. 193-212

LUGT, CH.B.; NOORDHOEK-ANANIAS, L. (1974)

Quantitative fluorimetric determination of the main cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves.
Planta Medica 25, 267-273

LUI, J.H.C.; STABA, E.J. (1981)

Effects of age and growth regulators on serially propagated *Digitalis lanata* leaf and root cultures.
Planta Med. 41: 90-95

BIBLIOGRAFIA

LUI, J.H.C.; STABA, E.J. (1979)

Effects of precursors on serially propagated *Digitalis lanata* leaf and root cultures.
Phytochemistry 18: 1913-1916

MADYASTHA, K.M.; MEEHAM, T.D.; COSCIA, C.J. (1976)

Characterization of a cytochrome P-450 dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant *V. rosea*.
Biochemistry 15: 1079-1102

MAEKAWA, B.; MORIMOTO, K. (1992)

Development of analytical method for selective detection of cardenolides by HPLC.
Bioscience, biotechnology and biochemistry, vol.56, 6, p.967

MAENPAA, J.; RANE, A.; RAUNIO, H.; HONKAKOSKI, P.; PELKONEN, O. (1993)
Cytochrome P-450 isoforms in human fetal tissues related to phenobarbital inducible forms in the mouse.

Biochemical pharmacology, vol.45, 4, pp.899-907

MAIER, M.S.; SELDES, A.M.; GROS, E.G. (1986)

Biosynthesis of the butenolide ring of cardenolides in *Digitalis purpurea*.
Phytochemistry vol. 25, n° 6, pp. 1327-1329

MARKKANEN, P.; IDMAN, T.; KAUPINEN, V. (1984)

Growth and cardenolide production by *Digitalis lanata* in different fermentor types.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 434: 491-495

MARTIN, S.M. (1980)

Environmental factors: Temperature, aeration and pH.

En: Plant tissue culture as a source of biochemicals. Ed. E.S. Staba, pp.143-148. Boca Raton. Florida. CRC Press.

MARTINELLI, L.; BRAGAGNA, P.; POLETTI, V.; SCIENZA, A. (1993)

Somatic embryogenesis from leaf derived and petiole derived callus of *Vitis rupestris*.
Plant Cell Reports, vol.12, 4, pp.207-210

MATTERSBERGER, J.; DEUTSCH, G.; DEEG, R. (1985)

Rapid enzyme immuno-assays for determination of thyroxine, TBG, T₄-binding-capacity, digoxin and digitoxin.

Clin. Chem. 31, 905

McFADDEN, J.J.; FREAR, D.S.; MANSAGER, E.R. (1989)

Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 dependent monooxygenase from wheat.

Pestic. Biochem. Physiol., 34, 92-100

BIBLIOGRAFIA

MEGIA, R.; HAICOUR, R.; ROSSIGNOL, L.; SIHACHAKR, D. (1992)

Callus formation from cultured protoplasts of Banana (*Musa sp.*)

Plant Science, vol.85, 1, pp.91-98

MEIJER, A.H.; PENNINGS, E.J.M.; DE WAAL, A.; VERPOORTE, R. (1990)

Purification of cytochrome P-450 dependent geraniol-10-hydroxylase from a cell suspension culture of *Catharanthus roseus*.

En: M.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas, J. Van Aartrijk, eds. *Progress in plant cellular and molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 769-774

MENHARD, C.W. (1977)

Mitochondrien

En: G.Jacobi ed. *Biochemische cytologie der Pflanzenzelle*. Thieme Verlag, Stuttgart. pl.109-126

MOLDENHAUER, D.; FURST, B.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M. (1990)

Cardenolides in *Digitalis lanata* cells transformed with Ti-plasmids.

Planta Med. 56 (85): 435-438

MONIER, S.; VAN LUC, P.; KREIBICH, G.; SABATINI, D.D.; ADESNIK, M. (1988)

Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P-450 in the endoplasmic reticulum membrane.

J. Cell. Biol. 107, 457-470

MORALES, C.; CUSIDO, R.M.; BONFILL, M.M.; FUENTE, J.A. (1992a)

Acción de determinadas auxinas sobre la diferenciación y síntesis de cardenólidos en *Digitalis purpurea*.

III Simposio Nacional sobre metabolismo y modo de acción de fitohormonas. Abril, 1992. Libro de actas (en prensa).

MORALES, C.; CUSIDO, R.M.; PALAZON, J.; BONFILL, M.M. (1993)

Response of *Digitalis purpurea* plants to temporary salinity.

J. of Plant Nutrition 16(2), 327-335

MORALES, C.; CUSIDO, R.M.; PALAZON, J.; ALTABELLA, T.; SOLSONA, M.D., BONFILL, M.M. (1992b)

Action de la gibbérelline, du phénobarbital et du méthylcolantrène sur le développement de systèmes endomembranaires dans des cals de *Digitalis purpurea* soumis à différents conditions d'éclaircissement.

Rev. Cytol. Biol. végét. Bot., 15: 125-138

MORALES, C.; CHAMA, I. (1993)

Effect of salinity in ionic disequilibrium and cardenolids synthesis in *Digitalis lanata* plants.

Remitido a: *Trends in Agricultural sciences*. En prensa. 1993

MOREL, P.; BEAUNE, P.H.; RATANASAVANH, D.; FLINOIS, J.P.; YANG, C.S.; GUENGERICH, F.P.; GUILLOUZO, A. (1990)

Expression of cytochrome P-450 enzymes in cultured human hepatocytes.

Eur. J. Biochem. 191, 437-444

MORISAKI, M.; SHIKITA, M.; IKEKAWA, M. (1985)

Side chain cleavage of cholesterol by chromatography-mass spectrometry in a selected ion monitoring mode.

Methods in Enzim. V. 11. Steroids and isoprenoids part B. Ed. by J.H. Law; Acad. Press, London.

MORITZ, S.; ALFERMANN, A.W.; REINHARD, E. (1982a)

Continuous biotransformation by immobilized cells in bioreactor.

Planta Med. 45: 154-155

MORITZ, S.; SCHULLER, I.; FIGUR, CH.; ALFERMANN, A.W.; REINHARD, E. (1982b)

Biotransformation of cardenolides by immobilized *Digitalis* cells.

En: Fujiwara, A. (ed). Plant tissue culture, 1982. Maruzen, Tokyo, pp. 401-402

MOSS, D.W. (1983)

Nomenclature and Units in Enzymology.

En: Methods of Enzymatic analysis, vol.1: Fundamentals (third ed.). Ed.: U.Bergmeyer. Verlag. Chemie. Weinheim.

MOUGIN, CH.; CABANNE, F.; CANIVENC, M.CH.; SCALLA, R. (1990)

Hydroxylation and N-demethylation of chlorotoluron by wheat microsomal enzymes.

Plant science, 66, 195-203

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962)

A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.

Physiol. Plant. 15: 473-497

NADLER, S.G.; STROBEL, H.W. (1988)

Role of electrostatic interactions in the reaction of NADPH-cytochrome P-450 reductase with cytochromes P-450.

Arch. Biochem. Biophys. 261, 418-429

NADLER, S.G.; STROBEL, H.W. (1991)

Identification and characterization of an NADPH-cytochrome P-450 reductase derived peptide involved in binding to cytochrome P-450.

Arch. Biochem. Biophys. 290, n° 2, pp. 277-284

NAHRSTEDT, A. (1982)

Strukturelle Beziehungen zwischen pflanzlichen und tierischen Sekundarstoffen.

Planta Med. 44, 2-14

BIBLIOGRAFIA

NATONEK, M.; ALBRECHT, K.; SZELECZKY, Z.; SZARKA, E.; SZENTIRMAI, A.;
UDVARDY-NAGY, E.; TRINN, M.; NAGY, L.; BUDAI, M.; TROMPLER, A.; KISS,
J.; BALOGH, T.; TOLGYESI, L.; ILA, L. (1980)

Verfahren zur Herstellung von 12 β -Hydroxy-cardenolidverbindungen.

GDR-Pat. DD 143, 927

NEBERT, D.W.; GONZÁLEZ, F.J. (1987)

P-450 genes: structure, evolution and regulation.

Ann. Rev. Biochem. 56: 945-93

NEBERT, D.W.; NELSON, D.R.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; FEYEREISEN,
R.; FUJII-KURIYAMA, Y.; GONZÁLEZ, F.J.; GUENGERICH, F.P.; GUNSAULUS,
I.C.; JOHNSON, E.F.; LOPER, J.C.; SATO, R.; WATERMAN, M.R.; WAXMAN, D.J.
(1991)

The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature.

DNA Cell Biol. 10, 1-14

NEBERT, D.W.; GELBOIN, H.V. (1970)

The role of ribonucleic acid and protein synthesis in microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cell culture. The independence of transcription and translation.

J. Biol. Chem. 245: 160-168

NELSON, D.R.; STROBEL, H.W. (1988)

On the membrane topology of vertebrate cytochrome P-450 proteins.

J. Biol. Chem. 263, 6038-6050

NESS, W.R. (1977)

The biochemistry of plant sterols.

Adv. Lipid. Res. 15: 233-324

NEUMAN, M.C.; PREECE, J.E.; VANSAMBEEK, J.W.; GAFFNEY, G.R. (1993)

Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of eastern black walnut.

Plant cell tissue and organ culture, vol.32, 1, pp.9-18

NEUWALD, F. (1952)

Zur Frage des Vorkommens freier Genine in Folia *Digitalis*.

Arch. Pharm. 285, 22

NOVER, L.; LUCKNER, M.; TEWES, A.; GARVE, R.; VOGEL, E. (1980)

Cell specialisation and cardiac glycoside formation in cell cultures of *Digitalis* species.

Acta Hort. 96: 67-70

BIBLIOGRAFIA

O'KEEFE, D.P.; LETO, K.J. (1989)

Cytochrome P-450 from the mesocarp of avocado (*Persea americana*).

Plant Physiol. 89, 1141-1149

O'KEEFE, D.P.; BOZAK, K.R.; TEPPERMAN, CH.J.A.; DEAN, C.; HARDER, P.A. (1992)

Endogenous and engineered cytochrome P-450 mono-oxygenases in plants.

Biochem. Soc. Trans. Vol. 20. pp. 357-361

OHLSSON, A.B. (1990)

Effects of abscisic acid on cardenolide accumulation and growth in *Digitalis lanata* tissue cultures.

J. Plant. Physiol. Vol. 136, pp. 510-512

OHLSSON, A.B.; BJÖRK, L.; GATENBECK, S. (1983)

Effect of light on cardenolide production by *Digitalis lanata* tissue cultures.

Phytochemistry vol. 22, n^o 11, pp. 2447-2450

OKEY, A.B. (1990)

Enzyme induction in the cytochrome P-450 system.

Pharmacol. Ther. 45, 241-298

OMURA, T.; ITO, A. (1991)

Biosynthesis and intracellular sorting of mitochondrial forms of cytochrome P-450.

Methods in enzymology, vol. 206, pp. 75-81

OMURA, T.; SATO, R. (1962)

A new cytochrome in liver microsomes.

J. Biol. Chem. 237: 1375-1376

OMURA, T.; SATO, R. (1964)

The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes I. Evidence of its hemoprotein nature.

J. Biol. Chem. 239: 2370-2378

ORME-JOHNSON, N.R.; LIGHT, D.R.; WHITE-STEVENS, R.W.; ORME-JOHNSON, W.H. (1979)

Steroid binding properties of beef adrenal cortical cytochrome P-450 which catalyzes the conversion of cholesterol in pregnenolone.

J. Biol. Chem. 254: 2013-2111

OROSZ, F.; NURIDSÁNY, M.; OVÁDI, J. (1986)

Isolation and quantitative determination of some cardioactive glycosides from *Digitalis lanata* by HPLC.

Medical Biochemistry 156, 171-175

BIBLIOGRAFIA

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. (1989)

Cytochrome P-450 catalysis: radical intermediates and dehydrogenation reactions.
Trends Pharmacol. Sci. 10, 354-359

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R.; REICH, N.O. (1986)

Inhibition of cytochrome P-450 enzymes.

En: Cytochrome P-450 structure, mechanism and biochemistry (Ortiz de Montellano, ed.)
pp. 273-314, Plenum, New York.

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R.; CHAN, W.K.; TUCK, S.F.; KAIKUS, R.M.; BASS, N.M.; PETERSON, J.A. (1992)

Mechanism based probes of the topology and function of fatty acid hydroxylases.
FASEB J. 6, 695-699

OU, W.J.; ITO, A.; OKAZAKI, H.; OMURA, T. (1989)

Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria.
EMBO J. 8, III, 2605.

PALEG, L.; HYDE, B (1964)

Physiological effects of gibberellic acid VII. Electron microscopy of barley aleurone cells.
Plant. Physiol. 35: 673-680

PAUL, Y.; GUPTA, S. (1988)

Effect of Kinetin (6-furfurylaminopurine) on changes in membrane lipids in relation to growth of isolated cotyledons of vegetable marrow (*Cucurbita pepo*).
Plant Science, 55, 87-92

PEARSON, D.W. (1978)

Nicotine production by tobacco tissue cultures.
PhD thesis. Nottingham University.

PEREZ BERMÚDEZ, P.; CORNEJO, M.J.; SEGURA, J. (1983)

In vitro propagatio of *Digitalis obscura*.
Plant Science Lett. 30: 77-82

PETERSEN, M.; ALFERMANN, A.W.; REINHARD, E.; SEITZ, H.V. (1987)

Immobilization of digitoxin 12 β -hydroxylase, a cytochrome P-450 dependent enzyme from cell cultures of *Digitalis lanata*.
Plant cell Reports 6: 200-203

PETERSEN, M.; SEITZ, H.U. (1988)

Reconstitution of cytochrome P-450 dependent digitoxin 12 β -hydroxylase from cell cultures of foxglove (*Digitalis lanata* EHRH).
Biochem. J. 252, 537-543

BIBLIOGRAFIA

- PETERSEN, M.; SEITZ, H.U. (1985)
Cytochrome P-450 dependent digitoxin 12 β -hydroxylase from cell cultures of *Digitalis lanata*.
FEBS letters 188: 11-14
- PETERSON, J.A.; O'KEEFFE, D.H.; WERRINGLOER, J.; EBEL, R.E.; EASTBROOK, R.W. (1978)
Patches and pockets: the microenvironments of a membrane bound hemoprotein.
En: Microenvironments and Metabolic Compartmentation, P.A. Srere, R.W. Eastbrook, eds. Acad. Press. New York, pag. 433-450
- PETERSON, J.A.; WHITE, R.E.; YASUCOCHI, Y.; COOMES, M.L.; O'KEEFFE, D.H.; EBEL, R.E.; MASTERS, B.S.; BALLOU, D.P.; COON, M.J. (1977)
Evidence that purified liver microsomal cytochrome P-450 is a one electron acceptor.
J. Biol. Chem. 252: 4431-4434
- PFEIFFER, B.; ROOS, W.; LUCKNER, M. (1982)
Accumulation of purpurea glycoside A in vacuoles of *Digitalis lanata* cells cultivated *in vitro*.
Planta Med. 45: 154
- PICKETT, C.B. (1972)
Glutathione s-transferases: gene structure, regulation, and biological function.
Annu. Rev. Biochem. 58, 743-764
- PILGRIM, H. (1977)
Sapogeninbildung in Suspensionkulturen von *Digitalis purpurea*.
Phytochemistry 16: 1311-1312
- PILGRIM, H. (1972)
Cholesterol side chain cleaving enzyme. Aktivität in Keimlingen und *in vitro* kultivierten Geweben von *Digitalis purpurea*.
Phytochemistry 11, 1725-1728
- PORTER, T.D.; COON, M.J. (1991)
Cytochrome P-450: multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms.
J. Biol. Chem. 266, 13469-13472
- PORTER, T.D.; BECK, T.W.; KASPER, C.B. (1990)
NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase gene organization correlates with structural domain of the protein.
Biochemistry 29: 9814-9818

BIBLIOGRAFIA

POULOS, T.L.; RAAG, R. (1992)

Cytochrome P-450cam: crystallography, oxygen activation and electron transfer.
FASEB J. 6, n°2, 674-679

REICHHART, D.; SALAÜN, J.P.; BENVENISTE, I.; DURST, F. (1980)

Time course of induction of cytochrome P-450, NADPH cytochrome c reductase and cinnamic acid hydroxylase by phenobarbital, ethanol, herbicides and manganese in higher plant microsomes.

Plant. Physiol. 66: 600-604

REID, W.W. (1968)

Accumulation of squalene-2,3 oxide during inhibition of phytosterol biosynthesis in *Nicotiana tabacum*.

Phytochemistry 7: 451-452

REINBOTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M. (1990)

Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis lanata*.

J. Plant Physiol., vol.137, pp.224-228

REINHARD, E. (1974)

Biotransformations by plant tissue cultures.

En: Tissue culture and Plant Science (H.E. Street, ed.), pp.433-459. Academic Press, London.

REINHARD, E.; ALFERMANN, A.W. (1980)

Biotransformation by plant cell cultures.

En: Fiechter A (ed). Advances in biochemical engineering 16. Springer. Berlin. Heidelberg. New York, pp.49-83

REINHARD, E.; BOY, M.; KAISER, F. (1975)

Umwandlung von *Digitalis*-Glycosiden durch zellsuspensionskulturen.

Planta Med., Suppl., pp.163-168

REES, H.H.; GOAD, L.J.; GOODWIN, T.W. (1968)

Studies in phytosterol biosynthesis. Mechanism of biosynthesis of cycloartenol.

Biochem. J. 107: 417-426

RICH, P.R.; BENDALL, D.S. (1975)

Cytochrome components of plant microsomes.

Eur. J. Biochem. 55: 333-341

RICH, P.R.; CAMMACK, R.; BENDALL, D.A. (1975)

Electron paramagnetic resonance studies of cytochrome P-450 in plant microsomes.

Eur. J. Biochem. 59: 281-286

BIBLIOGRAFIA

- RITZ, S.; HARDING, P.; MARTZ, W.; SCHUTZ, H.W.; KAATSCH, H.J. (1992)
Measurement of *Digitalis* glycoside levels in ocular tissues. A way to improve postmortem diagnosis of lethal *Digitalis* glycoside poisoning. z. Digitoxin.
International Journal of legal medicine, vol.105, 3, pp.155-159
- ROBERTS, E.S.; VAZ, A.D.N.; COON, M.J. (1991)
Catalysis by cytochrome P-450 of a novel oxidative reaction in xenobiotic aldehyde metabolism: deformylation with olefin formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8963-8966
- ROBINSON, T. (1980)
Cardiac glycosides.
The organic constituents of higher plants. 4th. ed. Cordus Press, North Amherst, M.A.
- ROSE, F. (1987)
Digitalis purpurea L.
The wild flower key, p.300, Ed. Omega
- ROWSON, J.M. (1955)
Studies in genus *Digitalis*.
J. Pharm. Pharmac. 7, 924
- ROY, P.K.; BARAT, G.K.; MEHTA, S.L. (1992)
In vitro plant regeneration from callus derived root explants of *Lathyrus sativus*.
Plant cell and organ culture, vol.29, 2, pp.135-138
- RÜCKER, W. (1983)
Wurzeldifferenzierung and *Digitalis purpurea* Blattexplantaten *in vitro*; Einfluß der Mineralsalze auf Wurzelwachstum.
Bodenkultur 34: 95-106
- RÜCKER, W. (1982a)
Kombinierter Einfluß von Indolessigsäure, Gibberellinsäure und Benzylaminopurin auf Kallus und Organdifferenzierungen an Blattexplantaten von *Digitalis purpurea*.
Z. Pflanzenphysiol. 107: 141-151
- RÜCKER, W. (1982b)
Callus and organ formation on *Digitalis* leaf cuttings.
In: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture 1982. Maruzen, Tokyo, pp. 195-196.
- RÜCKER, W. (1988)
Digitalis spp.: *in vitro* culture, regeneration, and the production of cardenolides and other secondary products.
Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 4, pp. 390-418

BIBLIOGRAFIA

- RÜCKER, W.; JENTZSCH, K.; WITCRTL, M. (1976)
Wurzeldifferenzierung und glykosidbildung bei *in vitro* Kultivierten Blattexplantaten von *Digitalis purpurea* L.
Z. Pflanzenphysiol. 80: 323-335
- RÜCKER, W.; JENTZSCH, K.; WICHTL, M. (1981)
Organdifferenzierung und Glycosidbildung bei *in vitro* kultivierten Blattexplantaten von *Digitalis purpurea* L.
Z. Pflanzenphysiol. 102: 207-220
- RÜCKER, W.; JENTZSCH, K.; WICHTL, M. (1983)
Untersuchungen über Wachstum, Morphogenese und Glykosidbildung and Wurzelorgankulturen von *Digitalis purpurea* L.
Biochem. Physiol. Pflanzen 178: 91-100
- SALAÜN, J.P.; BENVENISTE, I.; REICHHART, D.; DURST, F. (1978)
A microsomal (cytochrome P-450) linked lauric acid monooxygenase from aged Jerusalem artichoke tuber tissues.
Eur. J. Biochem. 90: 155-159
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. (1991)
Hormones and growth regulators : auxins and gibberellins.
Plant Physiology (4th. ed.) Wadsworth Publising Company. Belmont, California.
- SASAMOTO, H.; HOSOI, Y. (1992)
Callus proliferation from the protoplasts of embryogenic cells of *Quercus serrata*.
Plant cell tissue and organ culture, vol.29, 3, pp.241-245
- SAUER, H.H.; BENNET, R.D.; HEFTMANN, E. (1967)
Pregnenolone metabolism in *Digitalis lanata*.
Phytochemistry 6: 1521-1526
- SCOWCROFT, W.R.; RYAN, S.A. (1986)
Tissue culture and plant baeding.
En: Plant cell culture technology (MM Yeoman ed), pp.67-95. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- SCHEIBNER, H.; BJORK, L.; SCHULZ, V.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M. (1987)
Influence of light on cardenolide accumulation in somatic embrios of *Digitalis lanata*.
J. Plant Physiol. 130: 211-219
- SCHMIDT, J. (1992)
Digitalis intoxication.2.
Deutsche medizinische wochenschrift., vol.117, 46, p.1778

- SCHÖNER, S.; REINHARD, E. (1982)
Clonal multiplication of *Digitalis lanata* by meristeme culture.
Planta Med. 45: 155
- SCHÖNER, S.; REINHARD, E. (1985)
Cardenolide formation in *Digitalis lanata* plants propagated via meristem culture.
En: Haaß D, Blaschek W (eds) 33rd Ann. Congr. Soc. Medicinal plant research. Univ. Regensburg. *Acta Agron.* 34 (Suppl): 13
- SCHÜTTE, H.R. (1975)
Secondary plant substances. Aspects of steroid biosynthesis in plants.
In: *Progress in botany n° 37*. Springer-Verlag
- SEITZ, U.; ALFERMANN, A.W.; REINHARD, E. (1983)
Stability of biotransformation capacity in *Digitalis lanata* cell cultures after cryogenic storage.
Plant Cell Rep. 2: 273-276
- SELLWOOD, E.H.B. (1956)
Determination of the digitoxin content of *Digitalis purpurea*.
J. Pharm. Pharmac. 8,1, 1061
- SHAYIQ, R.M.; AVADHANI, N.G. (1990)
A phenobarbital inducible hepatic mitochondrial cytochrome P-450 immunochemically related to microsomal P-450b.
Biochemistry 29, 866-873
- SHET, M.; ESTABROOK, R.W. (1992)
Purification and characterization of a NADPH-cytochrome P-450 (cytochrome c) reductase from higher plant microsomes.
Faseb J., vol.6, n°1, A322 Abstract
- SHING, B.; RASTOGI, R.P. (1970)
Cardenolides, glycosides and genins.
Phytochemistry 9: 315-331
- SHÖNER, S.; REINHARD, E. (1986)
Long term cultivation of *Digitalis lanata* clones propagated in vitro: Cardenolides content of the regenerated plants.
Planta Medica 52(6): 478-481
- SILBERMAN, H.; THORP, R.H. (1953)
The estimation of the component cardiac glycosides in *Digitalis* plant samples using paper chromatography and fluorescence chromatography.
J. Pharm. Pharmac. 5, 428

BIBLIOGRAFIA

SKOOG, F.; MILLER, C.O. (1957)

Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*.
Symp. Soc. Exp. Biol., 11, 118-131

SKVIRSKY, R.C.; HANSON, M.R.; AUSUBEL, F.M. (1984)

Intraspecific genetic variation in cytokinin-controlled shoot morphogenesis from tissue explants of *Petunia hybrida*.
Plant Science Letters, 35, 237-246

SLIGAR, S.G.; MURRAY, R.J. (1986)

Cytochrome P-450 enzymes in sterol biosynthesis and metabolism.

En: *Cytochrome P-450, structure, mechanism and biochemistry*. Ortiz de Montellano, P.R., Plenum Press. New York

SMITH, A.R.H. (1986)

Plant molecular biology.

En: *Methods in Enzymology V. 118*. A.Weissbach; H.Weissbach eds. Acad. Press. London, pl: 539-550

SMITH, J.R.; GHEORGHIADU, M.; GOLDSTEIN, S. (1993)

The current role of digoxin in the treatment of heart failure.

Coronary artery disease, vol.4, 1, pp.16-26

SOLIDAY, C.L.; KOLATTUKUDY, P.E. (1977)

Biosynthesis of cutin ω -hydroxylation of fatty acids by the endoplasmic reticulum fraction from germinating *Vicia faba*.

Plant. Physiol. 59: 1116-1121

SOLSONA, M.D. (1992)

Creixement i producció de cardenòlids en calls de *Digitalis purpurea*: influència de la llum i d'alguns efectors químics.

Tesis doctoral. Departamento de Productos naturales, Biología vegetal sanitaria y Edafología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

STAFFORD, H.A. (1981)

Compartmentation in natural product biosynthesis by multienzyme complexes.

En: *The Biochemistry of plants, vol.7. Secondary plant products*. E.Conn ed., pl: 117-137. Academic Press.

STEVENS, V.L.; AW, T.Y.; JONES, D.P.; LAMBETH, J.D. (1984)

Oxygen dependence of adrenal cortex cholesterol side chain cleavage: Implications in the rate limiting steps in steroidogenesis.

J. Biol. Chem. 259: 1174-1179

STEWART, I.; SCHULER, J. (1989)

Antigenic crossreactivity between bacterial and plant cytochrome P-450 monooxygenases.
Plant Physiol. 90: 534-541

STOHS, S.J. (1969)

The metabolism of progesterone by plant microsomes.
Phytochemistry 8: 1215-1219

STOHS, S.J. (1977)

Metabolism of steroids in plant tissue cultures.
En: Barz W, Reinhard E, Zenk MH (eds). *Plant tissue culture and its bio-technological application*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp.142-150

STHOS, S.J. (1980)

Metabolism of steroids in plant tissue cultures.
En: Fiechter A (ed). *Advances in biochemical engineering*, 16. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp.85-107

STOHS, S.J.; EL-OLEMY, M.M. (1972a)

4-Androsten-3,17-dione metabolism by *Dioscorea deltoidea* suspension culture.
Lloydia 35: 81-83

STOHS, S.J.; EL-OLEMY, M.M. (1972b)

Pregnenolone and progesterone metabolism by cardenolide producing plants.
Phytochemistry 11, 2409-2413

STOHS, S.J.; ROSENBERG, H. (1975)

Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures.
Lloydia 38:181-195

STREET, H.E. (1973)

Plant tissue and cell culture.
Ed. H.E. Street. Univ. of California. Press. Berkeley.

STUHLFAUTH, T.; KLUG, K.; FOCK, H.P. (1987)

The production of secondary metabolites by *Digitalis lanata* during CO₂ enrichment and water stress.
Phytochemistry 26, n^o 10, pp. 2735-2739

SUGA, T.; HIRATA, T. (1990)

Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures.
Phytochemistry, vol.29, n^o8, pp.2393-2406

SUGISAWA, H.; OHNISHI, Y. (1976)

Isolation and identification of monoterpenes from cultured cells of *Perilla* plant.
Agr. Biol. Chem. 40: 231-232

SWINDELL, A.C.; GAYLOR, J.L. (1968)

Investigation of the component reactions of oxidative sterol demethylation.
J. Biol. Chem. 243, n^o21, 5546-5555

SZELECZKY, Z. (1979)

Thin layer chromatography of cardenolides in the presence of boric acid.
Journal of Chromatography, 178, 453-458

TABATA, M.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, N.; MARUMOTO, Y.; KONOSHIMA, M. (1971)

Regulation of nicotine production in tobacco tissue culture by plant growth regulators.
Phytochemistry 10: 723-729

TANDON, P.; RATHORE, T.S. (1992)

Regeneration of plantlets from hypocotyl derived callus of *Coptis teeta*.
Plant cell tissue and organ culture, vol.28, 1, pp.115-117

TANTIVATANA, P.; WRIGHT, S.E. (1958)

Estimation of digoxin and digitoxin in *Digitalis lanata*.
J. Pharm. Pharmac. 10, 189

TEMPLETON, J.F.; YANGZHI, L.; JICHUN, J. (1991)

Synthesis of 3 β ,14-dihydroxy-5 β ,14 β -pregnan-20-one C-3 derivatives: ozonolysis of digitoxin and digitoxigenin and their derivatives followed by zinc-acetic acid reduction to the C-21 methylketone.
J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1, 823-829

THOMAS, P.E.; REIK, L.M.; RYAN, D.E.; LEVIN, W. (1981)

Regulation of three forms of cytochrome P-450 and epoxide hydrolase in rat liver microsomes.
J. Biol. Chem. 256, 1044-1052

TIERNEY, D.; KOOP, D.R.; HAAS, A. (1990)

The formation of ubiquitin conjugates during P-450 IIE1 degradation.
FASEB J. 4, A2240

TORREY, J.G. (1985)

The development of plant biotechnology.
American Scientist 73, 354-363

BIBLIOGRAFIA

- TRABER, P.G.; WANG, W.; McDONNELL, M.; GUMUCIO, J.J. (1990)
P-450IIB gene expression in rat small intestine: cloning of intestinal P-450IIB1 mRNA using the polymerase chain reaction and transcriptional regulation of induction.
Mol. Pharmacol. 37, 810-819
- TSCHESCHE, R. (1964)
Les stéroïdes en C-21 d'origine végétale.
Bulletin de la Société Chimique de France. pp. 1219-1228
- TSCHESCHE, R. (1966)
Fortschritte der chemie organischer Naturstoffe, vol. 24, p.99
Wein: Springer Verlag
- TSCHESCHE, R. (1971)
Zur biosynthese der cardenolid und bufadienolid glycoside.
Plant. Med. Suppl. 4: 34-39
- TSCHESCHE, R. (1972)
Biosynthesis of cardenolids, bufadienolides and steroid sapogenins.
Proc. R.Soc. Lond. B. 180, 187-202
- TSCHESCHE, R.; BRÜGMANN, G.; SNATZKE, G. (1964)
Über Digitanoglykoside-IX zur Konstitution des digipurpurogenins.
Tetrahedron Lett. 9, 473-480
- TSCHESCHE, R.; HOMBACH, R.; SCHOLTEN, H.; PETERS, M. (1970)
Neue beiträge zur biogenese der cardenolide in *Digitalis lanata*.
Phytochemistry 9: 1505-1515
- TSCHESCHE, R.; LILIANWEISS, G. (1964)
Cardenolid biosynthese aus pergnenolonglucosid.
Z. Naturforsch 19b: 265-266
- TSO, T.C.; CHENG, A.L.S. (1971)
Metabolism of cholesterol-4 ¹⁴C in *Nicotiana* plants.
Phytochemistry 10: 2133-2137
- ULRICH, V. (1979)
Cytochrome P-450 and biological hydroxylation reactions.
Top. Curr. chem. 83: 67-104
- ULRICH V.; DUPPEL, W. (1975)
Iron and copper containing monooxygenases.
En: The enzymes Vol. XII. Oxidation-Reduction part B.P.D. Boyer. Acad. Press. New York

BIBLIOGRAFIA

- UNDERWOOD, E.E. (1968)
Stereology, or the quantitative evaluation of microstructures.
Journal of Microscopy 89, 161-180
- UNDERWOOD, E.E. (1970)
Quantitative stereology.
Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts.
- VAN DER HOEVEN, I.A.; HANGEN, D.A.; COON, M.J. (1974)
Cytochrome P-450 purified to aparent homogeneity from phenobarbital induced rabbit liver microsomes: catalitic activity and other properties.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 569
- VANDERVALK, P.; SCHOLTEN, OE.; VERSTAPPEN, F.; JANSEN, R.C. (1992)
High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo derived callus cultures of 3 *Allium* species.
Plant Cell Tissue and organ culture, vol.30, 3, pp.181-191
- VAN'T HOFF, J.; BJERKNES, C.A.; LAMM, S.S. (1986)
Meristematic precursors of vascular parenchyme differentiate from G2 phase after replicating DNA discontinuously.
Ann. J. Bot. 73, 87-95
- VARMA, K.R.; CASPI, E. (1970)
The mode of C-16 hydroxylation in the biosynthesis of gitoxigenin in *Digitalis purpurea*.
Phytochemistry 9, 1539-1543
- VARTAPETIAN, B.B.; ZAKHMILOVA, N.A. (1990)
Ultrastructure of wheat seedling mitochondria under anoxia and postanoxia.
Protoplasma 156, 39-44
- VAZ, A.D.N.; COON, M.J. ((1987)
Hydrocarbon formation in the reductive cleavage of hydroperoxides by cytochrome P-450.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1172-1176
- VAZ, A.D.N.; ROBERTS, E.S.; COON, M.J. (1991)
Olefin formation in the oxidative deformylation of aldehydes by cytochrome P-450: mechanistic implications for catalysis by oxygen-derived peroxide.
J. Am. Chem. Soc. 113, 5886-5887
- VERGERES, G.; WINTERHALTER, K.H.; RICHTER, C. (1989)
Identification of the membrane anchor of microsomal rat liver cytochrome P-450.
Biochemistry 28, 3650-3655

- VETTER, H.P.; MANGOLD, U.; SCHRÖDER, G. (1992)
Molecular analysis and heterologous expression of an inducible cytochrome P-450 protein from Periwinkle (*Catharanthus roseus* L.)
Plant Physiol. 100, 998-1007
- VOGEL, E.; LUCKNER, M. (1981)
Distribution of cardenolides in *Digitalis lanata*.
Planta Med. 41: 161-165
- WADA, A.; MATHEW, P.A.; BARNES, H.J.; SANDERS, D. (1991)
Expression of functional bovine cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 (P-450_{scc}).
Archives of biochemistry and biophysics, vol. 290, n^o 2, pp. 376-380
- WAGNER, F.; VOGELMANN, H. (1977)
Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formatio of secondary metabolites.
En: Barz W, Reinhard E, Zenk MH (eds). *Plant tissue culture and its biotechnological application*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp.245-252
- WATERMAN, M.R.; JOHN, M.E.; SIMPSON, E.R. (1986)
Regulation of synthesis and activity of cytochrome P-450 enzymes in physiological pathways.
En: *Cytochrome P-450 structure, mechanisms and biochemistry*. Ortiz de Montellano, P.R. Plenum Press. pp.347
- WATSON, E.; TRAMELL, P.; KALMAN, S.M. (1972)
Identification of submicrogram amounts of digoxin, digitoxin, and their metabolis products. Isolation by chromatography and preparation of derivatives for assay by electron capture detector.
Journal of Chromatography, 69, 157-163
- WAXMAN, D.J.; AZAROFF, L. (1992)
Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression.
Biochem. J. 281, 577-592
- WEAST, R.C. (1976,1987)
Handbook of chemistry and physics. 57th. and 68th. ed.
CRC PRESS, Inc. Cleveland, Ohio, USA. Boca Ratón, Florida, USA.
- WEEKS, W.W. (1970)
Physiology of alkaloids in germinating seed of *Nicotiana tabacum*.
Ph D Thesis, University of Kentucky, Lexington, U.S.A.

- WEIBEL, E.R.; (1969)
Stereological principles for Morphometry in Electron Microscopic Cytology.
Intern. Rev. Cytol. 26: 235-302
- WEIBEL, E.R.; BOLENDER, R.P. (1973)
Stereological techniques for electron microscopic morphometry.
En: Principles and Techniques of Electron Microscopy, Biological Applications, ed. M.A. Hayat, vol.3, pp.237-296. Van Nostrand. Rheinhold Co. Ltd, London.
- WEIBEL, E.R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F. (1966)
Practical stereological methods for morphometric cytology.
Journal of cell Biology, 30, 23-38
- WEILER, E.W. (1979)
Metabolism of digitoxin in individual plants of *Digitalis lanata*.
Planta Medica 35, 162-166
- WEILER, E.W.; WESTEKEMPER, P. (1979)
Rapid selection of strains of *Digitalis lanata* Ehrh. with high digoxin content.
Planta Med. 35: 316-322
- WEILER, E.W.; ZENK, M.H. (1976)
Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*.
Phytochemistry, vol.15, pp.1537-1545
- WEIMBERG, R.A. (1985)
The molecules of life.
Scientific American 253, 34-43
- WENDROTH, S.; SEITZ, H.U. (1990)
Characterization and localization of progesterone 5 α -reductase from cell cultures of foxglove (*Digitalis lanata* EHRH).
Biochem. J. 266, 41-46
- WERCK-REICHHART, D.; GABRIAC, B.; TEUTSCH, H.; DURST, F. (1990)
Two cytochrome P-450 isoforms catalyzing O-deethylation of ethoxycoumarin and ethoxyresourfin in higher plants.
Biochem. J. 270: 729-735
- WEST, C.A. (1980)
Hydroxylases, monooxygenases and cytochrome P-450
En: PK Stumpf and EE Coon. eds. The Biochemistry of Plants. pp: 317-364. Academic Press. New York

WHITE, R.E. (1991)

The involvement of free radicals in the mechanisms of monooxygenases.
Pharmacol. Ther. 49, 21-42

WHITE, R.E.; COON, M.J. (1980)

Oxygen activation by cytochrome P-450
Ann. Rev. Biochem. 49: 315-356

WHITE, R.E.; COON, M.J. (1982)

Heme ligand replacement. Reactions of cytochrome P-450.
J. Biol. Chem. 257: 3073

WHITLOCK, J.P.Jr. (1990)

Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30, 251-277

WIEGREBE, H.; WICHTL, M. (1993)

High performance liquid chromatographic determination of cardenolides in *Digitalis* leaves after solid-phase extraction.
Journal of Chromatography, vol.630, 1-2, pp.402-407

WITHERING, W. (1785)

An Account of the Foxglove and some of its medical uses with practical remarks on dropsy and other diseases.
Birmingham, printed by M. Swinney for Paternoster-Row, London, 1785

WOLF, C.R. (1982)

Metabolis basis of detoxification.

En: *Metabolic basis of detoxification* (Jakoby, W.B.; Bend, J.R.; Caldwell, U.; eds.), pp. 1-28, Academic Press, New York.

WU, CH.; ZAPATA, F.J. (1992)

Plant regeneration from protoplasts isolated from primary callus of four japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties.
Plant Science 86, 83-87

YAMAMURA, T.; TANAKA, S.; TABATA, M. (1991)

Participation of phytochrome in the photoregulation of terpenoid synthesis in thyme seedlings.
Plant cell Physiol. 32(5): 603-607

YANG, C.S.; BRADY, J.F.; HONG, J.Y. (1992)

Dietary effects on cytochrome P-450, xenobiotic metabolism, and toxicity.
FASEB J. 6, 737-744

BIBLIOGRAFIA

YASUKOCHI, Y.; MASTERS, R. (1976)

Some properties of a detergent solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P-450)-reductase purified by biospecific affinity chromatography.

J. Biol. Chem. 251 (17): 5337-5344

YASUKOCHI, Y.; PETERSON, J.A.; MASTERS, B.S.S. (1979)

NADPH-cytochrome c(P-450 reductase): Spectrophotometric and stopped-flow kinetic studies on the formation of reduced flavoprotein intermediates.

J. Biol. Chem. 254: 7079-7104

YOSHIDA, Y.; AOYAMA, Y.; SONODA, Y.; SATO, Y. (1990)

Consideration on the mechanism of C-C bond cleavage by lanosterol 14-demethylase (cytochrome P-450/14DM).

En: *Proceedings of the VIIIth. International Symposium on microsomes and drug oxidations (Ingelman-Sundberg, M.; Gustafsson, J.A. and Orrenius, S., eds), p. 118, Karolinska Institute, Stockholm.*

YOSHIKAWA, T.; FURUYA, T. (1979)

Purification and properties of sterol: UDPG glucosyltransferase in cell culture of *Digitalis purpurea*.

Phytochemistry 18: 239-241

YOSHIMATSU, R.; SATAKE, M.; SHIMOMURA, R. (1990)

Determination of cardenolides in hairy root cultures of *Digitalis lanata* by ELISA.

Journal of natural products 53,(6): 1498-1502

ZANEWICH, K.P.; ROOD, S.B.; SOUTHWORTH, C.E.; WILLIAMS, P.H. (1991)

Dwarf mutants of *Brassica*: Responses to applied Gibberellins and Gibberellin content.

J. Plant. Growth Regul. 10(3): 121-127

ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENAS, H.; STÖCKIGT, J.; WEILER, E.W.; DEUS, B. (1977)

Formation of the indole alkaloids Serpentina and Ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*.

En: *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application. Barz W, Reinhard E, Zenk M.H., eds., p.27. Springer, Berlin.*

ZIMMERLIN, A.; DURST, F. (1990)

Xenobiotic metabolism in plants: arylhydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 enzyme from wheat.

Phytochemistry 29(6): 1729-1732