

102
2.9.85



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION DE PRODUCTOS SECUNDARIOS
DE USO FARMACEUTICO A PARTIR DE
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

TRABAJO MONOGRAFICO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE LORETO SEGURA MORA



MEXICO, D. F.

1985.

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A B R E V I A T U R A S

- CTV - Cultivo de tejidos vegetales.
2,4-D - Acido 2,4-dicloro fenoxiacético.
ANA - Acido naftalenacético.
GA₃ - Acido giberélico.
AIA - Acido indol acético.
BA - Bencil adenina.
AIB - Acido indol benzofco.
PAL - Fenilalanina amonio-liasa.
ARNasa- ribonucleasa.
GDGAT - Glutamato sintasa.
GDH - Glutamato deshidrogenasa.
Pi - Fosfato inorgánico
AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico.
L-S - Medio de Linsmaier y Skoog.
M-S - Medio de Murashige y Skoog.
GLU - Glucosa
RAM - Ramnosa
RIA - Radio inmuno análisis.
UV - Luz ultravioleta
IR - Espectro infrarrojo
MS - Espectrofotometría de masas.
RMN - Resonancia magnética nuclear
P.f. - Punto de fusión.
PM - Peso molecular.
TLC - Cromatografía en capa fina.
EIA - Electroinmuno análisis.
GLC - Cromatografía Gas-Líquido
HPLC - Cromatografía de fase reversa de alta presión.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
a) Agregados celulares.....	5
b) Tejidos y órganos.....	7
c) Cultivo de órganos degenerados.....	7
d) Cultivos mixtos o mezclados.....	8
e) Cepas de CTV.....	8
f) Métodos de selección de cepas.....	8
1. PARAMETROS FISICOQUIMICOS Y NUTRICIONALES.....	13
1.1. Efecto de la fuente de Carbono.....	15
1.2. Efecto de la fuente de Nitrógeno.....	19
1.3. Efecto de los niveles de Fósforo.....	27
1.4. Efecto de otros nutrientes minerales.....	30
1.5. Efecto de las fitohormonas.....	33
1.6. Efecto de la luz.....	45
1.7. Efecto de la temperatura.....	51
1.8. Efecto del pH.....	53
1.9. Efecto de la aereación.....	54
1.10 Efecto de los antibióticos.....	55
1.11 Efecto de hongos.....	59
2. ALCALOIDES.....	64
2.1. Generalidades.....	64
2.2. Alcaloides derivados del indol.....	71
2.3. Alcaloides de acción antineoplásica.....	81
2.4. Alcaloides derivados de la fenantridina.....	83
2.5. Alcaloides morfínicos.....	83
2.6. Alcaloides derivados de la β -carbolina.....	86
2.7. Alcaloides derivados de las purinas.....	86
2.8. Alcaloides derivados de la bencilisoquinolina.....	87
2.9. Alcaloides derivados de la quinolina.....	90
2.10. Alcaloides derivados de la quinolicidina.....	91
2.11. Alcaloides derivados del tropano.....	91

3. ESTEROIDES	96
3.1. Esteroides de <u>Solanum</u> sp.	102
3.2. Esteroides de ginseng	102
3.3. Esteroides de <u>Citrullus colocynthis</u> y <u>P. harmala</u>	103
3.4. Sarsasapogenina de <u>Yucca filifera</u>	104
4. QUINONAS	106
4.1. Antraquinonas	106
4.2. Benzoquinonas	110
DISCUSION	113
CONCLUSION	115
BIBLIOGRAFIA	117

I N T R O D U C C I O N

En los últimos años de la década de los 40's James Bonner reportó que los cultivos de tejido de la planta del guayule producían huile. (1). En 1950 Walter Tulecke y Louis Nickell(2) demostraron que podía obtenerse biomasa a partir de células vegetales crecidas en tanques de acero. A pesar de estas publicaciones y otras relacionadas muchos científicos se preguntaban si la técnica de los cultivos de tejidos vegetales(CTV) podía ser exitosamente usada para estudiar productos secundarios y ser industrialmente útil. No hay duda hoy en día que los estudios de CTV han contribuido significativamente a nuestro conocimiento de los metabolitos secundarios de las plantas. Por ejemplo, sabemos que las células en cultivo de Catharanthus roseus pueden producir alcaloides monoméricos; también esta técnica nos ha permitido saber que las vacuolas de las células de cebolla tienen una enzima llamada alinasa, la cual está separada de los sustratos que dan origen al sabor; de igual manera a través del uso de CTV hemos sabido que la nutrescina N-metiltransferasa regula la bio-

síntesis de la nicotina(3).

Algunos fisiólogos vegetales aún dudan de que los CTV puedan ser desarrollados, que sean estables genéticamente y que produzcan compuestos en escala industrial. También es un hecho que la industria no solamente requiere de grandes cantidades de CTV para obtener sus compuestos sino que también el proceso sea provechoso desde el punto de vista económico. Los sistemas de CTV han sido desarrollados exitosamente en la década pasada para estudiar los productos secundarios, en mi juicio, será útil aplicarlos a la industria para producir compuestos de interés económico.

Si bien la producción inadecuada y la inestabilidad genética es algunas veces un problema significativo, la necesidad futura real de aplicación industrial es posible si llegamos a un mejor entendimiento de la diferenciación de las plantas y a un mejor desarrollo de la bioingeniería.

En las últimas 50 categorías de productos de CTV que se han investigado se identificaron no menos de 200 enzimas específicas y productos. Las categorías ampliamente consideradas son los alcaloides, las enzimas, los pigmentos y los esteroides.

Teóricamente, es posible obtener de los CTV cualquier compuesto que sea producido en la naturaleza por la planta de donde se obtuvo el cultivo. Prácticamente, la situación no es verdaderamente simple en ciertos casos, como por ejemplo cuando el producto deseado es producido en células especializadas las cuales no crecen bien en el cultivo, o cuando el producto está relacionado con la maduración de las células. Sin embargo, hay tres alternativas para producir metabolitos secundarios en CTV; 1) la síntesis de algunos productos en los CTV

que sean producidos por la planta en su habitat natural de la cual se derivó el cultivo, en las mismas o diferentes concentraciones; 2) la ausencia de metabolitos secundarios en condiciones de cultivo inferiores a las óptimas y 3) la producción de metabolitos secundarios en los CTV que no son producidos por la planta en la naturaleza, como por ejemplo la presencia de rutacultina en cultivos de Ruta graveolens; la de tres nuevas lactonas de sesquiterpenos en cultivos de tejido de Andrographis paniculata, así como la del 24-metilcolesterol en cultivos de tejido de Holarhena antidysenterica, y la lucidina en cultivos en suspensión de Morinda citrifolia, todos ellos ausentes de la planta que dió origen al cultivo(4).

Estos hechos sugieren que los CTV pueden o no contener vías metabólicas idénticas a las presentes en las plantas a partir de las cuales han sido obtenidos(3).

La tendencia actual de los grupos de investigación en la obtención de productos secundarios a partir de CTV es la de optimizar las velocidades de crecimiento, reformulando los medios de cultivo y modificando las condiciones ambientales tales como la luz, la temperatura, la velocidad de agitación, y la atmósfera en la cual crecen los cultivos.

De esta manera ha sido posible obtener más de 200 tipos de metabolitos secundarios a partir de los CTV (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de sustancias reportadas producidas por CTV in vitro.

Alcaloides	Flavonoides
Alergenos	Furanocromonas
Aminoácidos	Furanocumarinas
Antraquinonas	Glucósidos cardíacos
Agentes antileucémicos	Hormonas
Agentes antimicrobianos	Inmunoquímicos
Agentes antitumorales	Inhibidores de enzimas
Ácidos nucleicos y derivados	Inhibidores de virus de plantas
Aceites comerciales	Insecticidas
Aceites volátiles	Compuestos parecidos a insulina
Ácidos orgánicos	Látex
Benzonitrilos	Lípidos
Benzoquinonas	Naptoquinonas
Biotransformaciones	Péptidos
Carbohidratos	Perfumes
Condimentos	Pigmentos
Derivados del ácido benzoico	Polisacáridos
Diantronas	Proteínas
Emulsificantes de alimentos	Saborizantes
Enzimas (isoenzimas)	Taninos
Esteroides, esteroles	Terpenos y terpenoides
Fenólicos	Vitaminas

Los sistemas de CTV estudiados para la obtención de metabolitos secundarios pertenecen a uno de 4 tipos: agregados celulares, tejidos y órganos, órganos degenerados o cultivos mixtos.

AGREGADOS CELULARES.

La mayoría de los cultivos en suspensión contienen agregados de células (foto 1). El tamaño de los agregados de los cultivos es fuertemente afectado por la selección del inóculo y las condiciones de crecimiento. Generalmente bajas concentraciones de citocininas o altas concentraciones de 2,4-D favorecen la formación de pequeños agregados. Estos pequeños agregados pueden sintetizar metabolitos secundarios como los de zanahoria que producen grandes cantidades de antocianinas(3).

Los agregados celulares pueden diferenciarse en idioblastos, células secretoras y otros elementos vasculares. Su importancia y la de los organelos, para la producción de metabolitos secundarios aún no está bien entendida.

Sin embargo, se sabe que los idioblastos contienen cristales de oxalato de calcio que se forman en los tejidos cerca de áreas de gran actividad metabólica, también se conocen idioblastos que almacenan metabolitos secundarios como los de Ruta graveolens que almacenan aceites volátiles hasta en un 3%, sin embargo, no almacenan alcaloides como lo hace la planta(5). De igual manera los cultivos en suspensión de Datura producen pequeñas cantidades de alcaloides derivados del tropano mientras que los centros meristemáticos y/o los órganos de las raíces en cultivos diferenciados producen más alcaloides. Las células que están dentro de los agregados pueden también compartimentalizar constituyentes evitando así la formación de ciertos productos. Por ejemplo, las células de cebolla tienen con-

centrada la enzima alinasa en las vacuolas evitando de esta manera que reaccione con sus sustratos y por lo tanto la producción de serotonina(3).

Recientemente se han hecho esfuerzos considerables para el desarrollo de cultivos fotoautotróficos; por ejemplo, aquellos que sean fotosintéticamente activos y no requieran carbohidratos para su crecimiento. Tales cultivos difieren en sus lípidos y alcaloides de otros cultivos heterotróficos. Por ejemplo, los alcaloides de serotonina de Peganum son producidos por las células heterotróficas pero no por las fotoautotróficas(3).



Foto 1. Agregados celulares presentes en un cultivo en suspensión.

TEJIDOS Y ORGANOS.

La morfogénesis que lleva a la regeneración de las estructuras de la planta, es un tema ampliamente estudiado en la actualidad(6) ya que presenta un potencial biotecnológico muy grande. La superficie de los cultivos de tejidos a menudo dan origen a raíces y embriones somáticos, pero en ocasiones dan origen a brotes los cuales algunas veces producen flores, como los cultivos de ginseng o de tabaco. Este potencial permite explorar la capacidad que tiene cada tejido para expresar su potencial genético; así, por ejemplo, los embriones de apio verde producen mayor cantidad de ptalide que el cultivo que les dió origen, mientras que los de Panaver bracteatum sólo contienen trazas de tebaina al igual que las plántulas a las que dan origen(7), en tanto que las células en suspensión de P. somniferum producen cadeina y los brotes regenerados de ellos contienen morfina(3). Es decir la diferenciación de un tejido permite, en algunas ocasiones, la síntesis específica de algún compuesto, un ejemplo de ello son los callos de Solanum los cuales sólo contienen trazas de glucoalcaloides esteroideos mientras que sus raicillas contienen 5.2%, o como el caso de Digitalis cuyos brotes producen cantidades significantes de glucósidos cardíacos que se acumulan con la edad(9) al igual que los cultivos de brotes de Cinchona(10) y Catharanthus(11).

CULTIVOS DE ORGANOS DEGENERADOS.

Una alternativa a los cultivos de brotes o raíces puede ser mediante la modificación de su velocidad de crecimiento en fermentadores, y reduciendo su tamaño mediante la variación en las concentraciones de los reguladores del crecimiento empleados. Un ejemplo de esto son los cultivos de brotes de Chrysanthemum crecidos en presen-

cia de 20 ppm de benciladenina. Tales cultivos pueden crecer en la luz o en la oscuridad por muchas generaciones(3).

CULTIVOS MIXTOS O MEZCLADOS.

Un cultivo mixto, es aquel CTV que crece simultáneamente con algas verdes fijadoras de nitrógeno(12), bacterias que inducen fitoalexinas(13), u hongos que producen alcaloides(14). El microorganismo Agrobacterium rhizogenes puede también ser agregado a los CTV para inducir un crecimiento de la raíz más rápido y estable, lo que es deseable para una mejor producción de metabolitos secundarios.

CEPAS DE CTV.

Para obtener metabolitos secundarios a partir de CTV deberá seleccionarse y establecerse cuidadosamente las cepas.

Se ha visto que las plantas productoras de pequeñas cantidades de nicotina producen poca nicotina en los CTV, mientras que las plantas con alto contenido de alcaloides dan origen a CTV con mayor contenido de alcaloides. Sin embargo, algunos grupos creen que la alta producción de serpentina en C. roseus no está correlacionada con la planta original ya que las correlaciones observadas para otras plantas son pobres como las de Peganum(15) y las de Chrysanthemum. El estado del tejido de la planta original también deberá seleccionarse con cuidado(3).

MÉTODOS DE SELECCIÓN DE LAS CEPAS.

Un objetivo importante es la selección a partir de la población celular heterogénea, cepas estables altamente productoras de metabolitos secundarios. Las clonas pueden ser establecidas a partir de pequeños agregados celulares, de células simples o de protoplastos.

Desafortunadamente, a menudo se observa una variabilidad epigenética o fenotípica en las clonas y subclonas. Las subcepas en subcultivos repetidos pueden producir poco o ningún producto, como se observa para el alcaloide reserpina y el insecticida rotenona. Sin embargo, la producción de los esteroides de diosgenina y la visnagina se ha mantenido por años. En Catharanthus se aislaron setenta y seis clonas provenientes de protoplastos de hojas las que fueron más estables en su espectro de alcaloides que los cultivos derivados de diferentes plantas de Catharanthus. El número de cromosomas en las células de los CTV es a menudo inestable(16), este problema puede resolverse parcialmente si los cultivos celulares son preservados criogénicamente lo que también permite retener su capacidad de producción de metabolitos secundarios(3).

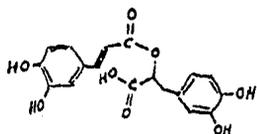
Los mutágenos raramente han sido usados con éxito para obtener cepas altamente productoras de metabolitos secundarios. Sin embargo, en el caso del ginseng la nitrosoguanidina ha sido usada para obtener cepas mutantes que producen gran cantidad de saponinas. Más exitoso que los mutágenos es el uso de análogos o altas concentraciones de intermediarios metabólicos. Los análogos de la fenilalanina son usados para seleccionar cepas de tabaco que producen más compuestos fenólicos y concentraciones elevadas del precursor ácido pimérico permitieron seleccionar cepas de Lavandula verde, altamente productoras de biotina(3).

Las cepas también pueden seleccionarse si los productos pueden ser correlacionados con la citología o morfología de los CTV. Por ejemplo, se pueden seleccionar células ricas en alcaloides midiendo la densidad citoplásmica, o células secretoras e idioblastos cuando

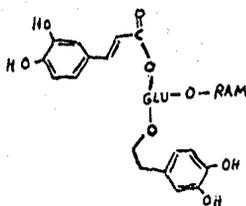
se buscan volátiles y terpenos y los vasos lactíferos para hidrocarburos. De esta manera se han seleccionado cepas celulares que acumulan gran cantidad de β -caroteno, antocianina, del pigmento shiconina o los alcaloides fluorescentes de la β -carbolina. Los procedimientos analíticos usados fueron por un lado químicos para la localización de los alcaloides en cepas altamente productoras de nicotina y RIA para cepas altamente productoras de ajmalicina y serpentina(3).

En un futuro cercano las técnicas que pueden usarse involucrarán flujos citométricos, microdensitometría, o quizá aún microinyectores que aspiren las células seleccionadas para el análisis. Los bioensayos no siempre pueden ser efectivos. Sin embargo, existen otras pruebas biológicas que pueden utilizarse(3).

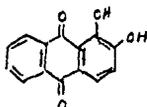
En resumen los metabolitos secundarios son obtenidos comercialmente mediante la extracción de la planta completa. Existe un gran número de problemas asociados con la manufactura de estos metabolitos. Los niveles de suministro de la materia prima puede ser alterada debido a problemas naturales tales como variaciones del clima o la presencia de plagas que arrasen con los cultivos. Estos problemas han sido reconocidos desde hace tiempo por lo que se ha buscado en los CTV una alternativa. Estos sistemas pueden proveer un suministro continuo y homogéneo de la materia prima en un estadio fisiológico uniforme debido a su independencia del medio ambiente, por las condiciones controladas utilizadas para su crecimiento. Por otro lado los CTV pueden ser manipulados más fácilmente que las plantas completas para incrementar los rendimientos o también pueden ser usados para generar compuestos aún desconocidos.



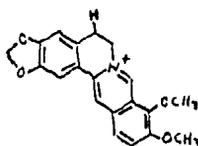
ACIDO ROSMARINICO
de Coleus blumei



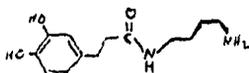
ACTEOSIDO de Syringa vulgaris



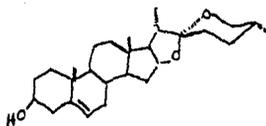
ALIZARINA de
Morinda citrifolia



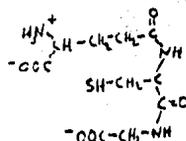
BERBERINA DE Thalictrum minus



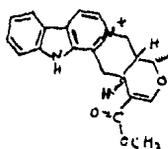
CAFEOIL PUTRESCINA de
Nicotiana tabacum



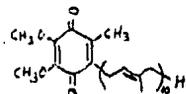
DIOSGENINA de
Dioscorea deltoidea



GLUTATION de
Nicotiana tabacum

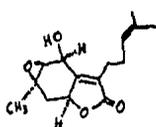


SERPENTINA de
Catharanthus roseus

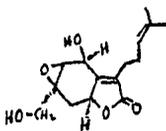


UBIQUINONA-10 de
Nicotiana tabacum

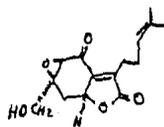
Fig. 1. Metabolitos secundarios producidos por CTV en cantidades iguales o excedidas de las de la planta intacta.



A



B



C

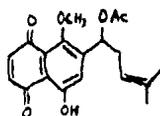
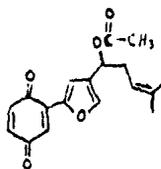
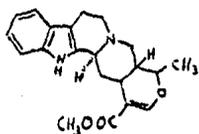
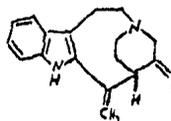
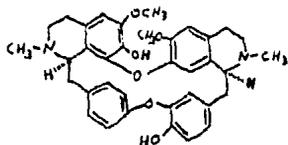
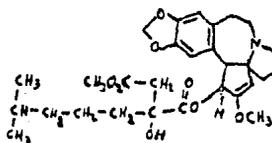
PANICULIDOS A, B, C de Andropogonis paniculataEQUINONA de Echium lyconsisEQUINFURANO de Echium lyconsis19-epi-AJMALICINA de Catharanthus roseusPERICINA de Picralima nitidaAROMOLINA de Stephania ceasaranthaHOMODEOXINHARRINGTONINA de Cephalotaxus harringtonia

Figura 2. Compuestos producidos por CTV pero no detectados en la planta intacta.

C A P I T U L O I

PARAMETROS FISICOQUIMICOS Y NUTRICIONALES

El uso de células vegetales cultivadas in vitro puede ser una poderosa herramienta para el entendimiento de la fitoquímica, incluyendo la fisiología, la enzimología y la regulación enzimática. El medio ambiente del cultivo puede ser estrictamente controlado, se pueden disminuir los efectos de las asociaciones microbianas así como los parámetros edáficos, y los efectos nutricionales y hormonales pueden ser estrictamente determinados. Existen ciertas limitaciones especialmente en la inducción de los cultivos de ciertas especies o la obtención de un buen crecimiento en otras, sin embargo, la limitante más importante de todas es la de que las células cultivadas in vitro frecuentemente dejan de mostrar el patrón normal de los metabolitos secundarios característico de la planta intacta, pero pueden sintetizar otros que la planta no produce. En años recientes los cultivos celulares también han sido usados para el estudio del estrés fitoquímico. Por ejemplo, el uso de ANA produce un incremento en la síntesis de la PAL (fenilalanina amonio-liasa) y de la faseolina un

producto del estrés en células en suspensión de Phaseolus vulgaris, por otro lado, la adición de 2,4-D (ácido 2,4-dicloro fenoxiacético) suprime el efecto producido por el ANA (17). Los agentes sulfhídricos, incluyendo al cloruro mercúrico, inducen la acumulación de medi carcinoma en Trifolium repens (18) y la acumulación de gliceolina en callos de Glycine max (19) irradiados con UV o el del tio-disulfuro obtenido de células en suspensión de Ricinus communis (20) el cual inhibe a la kuarano sintetasa, una enzima de la ruta de los diterpenoides.

La experiencia usual, sin embargo, es que muchos de los compuestos son producidos en bajas cantidades, en los CTV. La síntesis de los compuestos puede algunas veces ser inducida en varias direcciones, algunas de las cuales involucran la aplicación adicional de un estrés fitoquímico al sistema de CTV.

La habilidad o aparente incapacidad de los CTV para producir patrones normales de productos secundarios son manifestaciones de la regulación inducida por el estrés. La adición de activadores específicos, la eliminación de represores de la regulación, la manipulación genética y epigenética de las enzimas de las vías metabólicas pueden alterar los efectos de la regulación metabólica haciendo que se incrementen las concentraciones o velocidades de las enzimas del metabolismo secundario.

Se han revisado extensamente varios aspectos de la síntesis de metabolitos secundarios en los CTV.

En esta revisión estimamos la naturaleza y algunas de las causas y efectos de varios fenómenos de estrés que afectan al metabolismo secundario en los CTV lo que ofrece nuevas áreas de investigación en la bioquímica de las plantas.

1.1. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO.

Las fuentes de carbohidratos, por ejemplo sacarosa, son normalmente suministradas en un 2 a un 3% en los CTV y muestran una marcada influencia en la síntesis de los metabolitos secundarios. Por ejemplo, el grupo de Zenk estableció que los niveles de alcaloides en células cultivadas *in vitro* de Catharanthus roseus y la respuesta al crecimiento era una función de la concentración de sacarosa (21). Knobloch et al. establecieron que la síntesis de antocianinas y de alcaloides derivados del indol en células en suspensión de C. roseus se incrementaba cuando se incrementaba la concentración de la sacarosa del 4 al 10% (22). Igualmente, el grupo de Tai observó que la naturaleza y concentración de la fuente de carbono tiene un efecto significativo en la producción de diosgenina en células en suspensión de Dioscorea deltoidea (23), determinaron que sacarosa al 1.5% en el medio daba como resultado una alta producción de diosgenina comparada con fructosa, galactosa, lactosa o almidón. Las células cultivadas *in vitro* con alta producción de diosgenina crecen bien en un medio que contiene 3% de sacarosa (23).

La acumulación de fenólicos también es influenciada por los niveles de sacarosa. Un incremento en la sacarosa de 2 a 4% estimula la síntesis de los polifenoles en células en suspensión de rosas escarlatas de Paul (24). Westcott y Henshaw reportaron un incremento de tres veces en la concentración de fenólicos estimulado por la sacarosa en células en suspensión de Acer pseudoplatanus cuando se incrementó la concentración del 2 al 4% (25). Constabel estableció que 5% de sacarosa eleva la producción de los taninos en cultivos de tejido de Juniperus communis (26); el grupo de Mizukami estableció que el

rendimiento de los derivados de shikonina en callos de Lithospermum erythrorhizon se incrementaba cuando se aumentaba la sacarosa del 1 al 5% y alcanzaba niveles constantes cuando la concentración de sacarosa era del orden del 7 al 10% (27). Sin embargo, el crecimiento celular declinó a concentraciones altas de sacarosa. En tanto que en callos de Populus sp. con un incremento en los niveles de sacarosa del 0.3 al 5% se estimuló la producción de PAL y de antocianina mientras que las células no se vieron afectadas en su crecimiento (23). Matsumoto et al. (23) reportaron que la sacarosa, la glucosa, la fructosa y la rafinosa suministradas como el equivalente al 1% de glucosa eran metabolizadas y usadas para la síntesis de las antocianinas en células en susoensión de Populus sp. mientras que la galactosa, la lactosa, la maltosa, la melazitosa, el sorbitol, la trihalosa y el almidón no tenían ningún efecto estimulante en la síntesis de las antocianinas, pero sí reducían el crecimiento. Por el contrario, Ikeda et al. observaron una variación insignificante en la producción de ubiquinona en células en susoensión de Nicotiana tabacum crecidas en un medio con glucosa o sacarosa y establecieron que un incremento en las concentraciones de sacarosa (2-5%) resultaba en una disminución en la síntesis de la ubiquinona (29). En resumen una modificación en los niveles de los carbohidratos suministrados al medio afecta el metabolismo secundario. (Tabla 1.1).

La sacarosa tiene un efecto altamente estimulante en la producción de diosgenina por Dioscorea deltoidea (23). Al igual que en N. tabacum al bajar la concentración de sacarosa se estimula la síntesis de cumarina y la síntesis solamente disminuye como respuesta a la glucosa y fructosa (30).

El consenso general es que la sacarosa es mejor que cualquier otra fuente de carbono para el crecimiento y que las concentraciones arriba del 3% muchas veces incrementan la biosíntesis de los metabolitos secundarios. En algunos sistemas un incremento en la síntesis del metabolito puede ser indicio de una gran proliferación celular como una consecuencia del incremento en la fuente de carbono; sin embargo, esto por si solo no puede explicar completamente la acumulación neta de metabolitos secundarios observada, ya que por ejemplo se ha visto que la β -galactosidasa es inducida en células que crecen con lactosa. Estas observaciones sugieren que la represión por catabolito (la cual involucra la represión de enzimas por los intermediarios metabólicos) ejerce un considerable control en la regulación del metabolismo secundario. Sacher y Glasziou mostraron que la invertasa es reprimida por sus productos (31). La fuente de carbono influye en la composición de los ácidos grasos en el hongo Microsporium quenseum (32) y en la producción de los metabolitos secundarios en Cephalosporium acremonium (33), y es probable que mecanismos de regulación similar puedan alterar el metabolismo secundario en los CTV.

El metabolismo de los carbohidratos en las células vegetales incluye la vía de las pentosas, la glucólisis y el ciclo del ácido tricarbóxico. El ciclo de las pentosas es una fuente de parte del esqueleto carbonado de los aminoácidos aromáticos y de los compuestos fenólicos, y es una fuente potencial de poder reductor (NADPH) necesario para las reducciones biosintéticas. En las células vegetales, la glucólisis es una vía predominante mientras que la de las pentosas probablemente tiene aportes por no más que 30% del total de carbohidratos metabolizados.

Tabla 1.1 Efecto de la fuente y nivel de carbono en la síntesis de metabolitos secundarios.

Fuente carbonada	Efecto fitoquímico	Especie
Incremento de glucosa	Incremento de alcaloides " antraquinonas	<u>Choisya ternata</u> <u>Morinda citrifolia</u>
Eliminando glucosa	Disminuye el ácido lú- núlférico	<u>Marchantia polymorpha</u>
Adición de glucosa	Incremento de fileblina Disminuye podofilotoxina	<u>Embllica officinalis</u> <u>Podophyllum peltatum</u>
Adición de lactosa	Se induce Δ -galactosidasa	<u>Nemesia strumosa</u>
Adición de ribosa	Disminuyen los alcaloides	<u>Peganum harmala</u>
Incremento de sacarosa	Incremento de inhibidores de virus	<u>Agrosterma githago</u>
	Incremento de alcaloides y fenólicos.	<u>Catharanthus roseus</u>
	Disminuyen las antocia- nas	<u>Catharanthus roseus</u>
	Incremento del ácido rosmarínico	<u>Coleus blumei</u>
	Incremento de diosgenina	<u>Dioscorea deltoidea</u>
	Incremento de antraquinona	<u>Galium mollugo</u>
	Incremento de shiconina	<u>Lithospermum</u> <u>erythrorhizon</u>
	Disminuye la ubiquinona	<u>Nicotiana tabacum</u>
	Incremento de cinamoil putrecina	<u>N. tabacum</u>
	Incremento de antocianina	<u>Ponulus sp.</u>
	Incremento de solasodina	<u>Solanum laciniatum</u>
	Disminuye la ecdisterona	<u>Trianthema portulacastrum</u>
Disminución de sacarosa	Incremento de escopoleti- na y escopolina	<u>N. tabacum</u>
	Disminuye la ecdisterona	<u>T. portulacastrum</u>

1.2. EFECTO DE LA FUENTE NITROGENADA.

Los medios estándar para el cultivo de células vegetales in vitro usualmente contienen nitrógeno en la forma de una mezcla de nitratos y amonio. Sin embargo, algunos cultivos no pueden tolerar muchas veces niveles elevados de amonio. Por lo que se han utilizado medios que contienen solamente nitrato. Desde luego este cambio modifica sustancialmente la producción de los metabolitos secundarios.

Davies estableció que un incremento en los niveles de nitrato de 10 a 20 mM produce una disminución en la síntesis de los polifenoles en cultivos en suspensión de Rosa sp.(24), y esta disminución fue in dependiente de la concentración de glucosa en el medio. La acumulación de leucoantocianina también disminuye por el incremento de los niveles de nitrato (34). Sin embargo, otros compuestos suelen aumentar como la síntesis de la 1,4-naftoquinona en callos de Lithospermum anthracinigerum la cual aumenta cuando el nitrógeno total en el medio es incrementado de 37 a 134 mM. Aumentos adicionales dan como resultado una disminución en el rendimiento (27). El grupo de Zenk mostró que la producción de antraquinonas por Morinda citrifolia disminuye cuando los niveles de KNO_3 son modificados arriba o abajo del rango de 2.0-4.5 g/l (35). Ikeda et al.(29) establecieron que la producción de ubiquinona en cultivos en suspensión de N. tabacum se altera cuando la proporción de amonio:nitrato es cambiada de 3:1 a 1:3 conservando constante el nitrógeno total. La biosíntesis de alcaloides derivados del indol en Peganum harmala disminuye cuando el amonio o la glutamina son sustituidos por nitrato (36). Por el contrario el contenido de cafeína en células de Camellia sinensis se incrementa casi 4 veces en respuesta al amonio (37). Knobloch et al.(22) es-

establecieron que existen niveles relativamente altos de alcaloides (ajmalicina y sarcoentina), antocianinas y fenólicos en ausencia de fosfato y de nitrógeno inorgánico. La adición de KNO_3 y de NH_4NO_3 inhibe la acumulación de antocianinas en 90% y la síntesis de alcaloides en 80%.

Zielke y Filner demostraron que la nitrato reductasa es inducida por su sustrato en células en cultivo de N. tabacum (37). Los aminoácidos son productos finales del metabolismo del nitrógeno y reprimen a la nitrato reductasa en tabaco, así como en otros cultivos.

Jordan y Fletcher establecieron que la acumulación de nitrito se incrementa 30 veces en células de Rosa sp. que crecen en un medio que contiene nitrato en relación a las desarrolladas en un medio con nitrato y amonio (38). Las evidencias sugieren que la inducción de la nitrato reductasa es independiente del nitrato en células de N. tabacum. Halbrock ha sugerido que la correlación entre los niveles de nitrato y la actividad de la nitrato reductasa indican una regulación estricta de la actividad de la enzima por su sustrato, y posiblemente por otros metabolitos nitrogenados (39). Sin embargo, las enzimas relacionadas con el metabolismo general del fenilpropano muestran un dramático incremento en sus actividades en respuesta al agotamiento del nitrato en el medio de crecimiento.

Las evidencias actuales sugieren que la asimilación del nitrógeno en las plantas superiores como nitrato o a concentraciones bajas de amonio se lleva a cabo por la ruta de la glutamino sintetasa, y que durante condiciones de elevadas cantidades de amonio, o pequeños niveles de energía esta vía se interrumpe y entonces funciona la vía de la glutamato deshidrogenasa. La actividad de la glutamato deshidrogenasa se incrementa aún con pequeñas cantidades de amonio. La na

por parte del nitrógeno asimilado por las células en cultivo es usado para la biosíntesis de aminoácidos, proteínas, incluyendo enzimas y ácidos nucleicos. Se supone que el nitrógeno puede producir un estrés, tanto por la falta como por el exceso, y tiene efectos notables en el patrón de metabolitos nitrogenados producidos por células en cultivo, estos efectos no siempre son predecibles.

Numerosos estudios indican que el suministro de precursores de aminoácidos a los cultivos modifican la formación de metabolitos secundarios específicos.

Magna sugirió que la disponibilidad de intermediarios del fenil propanoide, por ejemplo la fenilalanina, ejerce un mayor control que la PAL en la síntesis de metabolitos secundarios. Sin embargo, cuando la L-fenilalanina, o la L-tirosina son adicionadas a cultivos de Colus blumei no tienen ningún efecto en la síntesis del ácido rosmarínico (43,41). Por el contrario, Zank et al.(42) establecieron que la adición de fenilalanina a cultivos de C. blumei producen un incremento del 100% en el contenido de ácido rosmarínico. Cultivos de C. roseus también producen mayores niveles de alcaloides indólicos en respuesta a la adición de triptófano (21,43,44), mientras que la adición de triptófano no tiene ninguna influencia en la síntesis de alcaloides en Camptotheca acuminata (45). Sorprendentemente, cuando se adiciona triptófano a cultivos de Phaseolus vulgaris produce alcaloides indólicos; P. vulgaris normalmente no puede producir alcaloides derivados del indol (46,47). Krueger y Carew establecieron que la adición de triptamina incrementa la síntesis de alcaloides en células de C. roseus si se adiciona 2-3 semanas después de la inoculación. Sin embargo, si la triptamina es adicionada al tiempo de la inocula-

ción la síntesis de alcaloides en C. roseus es reprimida (49,21,49).

La adición de otras fuentes de nitrógeno orgánico, tal como hidrolizado de caseína, peptona y extracto de levadura solos o con aminoácidos también ha sido estudiado. Los cultivos de Lithospermum erythrorhizon muestran una disminución en la síntesis de la 1,4-naftoquinona en respuesta al hidrolizado de caseína (27), Sconolia jaccanica muestra una disminución en la síntesis del inhibidor de plasmina (45,50). Un incremento en los niveles de diosgenina sintetizada, es resultado de un aumento en la concentración de extracto de levadura adicionada al medio, pero reduce el crecimiento celular en cultivos de Dioscorea deltoidea (51).

Las evidencias sugieren que los efectos del estrés de nitrógeno en células en cultivo son variables, y dependen en parte del estatus nutricional de las células durante el tiempo que dure el estrés. Evidentemente cualquier molécula que contenga nitrógeno puede ser afectada por el estrés de nitrógeno; estos incluyen aminoácidos, proteínas, aminoácidos no proteicos, alcaloides, amidas y pseudoalcaloides. Sin embargo, cualquier perturbación metabólica que afecte el metabolismo de las proteínas puede seguramente influenciar la formación de compuestos no nitrogenados.

La regulación feed-back puede dramáticamente afectar la síntesis de metabolitos nitrogenados por su influencia tanto en el metabolismo primario como en las principales rutas de síntesis de los compuestos secundarios. Por ejemplo, en la biosíntesis del triptófano la antranilato sintetasa es inhibida por feed-back por el triptófano. Este hecho es de gran importancia ya que el triptófano es el precursor de los alcaloides derivados del indol.

Mehta y Shailaga (52) establecieron que existe una acumulación de productos fenólicos en cultivos de Rosa sp. hasta que dicha acumulación fue inhibida por los niveles crecientes de nitrógeno. Sin embargo, la acumulación máxima de fenólicos se lleva a cabo cuando el medio es suplementado con extracto de levadura. El efecto del extracto de levadura es probablemente debido a que evita la represión catabólica pudiendo después ser metabolizado lentamente en aminoácidos y amonio (53).

Otra fuente de regulación puede ser la pérdida de la actividad de una enzima; este hecho es bien conocido en microorganismos. Por ejemplo, en la alga unicelular Chlorella vulgaris (54) la nitrato reductasa es inactivada por la adición de nitrato y amonio a las células en crecimiento en presencia de luz, y es probable que en células en cultivos actúe un mecanismo similar durante condiciones metabólicas en las que se altere la fuente de nitrógeno. Bajo tales condiciones de estrés la inactivación de la enzima puede desviar un metabolito de una ruta a otra y así afectar el patrón observado de los metabolitos secundarios. La inactivación selectiva de las enzimas en respuesta al estrés metabólico es un importante regulador en microorganismos y probablemente también en células en cultivo, pero la relación y la integración con las otras vías de síntesis de metabolitos secundarios ha sido relativamente poco explorado.

Tabla 1.2. Efecto de la fuente y nivel de nitrógeno mineral.

Fuente de nitrógeno	Efecto fitoquímico	Especie
Incremento de nitrógeno como $\text{NH}_4\text{NO}_3:\text{KNO}_3$	Incremento de la diosgenina	<u>Dioscorea deltoidea</u>
	Disminuyen las naftoquinonas	<u>Lithospermum erythrorhizon</u>
	Disminuye la nicotina	<u>Nicotiana tabacum</u>
	Incremento de escopolina y escopolina	<u>N. tabacum</u>
	Inhibición de la síntesis de fenólicos	<u>Rosa sp.</u>
	Incremento del inhibidor de plasmina	<u>Scorolia japonica</u>
Adición de KNO_3 y NH_4NO_3 Sólo KNO_3 o NH_4NO_3	Inhibición de antocianina y alcaloides	<u>Catharanthus roseus</u>
	Se inhibe la diosgenina	<u>D. deltoidea</u>
Alteración de la proporción de amonio;nitrato de 3:1 a 1:3	Incremento de ubiquinona	<u>N. tabacum</u>
Sustituyendo amonio por nitrato	Disminuyen los alcaloides derivados del indol	<u>Peganum harmala</u>
Disminución de KNO_3 abajo de 0.2% o incremento arriba de 0.45%	Disminución de antraquinonas	<u>Morinda citrifolia</u>
Incremento de nitrato	Disminución de polifenoles	<u>Rosa sp.</u>
	Disminución de leucoantocianinas	<u>Rosa sp.</u>
Solo nitrato	Incremento de amidas	<u>Rosa sp.</u>
Incremento de amonio	Incremento de cafeína	<u>Camellia sinensis</u>
	Incremento de glutatión	<u>N. tabacum</u>
Disminución de nitrógeno mineral	Incremento de solasodina	<u>Solanum laciniatum</u>
Supresión de nitrógeno mineral	Incremento de alcaloides, antocianina y fenólicos	<u>C. roseus</u>

Table 1.3. Efecto de la fuente de nitrógeno orgánico en la síntesis de metabolitos secundarios.

Fuente de nitrógeno	Efecto fitoquímico	Especies
Adición de cadaverina	Estimula la lupinina	<u>Lupinus polyphyllus</u>
Adición de 4-hidroxi-2-quinolona	Incremento de dictamina	<u>Ruta graveolens</u>
Adición de ornitina	Incremento de los alcaloides	<u>Datura stramonium</u>
	No hay efecto en los alcaloides de tropano	<u>Scopolia narviflora</u>
	Incremento ligero de alcaloides de tropano	<u>D. innoxia</u>
Adición de fenilalanina	Incremento de antocianina	<u>Catharanthus roseus</u>
	Incremento de ácido rosmarínico	<u>Coleus blumei</u>
	Incremento ligero de alcaloides de tropano	<u>D. innoxia</u>
	Incrementa alcaloides	<u>D. stramonium</u>
	Incrementa alcaloides	<u>D. tatula</u>
	Incremento de naftoquinonas	<u>Lithospermum erythrorhizon</u>
	Incremento de tebaina	<u>Papaver bracteatum</u>
	Incrementa alcaloides	<u>Scopolia acutangula</u>
	No hay efecto en alcaloides de tropano	<u>S. narviflora</u>
	Adición de fenilalanina para el crecimiento en fase tomo.	Disminuye la escopolina y la escopolina
Adición de fenilalanina y ác. casamino en la fase temprana del crecimiento	Incremento de escopolina y escopolina	<u>N. tabacum</u>
Adición de fenilalanina y ác. casamino en la inoculación	Disminución de escopolina y escopolina	<u>N. tabacum</u>
Adición de triptamina	Incremento de alcaloides indólicos	<u>C. roseus</u>

Continuación de la Tabla 1.3

Fuente de nitrógeno	Efecto fitoquímico	Especie
Adición de triptamina y secologanina	Síntesis de nuevos alcaloides	<u>Catharanthus roseus</u>
Adición de triptofano	No hay efecto en la síntesis de alcaloides	<u>Camptotheca acuminata</u>
	Incremento de alcaloides indólicos	<u>C. roseus</u>
	Disminuyen cinemol-outrescínas	<u>Nicotiana tabacum</u>
	Incremento de harmalina y harmina	<u>Peganum harmala</u>
	Síntesis de alcaloides indólicos	<u>Phaseolus vulgaris</u>
Adición de tirosina	No hay efecto sobre el ácido rosmarínico	<u>Colseus blursi</u>
	Incrementa alcaloides	<u>Pavaver somniferum</u>
Adición de glutamina por nitrato	Disminuyen los alcaloides indólicos	<u>Peganum harmala</u>
Adición de pectona e hidrolizado de caseína	Disminuyen las naftoquinonas	<u>L. erythrorhizon</u>
Incremento del hidrolizado de caseína	Inhibe la síntesis de antraquinonas	<u>Morinda citrifolia</u>
Adición de extracto de levadura	Incremento de diosgenina	<u>Dioscorea deltoidea</u>
	Incremento de fenólicos	<u>Rosa sp.</u>
Adición de pectona, extracto de levadura e hidrolizado de caseína	Disminución del inhibidor de plasmina	<u>Scopolia japonica</u>

1.3. EFECTO DE LOS NIVELES DE FOSFATO.

El fosfato inorgánico (Pi) tiene una importante función reguladora en células vegetales. Participa en procesos metabólicos tales como la fotosíntesis, la respiración, la glucólisis y es esencial para la síntesis de los ácidos nucleicos y la de los fosfolípidos. Parece razonable suponer que los niveles alterados de fosfato en el medio de crecimiento puedan afectar profundamente la biosíntesis de los metabolitos secundarios en células en cultivo. Por ejemplo, los niveles de fosfato pueden no tener efecto en la síntesis de alcaloides derivados de la protoberberina por células en cultivo de Berberis sp. (55). Otros estudios han demostrado que las células en cultivo de Spathanthus roseus y Nicotiana tabacum crecidas en medios sin Pi mostraron un incremento en la síntesis de alcaloides derivados del indol (22,36,56), y en la de las cumarinas respectivamente (30). Por el contrario, el incremento de las concentraciones de Pi causa un incremento en la producción de antraquinonas en Morinda citrifolia (35) y un incremento en la síntesis de alcaloides derivados del indol en C. roseus (57), e Ipomoea violacea (58).

La elimoclavina, un alcaloide de ergolina se ha encontrado en I. violacea, en otros miembros de las Convolvulaceae, y en los hongos Claviceps. La elimoclavina es formada en Claviceps spp. como se muestra en la figura 1.3. El Pi reprime tanto a la primera enzima como a la chanoclavina ciclasa. La adición de triptofano u otros compuestos reduce la inhibición. Sin embargo, un incremento en las concentraciones de Pi da como resultado un incremento en la síntesis total de alcaloides en I. violacea, pero reduce la síntesis de alcaloides en Ipomoea pesuvana y Rivea carumbosa (58).

En las células las rutas secundarias son frecuentemente inhibidas por niveles altos de P_i , mientras que concentraciones bajas de P_i frecuentemente son benéficas para un metabolismo secundario activo. La tabla 1.4, muestra los efectos de los niveles alterados de P_i en el metabolismo secundario en células en cultivo. Es evidente que las células vegetales poseen algún mecanismo de regulación similares a los de otros organismos (59). Sin embargo, es relativamente poco conocida la relación regulatoria entre los niveles de P_i y los metabolitos secundarios en células en cultivo. Esto representa un desafío en una área completamente inexplorada.

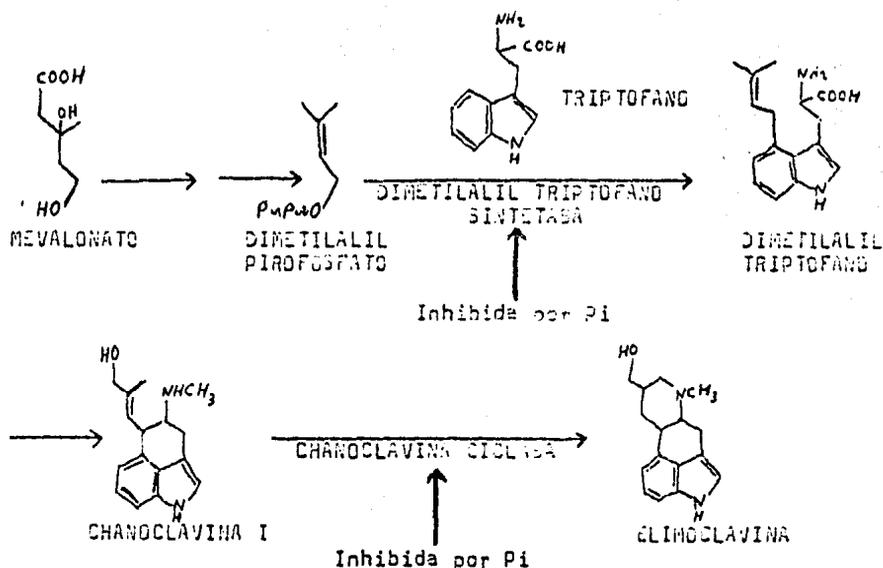


Figura 1.3. Biosíntesis de elinoclavina en *Claviceps* sp.; están indicadas las enzimas inhibidas por el fosfato inorgánico.

Tabla 1.4. Efecto del nivel de fosfato en la síntesis de metabolitos secundarios.

Nivel de fosfato	Efecto fitoquímico	Especies
Incremento de Pi	Incrementa alcaloides	<u>Catharanthus roseus</u>
	Incrementa alcaloides	<u>Ipomoea violacea</u>
	Incremento de antraquinonas	<u>Morinda citrifolia</u>
	Incremento de diosgenina	<u>Dioscorea deltoidea</u>
Disminución de Pi	Incremento de alcaloides, antocianinas y fenólicos	<u>Catharanthus roseus</u>
	Incremento de cinamoil putrecina	<u>Nicotiana tabacum</u>
	Incremento de escopolina	<u>N. tabacum</u>
	Incrementa alcaloides	<u>Peganum harmala</u>
	Incrementa solasodina	<u>Solanum laciniatum</u>
	No hay efecto en los alcaloides	<u>Tylophora indica</u>
	No tiene efecto en los alcaloides derivados de protoberberina	<u>Berberis sp.</u>
Incremento o disminución de Pi	No tiene efecto en los alcaloides derivados de protoberberina	<u>Berberis sp.</u>
Sin Pi	Incremento del ácido lunulárico	<u>Marchantia polymorpha</u>

1.4. EFECTOS DE OTROS NUTRIENTES MINERALES.

Mucha atención se ha dedicado al estudio de la fisiología, diferenciación y optimización del crecimiento celular en cultivo de tejidos. Sin embargo, existe una laguna en el conocimiento de los efectos de las concentraciones de otros nutrientes diferentes al nitrato y al fosfato en la síntesis de metabolitos secundarios por células en cultivo. En plantas intactas se conocen varias complicaciones de los procesos metabólicos afectados por nutrientes minerales esenciales.

Dobberstein y Staba establecieron que los niveles de alcaloides producidos por Argyrea nervosa se incrementan usando poco K^+ en el medio de crecimiento (58). Sin embargo, en Rivea corimbosa se ve una disminución en la síntesis de los alcaloides (59). Croteau y Karp establecieron que la enzima que cataliza la síntesis de los monoterprenos alcanfor y borneol requiere Mg^{++} para su actividad (60). La biosíntesis de glutatión requiere Mg^{++} y es estimulada por K^+ (61). La actividad de la entkaureno sintetasa la cual está involucrada en la síntesis de los diterpenoides, es dependiente de iones divalentes, como Mg^{++} , Mn^{++} y Ni^{++} (62). Otras reacciones enzimáticas involucradas en la síntesis de otros diterpenoides son afectadas por los iones divalentes Fe^{++} , Mg^{++} y Mn^{++} (63). Parece razonable que la síntesis de diterpenoides, esteroides, carotenoides e isoprenoides superiores sea afectada por un estrés de nutrientes especialmente iones.

El azufre es también importante para el metabolismo en las células vegetales. El sulfato provee el azufre que es requerido para la biosíntesis de metabolitos secundarios que contienen azufre, tales como aminoácidos, algunos poliacetilénos, glucósidos de mostaza y

compuestos saborizantes, por ejemplo el S-trans-propenil-L-cisteína de Allium cepa. Los compuestos que contienen azufre son importantes como intermediarios en la síntesis de varios metabolitos secundarios. La función de la S-adenosilmetionina en la metilación de una multitud de compuestos, tales como la N-metilación de precursores de alcaloides de argolina, es bien conocida (65).

La tabla 1.5 muestra algunos de los efectos fitoquímicos conocidos de nutrientes minerales en células en cultivo; desafortunadamente, estos datos se han determinado empíricamente.

Tabla 1.5. Efectos de nutrientes minerales diferentes al nitrato y al fosfato en la síntesis de metabolitos secundarios.

Nivel del nutriente	Efecto fitoquímico	Especie
Incremento de Ca^{2+}	Disminuyen las naftoquinonas	<u>Lithospermum erythrorhizon</u>
	Suprime la síntesis de clorofila	<u>Nicotiana tabacum</u>
Disminución de Ca^{2+}	Incremento de lignina	<u>Daucus carota</u> <u>N. tabacum</u> <u>Parthenocissus tricuspidata</u>
	Disminución de serotonina	<u>Peganum harmala</u>
Incremento de Fe^{2+}	Disminuyen las naftoquinonas	<u>L. erythrorhizon</u>
Incremento de K^+	Suprime la síntesis de clorofila	<u>N. tabacum</u>
Disminución de K^+	Incrementa alcaloides	<u>Argyrea nervosa</u>
	Disminuye serotonina	<u>Peganum harmala</u>
Incremento de SO_4^{2-}	Incrementa amidas	<u>N. tabacum</u>
	Disminuye el glutatión	<u>N. tabacum</u>
Disminución de SO_4^{2-}	Disminución de serotonina	<u>P. harmala</u>
	Disminuyen alcaloides	<u>P. harmala</u>
Adición de MgSO_4	No hay efecto en los alcaloides	<u>Catharanthus roseus</u>
Adición de NaCl	Incremento de prolina	<u>N. tabacum</u>
	Acumulación de aminoácidos	<u>N. tabacum</u>
	Estimula la síntesis de etano y etileno	<u>N. tabacum</u>
Adición de MgCl	No hay efecto en los alcaloides	<u>C. roseus</u>
Adición de KCl	Disminuyen alcaloides	<u>P. harmala</u>

EFECTO DE FITOHORMONAS EN LA SINTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

La evidencia actual indica que el incremento en los niveles de metabolitos secundarios en células en cultivo coinciden con la diferenciación u organogénesis. Por lo tanto no es sorprendente que la mayoría de los estudios del metabolismo secundario en células en cultivo están enfocados a los efectos que tienen los diferentes niveles de reguladores del crecimiento tanto en la organogénesis como en la síntesis de los metabolitos secundarios. En general se requieren dos tipos de reguladores del crecimiento por las células en cultivo las auxinas y las citocininas. En algunos casos también se usa ácido giberélico (GA_3). Son numerosos los reportes de que el tipo y concentración de auxina o de citocinina o la relación auxina:citocinina en el medio de crecimiento alteran dramáticamente el crecimiento y la acumulación de metabolitos secundarios en células en cultivo (Tabla 1.5). Por ejemplo, GA_3 y AIA pueden incrementar la actividad de la ARNasa lo que produce una disminución en el nivel de ARN. Tal efecto seguramente afecta el metabolismo secundario de las células vegetales.

Carow y Krueger (57) establecieron que al incrementar las concentraciones de 2,4-D se incrementaba ligeramente la producción de alcaloides indólicos en cultivos en suspensión de *C. roseus*. La disminución en los niveles de 2,4-D da como resultado la desaparición del crecimiento y disminuye la recuperación de alcaloides del medio. Sin embargo, las bajas concentraciones de 2,4-D no reprimen la síntesis de alcaloides tanto como los niveles altos. La concentración óptima de 2,4-D para la producción de alcaloides es de 1 mg/l. La adición de AIA al medio de crecimiento da como resultado diferencias cuali y

cuantitativas en la producción de alcaloides. Knobloch et al. (22) de terminaron que el 2,4-D suprime la síntesis de los alcaloides ajmalicina y serpentina en células en suspensión de C. roseus, pero en presencia de AIA se produce un incremento en los niveles de alcaloides. La benciladenina (BA) en presencia de auxina da un rendimiento alto de alcaloides pero bajas velocidades de crecimiento. Las giberelinas suprimen la síntesis de alcaloides (21).

Nettleship y Slaytor (36) establecieron que la síntesis de alcaloides indólicos en callos de P. harmala aumenta en respuesta a la disminución de la concentración del 2,4-D. Callos creciendo en medio que contiene solamente 2,4-D produce sólo al glucósido gentisato, y a la ruina. Sin embargo, la harmina, el harmalol y la ruina son los alcaloides sintetizados en mayor cantidad por callos creciendo en medios deficientes en auxinas. La harmina y el harmalol se encuentran en callos viejos de P. harmala creciendo con ANA (36). Recientemente, el grupo de Sasse (66) estableció que la harmina y el harmalol son los principales alcaloides detectados en células en cultivo de P. harmala en presencia de 2,4-D. La figura 1.4 ilustra los patrones de biosíntesis de los alcaloides de P. harmala creciendo bajo diferentes condiciones de estrés de auxinas. (36,66,67,68). Barz et al. (69) establecieron que las células fotoautotróficas de P. harmala en la reversión al heterotrofismo en presencia de 2,4-D y cinetina sintetizan harmalol, harmol y 5-hidroxitriptamina; pero en presencia de ANA estas células producen harmina, harmalina y harmol. El 2,4-D y la cinetina favorecen la preferencia de la síntesis de compuestos hidroxilados, pero el ANA favorece la formación de alcaloides metoxilados. Mulder-Krieger et al. (70) establecieron que los alcaloides quinamina y cinconamina eran producidos por cultivos de Cinchona pubescens

creciendo en presencia de $1 \mu\text{M}$ de las auxinas AIA, AIB y 2,4-D y $1 \mu\text{M}$ de zeatina. Por el contrario estos compuestos no son detectados en células creciendo con AIA, AIB, 2,4-D y ANA, y las citocininas BA o cinetina, excepto cuando el ANA y la BA están presentes al mismo tiempo. Todas las combinaciones probadas de auxinas y citocininas suprimen la síntesis de cinconinona, quinidinona, $3\alpha, 17\beta$ -cincofilina y de la $3\alpha, 17\alpha$ -dihidrocinconidina. La presencia de AIB y de zeatina, ó de 2,4-D y zeatina a concentraciones de $1 \mu\text{M}$ genera una gran producción de alcaloides. Akasu y cols. (71) aislaron dos alcaloides de callos de Stenhania cepharantha cultivadas con AIA y cinetina; la biscolaurina berbamina y la aromolina. El ANA y la cinetina también mantienen la síntesis de alcaloides a bajos niveles. Sorprendentemente, el AIA y la cinetina permiten una síntesis que sobrepasa los niveles de la planta intacta.

La síntesis de alcaloides del fenantreno; papaverina, morfina, codeína e isotabaina por células en suspensión de Papaver bracteatum es suprimida por 0.1 mg/l de 2,4-D (72). Por el contrario, Hodges y Raonport (73) establecieron que los alcaloides tebaina, codeína y morfina sí eran producidos por callos de P. somniferum creciendo en presencia de 2,4-D, ANA, 6-N-(2-isopentenil) aminopurina y cinetina. Cuando la 6-N-(2-isopentenil) aminopurina es suministrada sola se acumula la tebaina. La codeína es el mayor producto en callos crecidos en presencia de 2,4-D, o de cinetina, y se produce menor cantidad de morfina y tebaina.

Ikuta et al. (74) establecieron callos de Coptis japonica que producen los principales alcaloides establecidos en el rizoma de la planta intacta. La berberina y la jatrorricina predominan en los callos, pero las cantidades son más pequeñas que las determinadas en

la planta intacta. El contenido de alcaloides de células creciendo en presencia de 2,4-D y cinetina se incrementa con períodos prolongados de cultivo. El contenido de jatrorricina y el crecimiento se reducen cuando se excluye al 2,4-D del medio de cultivo. Sin embargo, la adición de cinetina en presencia de 2,4-D da como resultado un incremento en el contenido de berberina, pero reduce la síntesis de jatrorricina. La jatrorricina y alcaloides relacionados muestran una regulación por la concentración de 2,4-D en callos de Thalictrum minus. La columbamina, la talifendina, la talidastina y la deoxitalidastina no son detectadas en callos creciendo en presencia de 5 mg/l de 2,4-D. Sin embargo, la berberina sí está presente en callos creciendo con 2,4-D y cinetina y se encuentra en mayores cantidades que la determinada en los tallos de las plantas intactas.

Los callos de N. tabacum subcultivados repetidamente por 5 años en presencia de 2,4-D no producen alcaloides; pero los alcaloides anabasina, anatabina y nicotina son sintetizados rápidamente cuando las células se hacen crecer en medios con AIA (75). Ohta et al. (76) establecieron que la síntesis de nicotina por N. tabacum se lleva a cabo mejor en medios con 0.15 y 0.2 mg/l de ANA; la alteración de los niveles de auxinas por arriba o por abajo de un determinado rango reduce el contenido de nicotina. El efecto supresivo en la síntesis de nicotina es mayor en presencia de 2,4-D, que en presencia de ANA ó de AIA; 1 mg/l de 2,4-D, ó 10 mg/l de ANA ó 100 mg/l de AIA casi inhiben completamente la síntesis de nicotina. Las inhibiciones son reversibles. La adición de 5 mg/l de cinetina al medio de crecimiento también inhiben completamente la síntesis de nicotina (77).

La síntesis de antocianinas por células en suspensión de Daucus

Carota se lleva a cabo en ausencia de 2,4-D. La adición de 2,4-D al medio de crecimiento suprime su síntesis (78). Sin embargo, las células en suspensión de Haplopanus gracilis acumulan antocianina en presencia de $4.5 \times 10^{-6}M$ de 2,4-D (79). Schimtz y Seitz (30) establecieron que $10^{-12}M$ de GA suprime la síntesis de antocianinas en D. carota. $10^{-4}M$ de GA inhibe por completo la síntesis. La adición de GA_3 a H. gracilis a $10^{-6}g/ml$ inhiben la formación de PAL (81). Esto puede explicar en parte, la disminución en la síntesis de antocianinas observado en células expuestas a GA. Sugano y Hayashi (32) establecieron que la antocianina se sintetiza en cultivos de D. carota creciendo con 2,4-D en lugar de AIA. Harborne et al. (33) establecieron que las antocianinas cianidín-3-glucósido y delphinidín-3-glucósido se sintetizan en callos de Dimorphanthea auriculata cuando se crecen en presencia de 2,4-D: estos compuestos no son detectados en tallos intactos. Por el contrario los callos de Linum usitatissimum producen cianidín-3,5-diglucósido, pero no malvidina o hirsutidina (sus glucósidos) que son los que se encuentran normalmente en la planta (34). Smith et al. (35) aislaron cianidín-3,5-diglucósido y peonidín-3,5-diglucósido de callos de Strobilanthes dyeriana creciendo en AIA, pero no en 2,4-D. Otros estudios han mostrado que la síntesis de antocianinas es inhibida por auxinas, especialmente el 2,4-D en células de Populus sp., H. gracilis y Rosa sp. Sin embargo, el 2,4-D produce un estímulo en la síntesis de antocianinas en H. gracilis y Rosa sp. en presencia de luz, y niveles elevados de 2,4-D no inhiben la actividad de la PAL in vitro.

Okazaki et al. (36) establecieron que el 2,4-D, el AIA y la BA incrementan la síntesis de las cumarinas de escopoletina y el glucósido de escopolina. El AIA y la BA incrementan las concentraciones de es-

conopletina y escopoлина en las células y los niveles de escopoletina en el medio de cultivo. Por otro lado, el 2,4-D causa un incremento en la acumulación del glucósido en las células y disminuye el nivel de la aglicona en el medio. El etileno, el ácido abscísico o el GA no afectan la síntesis de estos compuestos.

Los callos de *Trianthema portulacastrum* creciendo en medios con 2,4-D producen ecdisterona, cuya producción es estimulada en presencia de 2,4-D y cinetina, las cuales estimulan la formación de raíz. Se ha establecido que el GA incrementa la síntesis de ecdisterona (37). Biesboer y Mahlberg (38) establecieron que la producción de esteroides por callos de *Euphorbia tirucalli* se aumenta por la adición de AIA y disminuye por la adición de BA en el medio de crecimiento.

Waller et al. (39) mostraron que los callos de *Delphinium ajacis* producen mucho más esteroides que la planta intacta.

Rucker et al. (90) observaron que la síntesis de glucósidos cardíacos en callos de *Digitalis purpurea* es influenciada por el AIA pero no lo es por la proporción de 2,4-D:AIA. Se ha establecido que el GA inhibe la biosíntesis del glucósido. Kaul y Staba (91) y Kaul et al. (51) reportaron la producción de diosgenina en callos de *Dioscorea deltoidea* creciendo con 0.1 a 1.0 mg/l de 2,4-D. Sin embargo, la remoción del 2,4-D resulta en una diferenciación y un poco inesperadamente en una disminución del nivel de diosgenina. Heble et al. (73) establecieron que los callos de *Solanum xanthocarpum* creciendo con AIA muestran un incremento en los niveles de diosgenina, pero el nivel de β -citossterol disminuye. Cuando el 2,4-D es sustituido por AIB se observa un resultado similar, y la síntesis de diosgenina se estimula cuando el AIB se aumenta al 0.01%. Stearns y Morton (92) establecieron que células en suspensión de *Glycine max* creciendo en ore-

sencia de AIB, con o sin GA, producen ácido palmítico y ácidos poli-insaturados menores. Los niveles de ácido oleico son reducidos en respuesta al AIB. Tabata et al. (93) establecieron que la síntesis de la 1,4-naftoquinona se incrementa en callos de L. erythrorhizon crecidos en la oscuridad en medios con AIA disminuyendo la producción cuando el 2,4-D es sustituido por AIA o los cultivos son irradiados con luz azul (300-560 nm). Sin embargo, con 2,4-D e irradiación con luz roja (660 nm) el rendimiento es máximo para la síntesis de podofilotoxina en callos de Podophyllum peltatum (94).

La mayoría de los estudios de estrés producido por los reguladores del crecimiento están involucrados en la optimización del rendimiento de los productos secundarios usando callos o células en suspensión en cultivos en batch. Con tales estudios no es posible evaluar los efectos de las auxinas y citocininas independientemente de los efectos de los parámetros nutricionales cambiantes intrínsecos a estos sistemas. Usando técnicas de cultivos continuos Balague et al. (95) establecieron que las células de Pyrus communis en presencia de 2,4-D consumen amonio, K^+ y Ca^{++} a altas proporciones, mientras que el nitrato y el Mg^{++} no lo son. Está claro que la síntesis de todo tipo de metabolitos secundarios se ve alterada por el estrés producido por los reguladores del crecimiento pero estos cambios son transitorios. Aunque la opinión general sugiere que las concentraciones incrementadas de auxinas suprimen el metabolismo secundario y pequeñas concentraciones pueden permitir la síntesis de productos secundarios.

Tabla 1.6. Efecto de los reguladores del crecimiento en la síntesis de metabolitos secundarios.

Reguladores del crecimiento	Efecto fitoquímico	Especie
Incremento de 2,4-D	Incremento de etileno	<u>Acer pseudoplatanus</u>
	Incremento de alcaloides	<u>Catharanthus roseus</u>
	Disminuyen polifenoles	<u>Cassia fistula</u>
	Inhibe la síntesis de alcaloides indólicos	<u>Peganum harmala</u>
	Estimula el etileno	<u>Nicotiana tabacum</u>
	Disminuyen las antocianinas en células crecidas en la oscuridad	<u>Rosa</u> sp.
	Incremento de antocianinas en células crecidas en la luz	<u>Rosa</u> sp.
	Adición de 2,4-D	Incremento de malato
Incremento de antraquinonas		<u>Cassia tora</u>
Disminuyen alcaloides		<u>C. roseus</u>
Se inhibe la síntesis de cinchonina, quinidina, cincofilina y dihidrocinconidina		<u>Cinchona pubescens</u>
Incremento de alcaloides		<u>Conium maculatum</u>
Inhibición de la síntesis de antocianinas		<u>Daucus carota</u>
Esterificación de tropano con acetato		<u>Datura innoxia</u>
Incremento de diosgenina		<u>Dioscorea deltoidea</u>
Disminución de protoberberina y alcaloides de aporfina		<u>Dioscoreophyllum cumminsii</u>
Inhibe la síntesis de naftoquinonas		<u>Echium lycopsis</u>
Se suprime la síntesis de antraquinonas		<u>Galium mollugo</u>
Se estimula la síntesis de hemigosinol y gosinol		<u>Gossypium hirsutum</u>

Continuación de la tabla 1.6.

Reguladores del crecimiento	Efecto fitoquímico	Especie
Adición de 2,4-D	Se inhibe la síntesis de antraquinonas	<u>Morinda citrifolia</u>
	Se inhibe la síntesis de alcaloides	<u>Nicotiana tabacum</u>
	Incremento de ubiquinona	<u>N. tabacum</u>
	Incremento de escopolina y disminuye la escopoletina	<u>N. tabacum</u>
	Inhíbe la síntesis de alcaloides	<u>Papaver bracteatum</u>
	Se sintetiza solo la codeína	<u>Papaver somniferum</u>
	Incremento de podofilotoxina	<u>Podophyllum peltatum</u>
	Incremento de diosgenina	<u>Solanum xanthocarpum</u>
Adición de 2,4-D	Se sintetiza ecdisterona	<u>Trianthema portulacastrum</u>
	Incremento de diosgenina	<u>Dioscorea deltoidea</u>
Disminución de 2,4-D	Disminución de carotenoides y esteroides	<u>Daucus carota</u>
	Inhíbe la síntesis de alcaloides	<u>Cinchona nubescens</u>
Adición de 2,4-D y cinetina	Incremento de berberina disminuye jatrorricina	<u>Coptis japonica</u>
	Hay síntesis de harmol, harmalol y 5-hidroxitriptamina	<u>Peganum harmala</u>
	Se estimula la síntesis de alcaloides	<u>Stephania cepharantha</u>
	Se altera el patrón de alcaloides	<u>C. roseus</u>
Adición de AIA	Incremento de alcaloides	<u>C. roseus</u>
	Se inhibe la síntesis de alcaloides	<u>C. nubescens</u>
	Esterificación de tropina y acetato	<u>Datura innoxia</u>
	No tiene efecto en la síntesis de glucósidos	<u>Digitalis purpurea</u>

Continuación de la tabla 1.6.

Reguladores del crecimiento	Efecto fitoquímico	Especie
Adición de AIA	Incremento de alcaloides	<u>Dioscoreophyllum cumminsii</u>
	Incremento de esteroides	<u>Eunhorbia tirucalli</u>
	Hay síntesis de naftoquinonas	<u>Lithospermum erythrorhizon</u>
	Se sintetiza anabasina, anatabina y nicotina	<u>Nicotiana tabacum</u>
	Disminución de podofilotoxina	<u>Podophyllum peltatum</u>
Adición de AIA y BA	Incremento de diosgenina y disminuye el citosterol	<u>Solanum xanthocarpum</u>
	Incremento de escopoletina y escopolina en las células y disminuye la escopoletina en el medio	<u>N. tabacum</u>
Adición de AIA y cinetina	Se estimula la síntesis de alcaloides	<u>Stemania ceccharantha</u>
Adición de AIB	Se inhibe la síntesis de cinchonina, quinidina, cincofilina y dihidrocinconidina	<u>Cinchona pubescens</u>
	Esterificación de tropina y acetato	<u>Datura innoxia</u>
	Se inhibe la síntesis de scolasodina	<u>Solanum xanthocarpum</u>
Adición de AIB, GA y cinetina	Incremento de ácido linoleico	<u>Glycine max</u>
Adición de ácido indolacético	Incremento de saponinas	<u>Panax ginseng</u>
Adición de ANA	Disminuyen alcaloides	<u>Catharanthus roseus</u>
	Incremento de alcaloides	<u>Chiosya ternata</u>
	Esterificación de tropico y ácido trónico (incremento de atropina)	<u>Datura innoxia</u>
	Incremento de alcaloides	<u>Dioscoreophyllum cumminsii</u>
	Se estimula la síntesis de hemigiosipol y giosipol	<u>Gossypium hirsutum</u>

Continuación de la Tabla 1.6.

Reguladores del	Efecto fitoquímico	Especie
Adición de ANA	Estimula la síntesis de naftoquinonas	<u>Juglans microcarpa</u> <u>Juglans major</u>
	Incremento de antraquinonas	<u>Morinda citrifolia</u>
	Se sintetiza harmina, harmol y harmalina	<u>Peganum harmala</u>
	Disminuye podofilotoxina	<u>Podophyllum peltatum</u>
Adición de ANA y BA	Inhibe la síntesis de cinconina, quinidinona, cincofilina y dihidrocincodina	<u>Cinchona pubescens</u>
Adición de ANA y cinetina	Hay síntesis de codeína, morfina y tebaina	<u>Papaver somniferum</u>
	Inhibe la síntesis de ecdisterona	<u>Trianthema portulacastrum</u>
Adición de GA	Inhibe la síntesis de alcaloides	<u>Catharanthus roseus</u>
	Incremento de digoxina	<u>Digitalis lanata</u>
	Inhibe la síntesis de glucósidos cardíacos	<u>Digitalis purpurea</u>
	Estimula la síntesis de ecdisterona	<u>Trianthema portulacastrum</u>
Adición de cinetina	Inhibe la síntesis de nicotina	<u>Nicotiana tabacum</u>
	Disminuye la ubiquinona e incrementa la lignina	<u>N. tabacum</u>
	Se sintetiza codeína	<u>Papaver somniferum</u>
Adición de ácido abscísico	Induce la síntesis de suberina	<u>Solanum tuberosum</u>
Adición de AMPc	Disminuye el camnesterol e incrementa citosterol	<u>Cerchorus olitorius</u>
Adición de 6-N-(2-isonentenil) amino purina	Inhibe la síntesis de codeína, morfina pero se sintetiza tebaina	<u>Papaver somniferum</u>

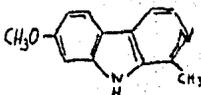
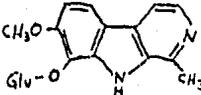
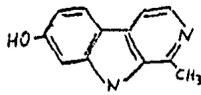
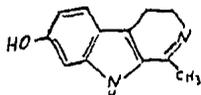
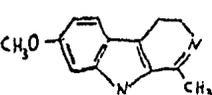
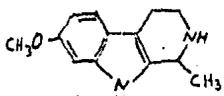
Compuestos de plantas intactas	Compuestos de células cultivadas		
	2,4-D	ANA	Deficiente en auxina
HARMINA 	- +	+	+
RUINA 	- -	-	+ DIHIDRORUINA
HARMOL 	- +	- +	+
HARMALOL 	- +	-	+
HARMALINA 	- -	- +	+
TETRAHIDROHARMINA 	- -	-	-

Figura 1.2. Patrón de alcaloides de β -carbolina establecido en plantas intactas y células en cultivo de Penanum harmala crecidas en medios con y sin auxinas.

EFECTO DE LA LUZ EN LA SINTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

La luz tiene efectos pronunciados en el crecimiento y desarrollo de los CTV, e influye en la formación de los metabolitos secundarios y no solo se ve afectada por la cantidad sino también por la calidad de la luz. Por ejemplo, la luz azul induce un máximo en la formación de antocianinas en células en suspensión de Hanlonannus gracilis. (96-99). La luz blanca induce la síntesis de antocianinas en C. roseus, y Populus sp. Por el contrario, Tabata et al. (93) establecieron que tanto la luz blanca como la azul inhiben completamente la síntesis de la 1,4-naftoquinona en callos de Lithospermum erythrorhizon.

La producción de ácido clorogénico en H. gracilis es estimulada por la luz blanca, azul y roja de las cuales la luz azul es la más efectiva (99,100). Sin embargo, Lackmann (96) estableció que la dependencia de la luz en la inducción de las antocianinas en células en suspensión de H. gracilis es controlada solamente por la luz azul. La producción de nodofilotoxina por callos de Podophyllum peltatum es estimulada por luz roja (660 nm) e inhibida por irradiación con luz azul (371, 420, 460 nm) (94). Se ha establecido que se requiere luz blanca para la síntesis de antocianinas en callos de Daucus carota, Helianthus tuberosus, L. usitatissimum, H. pumila y R. multiflora (101). Takeda y Katoh (102) establecieron que el rendimiento del sesquiterpenoide azuleno incrementa 4 veces en células en suspensión de Calvoesia granulata creciendo en luz blanca (300-800 nm). Las células en cultivo de Digitalis lanata sintetizan niveles elevados de glucósidos en respuesta a un incremento en la irradiación (103).

Amplias evidencias muestran que las actividades de las enzimas

responsables de la síntesis del glucósido de flavona en células en cultivo de Petroselinum hortense se incrementan dramáticamente por la irradiación con luz UV (104,105). La irradiación con luz UV (254 nm) de Glycine max da como resultado una rápida síntesis de gliceolina, y tal irradiación da como resultado un incremento de la síntesis del ácido γ -aminobutírico en cultivos en suspensión de Rosa damascena (106).

Las células de Ruta graveolens producen varias cumarinas y alcaloides cuando se hacen crecer en luz blanca continua. R. graveolens produce preferentemente 2-nonanona, 2-nonanil acetato y 2-nonanol en la oscuridad, y sus concentraciones disminuyen al incrementarse la intensidad de la luz blanca (107). Por el contrario los niveles de 2-undecanona, 2-undecanil acetato y 2-undecanol se incrementan en respuesta al aumento de la intensidad de la luz (108).

Los cultivos de callos de Scopolia acutangula producen más alcaloides en la luz que en la oscuridad (109). La incubación de los callos de P. harmala en la luz se favorece la producción del alcaloide derivado del indol harmina (67). La luz blanca tiene influencias en la síntesis de alcaloides derivados del indol por C. roseus (79,110,111).

Hahlbrock (112) aisló la flavona apigenina de células en suspensión de G. max iluminadas y observó una correlación entre la formación de la apigenina y las actividades incrementadas de la PAL y la p-cumarato CoA ligasa. La sinensetina, la nobiletina y otras flavonas metoxiladas han sido determinadas en cultivos de Citrus aurantium y de C. medica expuestos a la luz, pero no en los mantenidos en la oscuridad. Un rápido incremento en la actividad de la PAL precede a la síntesis de los flavonoides. La irradiación de H. gracilis con luz a

zul incrementa la actividad de la PAL y la producción de antocianinas (113,114).

Con anterioridad se ha demostrado que la asimilación del nitrato por las células vegetales es regulada principalmente por los niveles de nitrato reductasa, y la luz visible es un parámetro que controla su síntesis y su actividad. La nitrato reductasa es una enzima compleja que contiene FAD (flavin adenín dinucleótido), citocromo b559 y molibdeno y puede ser inactivada por amonio en presencia de luz, ó NADPH. Sin embargo, cuando el NADPH inactiva a la nitrato reductasa ésta es reactivada por luz azul, y los flavín nucleótidos dramáticamente incrementan la reactivación mediante luz azul (115). Madyastha et al. (116) demostraron que C. roseus contiene una monoxigenasa asociada con el citocromo P-450, la cual hidroxila en C-10 al geraniol y al nerol. Esta hidroxilación es un importante paso en la biogénesis de ciertos alcaloides derivados del indol. Grunwald (117) indicó que la irradiación es un importante factor en la síntesis del esteroles; las plantas crecidas con luz generalmente muestran contenidos más bajos de esteroles (principalmente estigmasterol) que las plantas crecidas en la oscuridad.

La luz afecta diversos procesos metabólicos durante el desarrollo de los cloroplastos de las plantas. La luz azul induce la biosíntesis de los lípidos, incrementa la asimilación de carbono y de nitrógeno así como la fosforilación oxidativa. Incrementos significativos en los lípidos totales, carotenoides o ARN ocurren solo después de una adecuada fotofosforilación. Estos cambios inducidos por la luz se regulan a través del fitocromo. La síntesis de los carotenoides es también fotoregulada en un proceso mediado también por fito-

cromo. El fitocromo puede ser el único pigmento claramente definido en las vacuolas de las plantas el cual es capaz de traducir la iluminación en una respuesta dentro de la regulación metabólica. Schopfer (118) revisó el control del fitocromo en las enzimas reguladas por la luz. Por ejemplo, las actividades de las enzimas involucradas en el ciclo reductivo y oxidativo de la ruta de las pentosas son moduladas por la luz in vivo, la luz y el nitrato son necesarios para mantener el alto nivel de la actividad de la nitrato reductasa en células vegetales, y la actividad de la peroxidasa es modulada por la luz. Un remarcado rango de enzimas puede ser regulado por la luz.

Aunque se han revisado varios aspectos de la regulación mediante la luz de las enzimas relacionadas con la fotosíntesis y el desarrollo de los cloroplastos, es relativamente poca la información disponible en relación a los efectos de la irradiación de las enzimas que sintetizan los metabolitos secundarios por células en cultivo de plantas, excepto aquellos del metabolismo de los fenilpropanoides. Las enzimas involucradas en la síntesis de la mayoría de los metabolitos secundarios permanecen sin ser caracterizadas. Muchos de los estudios relacionados con los efectos de la irradiación en la síntesis de metabolitos secundarios están relacionados principalmente con los patrones alterados de estos metabolitos. Ejemplos de los efectos de la luz en la formación de metabolitos secundarios se ilustran en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7. Efectos de la luz en la síntesis de metabolitos secundarios.

Calidad de luz	Alteración fitoquímica	Especie
Luz blanca	Incremento de sesquiterpeno y paniculido B	<u>Andropogonhis paniculata</u>
	Incremento de polifenoles, pero inhibe la polimerización de leucoantocianinas	<u>Camellia sinensis</u>
	Disminuye la cafeína	<u>C. sinensis</u>
	Incremento de antocianinas y alcaloides incólicos	<u>Catharanthus roseus</u>
	Incremento de digalactosil-diacil gliceroles	<u>Chenopodium rubrum</u>
	Incremento de flavonoides	<u>Citrus aurantium</u>
		<u>Citrus medica</u>
	Incremento de glucósidos cardíacos	<u>Digitalis purpurea</u>
	Incremento de diosgenina	<u>Dioscorea son.</u>
	Inhibe la síntesis de naftoquinonas	<u>Echium lyconsis</u>
	Incremento de apogenina	<u>Glycine max</u>
	Incremento de ácido clorogénico	<u>Hanlonanpus gracilis</u>
	Incremento de sulfolípidos	<u>Kalanchoe crenata</u>
	Incremento de antocianina	<u>Malus numila</u>
	Favorece la síntesis de harmina	<u>Peqanum harmala</u>
	Incremento de alcaloides y cumarinas	<u>Ruta graveolens</u>
	Disminuye 2-nonanona, 2-nonanil acetato, 2-nonanol e incrementa 2-undecanil acetato, 2-undecanol, 2-undecanona.	<u>Ruta graveolens</u>
	Incremento de alcaloides	<u>Scopolia acutangula</u>
	Incremento de glucoalcaloides	<u>Solanum acculeatissimum</u>
	Luz roja	Incremento de ácido clorogénico
Incremento de podofilotoxina		<u>Podophyllum peltatum</u>

Continuación de la Tabla 1.7.

Calidad de luz	Alteración fitoquímica	Especie
Luz verde	Incremento de antocianinas	<u>Populus</u> sp.
Luz azul	Inhibe la síntesis de las naftoquinonas	<u>Echium lycopsis</u>
	Incremento de ácido clorogénico	<u>Haemopappus gracilis</u>
	Incremento de antocianina	<u>H. gracilis</u>
	Inhibe la síntesis de podofilotoxina	<u>Podophyllum peltatum</u>
	Incremento de antocianina	<u>Populus</u> sp.
Luz UV	Incremento de glicaelina	<u>Glycine max</u>
	Incremento de glucósidos de flavonoides	<u>Petroselinum hortense</u>
Luz UV y luz roja lejana	Disminuye los glucósidos de flavonoides	<u>P. hortense</u>
Luz UV y luz	Incremento de glucósidos de flavonoides	<u>P. hortense</u>

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SINTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Las células de plantas usualmente son cultivadas en un rango de temperatura de 25-28°C. El régimen de temperatura alterado afecta la acumulación de compuestos específicos y de tipos de productos fitoquímicos sintetizados. Por ejemplo, la cantidad de saturación de ácidos grasos puede ser afectada. Así, la composición de los ácidos grasos está relacionada con la temperatura; los ácidos grasos saturados se incrementan en respuesta al incremento de la temperatura, y los ácidos insaturados se incrementan al disminuir la temperatura (119).

El cultivo de células de Catharanthus roseus a temperaturas por abajo de 27°C da como resultado un incremento en la síntesis de los alcaloides indólicos, mientras que a temperaturas por arriba de 27°C da como resultado una disminución de la síntesis de alcaloides (120). Por otro lado una disminución o un incremento en la temperatura de incubación de Camellia sinensis (37) o de Nicotiana tabacum (76), resulta en una disminución en la síntesis de cafeína y nicotina respectivamente. El incremento en la temperatura inhibe la síntesis de carotenoides en la fruta de tomate (121).

Las células vegetales tienen cambios bioquímicos y metabólicos en respuesta al estrés por temperatura. Las plantas intactas muestran alteración en el contenido de proteínas, y de los reguladores del crecimiento. El ácido abscísico puede ser un mediador en las células vegetales en el fenómeno de estrés por temperatura. Proteínas específicas son sintetizadas en respuesta a un régimen inferior de temperatura, y el ácido abscísico es capaz de inducir ciertas especies de proteínas. El incremento en la temperatura, igualmente, resultan en un metabolismo alterado de las proteínas. Los efectos de la temperatura se ilustran en la Tabla 1.8.

Tabla 1.8. Efectos de la temperatura en la síntesis de metabolitos secundarios.

Régimen de temperatura (°C)	Alteración fitoquímica	Especie
26-30	Incremento de sustancias antivirales	<u>Agrostemma githago</u>
Incremento de 25 a 28 a pH 4,2	Disminuyen las antocianinas	<u>Daucus carota</u>
Incremento de 25 a 28	Incremento clorofila	<u>Mentha arvensis</u>
Incremento arriba de 25	Disminuye la nicotina	<u>Nicotiana tabacum</u>
Incremento arriba de 26	Disminuye la cafeína	<u>Camellia sinensis</u>
Incremento de 27 a 33	Disminuyen los alcaloides indólicos	<u>Catharanthus roseus</u>
Incremento a 30	Incremento de antraquinonas	<u>Morinda citrifolia</u>
Incremento de 30 a 35	Disminuye la arbutina	<u>Juglans major</u> <u>Juglans minor</u>
Disminución	Incremento de ácido linoléico	<u>Brassica napus</u>
	Incremento de ácido linoleico	<u>Tropaeolum majus</u>
Disminución a 10	Incremento de fosfolípidos	<u>Rauwolfia serpentina</u>
Disminución a 15	Incremento de ácidos linoleico y linolénico	<u>Glycine max</u>
Disminución abajo de 25	Disminuye la nicotina	<u>Nicotiana tabacum</u>
Disminución abajo de 26	Disminuye la cafeína	<u>Camellia sinensis</u>
Disminución abajo de 26 hasta 16	Incremento de alcaloides indólicos	<u>C. roseus</u>
Disminución de 30 a 25	Disminuye la arbutina	<u>Juglans major</u> <u>Juglans minor</u>

EFECTO DEL pH EN LA SINTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

Las células de plantas son usualmente cultivadas en medios que tienen un rango de pH de 5-6. Diversos estudios han mostrado que el pH del medio pueda influenciar dramáticamente la producción de metabolitos secundarios por células en cultivo, incluyendo a las antocianinas, las antraquinonas y los alcaloides. Por ejemplo, Daucus carota (122,123) crece a pH 5.5 y produce menos antocianinas que cuando es cultivada a pH de 4.5. Cuando el pH es incrementado de 4.5 a 5.5 el rendimiento de la producción de antocianina disminuye en 90%. La alteración del pH afecta la formación de triptofol a partir de triptofano; cuando el pH es controlado a 6.3 la síntesis de triptofol es estimulada en 71% sobre los cultivos control a pH neutro, pero a pH 4.3 se inhibe la síntesis del triptofol (124).

Tabla 1.9. Efecto del pH en la síntesis de metabolitos secundarios.

pH	Alteración fitoquímica	Especie
6.0	Incremento de serentina	<u>Catharanthus roseus</u>
7.2	Incremento de cafeína	<u>Camellia sinensis</u>
Incremento 4.5 a 5.5	Disminuyen las antocianinas	<u>Daucus carota</u>
Disminución 7.0 a 6.3	Incremento de triptofol	<u>Ipomoea</u> sp.
Disminución a 4.3	Inhibe la síntesis de triptofol	<u>Ipomoea</u> sp.
Disminución 4.8 a 4.0	Incremento de antraquinonas	<u>Morinda citrifolia</u>
Incremento 4.6 a 5.0	Incremento de antraquinonas	<u>M. citrifolia</u>

EFECTO DE LA AERACION EN LA SINTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

El suministro de oxígeno afecta la composición fitoquímica de las células en cultivo, pero hay muy poca información de los efectos del estrés de oxígeno en la síntesis de compuestos secundarios. Las alteraciones metabólicas producidas por anaerobiosis en plantas ha sido extensamente revisado. Las actividades de la alcohol deshidrogenasa, de la enzima láctica y de la nitrato reductasa se encuentran incrementadas bajo condiciones de anaerobiosis. El efecto mejor conocido de la ausencia de oxígeno es el incremento en la actividad de la glucólisis, lo que produce una acumulación de etanol.

Bajo condiciones aeróbicas, una gran porción del cis-9-octadecanol es oxidado a ácido oleico e incorporado en los fosfolípidos; el 30% es esterificado a cera en células heterótrofas en suspensión de Glycine max y en células fotomixotróficas de Brassica napus, pero la velocidad de oxidación es incrementada posteriormente. Sin embargo, en cultivos sin oxígeno el poco octadecanol es convertido a ácido oleico; la mayor parte es convertido a ésteres de cera (125). Los lípidos en cultivos con aereación contienen más ácidos grasos insaturados que los cultivos mal aereados los cuales contienen proporciones relativamente altas de ácidos grasos saturados de cadena larga. Partiendo de una generación enriquecida en oxígeno, y siguiendo con sistemas privados de oxígeno las cantidades de aceites volátiles en callos de Ruta graveolens disminuyen. Pero después de 2 generaciones el contenido de aceite es grande en sistemas enriquecidos en oxígeno (109).

Se ha establecido que los aminoácidos libres se incrementan en cultivos de Acer pseudoplatanus en respuesta al incremento de CO₂ y

a la disminución del suministro de aire (126).

Un amplio rango de metabolitos incluyendo a los ácidos shiquímico, lactato y malato, son producidos por las plantas en respuesta a la parcial o total anoxia (127-129). Se sabe que una mayor proporción de los carbonos del etanol son convertidos en glutamina (130).

Recientemente, se ha demostrado que 10% de CO_2 en el ambiente inhibe la producción de CO_2 via la respiración en 65%, y 5% de CO_2 inhibe en 95% la respiración en tejido de chícharo. También el malato, el α -oxoglutarato y el succinato disminuyen su contenido en presencia de 10% de CO_2 . Los datos sugieren que en 10% de CO_2 la actividad del ciclo del ácido tricarbóxico es reducido por el suministro de piruvato. Los grandes incrementos de piruvato y α -oxoglutarato, sugieren una disminución en la tasa de oxidación y una subsecuente disminución de la actividad del ciclo del ácido tricarbóxico.

Se sabe que muchas enzimas tienen como sustrato al oxígeno molecular, por ejemplo, las oxigenasas catalizan la incorporación de oxigeno en sustratos orgánicos y se espera que las condiciones de hipoxia afecten las proporciones biosintéticas de los metabolitos secundarios oxigenados. Obviamente, falta mucho más por conocer en esta interesante área del metabolismo.

EFEECTO DE ANTIBIÓTICOS EN LA SÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Son diversos los reportes de que los antibióticos, incluyendo inhibidores de la síntesis de proteínas y análogos de aminoácidos, alteran el patrón de metabolitos secundarios sintetizados por células en cultivo. Por ejemplo, el sulfato de estreptomycin, el cual inhibe la síntesis de proteínas, promueve la síntesis de naftoquinonas

en callos de Lithospermum erythrorhizon (27). La cicloheximida y la puromicina inhiben la producción de daidzen en células en suspensión de Glycine max (131). Mientras que la actinomicina D si estimula la síntesis de daidzen y la de los glucósidos relacionados incluso el lignano. Por otro lado diversos inhibidores de la síntesis de ARN, reducen la producción de daidzen (131).

La puromicina y la actinomicina promueven la acumulación de alcaloides del fenantreno en células en suspensión de Panaver somniferum (132); la cicloheximida reduce la síntesis de alcaloides. Sin embargo, cuando los antibióticos son adicionados al inicio de la incubación, la puromicina y la actinomicina aumentan la síntesis de codeína, pero cuando los inhibidores son adicionados al tercer día de incubación, la actinomicina disminuye y la puromicina incrementa la síntesis de alcaloides (132).

Hahlbrock y Ragg (133) establecieron que la luz induce la actividad de las enzimas que sintetizan los glucósidos de los flavonoides en células de perejil siendo inhibidas por pequeñas concentraciones de actinomicina D y cicloheximida, tanto que las actividades de otras enzimas no son afectadas. La actinomicina D y la puromicina inhiben la actividad de la enzima inducida por la luz azul en Haploagrus gracilis (134). El cloranfenicol causa una disminución de un 50% en la citocromo oxidasa y bloquea la síntesis de otros componentes del transporte de electrones en la mitocondria en células en suspensión de soya.

Los análogos de aminoácidos que inhiben el crecimiento celular cuando la poza endógena de aminoácidos libres proteicos es pequeña, ha permitido establecer amplias aplicaciones en la selección de células modificadas. Por ejemplo, las células de Nicotiana tabacum que

proliferan en presencia de p-fluorofenilalanina, un análogo de la fenilalanina, producen cantidades muy aumentadas de PAL y un incremento en la síntesis de fenilalanina. (135,136). Esta combinación de un aumento en la actividad de la enzima y el sustrato puede permitir que mucho más fenilalanina sea dirigida al metabolismo del fenilpropanoide. Sin embargo, células de Daucus carota resistentes a la p-fluorofenilalanina acumulan fenilalanina pero no muestran incremento en la actividad de PAL ni incremento en la síntesis de los polifenoles (137,138). La resistencia al 5-metil-triptofano puede dar como resultado un incremento de los niveles de triptofano (139-141).

Los efectos fitoquímicos causados por agentes antibióticos han sido obtenidos empíricamente y es difícil interpretar los resultados de manera significativa, o extrapolar a sistemas alternativos. Esto se debe principalmente al hecho de que las enzimas involucradas no han sido caracterizadas con respecto a su síntesis, compartimentalización o sustrato.

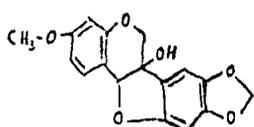
Los datos de la tabla 1.10 muestran las alteraciones fitoquímicas en respuesta a varios antibióticos.

Tabla 1.10. Efecto de los antibióticos en la síntesis de metabolitos secundarios.

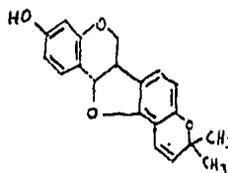
Antibiótico	Alteración fitoquímica	Especie
Acido aminooxifenil propiónico	Disminuyen las antocianinas	<u>Daucus carota</u>
Actinomicina D	Inhibe la síntesis de glucósidos de flavonoide	<u>Petroselinum hortense</u>
	Induce la síntesis de lignano y de glucósidos de flavona	<u>Vigna angularis</u>
Actinomicina D en la inoculación	Incremento de alcaloides derivados del fenantreno	<u>Vigna angularis</u>
Actinomicina D a 3 días de crecimiento	Disminuyen alcaloides	<u>Panaver somniferum</u>
Cloranfenicol	Estimula los alcaloides	<u>Nicotiana tabacum</u>
Cicloheximida	Induce nuevos alcaloides	<u>N. tabacum</u>
	Disminuyen los alcaloides	<u>P. somniferum</u>
	Disminuyen deoxiisoflavona y hay incremento de compuestos desconocidos	<u>Glycine max</u>
Puromicina a 3 días de crecimiento	Incremento de alcaloides	<u>P. somniferum</u>
Incremento de puromicina	Inhibe la síntesis de codeína	<u>P. somniferum</u>
Puromicina	El mismo efecto que con cicloheximida	<u>Glycine max</u>
Estreptomícina	Incremento de naftoquinonas	<u>Lithospermum erythrorhizon</u>
p-Fluorofenilalanina	Incremento de fendlicos	<u>N. tabacum</u>

EFFECTOS DEL ESTRÉS INDUCIDO POR HONGOS EN LA SINTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

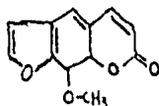
Se ha demostrado repetidamente que el estrés inducido por hongos en tejidos de plantas intactas produce la inducción y acumulación de metabolitos secundarios in vivo llamados fitoalexinas. Algunos de estos se muestran en la figura 1.3. Las moléculas que estimulan el metabolismo secundario son llamadas inductores y son derivados de hongos. Recientemente, la infiltración permitida por el agua muestra una acumulación de alcaloides esteroideos antifúngicos en Solanum aviculare (142).



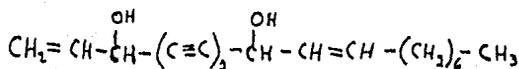
PISATINA



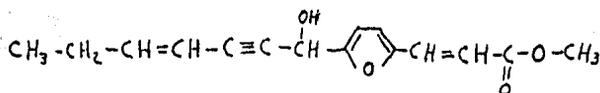
FASEOLINA



XANTOXINA



FALCARINDIOL



WIEROL

Figura 1.3. Metabolitos producidos en el estrés por plantas intactas in vivo en respuesta al ataque fúngico.

Las glucanas purificadas extraídas de la pared celular de Phy-
tonhthora megasperma var. soiae induce el metabolismo de los fenil-
propanoides e incrementa la actividad de la PAL en células en suspen-
sión de Glycine max. Las células también acumulan el antibiótico gli-
ceolina en respuesta a esta glucana fúngica. Similarmente, la activi-
dad de la PAL es estimulada en células en suspensión de Petroselinum
hortense y Acer pseudoplatanus tratadas con glucana (143). Esencial-
mente el mismo efecto es observado usando cultivos de Glycine max y
glucana de P. megasperma f. sp. glycinea, además de que se aisló un
pigmento rojo quinóide relacionado con la gliceolina (144).

La actividad específica de la PAL es usualmente baja en células
en cultivo, pero se eleva dramáticamente en respuesta al estrés; por
ejemplo, la eliminación de nitrato del medio (39). La glucana estimu-
la la actividad de la PAL independientemente de la eliminación de ni-
trato. Además, el elevado consumo de nitrato y el crecimiento celu-
lar son reducidos o parados en respuesta a la adición exógena de glu-
cana. Las células no tratadas suspenden la síntesis de la gliceolina
o algún compuesto relacionado, por la eliminación del nitrato. El in-
ductor procedente de Alternaria carthami inhibe el alto consumo de
fosfato por células de Petroselinum hortense las cuales primero tie-
nen un incremento en la concentración de fosfato vacuolar y una dis-
minución del fosfato citoplásmico. La rápida disminución en el fosfa-
to citoplásmico puede ser significativo en la regulación de los fe-
nilpropanoides (145).

Dixon et al. (146) estudiaron la inducción de la enzima mediante
el inductor en células en cultivo de Phaseolus vulgaris liberando ca-
lor de la pared celular de Colletotrichum lindemuthianum. También es-
tablecieron que esos productos fúngicos inducen varias enzimas de la

ruta de los flavonoides, y guía la acumulación de faseolina.

Un sistema similar opera en callos de Canavalia ensiformis y los requerimientos de enzimas y medicarpina son sintetizadas en respuesta a las esporas de Pithomyces chartarum. Las esporas también inducen a la o-metiltransferasa de los isoflavonoides (147). La medicarpina es detectada en alfalfa en callos inoculados con esporas de Phytophthora megasperma (148).

La síntesis de los terpenoides también puede ser inducida por el inductor fúngico. Eresk y Sziraki (149) demostraron que las células libres de P. infestans provocan la síntesis de risitina y pituberina en tejido de Solanum tuberosum. Helgeson et al. (150) aislaron capsidiol de callos de Nicotiana tabacum en respuesta a material de la pared celular y esporas de P. parvistica var. nicotianae. Budde y Helgeson (151) también demostraron que los callos de tabaco inducidos por esporas de P. parvistica var. nicotianae sintetiza 4 diferentes metabolitos incluyendo risitina y capsidiol.

Recientemente, la 6-metoximeleina ha sido inducida en células en suspensión de Daucus carota en respuesta a la infección con Chaetium globosum (152).

Los callos de Ruta graveolens cuando crecen en presencia de hongos sintetizan alcaloides de epóxido de acridona con un incremento de 10 veces (153).

Tietjen y Matera (154) son los primeros que indujeron inespecíficos compuestos poliacetilénicos en el estrés en células en suspensión de Carthamus tinctorius usando material derivado de la pared celular de Alternaria carthami. Los callos de Bidens alba suspenden la producción de algunos poliacetilenos (por ejemplo 1-fenilhepta-1,3,5-trieno) después de 3 años de subcultivos repetidos en una variedad de

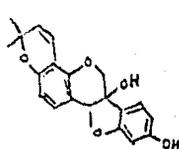
medios sintéticos con varios regímenes hormonales en la luz o en la oscuridad; aunque estos productos químicos son notables en la planta intacta. Se ha detectado un ascenso de 430 μg de fenilheptatriina/g de peso fresco de hojas en hojas intactas. Sin embargo, los callos de B. alba producen un incremento de 6.4 μg /g de callo de fenilheptatriina en los filtrados libres de células del hongo Pythium phanidermatum (155).

Las fitoalexinas son inducidas en nueve especies de plantas cultivadas in vitro por material de pared celular y esporas de varios hongos que pertenecen a 2 grupos o clases taxonómicas. Algunos de estos están ilustrados en la figura 1.4. El inductor activo es en algunos casos una glucana. La producción de fitoalexinas representa sólo una parte de una mayor estimulación del metabolismo secundario, y esta parte puede ser fácilmente reconocida porque estos metabolitos tienen actividad antibiótica. La mayoría de los estudios están enfocados a la inducción de la ruta de los fenilpropanoides y sus enzimas. La menor atención está destinada a otros cambios metabólicos y bioquímicos causados por el estrés inducido por hongos en células en cultivo.

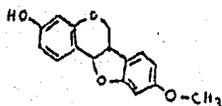
Recientemente, dos sesquiterpenoides, pituberina y pituberol, han sido inducidos en callos de Nicotiana tabacum inoculados con la bacteria Pseudomonas solanacearum (156).

Se prevea que el uso de sistemas de cultivo de tejidos para el estudio de la interacción célula-células y la inducción del metabolismo secundario usando varios inductores sufra un importante incremento en los años venideros. Una razón es que los cultivos de tejidos vegetales son fuentes potencialmente valiosas de productos far-

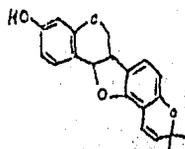
metabólicos deseables y nuevos compuestos biológicos. Sin embargo, la experiencia indica que relativamente pocos cultivos producen metabolitos secundarios en periodos prolongados en cantidades comparables a las sintetizadas en la planta intacta. Aquí también son estimulantes las posibilidades de que las diferentes fracciones de inductores fúngicos activen diferentes rutas biosintéticas, o que algún inductor pueda inducir diferentes respuestas en diferentes especies de plantas en cultivo.



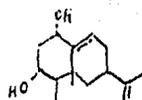
GLICEOLINA



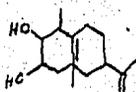
MEDICARPINA



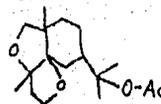
FASEOLINA



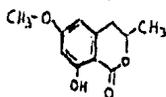
CAPSIDIOL



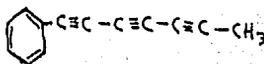
RISITINA



PITUBERINA



5-METOXINELEINA



FENILHEPTATRIINO

Figura 1.4. Metabolitos secundarios producidos en el estrés por infección fúngica por células en cultivo.

CAPITULO I I

ALCALOIDES

GENERALIDADES

Los alcaloides representan una de las primeras clases de metabolitos secundarios útiles en ser investigados y también representan uno de los grandes campos de trabajo en esta área de la investigación fitoquímica. Probablemente el primer trabajo mostrando la producción de alcaloides en cultivos es el de West y Mika en 1957 (4). Ellos demostraron la síntesis de atropina en callos de raíces de belladona. Desde entonces hay una gran cantidad de publicaciones que tratan de la producción de un gran número de tipos de metabolitos secundarios y enzimas, incluso el uso de células vegetales y cultivos de tejidos para la biotransformación del almidón.

Es bien sabido que existen diversas familias de plantas que son ricas en alcaloides. Por lo que fueron miembros de estas familias (Solanaceae, Apocynaceae, Amaryllidaceae y Leguminosae) los primeros en ser estudiados in vitro para determinar si los alcaloides producidos en la naturaleza también lo eran en los cultivos y, si es así,

cuales eran sus niveles. Un resumen de estos trabajos se da en la Tabla 2.1

El interés por los estudios de los alcaloides se ha incrementado tal vez por el descubrimiento de que la amapola escarlata gigante (Panaver bracteatum) contiene cantidades significativas de tebaína. La tebaína, al través del proceso de desmetilación, es fácilmente convertida a codeína. A diferencia de la simple y eficiente conversión de morfina a heroína, la conversión de tebaína a heroína es más difícil (4).

Se han encontrado nuevos metabolitos secundarios en los cultivos de tejidos. Los cultivos de Amsonia tabernaemontana Walt y Voacanga thauasii se seleccionaron para la producción de alcaloides y una cena de Catharanthus roseus G. Don para su actividad antimitótica.

Se han aplicado métodos apropiados para la selección de plantas sobreproductoras y colonias celulares estresadas, como es el "radio inmuno análisis" (RIA). Unos cuantos pasos estratégicos permiten la estabilización de células en cultivo produciendo altos rendimientos de metabolitos secundarios. El suministro de precursores y la utilización de reguladores del crecimiento a los cultivos pueden influir fuertemente en los comportamientos de producción.

Tabla 2.1. Alcaloides producidos a través de cultivo de tejidos
in vitro.

Alcaloide	Fuente vegetal
Acetonildihidroanguinarina	<u>Panaver somniferum</u>
Actinidina	<u>Tecoma stans</u>
Ajmalicina (cavincina)	<u>Catharanthus roseus</u>
Acuamicina	<u>C. roseus</u>
Anabasina	<u>Nicotiana tabacum</u>
Anatabina	<u>N. tabacum</u>
Apoatropina	<u>Sconolia parviflora</u>
Atropina (DL-hiosciamina)	<u>Atrona belladonna</u> <u>Duboisia myonoroides</u>
Berberina	<u>Contis japonica</u>
Cafeina	<u>Camellia sinensis</u> <u>Coffea arabica</u>
Camptotecina	<u>Camptotheca acuminata</u>
Candicina	<u>Trichocereus spachianus</u>
Alcaloides de β -carbolina	<u>Peganum harmala</u>
Capaurimina	<u>Corvdelis pallida</u>
Catalanceina	<u>C. roseus</u>
Catindina	<u>C. roseus</u>
Cavincidina	<u>C. roseus</u>
Cavincina	<u>C. roseus</u>
Cephalotaxina	<u>Cephalotaxus harringtonia</u>
Colina	<u>Medicago sativa</u>
Codeina	<u>Panaver somniferum</u>
Coptisina	<u>Contis japonica</u>

Continuación de la Tabla 2.1.

Alcaloide	Fuente vegetal
Cuscohigrina	<u>Hvocvamus niger</u>
Desacetil vindolina	<u>Catharanthus roseus</u>
Dihidroanguinarina	<u>Panaxer somniferum</u>
Dihidroitsiricina	<u>C. roseus</u>
Efedrina	<u>Ephedra foliata</u> <u>E. gerardiana</u>
Glucoalcaloides	<u>Solanum xanthocarpum</u>
Haemantamina	<u>Narcissus pseudonarcissus</u>
Harman	<u>Phaseolus vulgaris</u>
Harmina	<u>Peganum harmala</u>
Harringtonina	<u>Cephalotaxus harringtonia</u>
Homoharringtonina	<u>C. harringtonia</u>
Homodeoxiharringtonina	<u>C. harringtonia</u>
Hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona	<u>Ruta graveolens</u>
Hidroxi-N-metilacridona	<u>Ruta graveolens</u>
Hioscina (escopolamina)	<u>Datura stramonium</u> <u>Duboisia myoporoides</u> <u>Hvocvamus niger</u>
Hiosciamina	<u>Duboisia myoporoides</u> <u>Hvocvamus niger</u> <u>Scopolia acutangula</u> <u>Scopolia parviflora</u>
Alcaloides indólicos	<u>C. roseus</u>
Isopharringtonina	<u>C. harringtonia</u>
Jatroficina	<u>Coutis japonica</u>

Continuación de la Tabla 2.1.

Alcaloide	Fuente vegetal
Lancerina	<u>Catharanthus roseus</u>
Lochneridina	<u>C. roseus</u>
Magnoflorina	<u>Contis japonica</u>
Mitrafilina	<u>C. roseus</u>
Morfina	<u>Papaver rhoeas</u> <u>P. somniferum</u>
Narceina	<u>P. somniferum</u>
Narcotina	<u>P. somniferum</u> <u>P. rhoeas</u>
Nicotina	<u>Nicotiana tabacum</u>
Notharman	<u>Phaseolus vulgaris</u>
Norsanguinarina	<u>Corydalis pallida</u> <u>Macleaya cordata</u> <u>P. somniferum</u>
Oxisanguinarina	<u>P. somniferum</u>
Palmatina	<u>Contis japonica</u>
Papaverina	<u>P. somniferum</u>
Perivina (perosina)	<u>C. roseus</u>
Protopina	<u>Papaver bracteatum</u>
Reserpina	<u>Alstonia constricta</u> <u>Rauwolfia serpentina</u>
Rutacridona	<u>Ruta graveolens</u>
Sanguinarina	<u>Papaver somniferum</u>
Serpentina (alstonina)	<u>C. roseus</u>
Sitsiricina	<u>C. roseus</u>

Continuación de la Tabla 2.1.

<u>Alcaloide</u>	<u>Fuente vegetal</u>
Escitantina	<u>Tecoma stans</u>
Solamargina	<u>Solanum acculeatissimum</u>
Solasodina	<u>S. acculeatissimum</u>
Solasonina	<u>S. xanthocarpum</u>
Estacidrina	<u>Medicago sativa</u>
Estilopina	<u>Papaver bracteatum</u>
Tecomanina	<u>Tecoma stans</u>
Tabaína	<u>P. bracteatum</u>
	<u>P. somniferum</u>
	<u>Panavar rhoss</u>
Trigonelina	<u>Trigonella foenum-graecum</u>
Alcaloides derivados del Tropano	<u>Datura inermis</u>
	<u>D. innoxia</u>
	<u>Datura metel</u>
	<u>D. meteloides</u>
	<u>D. quercifolia</u>
	<u>D. stramonium</u>
	<u>D. tatula</u>
	<u>Scopolia japonica</u>
	<u>S. parviflora</u>
Valtropina	<u>Duboisia myoporoides</u>
Vindolina	<u>Catharanthus roseus</u>
Vindolinina	<u>C. roseus</u>

Tabla 2.2. Efecto farmacológico de algunos alcaloides

Alcaloide	Efecto	Fuente vegetal
Anibina	Analéptico	<u>Aniba duckei</u>
Armina	Alucinógeno	<u>Banisteriopsis caapi</u>
Cafeína	Estimulante cardíaco	<u>Ilex paraquariensis</u> <u>Paullinia cupana</u>
Cantirona	Antibiótico	<u>Sinaba cuspidata</u>
Cocaína	Anestésico local	<u>Erythroxylon coca</u>
Emetina	Emético	<u>Cenhaelis inecacuanha</u>
Escopolamina	Antiespasmódico	<u>Datura stramonium</u>
20-epiheineamina	Antiespasmódico	<u>Peschiera affinis</u>
Glaziovina	Angiolítico	<u>Ocotea glaziovii</u>
Guatambuina	Antitumoral	<u>Aspidosperma longineticolatum</u>
Hiosciamina	Antiespasmódico	<u>Datura insignis</u>
Leurocristina	Antileucémico	<u>Catharanthus roseus</u>
5-Metoxitriptamina	Alucinógeno	<u>Piptadenia peregrina</u>
6-Metoxicarboína	Alucinógeno	<u>Virola theiodora</u>
Nicodina	Antitumoral	<u>Fagara</u> spp.
Perivina	Simpaticolítico	<u>Geissospermum laeve</u>
Pilocarpina	Miótico	<u>Pilocarpus jaborandi</u>
Quinina	Antimalárico	<u>Cinchona ledgeriana</u>
Quinidina	Antifebril	<u>C. ledgeriana</u>
Reseroina	Tranquilizante	<u>Rauwolfia pentaphylla</u>
Teobromina	Estimulante cardíaco	<u>Theobroma cacao</u>
Toxiferina	Músculo paralizante	<u>Strychnos toxifera</u>
Tubocurarina	Músculo paralizante	<u>Chondodendron tomentosum</u>
Vincalucoblastina	Antileucémico	<u>Catharanthus roseus</u>
Yoimbina	Afrodisiáco	<u>Aspidosperma quebracho-</u> <u>blanco</u>

ALCALOIDES DERIVADOS DEL INDOL.

El uso de sistemas libres de células de C. roseus para la biosíntesis de ajmalicina y otros alcaloides derivados del indol, a partir de la triptamina y de la secologanina fue descrita por Scott y Lee (157) y confirmado por Stoke et al. (4). La strictocidina así producida se convierte en 4,21-dihidrocorinanteína y después en catenamína. Estos sistemas también han permitido clarificar el papel de la strictosidina y la vincocidina en la biosíntesis de los alcaloides derivados del indol. Se determinó que la geissosquicina es un intermediario en la biosíntesis de la ajmalicina, y que además representa una ruta alterna a la vía de la catenamína para la síntesis de ajmalicina; aunque la catenamína tiene la misma estereoquímica en el carbono 19 que la epiajmalicina, su estereoquímica en el carbono 19 es opuesta a la de la ajmalicina y a la de la tetrahidroastonina, esto sugiere que en la síntesis de estos dos últimos compuestos está involucrada la catenamína (4).

Se ha estudiado la distribución de la strictocidina sintasa y se ha demostrado que está presente en los cultivos de 15 miembros de la familia Apocynaceae. La enzima se purificó de extractos de células en suspensión de C. roseus.

Scott et al. (157) en 1979 examinaron la producción de alcaloides en cultivos de células en suspensión de C. roseus que era resistente al 5-metiltryptofano, esta línea sobreprodujo tryptofano y triptamina, pero no acumuló ajmalicina la cual sin embargo, si es detectable en una línea sensible. La antranilato sintasa de la línea resistente fue menos sensible a la inhibición por tryptofano que la enzima de la línea sensible. Schalenberg y Berlin (158) también examinaron la resistencia al 5-metiltryptofano en líneas celulares de C. roseus;

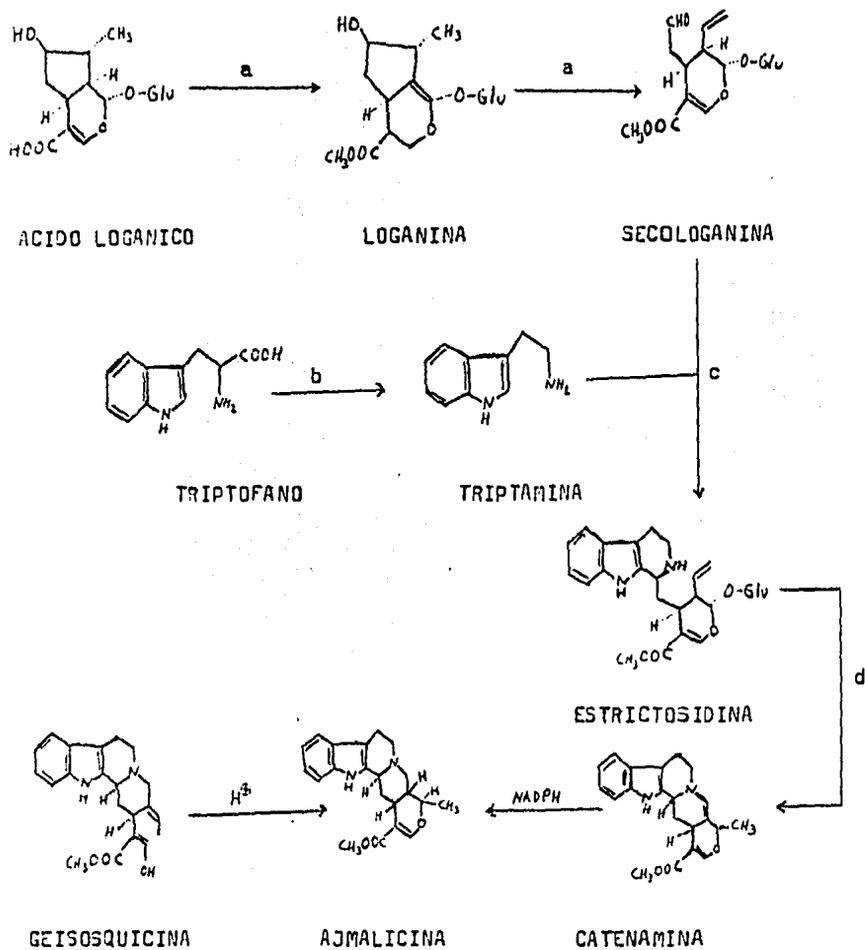
las líneas resistentes mostraron una marcada elevación de los niveles de triptofano pero no se correlacionaron con los niveles de serpienteina acumulada por los cultivos, la entranilato sintetasa tanto de células sensibles como de las células resistentes fueron igualmente sensibles al triptofano (4).

En años recientes se han logrado considerables triunfos en el incremento del contenido de alcaloides en células de C. roseus en cultivos en suspensión mediante la selección de cepas altamente productoras y la variación de algunos componentes del medio nutricional. Sin embargo, poca atención se ha dado a los problemas tecnológicos con respecto a los aspectos fisiológicos. Aquí se expondrán algunos resultados concernientes a diferentes pasos para la mejora de la producción de alcaloides por células en suspensión de C. roseus.

Las células en suspensión de C. roseus son cultivadas en el medio de Gamborg suplementado con $4.5 \mu\text{M}$ de 2,4-D y $0.23 \mu\text{M}$ de cinetina y se usa un fermentador de 3.5 l. para cultivos en batch (27°C , agitación de 90 rpm, 0.03-0.45 vol. de aire por minuto, disolución mínima de oxígeno 2 ppm). Los experimentos son llevados a cabo en un reactor de flujo continuo en el cual las células en suspensión son retenidas y separadas del efluente por gravedad. La limitación del crecimiento es obtenida por el 2,4-D omitido en el medio.

Se ha reportado previamente que durante el cultivo en batch, el contenido de alcaloides de las células alcanza un valor máximo cuando ocurre la fase estacionaria.

En el medio, las concentraciones de alcaloides remanentes son bajas y se observa un tiempo de retardamiento por la formación de trigamina y serpienteina. Los niveles de alcaloides son dependientes del pH del cultivo (159).



- S-adenosil-L-metionina: ácido logánico.
- Triptofano descarboxilasa.
- Estrictosidina sintetasa.
- β -glucosidasa.

Figura 2.1. Biosíntesis de ajmalicina a partir del ácido logánico y de la geissosquicina.

Usando un cultivo de C. roseus se obtuvo una gran cantidad (12g) de extracto crudo de alcaloides tanto del tejido como del medio. La CTL muestra que contiene más de 50 alcaloides diferentes. Trece alcaloides se purificaron en suficiente cantidad para permitir su análisis estructural (160).

Estos alcaloides se pueden clasificar en 4 tipos (Tabla 2.3). Seis de ellos (I a VI) se sabe que están presentes en la planta adulta. Otra, la tabersonina (VII) se encontró solamente en las semillas, otros tres (de VIII a X) se sabe que son compuestos naturales pero que nunca se extrajeron de plantas de C. roseus, el XI y XII nunca se describieron como compuestos naturales, pero se obtuvieron por síntesis, el XIII nunca se describió ni como compuesto natural ni como compuesto sintético.

De esta manera esta cepa puede biosintetizar y almacenar nuevos alcaloides y particularmente algunos derivados que se caracterizan por un residuo de triptamina hidroxilado (160).

Tabla 2.3. Alcaloides extraídos de cultivos en suspensión de C. roseus

ALCALOIDES	METODO DE IDENTIFICACION	
Ajmalicina	TLC, UV, IR, RMN, PM, MS	I
Mitrafilina	UV, RMN, MS	II
Tetrahidroalstonina	TLC, UV, MS, RMN	III
Vallesiacoctamina	RMN, UV, MS	IV
Isovallesiacoctamina	RMN, UV, MS	V
Isositsiricina	RMN, UV, MS	VI
Tabersonina	RMN, UV, MS, TLC, PM, IR	VII
Epi-3-ajmalicina	RMN, UV, MS, TLC, PM, IR	VIII
Desacetilakuamilina	RMN, UV, MS, TLC, PM, IR	IX
Dihidrocondilocampina	RMN, UV, MS	X
7-Hidroxi indolenin ajmalicina	RMN, UV, MS, IR	XI
Pseudoindoxilajmalicina	RMN, UV, MS, TLC, PM, IR	XII
Hidroxi desacetil akuamilina	RMN, IR, MS	XIII

Sasse et al. (162) observaron que existía una correlación entre la fuente del tejido y la producción de metabolitos en cultivos de células de Peganum harmala. Las investigaciones con Catharanthus roseus, tanto con hojas como con meristemas revelaron que la síntesis y la acumulación de alcaloides en los cultivos de células diferían significativamente.

Tanto durante la formación de callos a partir de los tejidos como durante los subcultivos, las diferencias en apariencia pueden ser notorias y pueden reflejar diferencias en la capacidad de sintetizar y acumular productos secundarios (Tabla 2.4).

Las variaciones en la formación de los diferentes productos por los cultivos de tejidos es, por supuesto, genético.

La variación en la formación de productos secundarios en células en cultivo puede ser inducida por mutagénesis, por hibridación somática y por transformación. Células de C. roseus han sido irradiadas con rayos X y se obtuvo una línea celular que produjo 2% de serpentina, un aumento significativo comparado con el cultivo original.

Se espera que la mutagénesis con células haploides amplíe la variedad y la cantidad de productos mucho más efectivamente.

La hibridación somática a través de la fusión de protoplastos podría dar origen a una suma de las capacidades biosintéticas paternas o dependiendo de la aberración cromosómica, la segregación y el patrón de herencia a una disminución de la suma total de las capacidades de las plantas padres (161).

La base para una selección exitosa de líneas celulares altamente productoras de metabolitos secundarios es la heterogeneidad de las células que lo constituyen.

Para la estabilización de las líneas celulares se requiere de un

número de subcultivos acompañados por procedimientos selectivos.

Los resultados de un análisis de 76 clonas mostraron perfiles similares en los alcaloides. El grado de variación se volvió más aparente cuando se comparó con perfiles de alcaloides obtenidos anteriormente con varios cientos de células derivadas casi todas de Catharanthus. La diferencia entre los dos grupos de perfiles de alcaloides fue sorprendente. Se comparó una cifra de las líneas celulares que producían alcaloides y la combinación de alcaloides agrupados en diferentes tipos de alcaloides semejantes (Corynanthe-, Strychnos-, Aspidosperma), la variación con clonas de una hoja fue baja comparada con la encontrada de las derivadas del material de diferentes plantas. Esta observación servirá de apoyo para afirmar que la variación en varios subcultivos de callos de un gran número de plantas es predominantemente una expresión de la heterogeneidad de la población de las plantas donadoras, y no lo es de los cultivos in vitro (161).

Tabla 2.4. Líneas celulares de alta producción de metabolitos secundarios obtenidas por selección de callos subcultivados.

Especie	Producto	Rendimiento (% peso seco)
<u>Morinda citrifolia</u>	Antraquinonas	0.310
<u>Panaver somniferum</u>	Alcaloides	5.600
<u>Coffea arabica</u>	Cafeína	1.600
<u>Hyoscyamus niger</u>	Escopolamina	0.002
<u>Dioscorea deltoidea</u>	Diosgenina	1.500
<u>Panax ginseng</u>	Ginsengósido	27.000
<u>Hyoscyamus niger</u>	Hiosciamina	0.020
<u>Nicotiana tabacum</u>	Nicotina	0.290
<u>Maclena microcarpa</u>	Protopina	0.400
<u>Coleus blumei</u>	Ac. rosmarínico	15.000
<u>Nicotiana tabacum</u>	Ubiquinona	0.200
<u>Ammi visnaga</u>	Visnagina	0.310

Se ha empleado ácido crómico, yoduro de potasio y el reactivo de Dragendorff para identificar a las células que pudiesen acumular alcaloides en tejidos frescos de C. roseus. Estas células muestran un exceso de fluorescencia primaria y de acumulación de colorantes vitales y lípidos indicadores con respecto a otras células y exhiben una reacción más intensa que otras células. Las pruebas en tejidos frescos pueden permitir identificar las posibles diferencias cuali y cuantitativas en el contenido de alcaloides entre la porción aérea y subterránea de la planta. Estos estudios muestran que los alcaloides están desigualmente distribuidos en las células y en los órganos de la planta y pueden ser detectados microscópicamente en células especializadas del parénquima (163).

Se han aislado vacuolas de diferentes células en cultivos y se ha determinado el mecanismo de transporte para los alcaloides a través de la membrana tonoplásmica, así como la compartimentalización de enzimas y productos dentro de las células. La serpentina, el mayor alcaloide en C. roseus, se encuentra localizado dentro de la vacuola, dos enzimas claves de la ruta de los alcaloides derivados del indol, la estrictosidina sintasa y una glucosidasa específica, se encuentran en el citosol. El transporte de alcaloides dentro del espacio vacuolar está caracterizado como un mecanismo activo y por lo tanto que requiere de energía, el cual es sensible a la temperatura y al pH del medio y es estimulado por K^+ y Mg^{2+} , y es inhibido por la N,N' -diciclohexilcarbodiimida y Cu^{2+} . La acumulación de alcaloides dentro de las vacuolas es contra un gradiente de concentración (164).

En otras investigaciones se ha visto que el alcaloide de Rauwolfia, la ajmalicina, puede usarse en el tratamiento de enfermedades

circulatorias, especialmente en lo que se refiere a la obstrucción del flujo sanguíneo cerebral. En combinación con otro alcaloide de Rauwolfia, la reserpina, es usada para aumentar la presión arterial. Anualmente se aislan 3500 Kg de ajmalicina de fuentes naturales para uso terapéutico en el tratamiento de algunas enfermedades. Los datos sobre ajmalicina han establecido que se encuentra como un producto natural en 20 especies de los géneros Rauwolfia, 4 de Catharanthus, dos de Mitragyna y en Pausinystalia yohimbe y Stemmadenia obovata. Para usos industriales la ajmalicina es extraída de raíces de Rauwolfia. Sin embargo, se puede preparar del alcaloide serpentina por reducción con BH_4^- .

En las raíces en rápido crecimiento de Catharanthus roseus se encuentran pequeñas cantidades de ajmalicina pero se producen grandes cantidades de serpentina. Este compuesto primero se aísla y después es convertido en ajmalicina. La biosíntesis de ajmalicina y serpentina fue elucidada mediante estudios de incorporación de isótopos usando plantas de C. roseus. La secuencia biosintética se muestra en la Figura 2.2 e involucra la condensación de la triptamina con la secologanina para dar el vincósido el cual es subsecuentemente, en diversos pasos transformado a ajmalicina y finalmente oxidado a serpentina (165).

Los cultivos en suspensión de Stemmadenia tomentosa sintetizan en condiciones normales de crecimiento los alcaloides derivados del indol: (-)-tabersonina, (-)-minovincidina, (+)-conoflorina (voafilina), condilocarpina, (+)-tubotamina (dihidrocondilocarpina), (-)-norfluorocurarina (vincamina), (-)-vinervina y (-)-coronaridina. Estos alcaloides pertenecen a las tres diferentes clases de alcaloides:

Aspidosperma, Strychnos e Iboca. Por el contrario, los cultivos de Voacanga africana produce un solo grupo de alcaloides representado por la (-)-tabersonina, la locnericina y la (-)-minovincinina (166).

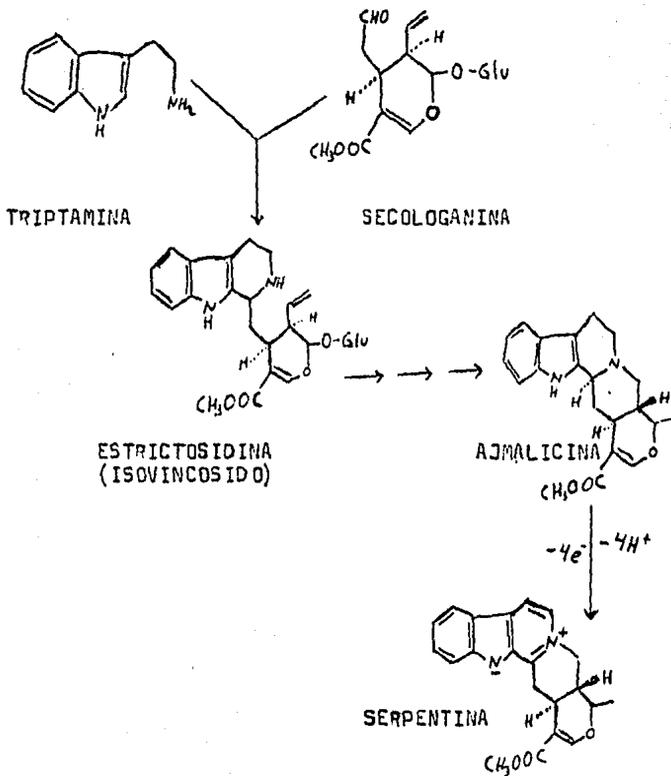


Figura 2.2. Secuencia biosintética para la formación de serpentina en plantas de Catharanthus roseus.

Se ha determinado que la sacarosa es mejor fuente de carbono que la glucosa y la fructosa para el crecimiento de las células y para la producción de alcaloides de cornezuelo de centeno en cultivos en suspensión de Evolvulus. La sacarosa a altas concentraciones es un factor limitante en la producción de alcaloides. Los cambios progresivos en la actividad de la triptofano sintetasa, la enzima clave en la producción de triptofano, el cual se conoce es precursor de los alcaloides del cornezuelo de centeno, se han examinado con diferentes concentraciones de sacarosa (167).

Los alcaloides del cornezuelo de centeno son compuestos farmacológicamente activos, constituyentes de la esclerotia de varias especies del hongo Claviceps. La síntesis de estos compuestos involucra la biosíntesis del aminoácido triptofano, una unión isoprenoide en la forma de dimetilalil pirofosfato derivado del ácido mevalónico y un grupo metil suministrado por la metionina. Se han aislado diversas enzimas involucradas en esta biosíntesis (168).

ALCALOIDES CON ACCION ANTINEOPLASICA.

En la búsqueda de los alcaloides derivados del indol, específicamente los alcaloides con actividad antileucémica en cultivos de tejido se requiere una selección de varias cepas basadas en consideraciones quimiotaxodómicas. C. roseus se ha convertido en la especie preferida en la mayoría de los laboratorios para la formación de callos. Se han estudiado las especies relacionadas con C. roseus: Vinca minor y Catharanthus ovalis, esta última muestra un mayor contenido de alcaloides que C. roseus (151).

Se han hecho estudios sobre otros agentes antileucémicos en cultivos de Camptotheca acuminata del cual se aisló e identificó el alcaloide camptotecina. Trabajos más recientes han demostrado la presencia de principios activos antileucémicos en Croton tiglium, Eunhorbia esula, Martynus buchananii y Martynus ovatus (4).

El trabajo con agentes antitumorales de plantas es casi idéntico al trabajo con agentes antileucémicos. Wall estableció que los extractos de Camptotheca acuminata eran activos contra ratas Walker-256 con carcinosarcoma. Se ha demostrado la producción de camptotecina en cultivos de células en extractos de Eunhorbia esula contra sarcoma 139, carcinosarcoma de Walker y carcinoma de pulmón de Lewis (4). Trabajos previos del mismo grupo con talicarpina del prado púrpura, elefantina y elefantopina de Elephantopus elatus, vitaferina A de Senecio arboreescens, solamarina de Solanum dulcamara y tetrandrina de Stephania hernandifolia y el trabajo del grupo Lilly con vincaleu colactina, leurosina, leurocristina, leurosidina, leurosivina y rovidina de Catharanthus roseus han demostrado que el campo de los metabolitos secundarios obtenidos de células en cultivo pueden tener

un gran potencial.

Delfel y Rothfus han demostrado recientemente que la cefalotaxina y sus ésteres antitumorales (harringtonina, isoharringtonina y homoharringtonina) son producidos por cultivos de Cenhalotaxus harringtonia. Como este árbol es de crecimiento lento y el suministro disponible se está agotando, el valor potencial de producirlos por medio de cultivos de tejidos esta aumentado y lo que es aún mejor se ha detectado un nuevo alcaloide en el medio, la homodeoxiharringtonina(4).

Tabla 2.5. Producción de agentes antineoplásicos por CTV y reguladores del crecimiento que indujeron los callos.

Espece	Agente antineoplásico	Fito hormonas (mg/l)
<u>Saccharis megantamica</u>	Sacarina	Kin 1, 2,4-D 0.5
<u>Brucea antidysenterica</u>	Bruceantina	Kin 1, 2,4-D 6.0
<u>Caesalpinia gilliesii</u>	Cesalina	Kin 1, 2,4-D 0.5
<u>Cenhalotaxus harringtonia</u>	Harringtonina Homoharringtonina	ANA 3.0
<u>Heliotropium indicum</u>	Indicina-N-óxido	Kin 1, 2,4-D 0.5 Kin 1, ANA 1.0
<u>Ochrosia moorei</u>	Elipticina 9-metoxielipticina	Kin 1, 2,4-D 0.5
<u>Putterlickia verrucosa</u>	Maytensina	Kin 1, 2,4-D 6.0
<u>Thalictrum dasycarum</u>	Talicarcina	Kin 0.1, 2,4-D 0.5
<u>Tripterygium wilfordii</u>	Triptolido Triptodiolido	Kin 1, 2,4-D 6.0 Kin 1, ANA 1.0 Kin 1, ANA 10.0

Kin = cinetina

ANA = ácido naftalenacético

2,4-D= ácido 2,4-dicloro acético

ALCALOIDES DERIVADOS DE LA FENANTRIDINA.

Los cultivos en suspensión de Eschscholtzia californica acumulan las formas dihidro de los alcaloides derivados de la fenantridina, la sanguinarina, la quelirrubina, la macarpina y la queleritrina, los cuales se sabe que son constituyentes de la planta Eschscholtzia. Se ha establecido que bajo condiciones experimentales la dihidroquelirrubina es el principal constituyente de las células en cultivo. Los rendimientos específicos de alcaloides varían de 0.0 a 1.7% en base a peso seco dependiendo de las condiciones del medio. El elevado rendimiento específico es de 1.5 mg/g en peso seco ó 13 mg/l en el medio de crecimiento B5. Después se transfieren las células al medio de inducción IM2 incrementando la acumulación a 17 mg/g en peso seco y 146 mg/l. El medio de inducción contiene niveles elevados de sacarosa, niveles bajos de fosfato y está desprovisto de fitohormonas. El efecto de diferentes condiciones de los medios en la biosíntesis de fenólicos es diferente a los establecidos para los alcaloides (169).

ALCALOIDES MORFINICOS.

El opio de amapola, Panaver somniferum L., es una planta medicinal importante, la cual contiene alcaloides de morfina tales como la morfina, la codeína y la tebaina. Recientemente, varios investigadores han examinado los callos de P. somniferum para la producción de estos alcaloides. Se ha reportado que los tres alcaloides se sintetizan en cultivos en suspensión. Kamo et al. (170) identificaron tebaina y codeína en callos no diferenciados, pero la morfina existe sólo en brotes diferenciados. Tam et al. (171) identificaron a la codeína

en cultivos en suspensión pero no a la morfina y a la tebaina. En experimentos de biotransformación usando reticulina 9S se confirmó que los tejidos de callos eran deficientes en la capacidad de sintetizar alcaloides morfínicos. De estos resultados se sugirió que la capacidad de biosíntesis de los alcaloides morfínicos podría estar relacionada con el grado de diferenciación de los cultivos. De ahí, que se reporte la relación entre la restauración de la capacidad de producir alcaloides morfínicos y el grado de rediferenciación. Para demostrar esta hipótesis se cultivaron callos albinos los cuales se separaron por subcultivo en el medio disminuyendo la cantidad de auxina. Los callos verdes y el tejido rediferenciado se desarrollaron a partir de callos albinos en un medio bajo la luz a 4000 lux, a 15-20°C.

Los alcaloides morfínicos se obtuvieron de acuerdo al estudio anterior. La fracción de alcaloides morfínicos obtenida, se usó para el análisis en: TLC (cromatografía en capa fina), EIA (Electroinmunoanálisis) y GLC (cromatografía Gas-Líquido), la fracción fue posteriormente purificada por cromatografía en columna de sílica gel.

El contenido de alcaloides morfínicos en tejidos en cultivo se determinó e identificó por los métodos mencionados. El ensayo inmunoenzimático se usó para determinar pequeñas cantidades de alcaloides en los tejidos parcialmente diferenciados. El ensayo sistémico de Enit Opiate usado es capaz de medir hasta 0.5 a 5 $\mu\text{g/ml}$ de morfina (172).

Por otro lado también se ha investigado la capacidad de síntesis de alcaloides en cultivos de *P. somniferum*. Los callos, los derivados meristemoides, las raíces rediferenciadas y los brotes rediferenciados, crecidos en medios que no contienen aminoácidos y contienen

Paraver bracteatum. El análisis de alcaloides usando cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de fase reversa de alta presión (HPLC) detectó la presencia de tebaina (0.007%) en los cultivos de brotes. La criptoína es aislada e identificada por su espectro de masa (175).

ALCALOIDES DERIVADOS DE LA β -CARBOLINA

Los cultivos de Peganum harmala creciendo en un medio para formar raíces acumulan metabolitos secundarios cuando el contenido de auxina del medio es reducido. Los metabolitos secundarios incluyen alcaloides, lignina y un pigmento rojo. Los alcaloides aparecen en las raicillas. Las fuentes de nitrógeno, Fe, carbono y energía son esenciales para la síntesis de los alcaloides; otros nutrientes son necesarios para su expresión máxima. El fosfato libre del medio estimula la formación del metabolito secundario el cual limita el crecimiento y la morfogénesis. La luz aumenta el contenido de los alcaloides de la dihidro- β -carbolina relativo a los derivados aromáticos pero no altera la acumulación total de alcaloides (176).

ALCALOIDES DERIVADOS DE LAS PURINAS.

La producción de los dos alcaloides derivados de las purinas, la teobromina y la cafeína han sido estudiados en cultivos en suspensión de Coffea arabica. La máxima velocidad de formación es en la fase exponencial del crecimiento. La velocidad de metilación y la potencia de biotransformación de la teobromina a tebaina, es mayor durante la fase log (177).

ALCALOIDES DERIVADOS DE LA BENZILISOQUINOLINA

Contis japonica Makino contiene una gran cantidad de alcaloides de benzilisoquinolina: la berberina (I), la coptisina (II), la palma tina (III) y la jateoricina (IV) en sus rizomas. Tiene gran cantidad de I (5-10% en peso seco) en el rizoma, sin embargo, estas plantas no pueden ser utilizadas comercialmente para preparar berberina, un antiséptico intestinal, porque el crecimiento es lento ya que se requiere más de 5 años de cultivo para obtener un pequeño rizoma que pesa sólo 2 g en peso seco. Aunque se ha intentado por varios investigadores japoneses producir I por cultivos en suspensión o en callo de C. japonica, se ha tenido dificultad en mejorar la velocidad de crecimiento.

Los callos iniciados de botones florales de Contis japonica Makino var. dissecta en medio de agar de Linnaeier-Skoog conteniendo 100 μ M de ANA y 1 μ M de BA fueron transferidos a medios en suspensión con agitación recíproca a una velocidad de 100 giros/min. a 25°C en la oscuridad y subcultivados a intervalos de 2-4 semanas durante 4 años.

El análisis cuantitativo de los alcaloides en el cultivo fue hecho por HPLC o por cromatografía en capa fina.

Se aislaron cuatro alcaloides cuaternarios de los cultivos en suspensión e identificados como I, II, III y IV (PM, TLC, UV, IR, MS). Las Tablas 2.6 y 2.7 muestran el tiempo de producción de alcaloides durante el ciclo de crecimiento celular y el efecto de las citocininas.

La síntesis de los alcaloides se inicia en la fase temprana del crecimiento exponencial y se mantiene en forma casi paralela con el

crecimiento celular hasta llegar a un máximo en la fase estacionaria. Los alcaloides extraídos de las células para este estadio consisten de I (60%), II (5%), III (10%) y IV (25%). Las velocidades de producción son estimadas en 50 mg y 84 mg/l/día para I y los alcaloides totales respectivamente.

Aunque es frecuente determinar que el contenido de los metabolitos secundarios en células en suspensión tiende a disminuir durante los sucesivos subcultivos, esta cepa particular de Coptis retiene su alta capacidad a lo largo del período de 3 años de estudio del cultivo.

Entre varias combinaciones de citocininas (BA, cinetina) y auxinas (2,4-D, AIA, AIB y ANA) se probó que la BA ($1 \mu\text{M}$ ó $0.1 \mu\text{M}$) y ANA ($100 \mu\text{M}$) son más favorables para el crecimiento y la producción de alcaloides. Sin embargo, una alta concentración de BA ($10 \mu\text{M}$) causa una disminución significativa en el contenido de III y IV sin afectar la producción de I y II. Un efecto similar se observa cuando se adiciona cinetina al medio a una alta concentración ($10 \mu\text{M}$). Estos resultados sugieren que el patrón de alcaloides de las células de Coptis pueden ser modificados por ajuste de la combinación y concentración de los fitorreguladores empleados (178).

Tabla 2.6. Contenido de alcaloides (% peso seco) en cultivos en suspensión de Coptis a diferentes generaciones.

Alcaloides	Tiempo después de iniciado el cultivo líquido.		
	(Meses) 24	33	39
Berberina	5.1	6.1	7.4
Coptisina	1.1	1.0	1.0
Palmatina	0.9	0.4	3.1
Jateorricina	1.2	0.6	3.5

Tabla 2.7. Efecto de las citocininas en el crecimiento y en la producción de alcaloides en cultivos de Contis.

Conc. citocinina (μM)	Crecimiento (mg peso seco)	Cont. de alcaloides (% peso seco)				
		I	II	III	IV	
Ninguna	203	4.5	0.20	2.40	2.10	
BA	0.1	366	6.3	0.96	1.99	2.40
	1.0	350	7.4	1.20	1.00	1.20
	10.0	317	6.8	0.69	0.36	0.35
Cinetina	0.1	235	5.3	0.39	2.20	2.30
	1.0	253	5.6	0.38	2.40	1.90
	10.0	356	7.6	1.00	1.30	1.40

ALCALOIDES DERIVADOS DE LA QUINOLINA.

Se ha estudiado la propagación de hojas, raíces y cultivos en suspensión de Cinchona ledgeriana y Cinchona succirubra (Rubiaceae) para la producción de quinina y quinidina. Los cultivos de órganos de hojas son crecidos y subcultivados en el medio M-S suplementado con BA; los cultivos derivados de raíces son crecidos en el mismo medio suplementado con 2,4-D y BA. En base a peso seco, los cultivos derivados de hojas de C. ledgeriana contienen 0.05% de quinina y 0.05% de quinidina y los de C. succirubra contienen 0.04% de quinina y quinidina por igual. La quinina y la quinidina son detectadas en los cultivos en suspensión o en cultivos derivados de raíces (179).

En relación con los estudios de producción de alcaloides en células y cultivos de tejidos de Cinchona, se ha desarrollado un método para el análisis cuantitativo de los alcaloides de quinolina. En un reporte previo se describió el análisis de los alcaloides de Cinchona por medición de la fase normal de HPLC. Sin embargo, uno de los sistemas no es capaz de separar la mayoría de alcaloides, que se encuentran en forma natural para los alcaloides de quinolina: cinconina, cinconidina, quinina, quinidina y sus dihidro derivados (180).

Se ha desarrollado una técnica de RIA para la determinación de quinina en el orden de los picogramos. El antisuero, contra un conjugado de quinina y un suero de albumina bovina, es altamente específico para los alcaloides de quinolina de Cinchona teniendo la configuración 8S y no tiene reacción cruzada con la quinona o cinconidiona. Usando este ensayo en clones de C. ledgeriana se determinó con más exactitud el contenido de quinina (181).

ALCALOIDES DERIVADOS DE LA QUINOLICIDINA.

Se han analizado por Cromatografía Gas-Líquido de alta resolución los patrones de alcaloides de quinolicidina en cultivos de 10 especies de Fabaceae y comparado con los niveles de alcaloides de las plantas respectivas.

La lujanina es producida en 10 cultivos en suspensión y es acompañada en algunas especies por los ésteres de esparteína, de tetrahidrorombifolina, de 17-oxosparteína, de 17-oxolujanina y de 13-hidroxi-lujanina como alcaloides menores. Se han obtenido patrones de alcaloides de diferentes plantas en las que los alcaloides de α -piridona son los alcaloides mayores en los géneros Cytisus, Genista, Laburnum y Sophora pero no se acumulan en los cultivos (182).

ALCALOIDES DERIVADOS DEL TROPANO.

Los alcaloides derivados del tropano constituyen un grupo distinto de metabolitos secundarios producidos por la familia Solanaceae. La isocianina y la escopolamina, las más importantes médicamente, se han usado como espasmolíticos y anestésicos. La formación de estos alcaloides del tropano en células en cultivo de Solanaceas se ha estudiado abundantemente, pero los contenidos de alcaloides reportados generalmente han sido mucho menores que los de las plantas madres.

Los segmentos de hoja esterilizados de Atrona belladonna, Datura stramonium, Duboisia laichardtii, D. myonorooides y Hyoscyamus niger todas ellas Solanaceas, contienen hiosciamina y escopolamina. Los callos de estos tejidos se obtuvieron inoculando en un medio de Linsmaier-Skoog (Medio de agar L-S) que contenía 5×10^{-6} M ó 5×10^{-5} M de

de ANA y 5×10^{-6} M de BA con 3% de sacarosa. Después de la inducción de los callos, Atropa, Datura y Hyoscyamus se transfirieron a un medio L-S que contenía 10^{-5} M de ANA y 5×10^{-6} M de BA. Los callos se mantuvieron en estos medios subcultivándose durante 3 ó 4 semanas bajo luz a 22°C.

Los alcaloides se extrajeron y se purificaron después se llevó a cabo una cromatografía gas-líquido (GLC), la fase estacionaria usada fue sílice al 2% OV-1 posteriormente se lavó con ácido y se trató con silane en Chromosorb W, el detector fue FID ó FTD. Los alcaloides se identificaron por GC-MS a una energía ionizante de 20 eV ó 70 eV. No hubo distinción entre la 1-hiosciamina y la atropina (d,1-hiosciamina).

De las 5 especies de Solanaceas usadas, sólo unos cuantos callos de Hyoscyamus dieron una prueba fuertemente positiva con el reactivo de Dragendorff. Ninguno de los callos de las otras 4 especies dieron una prueba confiablemente positiva, aún cuando se usaron varias concentraciones de ANA o sacarosa. El coeficiente de correlación para el contenido de hiosciamina y el valor de absorción a 520 nm para los extractos crudos de células coloreadas en cada agregado celular de Hyoscyamus fue significativamente alto ($r=0.51$). Sólo una línea, la H15, se obtuvo de aproximadamente 70 callus. Pequeñas colonias derivadas de esta línea mostraron resultados fuertemente positivos y casi uniformes con el reactivo. La producción de hiosciamina y esconolamina se confirmó en la línea H15. Sus células contenían de 0.01 a 0.03% de hiosciamina en base a peso seco y de 0.002 a 0.005% de esconolamina cuando se cultivó en un matraz de 100 ml con 25 ml de medio líquido L-S.

Se hizo la selección de las células H15 con un método de "Estu-

dio de agregado Celular" que usa un análisis de alcaloides por GLC. Las células de la línea H15 se incubaron en 30 matraces de 50 mm con 10 ml de medio c/u. Estos cultivos en suspensión en pequeña escala aumentó el contenido de los alcaloides 3 veces. Después de 4 semanas de incubación se muestread asépticamente aproximadamente la mitad del cultivo de cada matraz; a la semana, al contenido de alcaloides se le hizo un análisis por GLC. Seis matraces tuvieron una cantidad más grande de hiosciamina; sus células se dividieron en los 30 matraces y se cultivaron. Este estudio cíclico del cultivo se repitió. Después de 4 ciclos el contenido de hiosciamina en los matraces aumentó de 0.0022 a 0.00335% en base a peso fresco.

Las bajas concentraciones de fosfato inorgánico y de auxinas en el medio favorecieron la formación de hiosciamina en un cultivo en suspensión de la línea H15. La cantidad más grande de hiosciamina (260 μg /25 ml, 0.09% de peso seco) se produjo en el medio L-5 que contenía 10^{-8} M de ANA y 5×10^{-6} M de BA con 3% de sacarosa y en el cual la concentración de fosfato inorgánico se había reducido a 0.2 mM.

Se indujeron raíces a partir de la línea H15 las cuales se inocularon en cajas petri, al igual que agregados finos de células en medio L-5, después se cultivaron colonias que habían crecido bien en cultivos en suspensión en pequeña escala. La raíz primordia desarrolló raicillas con 10^{-8} M de BA en el medio. Estas raíces crecieron rápidamente (cerca de 7 veces en 4 semanas) y contenían mucho más escopolamina (0.12 a 0.3% en peso seco) que hiosciamina (0.74 a 0.03% en peso seco) ambos alcaloides estuvieron presentes en el medio así como en las células.

Tales cantidades de escopolamina y tales relaciones de escopolamina a hiosciamina nunca se habían reportado en cultivos de tejidos ni tampoco en tejidos intactos de H. niger. En los cultivos en suspensión de la línea H15, la formación de escopolamina se suprimió y la proporción de escopolamina a hiosciamina fue muy baja. Esto muestra claramente que la formación de escopolamina se asocia con la organización de la raíz. Se han reportado resultados similares para Datura innoxia.

En un estudio por separado se agregó hiosciamina y escopolamina a las raíces y a los cultivos con el objeto de estudiar su acumulación y conversión. Se agregó hiosciamina, sulfato de atropina, escopolamina e hidrobromuro de escopolamina al medio a una concentración de 0.1 mM ó 1 mM al principio o a la mitad del cultivo. Los cultivos en suspensión convirtieron escasamente la hiosciamina en escopolamina, pero las raíces cultivadas convirtieron del 10 al 20% de ésta en escopolamina; esto muestra las diferentes capacidades de los 2 cultivos para convertir la hiosciamina en escopolamina. La cifra de conversión por día fue mejor cuando el precursor se agregó en el 12avo. día de incubación.

Se encontró un porcentaje significativo de escopolamina en un matraz con raíces cuando se agregó 1 mM de hiosciamina al medio. Por el contrario, cuando la escopolamina se agregó hubo poco aumento en la cantidad de hiosciamina en el matraz tanto en la suspensión como en el cultivo de raíces, aún cuando el alcaloide adicional había sido bien absorbido por las células. En ambos experimentos el precursor adicionado de alguna manera mejoró el crecimiento celular (183).

También se ha reportado la producción de alcaloides derivados del tropano en Lycium barbarum pero no se ha estudiado mucho. El análisis de los alcaloides derivados del tropano de las raíces, brotes y frutas de L. barbarum se llevó a cabo por el procedimiento de Sairam y Khanna.

Las fracciones aisladas se identificaron por cromatografía líquida, punto de fusión y estudios de espectros de IR.

El contenido máximo de hiosciamina se encontró en los brotes (0.32%) mientras que la atropina se encontraba en mayor cantidad en las frutas (0.55%) y ambos se encontraban en forma mínima en las raíces (0.25%) y (0.42%) en Lycium barbarum (184).

Rajbhandari et al. encontraron que en cultivos de belladona que la formación de alcaloides derivados del tropano está asociada con la formación de estructuras de la raíz lo cual ha sido confirmado por Tabata et al. usando Scopolia parviflora. Se reportó que las raíces iniciadas de callos tienden a producir un patrón normal de alcaloides en contraste con el tejido desorganizado. Se sugiere que las diferentes auxinas a diferentes concentraciones estimulan significativamente la producción de los alcaloides. Se han reportado los efectos de varios factores parecidos a los reguladores del crecimiento, alcaloides exógenos, condiciones medioambientales en el crecimiento, la morfogénesis y la producción de alcaloides en cultivos de tejido de Hyoxyamus muticus (185).

CAPITULO III

ESTEROIDES

Los grandes esfuerzos realizados en el estudio de los metabolitos secundarios, su producción, su metabolismo y su conversión no solo se han usado para los alcaloides sino también han sido dedicados al estudio de los esteroides, esteroleos, saponinas y saponogeninas, como puede apreciarse en las tablas 3.1 y 3.2.

Tabla 3.1. Efecto de algunos esteroides obtenidos a partir de CTV.

Esteronide	Efecto	Fuente vegetal
Antiarina	Cardiotóxico	<u>Antiaris toxicaria</u>
Digitoxigenina	Cardiotónico	<u>Thavetia ahpai</u>
Diosgenina	Material para síntesis de hormonas	<u>Dioscorea laxiflora</u>
Glucósidos	Cardiotónico	<u>Asclenias curassavica</u>
Solasodina	Material para síntesis de hormonas	<u>Solanum lycocarynum</u>

Tabla 3.2. Esteroides, esterolas, saponinas y saponogeninas producidas por cultivos de tejidos in vitro.

Compuesto	Fuente vegetal
Amirina	<u>Corchorus olitorius</u>
	<u>Lindera strychnifolia</u>
	<u>Oryza sativa</u>
	<u>Tylophora indica</u>
	<u>Withania somnifera</u>
Brassicasterol	<u>Brassica napus</u>
Campesterol	<u>Artemisia absinthium</u>
	<u>Brassica napus</u>
	<u>Coffea arabica</u>
	<u>Digitalis lanata</u>
	<u>Dioscorea deltoidea</u>
	<u>Hydnocarpus anthelmintica</u>
	<u>Nicotiana tabacum</u>
	<u>Petroselinum hortense</u>
Cicloartenol	<u>Digitalis lanata</u>
	<u>Nicotiana tabacum</u>
Cicloeucaleanol	<u>N. tabacum</u>
Citrostadienol	<u>N. tabacum</u>
Colesterol	<u>Digitalis lanata</u>
	<u>Dioscorea deltoidea</u>
	<u>D. tokora</u>
	<u>Holarrhena antidysenterica</u>
	<u>Momordica charantia</u>
	<u>Nicotiana tabacum</u>

Tabla 3.2. (continuación).

Compuesto	Fuente vegetal
Colesterol	<u>Sesamum indicum</u>
	<u>Yucca glauca</u>
Diosgenina	<u>Dioscorea composita</u>
	<u>D. deltoidea</u>
	<u>D. floribunda</u>
	<u>D. spiculiflora</u>
	<u>D. tokora</u>
	<u>Eunhorbia cygarissias</u>
	<u>Eunhorbia esula</u>
	<u>Holarthena antidysenterica</u>
	<u>Hydnocarpus anthelminthica</u>
	<u>Lindera strychnifolia</u>
	<u>Momordica charantia</u>
	<u>Morus alba</u>
	<u>Nicotiana tabacum</u>
	<u>Oryza sativa</u>
	<u>Petroselinum hortense</u>
	<u>Sesamum indicum</u>
	<u>Tecoma stans</u>
	<u>Solanum aviculare</u>
	<u>S. elaeagnifolium</u>
	<u>S. laciniatum</u>
<u>S. nigrum</u>	
<u>S. xanthocarpum</u>	
<u>Trigonella occulta</u>	
<u>T. foenum-graecum</u>	

Tabla 3.2. (continuación).

Compuesto	Fuente vegetal
Diosgenina	<u>Tyloschorea indica</u> <u>Withania somnifera</u> <u>Yucca glauca</u>
Ergost-4-en-3,6-diona	<u>Glycine max</u> <u>Stenhania cernharantha</u>
Ergost-4-en-3-ona	<u>Glycine max</u> <u>Stenhania cernharantha</u>
24-Etiliden colesterol	<u>Withania somnifera</u>
Escualeno	<u>Nicotiana tabacum</u>
Espinasterol	<u>Cucurbita maxima</u>
Estigmasta-4,22-dien-3-ona	<u>Glycine max</u> <u>S. cernharantha</u>
Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona	<u>Glycine max</u> <u>S. cernharantha</u>
Estigmasta-7,22,25-trien-3 ol	<u>Cucurbita maxima</u>
Estigmat-4-en-3-ona	<u>Glycine max</u> <u>S. cernharantha</u>
Estigmast-4-en-3,6-diona	<u>Glycine max</u> <u>S. cernharantha</u>
Estigmasterol	<u>Artemisia absinthium</u> <u>Brassica napus</u> <u>Coffea arabica</u> <u>Corchorus olitorius</u> <u>Digitalis lanata</u> <u>Dioscorea deltoidea</u> <u>D. tokora</u>

Tabla 3.2. (continuación).

Compuesto	Fuente vegetal
Estigmasterol	<u>H. antidysenterica</u>
	<u>H. anthelminthica</u>
	<u>Inomoea sp.</u>
	<u>Momordica charantia</u>
	<u>N. tabacum</u>
	<u>Oryza sativa</u>
	<u>Petroselinum hortense</u>
	<u>Sesamum indicum</u>
	<u>Trigonella foenum-graecum</u>
	<u>T. occulta</u>
Gitogegina	<u>T. foenum-graecum</u>
	<u>Yucca glauca</u>
28-Isofucoesterol	<u>Digitalis lanata</u>
Lanesterol	<u>H. antidysenterica</u>
	<u>Dioscorea composita</u>
	<u>Momordica charantia</u>
Manogegina	<u>Sesamum indicum</u>
	<u>Yucca glauca</u>
24-metil colesterol	<u>H. antidysenterica</u>
	<u>Withania somnifera</u>
24-metil colest-7-en-3 β ol	<u>N. tabacum</u>
24-Metilencicloartanol	<u>Digitalis lanata</u>
	<u>N. tabacum</u>
24-metilenslofenol	<u>N. tabacum</u>
28-Norcitrostandienol	<u>N. tabacum</u>

Tabla 3.2. (continuación).

Obtusifoliosol	<u>Nicotiana tabacum</u>
Panaxadiol	<u>Panax ginseng</u>
Panaxatriol	<u>P. ginseng</u>
5 α -pregnan-3 β -ol, 20-ona	<u>Dioscorea deltoidea</u>
5 α -pregnan-3 β , 20 β -diol	<u>D. deltoidea</u>
Protocoroina	<u>D. tokora</u>
Sitosterol	<u>Amocynum cannabinum</u>
	<u>Artemisia absinthium</u>
	<u>Brassica napus</u>
	<u>Coffea arabica</u>
	<u>Corchorus olitorius</u>
	<u>Digitalis lanata</u>
	<u>D. deltoidea</u>
	<u>Tylochoera indica</u>
	<u>Withania somnifera</u>
	<u>Yucca glauca</u>
Solasodina	<u>Solanum acculeatissimum</u>
	<u>S. aviculare</u>
	<u>S. melongena</u>
	<u>S. nigrum</u>
Solasonina	<u>S. xanthocarpum</u>
Tigogenina	<u>Triconella occulta</u>
	<u>T. foenum-graecum</u>
Tokorogenina	<u>Dioscorea tokora</u>
Yonogenina	<u>D. tokora</u>

ESTEROIDES DE Solanum sp.

La URSS, algunas ciudades del Oeste de Europa, la República Popular de China, India, Nueva Zelanda, Egipto y Australia producen material crudo esterooidal, de Solanum laciniatum y de S. aviculare. Hay un incremento en la demanda de nuevas fuentes de esteroides, que se usan para la síntesis de fármacos esterooidales requeridos en muchas áreas de la medicina. Se han detectado una gran variedad de esteroides en cultivos de tejido de algunas especies de Solanum, incluyendo S. laciniatum. Se han hecho estudios para la producción de diosgenina y solasodina en callos y cultivos en suspensión de S. aviculare por Khanna et al. (186).

ESTEROIDES DE GINSENG.

Las raíces de ginseng, de las cuales son extraídos compuestos como las saponinas y las sapogeninas son de gran valor en algunas ciudades de Asia y se usan como sedantes o estimulantes. Ginseng requiere de 4 a 7 años para producir cantidades significativas de estos dos ingredientes. Después de cosechada la planta, la tierra permanece inusable por 25 a 50 años ya que el suelo ha perdido sus nutrientes. Ahora con el uso de las nuevas técnicas de cultivo de tejidos, se ha hecho posible acortar el tiempo e incrementar tanto el rendimiento como la concentración de las saponinas y las sapogeninas de la planta en varios órdenes de magnitud (187).

Se ha investigado el aumento en la producción de saponinas de ginseng por la adición de auxinas, citocininas e inhibidores enzimáticos así como la relación entre el crecimiento y el contenido de saponinas.

Se seleccionaron líneas celulares que contenían gran cantidad de saponina en condiciones hormonales de AIB 1 ppm y cinetina 1 ppm. Para la producción de alto contenido de saponina y un mejor crecimiento de las líneas celulares Pg-1, se examinaron las condiciones de cultivo tanto estáticas como en suspensión, en la luz y en la oscuridad y con agitación rotatoria. Se demostró que tanto la producción de saponinas como el crecimiento son significativamente más altos con agitación, especialmente por el uso de la combinación de AIB con cinetina ó piridilfenilurea. Se estudió el efecto de la semicarbazida en presencia de algunos precursores de la biosíntesis de saponinas y fitosteroles en los callos. El contenido más alto de saponina se obtuvo en presencia de mevalonato así como del inhibidor, la cantidad es más o menos de 2 a 2.5 veces mayor que en ausencia de mevalonato así como de la semicarbazida y en presencia de la semicarbazida sola. Por el contrario, no hubo cambio reconocible en el contenido de fitosteroles. Parece ser que la vía de biosíntesis de las saponinas en los callos puede ser inhibida competitivamente por la semicarbazida al competir por los precursores como en el caso del mevalonato. Se vió que la adición simultánea del mevalonato y la semicarbazida involucra la producción de saponina más marcadamente que cuando se adiciona solo el mevalonato a los callos, la cantidad aumenta aproximadamente 2 veces (133).

ESTEROLES DE Citrullus colocynthis y Peganum harmala.

Los callos de P. harmala son frágiles y de color amarillo verdoso. El índice de crecimiento en peso seco alcanzó el máximo en 6 semanas y los tejidos declinaron a las 8 semanas. Cuando la raíz de las

semillas de la planta C. colocynthis se crecieron en el medio MS, le aparecieron muchos vellos. La región del epicotilo dió origen a tallos y hojas gruesas. Cuando porciones aisladas del tallo se subcultivaron, se regeneraron los callos a partir de las raíces después de un 2o. subcultivo en medios frescos. Las porciones aisladas de los cotiledones de las semillas no pudieron sobrevivir. Cuando pequeñas porciones de la raíz y del epicotilo estuvieron sujetas al cotiledón, produjeron la formación de raíces en el 2o. y 3o. subcultivo. El índice de crecimiento máximo fue de 2.7 y ocurrió a las 6 semanas. Se han encontrado compuestos como el sitosterol ($\eta_f = 0.49$) y lanosterol ($\eta_f = 0.59$) en los cultivos a las 2, 4, 6 y 8 semanas en C. colocynthis y P. harmala.

El contenido total de esteroides fue máximo a las 6 semanas, C. colocynthis (10.9 mg/g peso seco) y P. harmala (3.77 mg/g en peso seco). Los frutos de C. colocynthis mostraron mayor contenido de esteroides (10.67 mg/g en peso seco) en comparación con el contenido en las raíces (5.13 mg/g en peso seco) y brotes (9.1 mg/g en peso seco) pero los estudios en los cultivos de tejido mostraron poco contenido en las partes intactas de las plantas (184).

SARSASAPOGENINA DE Yucca filifera.

La Yucca filifera es una planta que contiene sarsasapogenina en sus diferentes órganos especialmente en las semillas. Las semillas de esta planta de crecimiento lento que es abundante en el norte de México se usan como una fuente de sarsasapogenina.

Debido a la importancia de este esteroide en la industria farmacéutica, se ha estudiado la inducción de cultivos de tejido de Yucca filifera junto con la determinación de la capacidad de dichas célu-

las para producir sarsasapogenina.

Las semillas esterilizadas de Yucca filifera, así como los fragmentos de semillas, se incubaron en el medio de cultivo. Los cultivos se incubaron a 29°C y estos cultivos estuvieron a una intensidad de luz de 1000 lux en las primeras 20 transparencias. Después de obtener un callo se pasó a un medio líquido para obtener el cultivo en suspensión y se subcultivó por 3 ciclos de crecimiento, el tejido en suspensión se sembró en varias cajas petri que contenían ANA 1×10^{-5} M y BA 1×10^{-9} M. Se incubaron en diferentes condiciones de luz roja, luz blanca y en la oscuridad. Después de 12 semanas se seleccionaron las colonias con mayor crecimiento. Estas colonias se subcultivaron cada 24 días, 20 veces y después se extrajo la sarsasapogenina, según el método de A. Romo del Vivar et al. (199).

Los medios más exitosos para la inducción y propagación fueron los que contenían: ANA 1×10^{-5} M y BA 1×10^{-8} M, ANA 1×10^{-5} M y BA 1×10^{-9} M, y 2,4-D 1×10^{-6} M y BA 1×10^{-8} M.

Estos cultivos se subcultivaron 40 veces, dando un desarrollo de tejido homogéneo, las mejores condiciones fueron bajo luz roja a 29°C.

El colesterol y la sarsasapogenina estuvieron presentes como glucósidos y se determinaron después de la hidrólisis del tejido desgrasado.

La mayor producción de sarsasapogenina se alcanzó a los 22 días de crecimiento del cultivo, manteniéndose constante trece días más (199).

CAPITULO IV

QUINONAS

ANTRAQUINONAS.

Se han producido CTV de un total de 19 diferentes especies pertenecientes a los géneros Asperula, Galium, Rubia y Sherardia. Todas las especies en CTV producen antraquinonas con diferentes rendimientos. Las células crecen en un medio basal conteniendo 7 diferentes ácidos fenoxiacéticos sustituidos, así como ácido 1-naftalenacético, todos a 10^{-5} M.

Hay una gran producción de pigmentos en cada cultivo. La formación de antraquinona es óptima para cada especie individual, pero no para el patrón general. El mayor rendimiento de antraquinona es observado en Galium verum (1.7 g/l) y en Rubia fruticosa (20% peso seco) (191).

Los laxantes de antraquinona representan un grupo de productos naturales que han sido usados para propósitos medicinales por miles de años. La especie Cassia es productora importante de fármacos vegetales derivados del antraceno. Se han llevado a cabo varios estu-

dios con respecto a la producción de antraquinonas en cultivo de tejidos de la especie Cassia. El patrón de antraquinonas producidas en cultivo de tejidos puede a menudo diferir o ser similar al de la planta madre. En muchos de esos cultivos solo se producen oxiantaquinonas y diantronas los cuales se encuentran en la mayoría de los laxantes farmacológicamente activos; los glucósidos de diantronas se encuentran regularmente ausentes.

En un estudio muy reciente se utilizaron 4 especies de Cassia indígena Nigeriana: C. nodosa, C. alata, C. occidentalis y C. podocarpa. Los callos se derivaron de las semillas de las plantas, las cuales se colocaron en el medio MS adicionado de 2,4-D (0.6 mg/l) cinetina (0.35 mc/l) y sacarosa (35 g/l). Los cultivos crecieron a 27°C bajo iluminación constante. Los callos se mantuvieron en el mismo medio y se subcultivaron a intervalos de 5 a 6 semanas.

La detección de agliconas de antraquinona y sus glucósidos se llevó a cabo por cromatografía de capa fina. Se emplearon métodos colorimétricos para la estimación de los extractos de los callos.

Un callo saludable de C. podocarpa consiste de una masa suave en la cual el color del tejido varía de gris al café claro. Este ensayo se repitió en cada frasco tres veces, en subcultivos cada 6 semanas. El análisis químico reveló que no hubo cambio en el espectro cualitativo, pero la acumulación total de antraquinonas fue mayor en las células café en un 40% comparado con los callos grises. No se sabe con certeza si la continuidad del potencial biosintético de la línea celular café pueda mantenerse por un largo tiempo. La producción total de compuestos de antraquinonas en cultivos de C. podocarpa, es casi la misma que la obtenida en las hojas de la planta

completa. Una aproximación a la selección visual de alta producción de líneas celulares café en callos de C. nodosa, produjeron un aumento en la acumulación total de antraquinona, de 1.3 a 1.8% de peso seco del material. Se sugiere que la síntesis de antraquinona esta asociada probablemente a la pigmentación café del tejido (192).

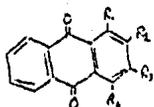
Muchas plantas de la familia Rubiaceae han demostrado ser fuente rica de antraquinonas. Por ejemplo Morinda citrifolia L. contiene varias antraquinonas, incluyendo glucósidos. Zenk et al. obtuvieron de esta planta, cultivos en suspensión que producían antraquinonas en grandes cantidades. También se han examinado los constituyentes en las células cultivadas de Galium mollugo y se aislaron varias antraquinonas. Estas antraquinonas se formaron ya sea por vía acetato-malonato o por la ruta del ácido shikímico.

En células en cultivo de Rubia cordifolia L. se aislaron 4 antraquinonas libres y un glucósido de antraquinona como cristales puros. Los callos se indujeron de las hojas de R. cordifolia L. Var. Mungista Miq. Se usó el medio MS suplementado con 2 mg/l de 2,4-D, 0.2 mg/l de cinetina, 3 g/l de extracto de malta y 3 g/l de agar. Después de 3 subcultivos a 23°C se transfirieron los callos a un medio líquido y se incubaron a 25°C en la oscuridad a 110 rpm. Las células se cultivaron en medio líquido sin extracto de malta después del 4o. subcultivo y el 2,4-D en el medio se reemplazó por ANA después del 3o. subcultivo. Durante un año de subcultivo la velocidad de crecimiento celular aumentó bajo esas condiciones.

Se cosecharon 3,5 Kg de células y después de ser extraídas se obtuvieron cuatro compuestos. El compuesto 1 fue etil éter de lucidina (0.3 mg de agujas amarillas), el compuesto 2 pseudonurpurina

(50.1 mg de agujas rojas), el compuesto 3, alizarina (14.5 mg de agujas amarillas) y el compuesto 4, purpurina (3.4 mg de agujas amarillas) los cuales se obtuvieron por recristalización en diclorometano. De la porción soluble en agua se obtuvo el compuesto 5, ácido ruberítrico (103.2 mg de agujas amarillas). La identificación se llevó a cabo por comparación con estándares (P.f., espectros UV, IR RMN y MS) (193).

Estructura de las antraquinonas



1. Etil éter de lucidina; $R_1=H$, $R_2=OC_2H_5$, $R_3=CH_2OH$, $R_4=OH$
2. Pseudopurpurina; $R_1, R_2, R_4=OH$, $R_3=COOH$
3. Alizarina; $R_1, R_2=H$, $R_3, R_4=OH$
4. Purpurina; $R_1, R_2, R_4=OH$, $R_3=H$
5. Acido ruberítrico; $R_1=OH$, $R_2=Glucosa-Xilosa$, $R_3, R_4=H$

También se ha visto que los cultivos celulares de Morinda citrifolia son el mejor sistema para el estudio de la formación de productos secundarios, la síntesis de antraquinonas es inusualmente alta y estable.

Se ha probado tanto la estructura química como la concentración del regulador de crecimiento en la formación de las antraquinonas de los cultivos. Se han probado un total de 150 efectores y se ha establecido que el ácido naftalenacético (10^{-5} M) produce una formación máxima de antraquinonas en estos cultivos.

Este estudio con Morinda demostró nuevamente que los reguladores del crecimiento de las plantas juegan un papel importante en la regulación de las rutas biosintéticas (194).

Se ha observado que la combinación de los 3 aminocidos aromáticos: L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano a concentraciones de 300 ppm inhiben la formación de antraquinonas en un 90% mientras que el crecimiento de los cultivos no es afectado.

Se sabe que los ácidos benzoico amino sustituidos específicamente inhiben la formación de pigmentos en los cultivos de Morinda. Se ha establecido que sólo la calidad, pero no la posición del sustituyente en el anillo aromático determina la efectividad del compuesto siguiendo el orden: $\text{NO}_2 < \text{Cl} < \text{OH} < \text{NH}_2 < \text{CH}_3 < \text{OCH}_3$ (195).

BENZOQUINONAS.

Se han aislado cepas celulares que producen grandes cantidades de agentes cardiovasculares como la ubiquinona-10, a partir de cultivos en suspensión de tabaco mediante clonación. Se han examinado los efectos de algunas condiciones de cultivo tales como la concentración de sacarosa, la concentración del 2,4-D, la temperatura a la cual se crece el cultivo y la adición de extracto de levadura, tanto para la producción de ubiquinona-10 como para mantener la estabilidad de una alta productividad durante cultivos sucesivos. Mediante la selección repetida, la producción de ubiquinona-10 aumentó a 15 mg/l mientras que el peso seco aumentó a 1390 $\mu\text{g/g}$ (133).

La ubiquinona ha sido aislada de células en cultivo de tabaco y de Parthenocissus sp. Lichtenthaler y Straub han estudiado la producción de benzoquinonas en un gran número de cultivos. (Tabla 4.1) (4).

Tabla 4.1. Producción de benzoquinonas en cultivos de tejido in vitro.

Compuesto	Fuente vegetal
Benzoquinonas (no específicas)	<u>Petunia hybrida</u>
	<u>Pimpinella anisum</u>
Plastohidroquinona	<u>Hordeum vulgare</u>
	<u>Nicotiana tabacum</u>
	<u>Petunia hybrida</u>
	<u>Pimpinella anisum</u>
Plastoquinona	<u>Hordeum vulgare</u>
	<u>Nicotiana tabacum</u>
	<u>Petunia hybrida</u>
	<u>Pimpinella anisum</u>
Tocoferol	<u>Hordeum vulgare</u>
	<u>N. tabacum</u>
	<u>Petunia hybrida</u>
	<u>Pimpinella anisum</u>
Tocoquinona	<u>Hordeum vulgare</u>
	<u>N. tabacum</u>
	<u>Petunia hybrida</u>
	<u>Pimpinella anisum</u>
Ubiquinona	<u>N. tabacum</u>
	<u>Parthenocissus sp.</u>
Vitamina K	<u>Hordeum vulgare</u>
	<u>Nicotiana tabacum</u>
	<u>Petunia hybrida</u>
	<u>Pimpinella anisum</u>

Para obtener la información básica en la formación de ubiquinona por células BY-2 en cultivos en suspensión, se han investigado los efectos del fosfato inorgánico, la fuente de nitrógeno y factores físicos como el pH inicial, irradiación con luz y la temperatura. La concentración de fosfato y la fuente de nitrógeno no tienen efecto, pero la relación de nitrógeno del amonio y del nitrato son significativamente efectivos en la formación de ubiquinona. El incremento en el contenido de ubiquinona es reconocido a altas concentraciones de 2,4-D especialmente con pequeñas concentraciones de sacarosa. Los factores físicos no tienen efecto marcado en la formación de ubiquinona excepto la temperatura. El contenido de ubiquinona es considerablemente elevado a altas temperaturas (196).

Tabla 4.2. Efecto de algunos compuestos fenólicos y su fuente vegetal.

Compuesto	Efecto	Fuente vegetal
Antraquinonas	Laxante	<u>Cassia speciosa</u>
Aripironas	Depresivos del SNC	<u>Aniba guianensis</u>
Biflorina	Antibiótico	<u>Caoraria biflora</u>
Burquelina	Antitumoral	<u>Aniba burchellii</u>
Cardol	Vermífugo	<u>Anacardium occidentale</u>
Centrolobina	Antibiótico	<u>Centrolobium robustum</u>
Crisarobina	Laxante	<u>Vataireopsis aparoba</u>
Filicina	Tenicida	<u>Dicynellium carvophyllatum</u>
Lanacol	Antitumoral	<u>Tabebuia imnetiginosa</u>
Plumbagina	Antibiótico	<u>Plumbago scandens</u>
Surinamensina	Cercaricida	<u>Virola surinamensis</u>
Acido úsnico	Antibiótico	<u>Usnea aspera</u>

D I S C U S I O N

Durante el crecimiento normal in vitro, las células vegetales producen dos tipos de metabolitos, primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son proteínas, grasas y vitaminas las cuales son esenciales para la vida de la planta, mientras que los metabolitos secundarios tales como fragancias, pigmentos, diferentes fármacos y otras sustancias son producidas como mecanismo de defensa para la supervivencia de la planta, como respuesta al estrés o como respuesta a alguna otra condición fisiológica no conocida. Estos metabolitos son sintetizados en las plantas por diversos genes reguladores en diferentes pasos y requieren la acción de diversas enzimas.

Hay considerables evidencias que indican que el estrés nutricional, hormonal y factores medioambientales, afectan dramáticamente la fisiología y el metabolismo secundario en células en cultivo. Una de las características de las células en cultivo es la actividad de genes que codifican para compuestos no producidos usualmente. Esta respuesta puede ocurrir a través del estrés mediante la inducción de ARNm específicos, los cuales pueden resultar de una nutrición alterada, o cambios en el régimen de luz, pH, temperatura,

anoxia o contacto microbiano. Alternativamente, algunos compuestos característicos de las plantas no pueden ser sintetizados.

La reducción del flujo metabólico primario impuesto por el estrés en las células, dan como resultado una disminución en el crecimiento y perturbaciones enzimáticas específicas. Las evidencias sugieren que la síntesis de productos secundarios se eleva cuando la tasa de crecimiento disminuye y carbohidratos, minerales y oxígeno baja.

Una de las metas del estudio del metabolismo secundario es la obtención de patrones de productos secundarios a partir de células en cultivo. Aunque se han hecho avances significativos e interesantes y diariamente se aíslan nuevos productos, la regulación de las vías secundarias es todavía poco conocida.

Parece ser que la selección de cepas productoras de grandes cantidades de metabolitos por medio de clonas celulares es uno de los métodos más adecuados para mejorar los potenciales de producción de células cultivadas, no sólo para metabolitos secundarios sino también para metabolitos primarios, aunque las bases genéticas de la variación celular relacionadas con la capacidad biosintética de las células en cultivo aún no han sido clarificadas.

C O N C L U S I O N

Los cultivos de tejidos vegetales son una fuente importante de productos secundarios, ya que se pueden obtener una gran cantidad de ellos, no sólo los que se pueden encontrar normalmente en las plantas sino además nuevos productos que no se encontraban originalmente en las plantas.

Los cultivos de tejidos tienen la capacidad de reducir el número de vasos requeridos para sintetizar y convertir los derivados de la planta. La producción de metabolitos secundarios por los cultivos de tejido puede ser continua, ya que no está limitada por la estación o el clima como lo está en la planta en crecimiento.

Para poder ser útil como fuente industrial alterna de productos secundarios, un cultivo celular deberá satisfacer varios requerimientos. Un buen rendimiento de producto final es esencial. El rendimiento en producto expresado por unidad de tejido deberá por lo menos ser de la misma magnitud que la planta intacta. Además su velocidad

de acumulación en la célula o liberación al medio deberá ser más rápida que su velocidad de degeneración. Las células deberán ser genéticamente estables para que produzcan una cantidad más o menos constante del producto y la producción deberá ser costeable.

Aunque todavía falta que un gran número de problemas fisiológicos y tecnológicos sean resueltos, las estrategias seguidas claramente demuestran que los cultivos en suspensión pueden ser usados para la producción de metabolitos secundarios, por lo que en un futuro no muy lejano los cultivos de tejidos se usarán para la obtención de productos secundarios a nivel industrial.

B I B L I O G R A F I A

1. Arreguin, B. and J. Bonner, *Biochemistry*, 26, 173-186, (1950).
2. Tuelcke, W. and L.G. Nickell, *Science*, 130, 863-864, (1959).
3. Staba, E.J., *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 25-30, (1982).
4. Nickell, L., *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals* (ed. by E. Staba), CRC Press Inc., Boca Raton, Fl., pp. 235-256, (1980).
5. Takeda, R. and K. Katoh, *Planta*, 151, 525-530, (1981).
6. Tran Thanh Van, K. *Ann. Rev. Plant Physiology*, 32, 291-311, (1982).
7. Staba, E., S. Zito and M. Amin, *J. Natural Prod.*, In press. (1982).
8. Kano, K., W. Kimoto, A. Hsu, P. Mahlberg, and D. Bills, *Phytochemistry*, 21, 219-222, (1981).
9. Hagimori, M., T. Matsumoto and Y. Obi, *Plant Physiology* 60, 653-656, (1982).
10. Staba, E. and A. Chung, *Phytochemistry* 20, 2495-2498, (1981).
11. Krueger, J., D. Carew, J. Lui and E. Staba, *Planta Medica* 45, 56-57, (1982).
12. Bradley, P. *Z. Pflanzenphysiol.* 100, 65-67, (1980).
13. Zett, W. and R. Zacharius, *Plant Science Litt* 24, 303-309, (1982).
14. Becker, H., H. Zischer and E. Eich, *Pharmazie* 34, 189-191, (1979).
15. Sasso, Z., U. Heckenberg and J. Berlin, *Plant Physiology* 69, 400-404, (1982).
16. Constantin, M. *Environ. Exper. Bot.* 21, 359-369, (1981).

17. Dixon, R.A. and K.W. Fuller, *Physiol. Plant Pathol.* 9, 299-312, (1976).
18. Gustino, D.L., *Plant Physiology* 68, 1323-1326, (1981).
19. Feilley, J.J. and W.L. Klarman, *Environ. Exp. Bot.* 20, 131-134, (1980).
20. Gafni, Y. and I. Shechter, *Phytochemistry* 20, 2477-2479, (1981).
21. Zenk, M.H., H. El-Shagi, H. Arens, H. Stockigt, E.W. Weiler, B. Osus, *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (W. Barz, W. Reinhard, M.H. Zenk, eds.) Springer-Verlag, Berlin, New York, pp. 27-43, (1977).
22. Knobloch, K.H., G. Dast and J. Berlin, *Phytochemistry* 21, 591-594, (1982).
23. Tal, B., J. Gressel and I. Goldberg, *Planta Medica* 44, 111-115, (1982).
24. Davies, M.E. *Planta* 104, 50-65, (1972).
25. Westcott, F.J. and G.G. Henshaw, *Planta* 131, 67-73, (1976).
26. Constabel, F., *Planta* 79, 58-64, (1969).
27. Mizukami, H., M. Konashima and M. Tabata, *Phytochemistry* 16, 1183-1186, (1977).
28. Matsumoto, T., K. Nishida, M. Noguchi and E. Tamaki, *Agric. Biol. Chem.* 37, 561-567, (1973).
29. Ikeda, T., T. Matsumoto and M. Noguchi, *Agric. Biol. Chem.* 40, 1765-1770, (1976).
30. Okazaki, M., F. Hino, K. Nagasawa and Y. Miura, *Agric. Biol. Chem.* 46, 601-607, (1982).
31. Sacher, J.A. and K.T. Glasziou, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5, 280-292, (1962).
32. Jindal, H.K., V.S. Bansal, C. Kasinathan, S. Larroya and G.K. Khuller, *Experientia* 39, 151-153, (1983).
33. Behmer, C.J. and A.L. Demain, *Curr Microbiol.* 8, 107-114, (1983).
34. Amorin, H.B., D.K. Dougall and W.R. Sharp, *Physiol. Plant* 39, 91-95, (1977).

35. Zenk, M.H., H. El-Shagi and U. Schulte, *Planta Med. Suppl.* 79, 79-101, (1975).
36. Nettleship, L. and M. Slaytor, *J. Exp. Bot.* 25, 114-123, (1974).
37. Zielke, H.K. and P. Filner, *J. Biol. Chem.* 246, 1772-1779, (1971).
38. Jordan, D.B. and J.S. Fletcher, *Plant Sci. Lett.* 17, 95-99, (1979).
39. Hahlbrock, K. *Tissue Culture and Plant Science* (ed. by H.E. Street) Academic Press London pp. 363-378, (1974).
40. Margna, U. *Phytochemistry* 16, 419-426, (1977).
41. Razaque, A. and B.E. Ellis, *Planta* 137, 287-291, (1977).
42. Zenk, M.H., H. El-Shagi and B. Ulbrich, *Naturwissenschaften* 64, 535-536, (1977).
43. Krueger, R.J. and D.P. Carew, *Lloydia* 41, 327-331, (1978).
44. Deus, B. *Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods* (A.W. Alfermann, E. Reinhard, eds.) Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung mbH, Munich, pp. 113-123, (1979).
45. Misawa, M., K. Sakato, H. Tanaka, M. Hayashi and M. Samejima *Tissue Culture and Plant Science* (ed. by H.E. Street) Academic Press, London pp. 405-432, (1974).
46. Veliky, I.A. *Phytochemistry* 11, 1405-1406, (1972).
47. Veliky, I.A. and K.M. Barber, *Lloydia* 33, 125-130, (1975).
48. Doller, G., A.W. Alfermann and E. Reinhard, *Planta Medica* 30, 14-20, (1976).
49. Doller, G. *Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods* (A.W. Alfermann, E. Reinhard, eds.) Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung mbH, Munich pp. 109-116, (1978).
50. Misawa, M., H. Tanaka, O. Chiyo and N. Mukai, *Biotechnol. Bioeng.* 17, 305-334, (1975).
51. Kaul, B., S.J. Stohs and E.J. Staba, *Lloydia* 32, 247-359, (1969).
52. Mehta, A.T. and R. Shailaja, *Front Plant Tissue Cult, IAPTC Congr. 4th, Calgary Alberta, poster # 1406, 1978*.

53. DiCosmo, Frank, and G.H.N. Towers, Recent Advances in Phytochemistry (Ed. by B.N. Timmermann, C. Steelink and F.A. Loewus) Plenum Press, New York and London, Vol. 13, pp. 97-175, (1983).
54. Lorimer, G.H., H.S. Gewitz, W. Voelker, L.P. Solomonson and B. Vennessland, J. Biol. Chem. 249, 6074-6079, (1974).
55. Hinz, H. and M.H. Zenk, Naturwissenschaften 68, 620-621, (1981).
56. Knobloch, K.H. and J. Berlin, Z. Naturforsch 35c, 551-556, (1980).
57. Carew, D.P. and P.J. Krueger, J. Nat. Prod. 4, 326-336, (1977).
58. Dobberstein, P.H. and E.J. Staba, Lloydia 32, 141-152, (1969).
59. Beevers, L. Encyclopaedia of Plant Physiology New Series Vol. 14 A, (D. Boulter, B. Parthier, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 136-163, (1982).
60. Croteau, R. and F. Karp, Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 440-447, (1976).
61. Webster, G.C. Plant Physiology 28, 728-730, (1953).
62. Frost, R.G. and C.A. West, Plant Physiol. 59, 22-29, (1977).
63. Rappaport, L. and D. Adams, Phil Trans R. Soc. London B 234, 521-539, (1978).
64. Schwenn, J.D., U. Schriek and H. Kiltz, Planta 153, 540-549, (1983).
65. Floss, H.G., J.E. Robbers and P.F. Heinstein, Recent Adv. Phytochem. 9, 141-173, (1974).
66. Sassa, F. and U. Heckenberg, Plant Physiology 69, 400-404, (1982).
67. McKenzie, E., L. Nettleship and M. Slaytor, Phytochemistry 14, 273-275, (1975).
68. Allen, J.R.F. and B.R. Holmstedt, Phytochemistry 19, 1573-1592, (1980).
69. Barz, W., H. Herzbeck, W. Husemann, G. Schneiders and H.K. Mangold, Planta Medica 40, 137-148, (1980).

70. Mulder-Krieger, T., R. Verwoorte, Y.P. de Graaf, M. Vander Kreek and A. Baerheim-Svendsen, *Planta Medica* 46, 15-18, (1982).
71. Akasu, M., H. Itokawa and M. Fujita, *Phytochemistry* 15, 471-473, (1976).
72. Zito, S.W. and E.J. Staba, *Planta Medica* 45, 53-54, (1982).
73. Hodges, C.C. and H. Rapoport, *J. Nat. Prod.* 45, 482-485, (1982).
74. Ikuta, A., K. Syono and T. Furuya, *Phytochemistry* 14, 1209-1210, (1975).
75. Furuya, T., H. Kojima and K. Syono, *Phytochemistry* 10, 1529-1532, (1971).
76. Ohta, S., O. Matsui and M. Yatazawa, *Agric. Biol. Chem.* 42, 1245-1251, (1978).
77. Shiio, I. and S. Ohta, *Agric. Biol. Chem.* 37, 1357-1964, (1973).
78. Ozeki, Y. and A. Komamine, *Physiol. Plant* 53, 570-577, (1981).
79. Constabel, F., J.P. Shyluk and O.L. Gamborg, *Planta* 96, 306-316, (1971).
80. Schmitz, M. and U. Seitz, *Pflanzenphysiol.* 63, 259-265, (1972).
81. Greger, H.D. *Protoplasma* 80, 273-277, (1974).
82. Sugano, N. and K. Hayashi, *Bot. Mag. (Tokyo)* 80, 440-449, (1967).
83. Harborne, J.B., J. Arditti and E. Ball, *Am. J. Bot.* 57, 763, (1970).
84. Ibrahim, R.K., M.L. Thakur and B. Permanand, *Lloydia* 34, 175-182, (1971).
85. Smith, S.L., G.W. Slywka and J. Krueger, *J. Nat. Prod.* 44, 509-510, (1981).
86. Okazaki, M., F. Hino, K. Kominami and Y. Miura, *Agric. Biol. Chem.* 46, 609-614, (1982).
87. Ravishanker, G.A. and A.R. Mehta, *J. Nat. Prod.* 42, 152-159, (1979).

33. Biesboer, D.J. and P.G. Mahlberg, *J. Nat. Prod.* 42, 648-657, (1979).
39. Weller, G.R., S. Mangiafico, R.C. Foster and R.H. Lawrence, *Planta Medica* 42, 344-355, (1981).
90. Rucker, W., K. Jentzsch and M. Wichtl, *Z. Pflanzenphysiol.* 102, 207-220, (1981).
91. Kaul, B. and E.J. Staba, *Lloydia* 31, 171-179, (1968).
92. Stearns, E.M. and W.T. Morton, *Phytochemistry* 14, 619-622, (1975).
93. Tabata, M., H. Mizukami, N. Hiraoka and M. Konoshima, *Phytochemistry* 13, 927-932, (1974).
94. Kadkade, P.G. *Plant Sci. Lett.* 25, 107-115, (1982).
95. Balague, C., A. Latche, J. Fallot and J-C. Pech, *Plant Physiology* 69, 1339-1343, (1983).
96. Lackman, I. *Planta* 98, 258-269, (1971).
97. Strickland, R.G. and N. Sunderland, *Ann. Bot.* 36, 671-685, (1972).
98. Gregor, H.D. and J. Reinert, *Protoplasma* 74, 307-319, (1972).
99. Strickland, R.G. and N. Sunderland, *Ann. Bot.* 36, 671-685, (1972).
100. Strickland, R.G. and N. Sunderland, *Ann. Bot.* 36, 443-457, (1972).
101. Ibrahim, R.K., M.L. Thakur and B. Permanand, *Lloydia* 34, 175-182, (1971).
102. Takeda, R. and K. Kato, *Planta* 151, 525-530, (1981).
103. Salah, M.M. *Planta Medica* 45, 135, (1982).
104. Wellman, E. *Planta* 101, 283-286, (1971).
105. Duell-Pfaff, N. and E. Wellmann, *Planta* 156, 213-217, (1982).
106. Murphy, T.M., G.B. Matson and S.L. Morrison, *Plant Physiology* 73, 20-24, (1983).
107. Steck, W., B.K. Bailey, J.P. Shyluk and D.L. Gomborg, *Phytochemistry* 10, 191-194, (1971).

103. Corduan, G. and E. Reinhard, *Phytochemistry* 11, 917-922, (1972).
109. Kuang-Chich, C. and L. Cheng, *Plant Tissue Culture*. (ed. by H. Hu) Pitman Publishing Ltd London, pp. 469-479, (1981).
110. Carew, D.P. and R.J. Kreuger, *Phytochemistry* 15, 442, (1976).
111. Roller, U. *Production of Natural Compound by Cell Culture Methods* (A.W. Alfermann, E. Reinhard, eds.) Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung mbH. Munich. pp. 95-104, (1978).
112. Hahlbrock, K. *Phytochemistry* 11, 165-167, (1972).
113. Gregor, H.O. and J. Reinert, *Protoplasma* 74, 307-319, (1972).
114. Fritsch, H., K. Hahlbrock and H. Grisebach, *Z. Naturforsch* 26b, 581-595, (1971).
115. Roldan, J.F., F. Galeya and P.J. Aparicio, *Z. Pflanzenphysiologie* 90, 467-474, (1978).
116. Madyastha, K.M., J.E. Ridgway and J.G. Dwyer, *J. Cell Biol.* 72, 302-313, (1977).
117. Grunwald, C. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 284, 541-558. (1978).
118. Schopfer, P. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 233-252, (1977).
119. Gover, M., A. Sansonetti and P. Mazliak, *Phytochemistry* 22, 955-959, (1983).
120. Courtois, D. and J. Guern, *Plant Sci. Lett.* 17, 473-482, (1980).
121. Bagar, M.R. and T.H. Lee, *Z. Pflanzenphysiol.* 88, 431-435, (1978).
122. Dougall, D.K., S. Labrake and G.H. Whitten, *Biotechnol. Bioeng.* 25, 531-594, (1983).
123. Dougall, D.K., S. Labrake and G.H. Whitten, *Biotechnol. Bioeng.* 25, 569-579, (1983).
124. Veliky, I.A. *Lloydia* 40, 482-486, (1977).
125. Weber, N. and H.K. Mangold, *Planta* 155, 225-230, (1982).
126. Wickremasinghe, R.L., T. Swain and J.L. Goldstein, *Nature (London)* 199, 1302-1303, (1963).

127. Crawford, R.M.M. Plant Life Anaerobic Environments (D.D. Hook, R.M.M. Crawford, eds.). Ann. Arbor Sci. Publ., Ann. Arbor., MI pp. 119-136, (1978).
128. Chirkova, T.V. Plant Life Anaerobic Environments (D.D. Hook, R.M.M. Crawford, eds.). Ann. Arbor. Sci. Publ., Ann. Arbor., MI pp. 137-154, (1978).
129. Leblava, S. Plant Life Anaerobic Environments (D.D. Hook, R.M.M. Crawford, eds.). Ann. Arbor. Sci. Publ., Ann. Arbor., MI pp. 119-136, (1978).
130. Cossins, E.A. Plant Life Anaerobic Environments (D.D. Hook, R.M.M. Crawford, eds.). Ann. Arbor. Sci. Publ., Ann. Arbor., MI pp. 169-202, (1978).
131. Miller, C.O. Plant Physiology 49, 310-313, (1972).
132. Hus, A-F. J. Nat. Prod. 44, 408-414, (1981).
133. Hahlbrock, K. and H. Ragg, Arch. Biochem. Biophys. 166, 41-46, (1975).
134. de Klerk-Kiebert, Y.M., T.J.A. Knoppers and L.H.W. Van Der Plas, Physiol. Plant 55, 98-102, (1982).
135. Berlin, J. and K.H. Knobloch, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 219-220, (1980).
136. Berlin, J., K.G. Kokoschke and K.H. Knobloch, Plant Med. 42, 173-190, (1981).
137. Berlin, J. and J.M. Widholm, Plant Physiol. 59, 550-553, (1977).
138. Berlin, J. and J.M. Widholm, Phytochemistry 17, 65-68, (1978).
139. Widholm, J.M. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals (ed. by E.J. Staba). CRC Press, Boca Raton, Fl. pp. 99-112, (1980).
140. Widholm, J.M. Biochim. Biophys. Acta 279, 48-57, (1972).
141. Widholm, J.M. Biochim. Biophys. Acta 261, 52-53 (1972).
142. Rowan, D.D., P.E. Mac Donald and R.A. Skipp, Phytochemistry 22, 2102-2104, (1983).
143. Ebel, J., A.R. Ayers and P.A. Albersheim, Plant Physiol. 57, 775-779, (1976).

144. Zähringer, U., E. Scaller and H. Grisebach, *Z. Naturforsch* 36c, 234-241, (1981).
145. Strasser, H., K.G. Tietjen, K. Himmelspach and U. Matern, *Plant Cell Reports* 2, 140-143, (1983).
146. Dixon, R.A., P.M. Dey, D.L. Murphy and I.M. Whitehead, *Planta* 151, 272-280, (1981).
147. Gustine, D.L. and R.T. Sherwood, *Plant Physiology* 61, 226-230, (1978).
148. Miller, SA., L.B. Graves and D.P. Maxwell, *Phytopathol.* 71, 395, (1981).
149. Eresk, T. and I. Sziraki, *Phytopath. Z.* 97, 364-368, (1980).
150. Helgeson, J.P., A.D. Budde and G.T. Haberlach, *Plant Physiology Suppl.* 61, 58, (1978).
151. Budde, A.D. and J.P. Helgeson, *Phytopathol.* 71, 206, (1981).
152. Kurosaki, F. and A. Nishi, *Phytochemistry* 22, 669-672, (1983).
153. Eilert, U., B. Engel, E. Reinhard and D. Wolters, *Phytochemistry* 22, 14-15, (1983).
154. Tietjen, K. and U. Matern, *Phytochem. Soc. N. Amer. Newsletter*, July, p. 12, (1981).
155. DiCosmo, F., R.A. Norton and G.H.W. Towers, *Naturwissenschaften* 69, 550-551, (1982).
156. Fujimori, T.H., H. Tanaka and K. Kato, *Phytochemistry* 22, 1033, (1983).
157. Scott, A.I., H. Mizukami and S.L. Lee, *Phytochemistry* 13, 795-798, (1979).
158. Schallenberg, J. and J. Berlin, *Naturforsch* 34c, 541, (1979).
159. Parelleux, Alain and Roger Vinas, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 323-324, (1982).
160. Petiard, V., D. Courtois, F. Gueritte, N. Langlois and S. Monnon, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 309-310, (1982).

161. Constabel, F., W.G.W. Kurz and J.P. Kutney, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 301-304, (1982).
162. Sasse, F., U. Heckenberg and J. Berlin, *Plant Physiology* 69, 400-404, (1982).
163. Yoder, Larry R. and Paul G. Mahlberg, *American Journal of Botany* 63a, 1167-1173, (1976).
164. Deus-Neumann, B. and M.H. Zenk, *Planta* 162, 250-260, (1984).
165. Zenk, M.H., El-Shagi, M. Arens, J. Stüeckigt, E.U. Weiler and B. Deus, *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application*, (ed. by W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk), Of the First International Congress on Medicinal Plant Research, pp. 22-26, September 6-10, (1976).
166. Stüeckigt, J., Karl-Heinz Pawelka, Ana Rother and B. Deus, *Z. Naturforsch* 37c, 856-860, (1982).
167. Nambiar, G.R. and A.R. Mehta, *Indian Journal of Experimental Biology*, Vol. 19, 535-537, June (1981).
168. Floss, H.G., J.E. Robbers and P.F. Heinstein, Regulation of Ergot Alkaloid Formation: Influence of Tryptophan and its analogs and of the Endproduct Elymoclavine, Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana.
169. Berlin, J., E. Forcha, V. Wray, J. Hammer and W. Hüssel, *Z. Naturforsch* 38c, 346-352, (1983).
170. Kamo, K.K., W. Kimoto, A-F. Hsu, P.G. Mahlberg and D.P. Bills, *Phytochemistry* 21, 219-222, (1982).
171. Tam, W.A.J., F. Constabel and W.G.W. Kurz, *Phytochemistry* 19, 436-437, (1980).
172. Yoshikawa, T. and T. Furuya, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Furuya), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 307-308, (1982).
173. Kamo, K.K., W. Kimoto, A-F. Hsu, P.G. Mahlberg and D.D. Bills, *Phytochemistry* 21, 219-222, (1982).
174. Furuya, T., T. Yoshikawa and M. Taira, *Phytochemistry* 23, 999-1001, (1984).
175. Staba, E.J., S. Zito and M. Amin, *Journal of Natural Prod.* Vol. 45, 256-262, (1982).

176. Nettleship, Lesley and M. Slaytor, *Journal of Experimental Botany* 25, 1114-1123, (1974).
177. Frischknecht, P.M. and T.W. Baumann, *Journal of Medicinal Plant Research* 4, 245-249, (1980).
178. Fukui, H., K. Nakagawa, S. Tsuda and M. Tabata, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 313-314, (1982).
179. Staba, E.J. and Alex C. Chung, *Phytochemistry* 20, 2495-2498, (1981).
190. Verpoorte, R., T. Mulder-Krieger, P. Wijnsma, J.M. Verzijl and A. Baerheim Svendsen, *Z. Naturforsch* 39c, 680-683, (1984).
131. Robins, R.J., A.J. Webb, M.J.C. Rhodes, J. Payne and M.R.A. Morgan, *Planta Medica* 50, 235-233, (1984).
132. Wink, M., L. Witte, T. Hartmann, C. Theuring and V. Volz, *Journal of Medicinal Plant Research* 43, 253-257, (1983).
133. Hashimoto, T., Sato, F., M. Mino and Y. Yamada, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 305-306, (1982).
134. Nag, T.N., Harsh, M.L. and D. Singh, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 293-294, (1982).
135. Grewal, S., S. Koul, A. Ahuja and C.K. Atai, *Indian Journal of Experimental Biology* 17, 553-561, June, (1979).
136. Galanes, Ileana T., D.T. Webb and D. Rosario, *Journal of Natural Products*, Vol. 47, pp. 373-376, Mar-Apr. (1984).
137. Diomande, Mamadou, *ATAS Bulletin I, Tissue Culture*, pp. 26-27, Nov. (1984).
138. Furuya, T., *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 269-272, (1982).
139. Romo del Vivar, A., B. Arreguin, R. Camacho, G. Guerrero, A. Ortega and M. Castillo, *Rev. Latinoamericana de Química* pp. 240-243, (1974).
191. Quintero, A., Rosas, V., F. Zamudio, S. Capella and A. Romo, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 295-296, (1982).

191. Schulte, U., H. El-Shagi and M.H. Zenk., *Planta Cell Reports* 3, pp. 51-54, (1984).
192. Rai, Prem P. and Shok. Musa, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 277-278, (1982).
193. Suzuki, H., T. Matsumoto, and Y. Obi, *Plant Tissue Culture 1982*, (ed. by A. Fujiwara), Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 285-286, (1982).
194. Zenk, M.H., U. Schulte and H. El-Shagi, *Naturwissenschaften* 71, S. 266, (1984).
195. El-Shagi, H., U. Schulte and M.H. Zenk, *Naturwissenschaften* 71, S. 267. (1984).
196. Ikeda, Tsutomu, Takashi Matsumoto and Masao Noguchi, *Agric. Biol. Chem.*, 41(7), pp. 1197-1201, (1977).