

Lej 130



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DEL METABOLISMO  
NITROGENADO Y CONTENIDO DE ALCALOIDES  
DURANTE EL CICLO DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS  
IN VITRO EN Catharanthus roseus

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

**MARIA DEL CARMEN VELASCO RODRIGUEZ**

MEXICO, D. F.

1987



## **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.

## ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
GDH	Glutamato deshidrogenasa
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamino sintetasa
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -oxoglutarato
mM	milimolar
NAD <sup>+</sup>	Nicotín adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotín adenín dinucleótido fosforilado oxidado
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosforilado reducido
NiR	Nitrito reductasa
NR	Nitrato reductasa
r.p.	Recién preparado
VCR	Vincristina
VLB	Vinblastina

## INDICE

INTRODUCCION .....	1
OBJETIVO .....	2
ANTECEDENTES	
LA PLANTA	
TAXONOMIA .....	3
DESCRIPCION .....	4
UTILIDAD DE LA ESPECIE .....	4
METABOLISMO NITROGENADO .....	5
VIA DE LA DESHIDROGENASA GLUTAMICA (GDH) .....	8
VIA DE LA GLUTAMINO SINTETASA/GLUTAMATO SINTASA (GS/GOGAT) .....	10
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV) .....	13
OBTENCION DE UN CULTIVO DE TEJIDO .....	14
REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LOS CTV .....	16
CULTIVO DE CALLOS .....	19
LOS ALCALOIDES .....	20
MATERIALES Y METODOS .....	27
RESULTADOS Y DISCUSION .....	45
CONCLUSIONES .....	57
APENDICE .....	59
BIBLIOGRAFIA .....	62

## INTRODUCCION

El cultivo in vitro de tejidos y células vegetales se basa en un conjunto de técnicas que permiten hacer cierto grado de manipulación en el proceso de morfogénesis de los tejidos vegetales, de tal manera que a partir de células somáticas es posible la formación de un conjunto de células no diferenciadas idénticas entre sí y genéticamente totipotenciales (callo). Este es un modelo que permite mayor control experimental en el estudio del metabolismo intermediario ya que, además de la mayor homogeneidad genética y fisiológica de las células, los factores químicos y ambientales son fácilmente manipulables.

Este sistema ha sido empleado en el presente trabajo para llevar a cabo un estudio sobre el metabolismo nitrogenado de Catharanthus roseus, una planta productora de alcaloides anticancerígenos de gran valor tanto medicinal como comercial. Entre los alcaloides producidos por C. roseus, la vincristina (VCR) y la vinblastina (VBL) han sido empleadas con éxito en el tratamiento de la leucemia y otros cánceres humanos y se usan rutinariamente en las diferentes quimioterapias que se emplean actualmente.

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar la influencia del ácido indól acético en la síntesis de alcaloides, contenido de clorofila y en el comportamiento de las enzimas GDH, GS y GOGAT, durante el ciclo de crecimiento del cultivo de tejidos de C. roseus.

## ANTECEDENTES

### LA PLANTA

#### TAXONOMIA:

El género Vinca fue establecido por Linnec en el año de 1753 en su "Species Plantarum", donde distingue dos especies: Vinca minor y Vinca major. La descripción genérica asociada con su diagnosis específica apareció en 1754 en la quinta edición de "Genera Plantarum", donde Vinca minor L. es el lectotipo aceptado del género (Stearn, 1966).

Esta especie recibe diferentes nombres de acuerdo al lugar donde se cultiva, entre los cuales tenemos: Vinca, Vicaria, Magdalena, perVinca, Teresita, Maravilla, etc. Además, ha recibido los siguientes nombres científicos: Vinca rosea, Lochnera rosea, Catharanthus roseus y Ammocallis rosea. Ya que esta planta recibía tantos nombres científicos Stearn en 1966 decidió realizar una investigación para determinar cuál era el nombre científico correcto y encontró que desde 1920 los botánicos convinieron en clasificarla dentro de la flora de las Apocinaceas de las Indias occidentales, con el nombre de Catharanthus roseus L.G.

(Don), nombre ya usado por varios autores, antes de que Stearn lo tomara en 1966.

Pichon (1951) en Farnsworth, (1961). la clasifica como sigue:

Familia	Apocinaceae
Subfamilia	Plumerioideae
Tribu	Alsotonieae
Subtribu	Catharanthus G. Don
Sección	Lochnera Pich.
Género y Especie	<u>Catharanthus roseus</u> (L.) G. Don

#### DESCRIPCION:

Es una planta subarborescente de 40 a 80 cm de alto, de rápido crecimiento, leñosa en su base, con ramas erectas, hojas simples, enteras, opuestas, siempre verdes, de 3 a 8 cm de largo por 1.5 a 5 cm de ancho, su peciolo es bidentado en su base. Flores solitarias o en pares, de color rosa o blanco, con el centro rojo o púrpura oscuro.

#### UTILIDAD DE LA ESPECIE:

Es empleada contra diversas enfermedades en varios países. Por ejemplo, en el Salvador, Cuba y las Filipinas las hojas se utilizan para las afecciones de la garganta y los ojos. En las Filipinas las raíces también se utilizan como agente abortivo. En Vietnam las hojas, las raíces y la planta completa se utilizan para las evacuaciones intestinales. En Madagascar, las raíces y



la planta completa, se utilizan como laxante y para el dolor dental. En Sudáfrica la raíz y las hojas se ocupan para la menstruación excesiva, etc. (Farnsworth, 1961).

C. roseus, es una planta productora de alcaloides, entre los cuales se encuentran principalmente la vincristina (VCR, conocida antes como leurocristina) y la vinblastina (VBL, conocida antes como vincleucoblastina), que han sido empleadas con éxito, desde 1963, en el tratamiento de la leucemia y de otros cánceres humanos.

Estas sustancias se presentan en las plantas en muy pequeñas cantidades (0.00025 %), por lo que se requiere de grandes cantidades de ella para la producción comercial del medicamento: de VBL y VCR se obtienen 1.0 g y 20.0 mg/1000 Kg de planta respectivamente. En México, la VCR y VBL se utilizan en forma bastante amplia para tratar algunos tipos de leucemia y varias neoplasias. La VBL es usada en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y en el neoplasma testicular, mientras que la VCR exhibe actividad contra el linfoma de Hodgkin, la leucemia linfoblástica aguda, el tumor de Wilmsy y el nabdomiosarcoma.

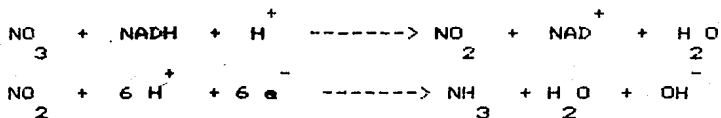
#### METABOLISMO NITROGENADO

El nitrógeno ocupa el 4o. lugar en abundancia en los organismos vivos y se encuentra en una gran cantidad de compuestos esenciales tal como las proteínas, los ácidos nucleicos y algunos reguladores del crecimiento de las plantas (Loyola-Vargas

et al., 1981).

El nitrógeno atmosférico es primero fijado por algunos microorganismos y convertido en nitrógeno inorgánico reducido (amonio), el cual puede ser oxidado por la flora del suelo hasta nitrato (Loyola-Vargas et al., 1981), en los nódulos de las raíces de las leguminosas es incorporado directamente a la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados. A este proceso de transformación del nitrógeno atmosférico a nitrógeno orgánico reducido se le denomina fijación del nitrógeno.

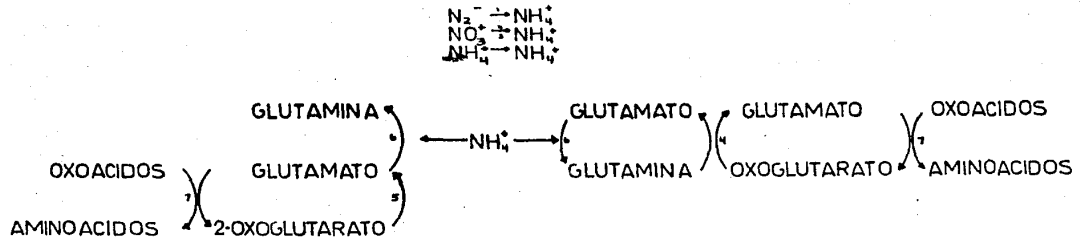
La reducción del nitrato a amonio se realiza en dos pasos, los cuales son catalizados por dos enzimas diferentes: la nitrato reductasa (NR), que cataliza la conversión de nitrato a nitrito y la nitrito reductasa (NiR), que cataliza la reducción de nitrito a amonio:



La actividad de la NR está considerada como un paso limitante en la utilización del nitrato en las plantas (Brunetti, 1976). Generalmente, la NR en plantas superiores es menos sensible a la regulación por amonio, aunque se ha reportado una represión parcial en maíz y en raíz de algodón (Radín, 1975).

El amonio resultante puede ser asimilado por dos vías diferentes: la vía de la glutamino sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT), y la vía de la deshidrogenasa glutámica (GDH). (Fig. 1).

## RUTA DE ASIMILACION DEL NITROGENO EN PLANTAS SUPERIORES



- 1 Nitrogenasa
- 2 Nitratorreductasa
- 3 Nitri torreductasa
- 4 GOGAT
- 5 GDH
- 6 GS
- 7 Transaminasa

Fig. 1

La primera vía asimila inicialmente al amonio en el amido de la glutamina en presencia de la GS, y a continuación la glutamina reacciona con el 2-oxoglutarato, en presencia de la GOGAT, para producir dos moléculas de glutamato (Mifflin y Lea, 1976). Mientras que la segunda vía produce directamente glutamato. Una vez que el amonio se ha incorporado a una molécula orgánica, como el grupo amino del ácido glutámico, es translocado a otras moléculas orgánicas para formar los demás aminoácidos mediante las enzimas denominadas transaminasas.

#### VIA DE LA DESHIDROGENASA GLUTAMICA (GDH)

Harel (1977) menciona en sus trabajos que la NR y la NIR están localizadas exclusivamente en las células del mesófilo en hojas de maíz y la GDH se encuentra en la membrana celular, por otra parte la GDH ha sido localizada principalmente en mitocondria estando presente en la hoja en grandes cantidades (Wallsgrave et al., 1977).

El grupo de Rhodes (1976) ha demostrado en experimentos con *Lemna minor*, que cuando hay concentraciones elevadas de amonio, la actividad de la GDH se incrementa. Más recientemente demostraron que la actividad de la GDH es inhibida por ATP, el cual es un sustrato para la GS y que el ADP y el 5'-AMP inhiben la actividad de la GS mientras que sólo tiene un pequeño efecto sobre la GDH.

Estos resultados sugieren que la GS podría ser la enzima principal para la asimilación del amonio, cuando los cambios de energía son altos. Sin embargo, cuando el potencial biosintético

es bajo, los cambios de energía reducidos y los niveles de amonio altos. la GDH podría ser más importante en la asimilación de amonio (Rhodes et al., 1976).

El grupo de Oaks (1980) encontró niveles altos de amonio y nitrato en células maduras de raíz de maíz y ésta podría ser la razón de que la actividad de la GDH se vea incrementada en estos sitios (Oaks et al., 1980).

Naven y Hartmann (1980) reportaron que la mitocondria de las células vegetales está adaptada para asimilar amonio, al menos cuando los niveles de amonio intracelular son elevados. También demostraron la participación de la GDH en la formación de glutamato bajo condiciones similares in vivo usando precursores marcados con <sup>15</sup>N.

Los iones también parecen tener una función regulatoria sobre la GDH. se ha reportado que el Ca<sup>2+</sup> mejora grandemente los niveles de GDH (Zeleneva y Khavkina, 1980) y que la actividad enzimática aminativa se ve inhibida por el EDTA, mientras que la desaminación oxidativa no se ve afectada (Takanashi y Farhashi, 1983).

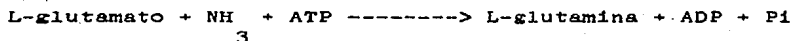
La existencia de diversas isoenzimas de la GDH han llevado a proponer que éstas podrían tener una función fisiológica relevante en las plantas. Se ha reportado que las isoenzimas de la GDH están exclusivamente localizadas en la matriz mitocondrial de Pisum sativum (Naven, 1980). También se ha observado que la GDH mitocondrial es sensible a cambios en los estados fisiológicos

del tejido. Yue (1969) reporta siete isoenzimas de la GDH para maíz, las cuales se encuentran en mitocondria y son dependientes de NAD<sup>+</sup>.

Observando lo anterior podemos decir que aún no se encuentra claramente determinada la función de la GDH en la asimilación del amonio, pero es evidente que tiene una función relevante durante dicho proceso.

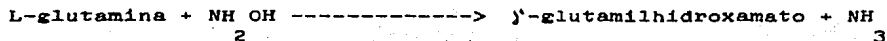
#### VIA DE LA GLUTAMINO SINTETASA/GLUTAMATO SINTASA (GS/GOGAT)

La glutamino sintetasa cataliza la amidación del glutamato (Kanamori y Matsumoto, 1972), por medio de la siguiente reacción:



La GS es considerada la enzima responsable para la asimilación primaria del amonio en las plantas superiores. Esta enzima está presente en los cloroplastos, los cuales han sido propuestos como el mejor sitio de síntesis de novo de los aminoácidos en las plantas superiores (Scott y Neyra, 1979), así como en el citoplasma (Hirel y Gadal, 1980).

Cuando el NH<sub>3</sub> es reemplazado por hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH), se da lugar a la formación del γ-glutamil-γ-hidroxamato:



O'Neal (1973) observó que el mercaptoetanol y otros compues-

tos sulfhidrilo incrementaban la actividad de la enzima, en tanto que en presencia de acetato fenilmercurico y ácido hidroximercurico-fenilsulfónico la actividad de la GS en arroz fue inhibida en un 94 y 85% respectivamente, sin embargo la enzima que fue inactivada por preincubación con acetato fenilmercurico ó  $HgCl_2$ , fue reactivada por la adición de cisteína en un tiempo muy corto. Esto indica que la enzima posee grupos sulfhidrilo esenciales para su actividad (Kanamori y Matsumoto, 1972).

En 1975 Givan demostró que la síntesis de glutamina en la oscuridad ocurre sólo en presencia de ATP, y que la fotoconversión de glutamato a glutamina fue inhibida por concentraciones milimolares de amonio y nitrito. La síntesis de glutamina dependiente de ATP en la oscuridad no fue inhibida por iones amonio o nitrito.

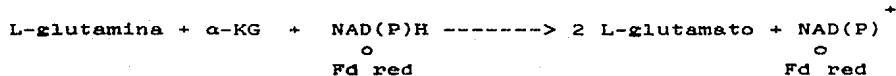
La actividad de la GS es también inhibida por AMP, CTP, glicina y alanina, esto puede indicar una posible autonomía en la biosíntesis de las purinas y de las pirimidinas (Haystead, 1973).

En 1980, Barrat encontró que en cebada, soya y arroz había 2 diferentes formas de GS. Posteriormente en 1981 encontró que en haba existían 5 diferentes formas de GS: GS<sub>1</sub> y GS<sub>2</sub> se encontraban en el cloroplasto, GS<sub>4</sub> y GS<sub>5</sub> en el citoplasma y la GS<sub>3</sub> fue observada en extractos de raíz de plántulas de tres semanas de edad, que estuvieron expuestas a un pretratamiento por 24 horas con  $NH_4Cl$  o con urea (Barrat, 1980).

Kretovich (1981) observó que cuando se infiltraban iones

amonio dentro de la hoja intacta había un incremento en la actividad de la GS, tanto en la del cloroplasto como en la del citosol (Kretovich et al., 1981).

En 1979, Tempest encontró en la bacteria Aerobacter aero-  
genes a la GOGAT como una enzima actuando en una ruta alterna para la asimilación del amonio junto con la GS. También demostró que cuando el amonio es limitante en el crecimiento de A. aero-  
genes, los niveles de GS y GOGAT suben y la GDH disminuye. La GOGAT procede de acuerdo a la siguiente reacción:



Lea y Mifflin encontraron que la GOGAT dependiente de ferredoxina, localizada en los cloroplastos, depende de la luz para poder efectuar la conversión del 2-oxoglutarato a glutamato (Mifflin y Lea, 1976).

El NADH y el NADPH son eficientes donadores de electrones para las enzimas que se obtienen de extractos de endospermo y raíces de maíz (Oaks et al., 1980), sin embargo en soya se ha encontrado que la actividad de la GOGAT es mucho mayor con NADH que con NADPH (Storey y Reporter, 1978).

La GOGAT al igual que la Nir requiere ferredoxina para su actividad, la cual es producida en los cloroplastos en presencia de luz, en la raíz existe una proteína similar a la ferredoxina y que funciona como fuente natural de donación de electrones para la Nir y la GOGAT (Rathman y Edwards, 1976).



## CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

En la actualidad el cultivo de tejidos vegetales ha tomado gran relevancia, debido a que se basa en un conjunto de metodologías y técnicas de laboratorio que pueden modificarse y adaptarse a distintas especies vegetales, además, de poseer muchas ventajas y aplicaciones tales como el permitir cierto grado de manipulación en el proceso de morfogénesis de los tejidos vegetales, de tal manera que a partir de células somáticas es posible la formación de un conjunto de células no diferenciadas, idénticas entre sí y genéticamente totipotenciales (callo); minimización de variables de tipo medio ambientales, es decir, se puede tener mayor control sobre la luz, humedad, temperatura y composición del medio de cultivo (medio nutritivo); así mismo, se puede reducir o eliminar la presencia de bacterias y hongos contaminantes y principalmente se da lugar a la producción de sustancias químicas útiles.

En general, podemos resumir las ventajas del CTV en los siguientes puntos:

- a) Condiciones controladas
- b) Selección de variantes
- c) Independencia del medio ambiente
- d) Libres de contaminación
- e) Estado fisiológico uniforme
- f) Obtención de nuevos compuestos (Loyola-Vargas, 1984)

A pesar de dichas aplicaciones y ventajas, cabe mencionar la existencia de ciertos problemas como son:

- a) Inestabilidad genética
- b) Poca producción de sustancias de interés
- c) Lenta velocidad de crecimiento del cultivo

De lo anterior podemos deducir que un CTV puede ser el crecimiento productivo de una masa de células vegetales sobre algún tipo de medio nutritivo.

La principal razón de utilizar cultivos de tejidos es para tener un mayor conocimiento acerca de las propiedades de las células aisladas (cultivo) de la planta y en la medida que conozcamos ésto, tener mayor información acerca de las propiedades e interrelaciones de las células dentro de la planta (Dennis, 1976).

Para establecer un cultivo in vitro de cualquier especie, se puede utilizar un sistema de ensayo y error (Gamborg et al., 1976) o bien buscar bibliográficamente algún medio adecuado utilizado en alguna familia cercana a la especie en estudio y probar ese medio para observar si da o no resultado, si el resultado es negativo se pueden hacer variaciones y volver al sistema de ensayo y error.

#### OBTENCION DE UN CULTIVO DE TEJIDO:

Como mencionamos anteriormente, al tejido indiferenciado creciendo sobre un medio sólido se le llama callo y su inducción se efectúa generalmente plantando un trozo de tejido diferenciado estéril sobre un medio nutritivo gelificado con agar y al cual se

le han agregado fitorreguladores. El callo puede cultivarse transfiriéndolo todo o una parte a medio sólido fresco con el objeto de que adquiriera un crecimiento rápido y una consistencia suave, a esto se le conoce como resiembra. Dependiendo de la planta de que provienen los callos pueden ser blancos, amarillentos, verdes o pigmentados con antocianinas (Dodds y Roberts, 1982).

Las diferencias en el medio de cultivo, el medio ambiente, edad, origen celular y tasas de crecimiento puede explicar el comportamiento de una línea en particular y no necesariamente representar una característica general de las células vegetales en cultivo. Condiciones más uniformes en cultivo pueden ayudar a obtener datos y observaciones más comparables.

Existen tres factores en particular, los cuales gobiernan los sucesos de los cultivos celulares y éstos son: origen del explante, el medio de cultivo y las condiciones ambientales (Gamborg et al., 1976):

- a) Origen del explante. La producción útil de callos y subsecuentemente la regeneración de la planta es dependiente, en parte, de la calidad asociada con los explantes usados y éstos están relacionados con la condición de la fuente vegetal, es decir, que ella haya tenido buenos requerimientos nutricionales antes de ponerse en cultivo de tejidos. Las plantas jóvenes proveen los mejores explantes.
- b) Medio de cultivo. Dependiendo de la planta que se esté es-

tudiando. se utilizará al medio de cultivo adecuado, por ejemplo, existen diferentes medios basales como el de Murashige, el de White, el de Gamborg, etc., los cuales pueden utilizarse tal como dice su preparación o se les pueden hacer ciertas modificaciones de acuerdo a las necesidades de la planta en estudio.

- c) Condiciones ambientales. Estas se refieren a las condiciones ambientales que necesita el cultivo para su desarrollo óptimo, teniendo en cuenta que para este desarrollo, existen tratamientos de precultivo realizados sobre la planta fuente, y posteriormente para el cultivo *in vitro*, se tiene un control sobre algunas variables tales como: temperatura (rango óptimo 25-27 °C), fotoperíodo, intensidad luminosa, humedad, etc. (Staba, 1980), por supuesto que todos estos factores varían dependiendo de la especie vegetal tratada.

#### REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LOS CTV

Aunque las plantas completas tienen requerimientos simples para su crecimiento, los cultivos de tejidos vegetales tienen necesidades más complejas, es decir, requieren de macro y micronutrientes, tales como vitaminas, hormonas, fuentes de carbono, etc., ya que *in vivo* son sintetizadas por algún órgano de la planta y transportados hacia donde son metabolizados, en tanto que en los CTV no.

Los medios basales de Murashige y Skoog (MS), Gamborg,

Miller y Ojima son más adecuados para un amplio rango de plantas y para la promoción de organogénesis en cultivos. Se deben encontrar concentraciones adecuadas para que haya un crecimiento de las células cultivadas para cada especie. Generalmente el medio MS presenta una solución de sales, las cuales ayudan a mantener el crecimiento de más células en cultivos vegetales. Algunos iones, como el ión amonio, también puede presentarse en el medio de cultivo en altas concentraciones en todas las plantas y desarrollar tejido in vitro en todos los estadios. El agregar fosfato monobásico de sodio en la solución de sales del medio MS ha resultado benéfica para algunos tejidos. El medio MS en comparación con otros medios presenta mayor cantidad de microelementos. El agregar agentes quelantes, como el EDTA, asegura que el hierro sea capaz de quedar en solución en un amplio rango de pH (Seabrook et al., 1976). El efecto de promoción del crecimiento y la selectividad del medio de cultivo para tejidos vegetales son dependientes del pH, por lo cual los medios de cultivo son usualmente ajustados a un rango de pH de 5 a 6 antes de la adición del agar.

Las vitaminas son importantes para que haya un buen crecimiento in vitro del cultivo de tejido, la más ampliamente usada es la tiamina-HCl. Las concentraciones de nitrógeno y potasio parecen ser importantes para la embriogénesis somática.

La sacarosa se utiliza como fuente de carbono, que es absolutamente necesaria para la mayoría de los tejidos, muy pocas células son autotróficas in vitro. La sacarosa, en concentra-

ciones de 2 a 3% es comúnmente usada como fuente de carbono. Hay evidencia de que la producción de algunos metabolitos obtenidos de cultivo de tejidos vegetales pueden ser afectados por la concentración de la sacarosa (Tabata, 1977).

Los reguladores del crecimiento, en plantas intactas, actúan para regular y coordinar procesos los cuales ayudan al desarrollo normal de la planta. El crecimiento, la diferenciación del tejido y las células, así como el metabolismo secundario, son afectados por los fitorreguladores. El agregar reguladores del crecimiento al medio de cultivo, no es siempre necesario para cultivos de callo. Sin embargo, el suministro de dichos reguladores es usualmente obligado para cultivo de callos en los cuales se requiere un incremento en las tasas de crecimiento u organogénesis. Muy pocas plantas en cultivo *in vitro* producirán callos abundantemente en la ausencia de reguladores del crecimiento.

El ácido indolacético es la auxina generalmente más usada para el cultivo de tejidos vegetales debido a sus pocos efectos adversos sobre la organogénesis. Si bien el ácido 2, 4-diclorofenoxiacético también es ampliamente utilizado.

Las citocininas son un segundo grupo de reguladores del crecimiento en donde las más usadas son la cinetina (K) y la benzilaminopurina (BAP), esta última tiene particularmente efecto en la dominancia apical en brotes axilares y sobre la proliferación de brotes inducidos *in vitro* (Staba, 1980). Se ha reportado que el balance de niveles de auxina y citocinina, son necesarias para el control del crecimiento y la organogénesis *in vitro*.

Los aminoácidos y las amidas pueden ser utilizados para el cultivo de tejidos vegetales de algunas especies. Las más utilizadas son L-asparagina, L-ácido aspártico, L-arginina, y L-glutamina (Huang y Murashige, 1977).

La fuente de nitrógeno está dada por el amonio y el nitrato, además se sabe que los ácidos citidílico y guanidílico sirven para mejorar el cultivo de callos.

#### CULTIVO DE CALLOS

El cultivo de tejidos vegetales puede realizarse en un medio nutritivo solidificado con agar, en donde el tejido forma un callo o masa de células en proliferación. el cual es conveniente para inducir y mantener líneas celulares (Gamborg y Wetter, 1975).

Este callo representa un crecimiento relativamente lento. Las nuevas células son formadas en la periferia de la masa del callo existente, las cuales se encuentran sometidas a un gradiente nutricional que va desde las células que están en contacto directo con el medio hasta las que crecen en la superficie del callo.

Cuando un callo se deja crecer por mucho tiempo en el mismo medio, los nutrientes esenciales del medio son consumidos por el callo al igual que hay pérdida de agua del agar y secreción de metabolitos por el callo, por esta razón hay que resembrarlos en medio fresco después de un cierto tiempo para que éstos no mueran y crezcan en mejores condiciones.

## LOS ALCALOIDES

Los alcaloides son compuestos nitrogenados, presentes en las plantas, que frecuentemente producen respuestas fisiológicas al ser administrados a mamíferos. Este término se aplica a una heterogénea colección de bases de las que se excluyen a las purinas y a las pirimidinas.

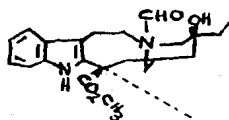
Catharanthus roseus, es una planta que contiene casi todos los tipos de alcaloides derivados del indol, y que ha sido estudiada en forma muy significativa durante los últimos 20 años.

Los primeros compuestos aislados de la planta entera fueron la vincoleucoblastina (vinblastina) y la leurosina, pero otras fracciones demostraron tener aún mayor actividad farmacológica. Posteriormente se encontraron la vincristina y la leurosidina. A la fecha se han reportado cerca de 200 alcaloides, comprendidos dentro de los tipos Corynanthe, Iboga, Aspidoasperma y Strichnos, con patrones estructurales diferentes entre sí.

Tanto vincristina como vinblastina (Fig. 2) pertenecen al tipo Aspidoasperma, que tiene como precursores inmediatos a la vindolina y a la 15- $\beta$ -carbometoxivelbanamina; alcaloides relativamente menores ya que su producción en la planta es de 1 g y 20 mg/ 1000 Kg de peso fresco, respectivamente. Ambos han demostrado ser también agentes valiosos en el tratamiento de enfermedades neoplásicas humanas, solos o en regímenes combinados.

El mecanismo de acción de estos alcaloides se lleva a cabo inhibiendo la síntesis de los ácidos nucleicos, de las proteínas





VCR R = -COH

VLB R = -CH<sub>3</sub>

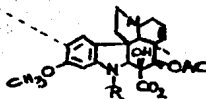


Figura 2. Las estructuras de la VLB y la VCR difieren sólo en que la segunda contiene un grupo formilo en lugar del metilo unido al nitrógeno del dihidroindol de la molécula.

y de los lípidos; su efecto en la síntesis protéica está probablemente relacionado con su capacidad de unirse a los ribosomas y a sus subunidades, originando la precipitación de complejos en los ribosomas de las células afectadas.

Los alcaloides de *C. roseus*, son también agentes inhibitorios específicos del ciclo celular, bloqueando la metafase en la mitosis; esta actividad biológica se explica por su capacidad de fijarse a la proteína tubulina, un componente clave de los microtúbulos celulares. La división celular en la metafase se interrumpe por la disrupción de los microtúbulos del aparato mitótico.

En 1971, Kempis, Hesse y Schmid, discutieron sobre un nuevo enfoque para la clasificación de los alcaloides del indol basado en el establecimiento de su biosíntesis. De este modo, los alcaloides fueron divididos en 5 clases y dentro de cada clase se desarrollaron varias subclases.

El triptofano es el precursor biosintético de todos estos alcaloides, pero excepto para los alcaloides más simples, es raro que sea la única fuente de carbono. Frecuentemente varios de los carbonos son suministrados por otra fuente de carbono, tal como una unidad de monoterpeno.

El triptofano es descarboxilado por medio de la triptofano descarboxilasa para dar la triptamina. La triptofano descarboxilasa es la primera enzima que cataliza al metabolito primario L-triptofano hacia la síntesis de los metabolitos secundarios. Esta enzima ha sido extraída a partir de *C. roseus* y ha sido parcialmente purificada por precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel. La actividad de la triptofano descarboxilasa parece ser uno de los factores que regulan la biosíntesis de los alcaloides en *C. roseus*.

Observaciones recientes muestran que la síntesis de los alcaloides del tipo Aspidosperma e Iboga, (Kurz, 1981) los cuales aparecen más tarde en la vía biosintética, pudieron llevarse a cabo después de que la formación de los alcaloides tipo Corynanthe ha alcanzado un máximo.

Se ha demostrado que los cultivos de tejidos vegetales han sido útiles para estudiar las propiedades y regulación de vías metabólicas en el metabolismo secundario (Hahlbrock, 1976). Recientemente se ha podido estimular la biosíntesis del alcaloide indólico ajmalicina en cultivos en suspensión de *C. roseus* modificando las condiciones del medio de cultivo (Knobloch, 1980).

La producción de alcaloides en cultivos celulares puede ser considerada como un proceso de diferenciación gobernado por las condiciones ambientales así como por el genotipo del material en cuestión. Mientras que las condiciones ambientales que pueden inducir a las células en cultivo a sintetizar y acumular alcaloides han sido bien descritas, la selección de un genotipo prometedora requiere una continua investigación (Kurz, 1981).

Se ha observado (Kutney, 1981) que los cultivos de células de diferentes plantas, aún derivados y propagados de la misma manera, muestran diferentes vías enzimáticas, quizás debido a la pérdida o ganancia de actividad de algunas enzimas.

Un estudio de más de 400 callos y cultivos en suspensión de *C. roseus*, detectó que la composición de los alcaloides parecía ser específica para cada línea celular (Roller, 1978).

Se ha encontrado que el contenido de alcaloides es óptimo si el crecimiento es iniciado por un inóculo que se encuentre en la fase logarítmica del crecimiento y con un índice mitótico alto (Kutney, 1980). Se ha demostrado (Kurz, 1981) que el porcentaje de los alcaloides por gramo de peso seco se incrementa con el tiempo, con una producción óptima a las 3 ó 4 semanas. Con respecto a los periodos más tempranos del crecimiento del cultivo se demuestra un incremento más rápido en la biosíntesis de la ajmalicina y de la yohimbina (fam. Corynanthe) que la observada para la vindolina (fam. Aspidosperma).

La mayoría de los estudios se han concentrado en el metabo-

lismo de los alcaloides monoméricos, sobre todo en la ajmalicina, cuya ruta metabólica es paralela a la ruta hacia VCR y VBL.

En la figura 3 se observa la ruta biosintética de la estrictosidina, la cual tiene una función clave en la biosíntesis de los alcaloides de *C. rosea*. Como se indica, el nitrógeno es derivado de la triptamina y el resto de la molécula de un monoterpeneoide tipo Corinantha, el glucósido iridoide:secologanina.

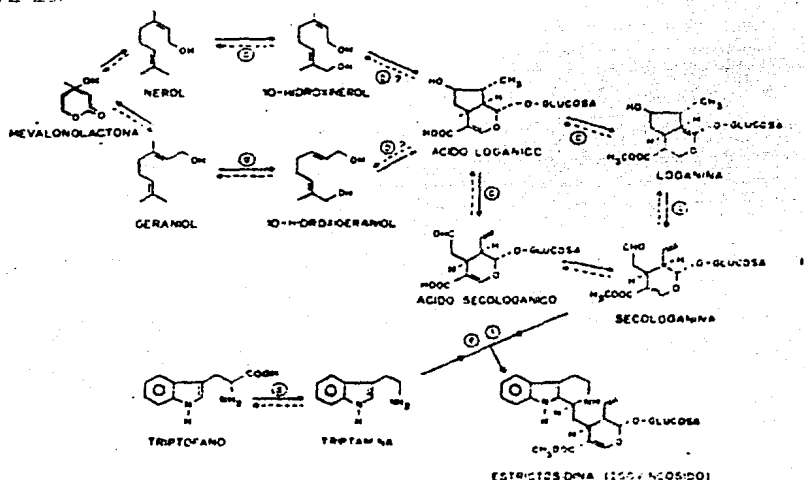


Figura 3. Biosíntesis de la estrictosidina.

La enzima que hidroliza al geraniol y al nerol a los derivados 10-hidroxi, es una oxigenasa del grupo citocromo P-450, esta enzima se encuentra localizada en vacuolas o provacuolas. Por otra parte se ha encontrado a una enzima que cataliza la reacción de geraniol a geranial, y de nerol a neral, en la pre-

sencia de  $\text{NAD}^+$  ó de  $\text{NADP}^+$  y la reacción inversa cuando se usa  $\text{NADH}$  ó  $\text{NADPH}$ . Esta oxidación puede estar involucrada en la biosíntesis, tal vez como un intermediario entre el 10-hidroxigeraniol (ó nerol) y el ácido logánico, pero este punto aún no ha sido comprobado.

Después de que ha sido producida la secologanina a partir del ácido logánico; hay una condensación enzimática estereoespecífica de la triptamina y la secologanina, para dar estrictosidina. Esta condensación se lleva a cabo por medio de una enzima conocida como estrictosidina sintetasa. La estrictosidina resultante tiene una estereoquímica 3- $\alpha$ , ésta es la configuración que se necesita para la formación biosintética de los alcaloides indólicos monoterpénoides. La estrictosidina es deglucosilada por medio de una glucosidasa.

En 1979 Lee y Hirata encontraron que a partir de catenammina se llevaba a cabo la conversión a ajmalicina, por medio de la enzima catenasina reductasa, la cual es dependiente de  $\text{NADPH}$ .

A partir de ajmalicina y hasta la biosíntesis final de los alcaloides de *C. roseus* no se conoce exactamente cuántas y cuáles son las enzimas que intervienen; sólo se conocen algunos intermediarios, como se muestra en la figura 4.

## MATERIALES

### MATERIAL DE VIDRIO:

- Matraces aforados
- Matraces erlenmeyer
- Tubos de cultivo
- Pipetas pasteur
- Probetas
- Vasos de precipitados
- Pipetas
- Frascos gerber
- Cajas petri

### MATERIAL GENERAL:

- Espátulas
- Algodón
- Pinzas de disección
- Gasa
- Pisetas

### EQUIPO:

Potenciómetro Beckman  
Placas de calentamiento y agitación  
Centrífuga Beckman JA-21  
Espectrofotómetro Carl Zeiss  
Licuadora Osterizer  
Balanza analítica  
Balanza granataria  
Baño maría de temperatura constante  
Agitador vortex

Campana de flujo laminar

Refrigerador

Congelador

Cuarto de cultivo

Autoclave

**FITORREGULADORES:**

- AIA (Ácido indolacético)
- BAP (bencil amino purina)

**REACTIVOS:**

Los reactivos utilizados fueron todos de grado reactivo, de las casas: Baker, Merck y Sigma.

**ELABORACION DEL MEDIO DE CULTIVO**

En un matraz con agua destilada en agitación se agregaron las soluciones que se muestran en el apéndice. Posteriormente en vasos de precipitado con agua en agitación se agregaron los fitorreguladores, los cuales previamente fueron llevados a un pH ácido, a continuación se mezclaron con las soluciones y se ajustó el pH a 5.6. En seguida se agregó la sacarosa, se esperó a que se disolviera y se aforó a la cantidad requerida. A continuación se agregó el agar, el cual debe haberse lavado al menos 3 veces con agua hasta que adquiriera un color blanco, y se procedió a fundir a una temperatura aproximada de 50 C.

Posteriormente se vació en los tubos de cultivo (8 ml en

c/u), se taparon con papel aluminio y se autoclavearon a 121oC durante 15 minutos.

Cada mes se deben hacer soluciones nuevas, para evitar que haya precipitaciones y contaminación en las soluciones stock.



## MÉTODOS

### DETERMINACION DE PROTEINAS: Método de Peterson (1977)

#### Soluciones stock:

- Cobre-tartrato-carbonato (CTC). A una solución al 10% de carbonato de sodio, la cual está en agitación, se le añade sulfato de cobre-tartrato para dar una concentración final de 0.25%. Esta solución es estable por lo menos 2 meses a temperatura ambiente.
- Dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS)
- Hidróxido de sodio 0.8 N
- Folin Ciocalteu

#### Soluciones para trabajar:

- Desoxicolato de sodio al 0.15% (DOC)
- Acido tricloroacético al 72% (TCA)
- Albúmina (BSA) (0.5 mg/ml). se prepara mezclándola junto con 1 mg/ml de azida de sodio (como agente antibacteriano, no interfiere) y se almacena a -70 C en pequeñas alícuotas. Sirve para 15 días.
- Reactivo A: Mezclar partes iguales de los stock CTC, NaOH, SDS y H<sub>2</sub>O
- Reactivo B: 1 volumen de reactivo de Folin Ciocalteu mezclado con 5 volúmenes de agua (es estable a temperatura ambiente se

debe colocar en frasco ámbar).

**Procedimiento:**

- 1) La muestra, que contenga 5-100  $\mu$ g de proteína, se lleva a 1 ml con agua destilada
- 2) Adicionar 0.1 ml de DOC al 0.15%
- 3) Dejar reposar 10 min a temperatura ambiente
- 4) Enfriar 5 minutos
- 5) Adicionar 0.1 ml de TCA al 72% previamente frío, mezclar
- 6) Enfriar 20 minutos
- 7) Centrifugar a 3.000 x g durante 15 minutos
- 8) Descartar el sobrenadante y dejar el tubo boca abajo para escurrir. La pastilla queda pegada en el fondo del tubo
- 9) A la pastilla se le adiciona 1 ml de reactivo A más 1 ml de agua, mezclar y dejar 10 minutos a temperatura ambiente
- 10) Adicionar 0.5 ml del reactivo B y mezclar inmediatamente
- 11) Dejar 30 minutos en reposo
- 12) Leer la absorbancia a 750 nm

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GS**

La actividad se midió mediante una modificación del método de Kanamori y Matsumoto (1972). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	50.0 mM	1.5 ml	pH = 7.5
ATP	6.6 mM	0.2 ml	pH = 7.0 r.p.
Glu-Na	192.0 mM	0.5 ml	pH = 7.0
MgSO	33.3 mM	0.1 ml	

4

NH <sub>2</sub> OH	10.0 mM	0.3 ml	pH = 7.0 r.p.
Cisteína	3.3 mM	0.1 ml	
Extracto	-----	0.3 ml	

La reacción se inició con la adición del glutamato. La mezcla se incubó por 30 minutos a 37 C en lugar de 15 min a 30 C. como el método original. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. En cada determinación se usó un blanco a tiempo cero, es decir, contenía todos los reactivos y el mismo volumen de extracto enzimático pero la reacción debe detenerse a tiempo cero adicionando 1 ml del reactivo de cloruro férrico.

El  $\gamma$ -glutamil- $\gamma$ -hidroxamato formado se determinó adicionando 1 ml del reactivo de cloruro férrico (volúmenes iguales de FeCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O al 10% en HCl 0.2 N, TCA al 24% y HCl al 50%). Se centrifugó 15 minutos a 3.000 rpm y se midió el incremento en la absorbancia a 540 nm respecto a cada blanco.

La velocidad de la reacción se expresó como  $\mu$ moles de  $\gamma$ -glutamil- $\gamma$ -hidroxamato formado por minuto, para lo cual se utilizó una gráfica de calibración.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu$ mol de  $\gamma$ -glutamil- $\gamma$ -hidroxamato por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad específica se expresó como unidades de enzima por miligramo de proteína.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GOGAT

La actividad de la GOGAT-NAD(P)H se determinó por el método de Beevers y Storey (1976), con las modificaciones introducidas por Loyola (1983).

La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	1.5 ml	pH = 7.5
$\alpha$ -KG	10 mM	0.5 ml	pH = 7.0
Gln	30 mM	0.5 ml	
NAD(P)H	80 $\mu$ M	0.2 ml	
Extracto		0.3 ml	
		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NAD(P)H, se incubó a 30 C por dos minutos, después se inició la reacción añadiendo el NAD(P)H. Se graficó la disminución en la absorbancia a 340 nm. Se usó sólo la parte lineal de la gráfica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NAD(P)H transformados por minuto, para lo cual se utilizó una gráfica de calibración. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0.001 en la absorbancia a 340 nm por minuto.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GDH-NAD(P)H

La actividad de esta enzima se determinó por el método de

Joy (1973) con las modificaciones introducidas en este trabajo.

La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	1.7 ml	pH = 8.2
$\alpha$ -KG	10 mM	0.5 ml	pH = 7.0
NH <sub>4</sub> Cl	100 mM	0.5 ml	
NAD(P)H	160 $\mu$ M	0.2 ml	
Extracto		0.1 ml	
		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NAD(P)H se incubó a 30 °C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo el NAD(P)H. Se graficó la disminución en la absorbancia a 340 nm. Se usó sólo la parte lineal de la gráfica.

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NAD(P)H transformados por minuto, para lo cual se utilizó una gráfica de calibración.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GDH-NAD(P)

Para esta determinación se utilizó el método de Loyola (1984). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	2.1 mM	pH = 9.4
Glu	60 mM	0.5 ml	
NAD(P)	600 $\mu$ M	0.2 ml	pH = 8.0
Extracto		0.2 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el  $\text{NAD(P)}^+$ , se incubó a  $30^\circ\text{C}$  por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo el  $\text{NAD(P)}^+$ .

Se graficó el incremento en la absorbancia a  $340\text{ nm}$ . Se utilizó sólo la parte lineal de la gráfica.

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final excepto para el Tris. La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de  $\text{NAD(P)}^+$  transformados por minuto, para lo cual se utilizó una gráfica de calibración.

#### DETERMINACION DE NITRATOS

Se siguió la técnica de Nicholas y Nason (1971). Se realizó una curva patrón con  $\text{KNO}_3$ . El procedimiento a seguir para la curva patrón es el mismo para el ensayo que para las muestras:

Extracto  $0.02\text{ ml} + 1.48\text{ ml}$  de agua destilada

$+$   
 $0.1\text{ ml}$  de ácido sulfámico al  $10\%$

↓  
agitar y dejar reposar durante  $2\text{ min.}$

↓  
agitar y adicionar  $0.4\text{ ml}$  de  $\text{HClO}_4$  al  $20\%$

↓  
agitar y medir absorbancia a  $210\text{ nm}$

La curva patrón se obtiene graficando la concentración en  $\mu\text{g}$

de KNO<sub>3</sub> contra la absorbancia a 210 nm.

3

#### DETERMINACION DE AMONIO

El amonio se determinó por el método del indofenol (Kaplan, 1965) que se basa en la formación del complejo de indofenol a partir del amonio liberado en la reacción utilizando como catalizador nitroprusiato de sodio:

Para cuantificar el amonio liberado por este método es necesario tener un pH neutro.

#### Mezcla de reacción (muestra):

1.7 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM	pH = 7.5
0.2 ml urea	200 mM	
0.1 ml extracto de tejido		

#### Mezcla de reacción (blanco):

1.9 ml de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM	pH = 7.5
0.1 ml del extracto de tejido		

Solución A: fenol 0.106 M + nitroprusiato de sodio 0.17 mM

Solución B: NaOH 0.125 M + hipoclorito de sodio 11 mM

#### Método:

Agregar a la mezcla de reacción 5 ml de la solución A

↓  
Adicionar 5 ml de la solución B

Agitar y dejar desarrollar el color por 30 min



Medir el incremento en la absorbancia a 575 nm

La curva patrón se obtiene graficando la concentración del NH Cl contra la absorbancia a 575 nm.

4

#### DETERMINACION DE AMINOACIDOS

Se utilizó el método de Cocking (1954). Se realizó una curva patrón con ácido glutámico. El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras es el mismo:

0.04 ml de extracto + 0.96 ml de agua destilada



1 ml de reactivo de ninhidrina



se pone a ebullición 30 min



2.5 ml de isopropanol al 50%



reposar 15 min a temperatura ambiente



leer la absorbancia a 570 nm

Reactivo de ninhidrina:

Solución A: amortiguador de citratos 0.2 M pH 5.0 0.1 (r.p.).

adicionar por cada 50 ml de amortiguador 0.08 g de SnCl<sub>2</sub>.

2



Solución B: Tomar 10 ml del reactivo A y adicionar 0.4 ml de ninhidrina previamente disuelta en 10 ml de metilcelosolve (etilenglicol-monometil-éter).

La curva patrón se obtiene graficando la concentración en  $\mu\text{g}$  de glu contra la absorbancia a 570 nm.

#### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CLOROFILA

Método de Arnold (1949). El procedimiento a seguir se anota a continuación:

- colocar en un tubo 1 ml de acetona al 80 %
- adicionar 100  $\mu\text{l}$  de extracto
- tapar el tubo con parafilm, agitar en vortex y guardar en la oscuridad durante 5 min
- transcurrido el tiempo anterior se centrifuga a 600 x g por 5 min
- posteriormente decantar la solución y colocar en una celda de vidrio para efectuar las lecturas de la absorbancia a 665 y 649 nm.

La concentración de clorofila en  $\mu\text{g/ml}$  se calcula utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a} = 11.63 (A_{665}) - 2.39 (A_{649})$$

$$\text{Clorofila b} = 20.11 (A_{649}) - 5.18 (A_{665})$$

$$\text{Clorofila total} = 6.45 (A_{665}) + (A_{649}) 17.2$$

## PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO

Previamente se debe enfriar todo el material que se va a utilizar. Para la preparación del extracto enzimático se siguió el procedimiento que a continuación se menciona:

- 1) El tejido (callo) se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$
- 2) El tejido congelado se molió en un mortero (previamente enfriado).
- 3) Se le adicionó inmediatamente el buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 mM, mercaptoetanol 5 mM, pH 8.2) en una relación de 1 g:2.5 ml y 5% (p/p) de polivinilpolipirrolidona.
- 4) La mezcla se homogeneizó y se filtró sobre gasa (previamente humedecida con buffer).
- 5) El filtrado se centrifugó a 18,000 rpm durante 30 min en el rotor JA-20 en la centrifuga J2-21
- 6) El sobrenadante de la centrifugación (extracto crudo) fue utilizado para las determinaciones enzimáticas.

## DETERMINACION DE ALCALOIDES

Los alcaloides estándar fueron obtenidos de Sigma. Los solventes usados en el HPLC fueron de grado HPLC de la casa Merck.

Los alcaloides fueron extraídos con metanol (12 h) y después con cloroformo (12 h) en un Soxhlet. Los extractos de metanol y cloroformo fueron evaporados por separado y se redisolvieron en un pequeño volumen (0.5 ml) antes del análisis.

Las muestras fueron analizadas por HPLC en un cromatógrafo Varian 5060 usando una columna de fase reversa MCH-5. La elución fue realizada a 30 °C con un gradiente ternario:

A = agua/metanol 90:10

B = metanol

C = 0.1 M SDS en 0.02 M de buffer de fosfatos pH = 5.3

La proporción utilizada de A/B/C fue: 47:48:5 en el tiempo cero y una proporción A/B/C = 0:95:5 a un tiempo de 33 min. La detección fue realizada con un detector Varian UV-2050, de longitud variable a 254 nm. Unos segundos después, cuando la absorbancia se estabilizó, se hizo un barrido de 190 a 300 nm.

Fig. 5. Curva patrón para proteínas

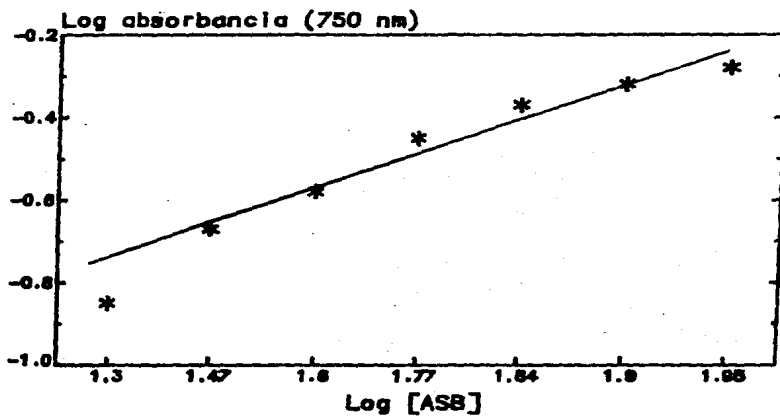


Fig. 6. Curva patrón para nitratos

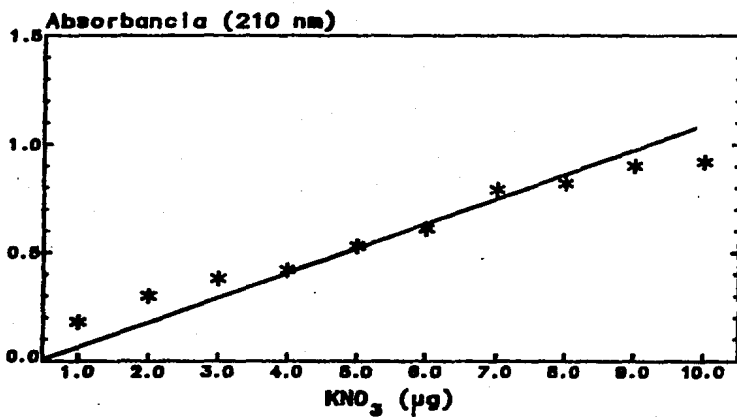


Fig. 7. Curva patrón para amonio

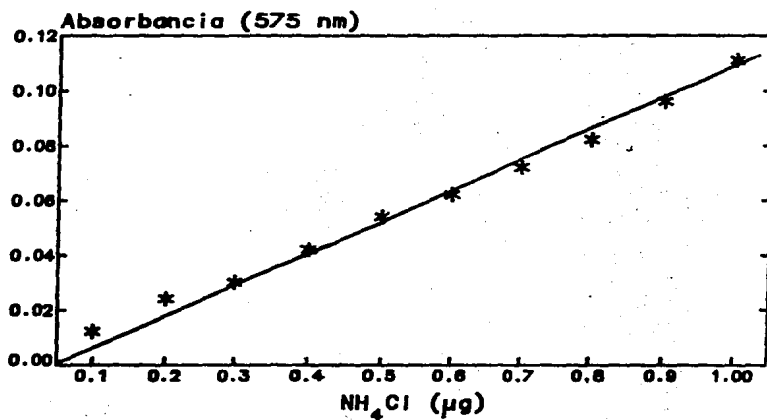
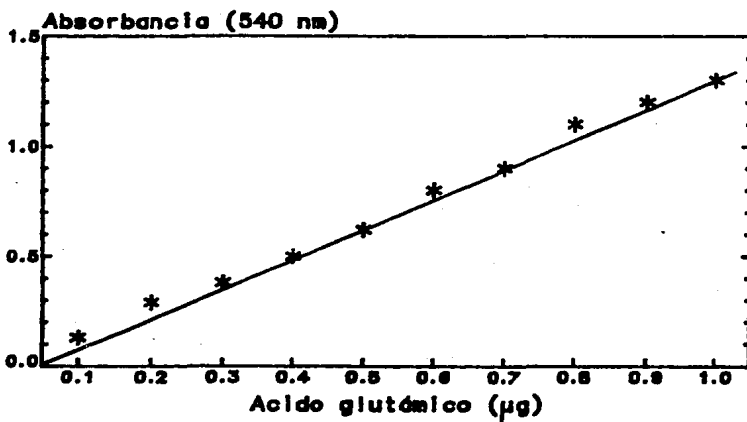


Fig. 8. Curva patrón para aminoácidos



## RESULTADOS Y DISCUSION

El desarrollo y crecimiento de un cultivo depende evidentemente de las condiciones bajo las cuales se está creciendo. En los cultivos empleados en el presente trabajo, se utilizaron dos combinaciones de reguladores del crecimiento. Cuando se tuvo presentes tanto al AIA como BAP los callos crecieron más vigorosamente (Fig. 9) y fueron de color blanco. Cuando la auxina fue omitida el crecimiento fue más lento y los cultivos mostraron una fase de retardamiento más prolongada (Fig. 9) por lo que durante el período de tiempo estudiado no alcanzó la fase estacionaria. Bajo esta última condición los cultivos fueron capaces de desarrollar la síntesis de clorofila.

Puesto que las células al ir creciendo van pasando por diferentes etapas de desarrollo, es probable que las actividades específicas de las enzimas sean un reflejo de este desarrollo, por lo que se procedió a evaluar este parámetro para cada una de las enzimas estudiadas a lo largo del ciclo de crecimiento.

El patrón enzimático mostrado por la GDH-NADH se muestra en la figura 10 (páneos A y C). Los cultivos blancos presentan tres picos de actividad de la GDH (Fig. 10-A), en tanto que los callos verdes sólo uno (Fig. 10-C). Es probable que la ausencia de los



picos II y III, que aparecen en la fase estacionaria del ciclo de crecimiento de los callos blancos, se deba a que la curva de crecimiento de los callos verdes se encuentra desplazada debido a un crecimiento más lento y por lo tanto aún no llega a la fase estacionaria.

Otra diferencia fundamental entre ambos cultivos es el valor absoluto para la actividad de la GDH-NADH. Los callos blancos poseen una actividad específica 5 veces mayor para esta enzima que la determinada en los callos verdes.

Parecería ser que los callos blancos si bien provienen de explantes de hoja al igual que los callos verdes, han adquirido o desarrollado propiedades de tejidos no fotosintéticos, como de raíz. Este efecto desde luego es completamente dependiente de la presencia del AIA, por lo que el efecto puede ser indirecto, es decir que sea el AIA o más bien el balance AIA/BAP el que está produciendo el fenómeno de desdiferenciación y como consecuencia el cambio en el patrón de las enzimas.

Puesto que la GDH es capaz de catalizar la misma reacción en los dos sentidos, también se midió el sentido desaminativo de la reacción, entre otras cosas porque actualmente aún es materia de controversia cual es la verdadera función de esta enzima. Es decir si principalmente cataliza la síntesis del ácido glutámico o su degradación. El modelo de CTV puede ayudar a elucidar este problema, ya que podría esperarse que estas dos acciones de la GDH se encuentren separadas a lo largo del ciclo de crecimiento de los cultivos.

La actividad de la GDH-NAD, al igual que para la GDH-NADH, también es mucho mayor en los callos blancos (Fig. 10-B) comparada con los callos verdes (Fig. 10-D). Los callos blancos presentan tres picos de actividad a los 10, 15 y 20 días de iniciado el subcultivo, en tanto que los callos verdes sólo presentan uno a los 5 días (Fig. 10-B). Pero a diferencia de la GDH-NADH, este pico no coincide con ninguno de los picos de los callos blancos, aunque podría ser el pico de los 10 días por la etapa del crecimiento en que se encuentran los cultivos.

Por otro lado si comparamos las actividades de GDH-NADH contra las de GDH-NAD para cada cultivo podemos observar que ambas actividades coinciden en los dos tipos de cultivo, a lo largo del ciclo de crecimiento.

En la gráfica de la figura 11 puede observarse que la actividad específica de la GS en los callos blancos (Fig. 11-A) es aproximadamente diez veces mayor que en los callos verdes (Fig. 11-C). Además, el comportamiento durante los primeros dieciséis días es totalmente diferente en ambos casos, ya que mientras que en los callos verdes se presentan tres picos de actividad muy bien definidos, a los 2, 9 y 17 días en los callos verdes dicha actividad es muy baja y permanece constante hasta el día 17 en el que se presenta el único pico de actividad.

Hasta ahora, en plantas, se han descrito dos isoenzimas para la GS, una en el citoplasma y otra en el cloroplasto de las células fotosintéticas, en tanto que en las células de la raíz se ha descrito sólo una GS, similar a la GS del citoplasma de los

tejidos fotosintéticos.

Los CTV parecen mostrar su propio desarrollo isoenzimático para la GS, ya que los callos blancos muestran 3 picos de actividad de GS. Queda por elucidar si estos picos son verdaderas isoenzimas, o si se trata de la misma isoenzima pero modificada covalentemente, por ejemplo por glucosilaciones como se ha determinado en algunas plantas. Una tercera alternativa podría ser que cada uno de los picos tuviera una composición de péptidos diferente. La GS de *Phaseolus vulgaris* está compuesta de dos tipos diferentes de péptidos,  $\alpha$  y  $\beta$ , y la composición en el número de cada uno de ellos varía con la edad de la planta (Lara et al., 1984). En el presente caso cabría esta posibilidad, que cada uno de los picos mostrara una diferente composición en el número de subunidades que forman a la GS.

La GOGAT-NADH también muestra un comportamiento diferencial entre los callos blancos (Fig. 11-B) y los callos verdes (Fig. 11-D), ya que mientras los callos blancos presentan 2 picos de actividad, uno al inicio de la fase logarítmica y el otro en la estacionaria, en tanto que los callos verdes presentan 2 picos en la fase logarítmica, el primero probablemente es el mismo que el de los callos blancos, pero el segundo es definitivamente diferente.

En este caso la actividad específica de la GOGAT-NADH es mayor en los callos verdes respecto a los callos blancos.

Puesto que las enzimas de asimilación del nitrógeno son muy

diferentes entre los 2 cultivos tanto cuali como cuantitativamente, así como el grado de diferenciación, uno podría esperar que la composición de aminoácidos mostrara diferencias, tanto cuali como cuantitativamente, tal y como nuestro grupo ha determinado que pasa en raíces y hojas de C. roseus (Loyola-Vargas et al., 1987). La figura 12 muestra que efectivamente el patrón de desarrollo en la síntesis de los aminoácidos es diferente entre los 2 cultivos. En el caso de los callos blancos hay una acumulación mucho mayor de aminoácidos durante la fase de retardamiento (Fig. 12-A), justo previo al inicio del crecimiento del cultivo, como si las células se prepararan sintetizando y acumulando aminoácidos para poder iniciar un rápido crecimiento. En el caso de los callos verdes también se presenta un pico de acumulación de aminoácidos, sólo que este se produce a los 9 días, también durante la fase de retardamiento de este cultivo (Fig. 12-B). Sin embargo, la cantidad total de aminoácidos es 1.69 veces mayor en los callos verdes respecto a los callos blancos.

Los callos que denominamos blancos, no contienen clorofila, medida por la técnica de Arnold cuya sensibilidad es de 1  $\mu\text{g}$  PF, mientras que los callos verdes contenían hasta 12  $\mu\text{g}$   $\text{g}/\text{P F}$ . La clorofila extraída de los callos está compuesta tanto por clorofila a como clorofila b, y la relación entre ambas, si bien varía a lo largo del ciclo de crecimiento, fue de alrededor de 0.5. Este valor al igual que la clorofila total, están muy por abajo de los valores determinados en los tejidos fotosintéticos de las plantas de C. roseus. Sin embargo, estos fueron los primeros cultivos con clorofila que obtuvo nuestro grupo. Una selec-

ción de los cultivos más verdes y su subsecuente cultivo produjo cultivos con 30  $\mu\text{g/g}$  P F de clorofila y una relación de clorofila a/b de 2.2 (Méndez-Zeel, 1986). El subsecuente cambio de medio de cultivo de estos callos, del MS al de Phillips y Collins, ha producido una línea celular con contenidos promedio en la cantidad de clorofila de aproximadamente 100  $\mu\text{g/g}$  P F (Méndez-Zeel et al., Comunicación personal).

Los alcaloides no se producen a lo largo de todo el ciclo de crecimiento de los cultivos (Fig. 14), sino que se presentan en etapas específicas del crecimiento.

Se producen dos máximos en la cantidad de VCR, uno durante la fase de retardamiento y el otro al inicio de la fase estacionaria. Estas dos etapas en la síntesis de la VCR coinciden con los picos de máxima actividad enzimática tanto de la GS como de la GDH. Por lo que respecta a la VLB podemos decir que su presencia es mínima y en algunos momentos llega a desaparecer. Por lo cual se observa que los callos crecidos en presencia de AIA presentan una cantidad elevada de VCR y una cantidad mínima de VBL.

Los criterios de identificación de los picos fueron: el tiempo de retención en la columna de HPLC, el espectro de UV del pico que eluye de la columna y coinyección con estándares.

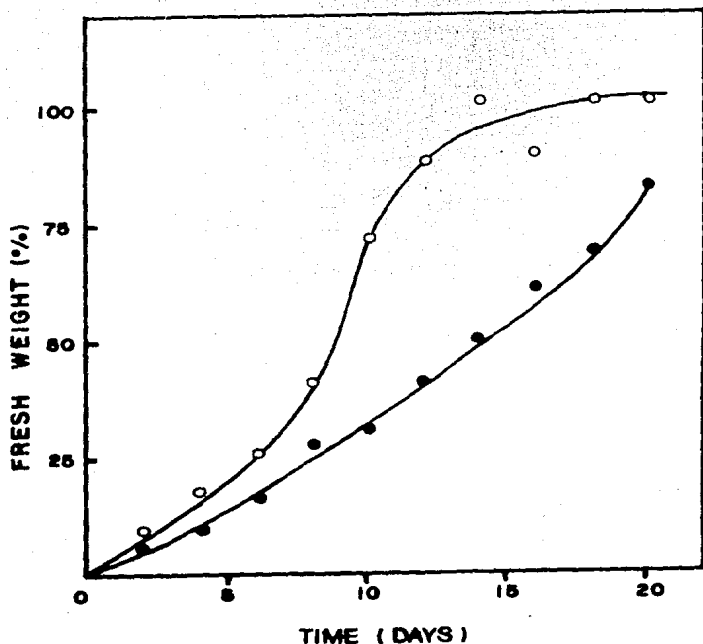


Figura 9. Curvas de crecimiento de los callos blancos ( ) y verdes ( ) de *Catharanthus roseus*. Para el medio de cultivo se utilizaron las sales del medio M.S. (Ver apéndice), adicionado de glicina (2 mg/l), piridoxina (0.5 mg/l), ácido nicotínico (0.5 mg/l), tiamina (10 mg/l), mio-inositol (100 mg/l), sacarosa (20 g/l) y agar (previamente lavado con agua, 8 g/l). Como se mencionó anteriormente la concentración de los reguladores fue ácido indolacético (3 mg/l) más bencilaminopurina (3 mg/l). Los cultivos se incubaron en luz continua (3000 lux) y a una temperatura de 28°C.

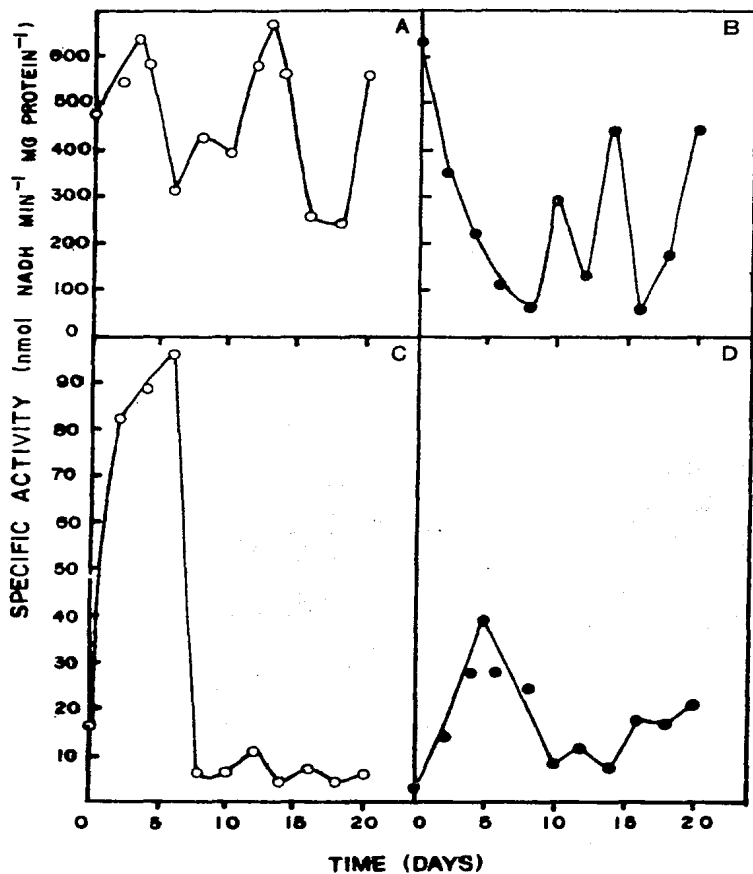


Figura 10. Patrones enzimáticos de la GDH-NADH a lo largo del ciclo de cultivo de callos de *C. roseus*. GDH aminativa (○), GDH desaminativa (●). Páneles A y B: cultivo en presencia de AIA (callos blancos). Páneles C y D: cultivos en ausencia de AIA (callos verdes).

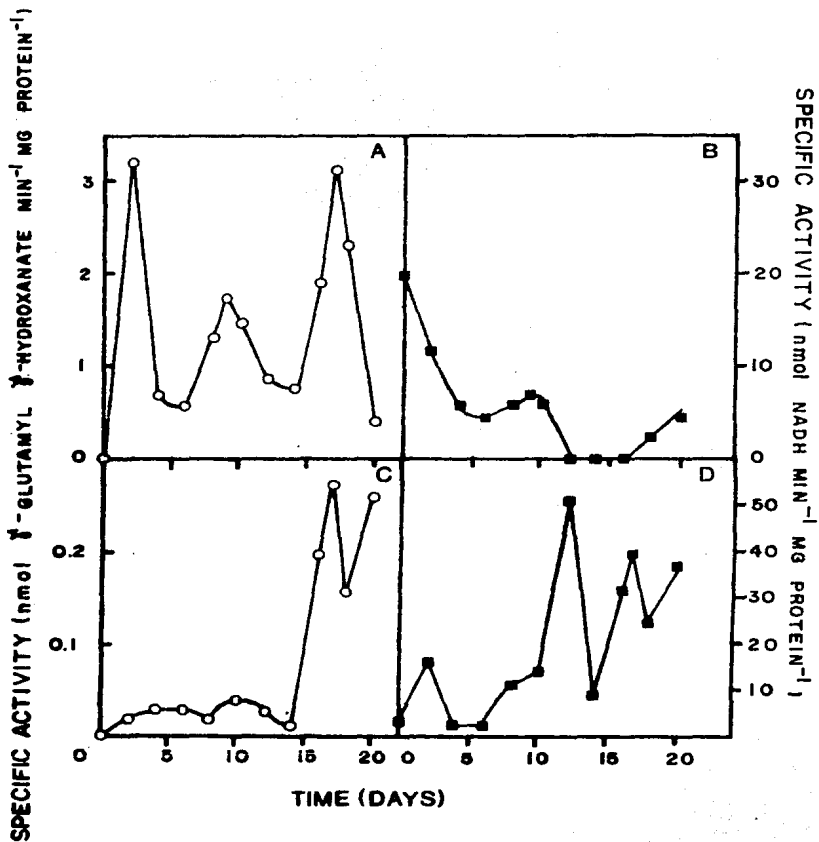


Figura 11. Patrones enzimáticos para la GS (○) y para la GOGAT (■). Paneles A y B: callos blancos y paneles C y D: callos verdes.



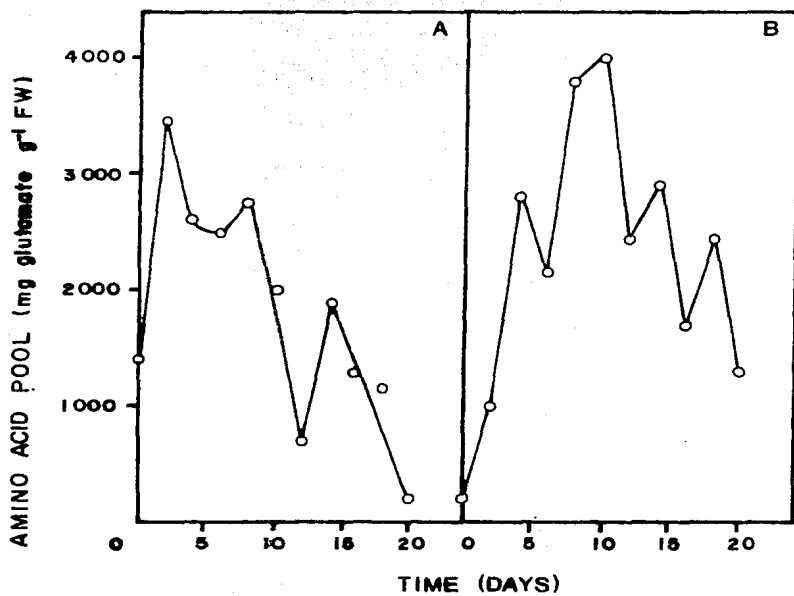


Figura 12. Poca de aminoácidos durante el ciclo de cultivo de callos blancos ( A ) y verdes ( B ).

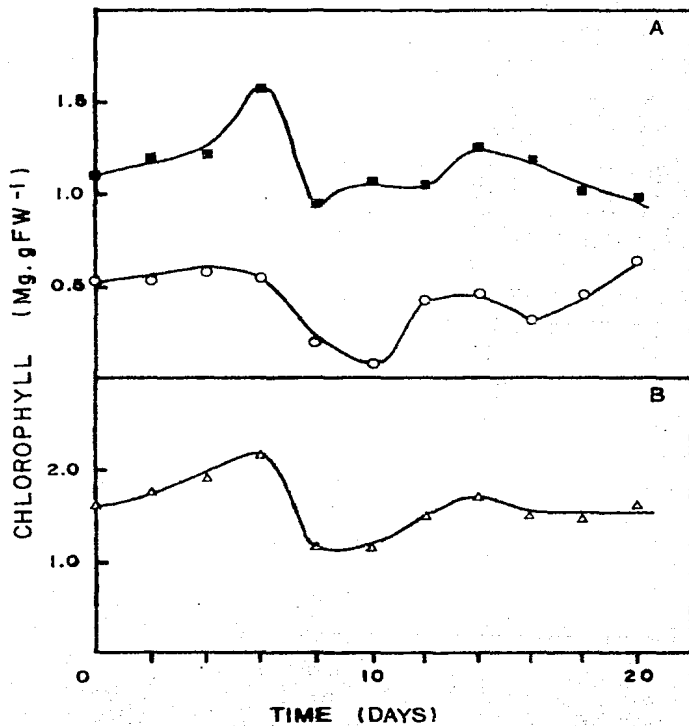


Figura 13. Contenido de clorofila en callos verdes de *C. roseus*. Clorofila a (○), clorofila b (■) y clorofila total (△).

ALCALOIDES EN CTV DE  
*Catharanthus roseus*

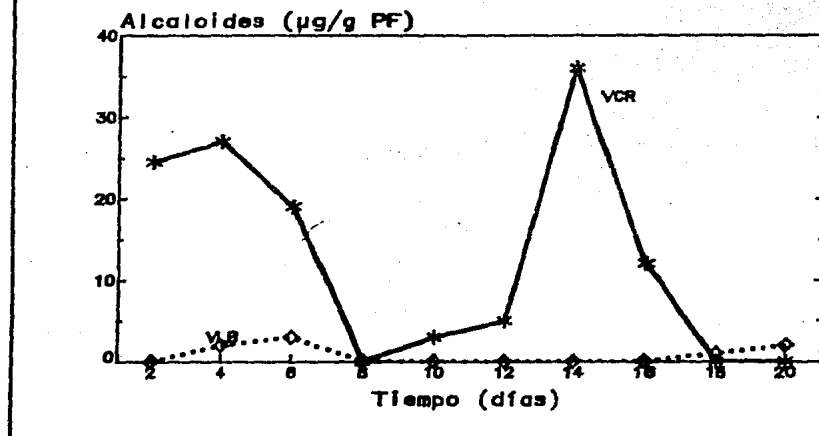


Figura 14. Patrón de alcaloides a lo largo de la curva de crecimiento de callos blancos de *C. roseus*. Los alcaloides se extrajeron con metanol (12 h) y con cloroformo (12 h), en un soxhlet. Los extractos obtenidos a partir de metanol y cloroformo fueron disueltos en 500 µl de disolvente. Las muestras fueron analizadas por un HPLC en un cromatógrafo Varian 5060. La elución se llevó a cabo a 30°C con un gradiente ternario A:agua/metanol 90:10; B = metanol; C = 0.1 M SDS en 0.02 M de buffer de fosfatos pH 5.3, a partir de una proporción A/B/C = 47:48:5 en el tiempo cero a una proporción A/B/C = 0:95:5 a los 33 minutos. La detección fue hecha con un detector Varian UV 2050 a 254 nm. VLB (◇) y VCR (\*).

## CONCLUSIONES

La presencia de los picos de actividad enzimática durante el ciclo de cultivo no es nuevo, ya que se ha encontrado en maíz el mismo fenómeno (Loyola Vargas y Sánchez de Jiménez, 1986), y existe una abundante literatura al respecto.

Sin embargo, la función de estas actividades enzimáticas aún está lejos de ser clara.

Los datos mostrados en el presente trabajo, sugieren que puede existir una conexión entre los picos de actividad de GDH, GS, los aminoácidos y la síntesis de los alcaloides, ya que si se observan las gráficas respectivas, los picos de máxima actividad en cada uno aparecen casi simultáneamente.

Esta potencialidad del CTV para producir metabolitos secundarios deberá explorarse a fondo, especialmente la posibilidad enunciada en el párrafo anterior, de que la vía inicial de asimilación del nitrógeno pueda determinar su destino hacia una poza de aminoácidos predeterminada lo cual deberá seguramente influir en la composición de alcaloides de los CTV de C. roseus.

Para probar si la hipótesis enunciada es correcta deberán utilizarse, tanto fuentes nitrogenadas diferentes como

**inhibidores específicos de las diferentes enzimas del metabolismo nitrogenado durante el crecimiento de cultivos.**

### APENDICE

1. Medio basal de Murashige y Skoog (1962; medio MS modificado).

Compuesto	Fórmula	Concentración mg/l
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44000
Nitrato de potasio	$\text{KNO}_3$	19000
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16480
Yoduro de potasio	$\text{KI}$	83
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5
Fosfato monobásico de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17000
Acido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	620
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37000
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1700
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Sulfato de fierro	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5570
EDTA	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	7450
Glicina		200
Piridoxina		50
Acido nicotínico		50
Tiamina		1000
M-inositol		10000
Agar		8000
Sacarosa		20000

pH = 5.6

2) Soluciones concentradas para la obtención del medio M.S.

Soluciones	Compuestos que intervienen	Concentración g/l
A	Cloruro de calcio	44.00
B	Nitrato de potasio	19.00
	Sulfato de amonio	16.48
C	Yoduro de potasio	0.083
	Cloruro de cobalto	0.0025
D	Fosfato monobásico de potasio	117.00
	Acido bórico	0.62
	Molibdato de sodio	0.025
E	Sulfato de magnesio	37.00
	Sulfato de manganeso	1.70
	Sulfato de cobre	0.025
	Sulfato de zinc	0.0086
F	Sulfato de fierro	5.57
	EDTA	7.45
V	Glicina	0.20
	Piridoxina	0.05
	Acido nicotínico	0.05
	Tiamina	1.0
	M-inositol	10.00

3) Cantidad adecuada de las soluciones para hacer un litro de medio M.S.

Soluciones	ml/l
A	10
B	10
C	10
D	10
E	10
F	5
V	10

Fitorreguladores

pH = 5.6

Sacarosa ..... 20 g/l

Agar ..... 8 g/l

Nota:

En la solución V (vitaminas) la tiamina esta diez veces más concentrada que en el medio original de M.S. y la fuente de nitrógeno es 26 mM modificando al medio M.S. original.



## BIBLIOGRAFIA

- Alenkhina, N.D. and Kenzheabeava, S.J. (1977) Investigation of glutamine synthetase activity in plant roots in connection with the cultivation temperature. Soviet Plant Physiol. 6: 910-914.
- Barrat, D.H.P. (1980) Method for the detection of glutamine synthetase activity on starch gels. Plant Sci. Lett. 18: 249-255.
- Barrat, D.H.P. (1981) Identification of multiple forms of glutamine synthetase in field bean (*Vicia faba* L.). Plant Sci. Lett. 20: 273-279.
- Beevers, L. and Storey, R. (1976) Glutamate synthetase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. Plant Physiology 57: 882-886.
- Brunetti, N. and Hageman, H. (1976) Comparison of *in vivo* and *in vitro* assays of nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Plant Physiol. 58: 583-587.
- Canvin, D.T. and Atkins, C.A. (1974) Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves: effect of light, carbon dioxide and oxygen. Planta 116: 207-224.
- Cocking, E.C. and Yenm, E.W. (1954) Estimation of aminoacids by ninhydrin. Biochem J. 58: XII.
- Döller, G. (1978) Production of natural compounds of cell culture methods, A.W. Alfermann and E. Reinhard, eds., Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung M.B.H., München, p. 109.
- Farnsworth, R.N. (1961) The Pharmacognosy of the periwinkles: Vinca and Catharanthus. Lloydia 24: 105-138.
- Gamborg, O.L. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151.
- Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A. and Vasil, I.K. (1976) Plant tissue culture media. In vitro 12: 473-478.

Gamborg, O.L. and Shyluk, J.P. (1981) In Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture, T.A. Thorpe, ed., Academic Press, N.Y., p. 21.

Gamborg, O.L. and Wetter (1975) Plant Tissue Methods, Saskatoon, Canada, National Research Council, Canada.

Givan, C.V. (1975) Light-dependent synthesis of glutamine. Biochem in pea chloroplast preparations. *Planta* 122: 281-291.

Hahlbrock, K., Knobloch, K.H., Kreuzaler, F., Potts, J.R.M. and Wellmann E. (1976) *Eur. J. Biochem.* 61: 199.

Hajime, M. (1979) Purification and properties of strictosidine synthetase from Catharanthus roseus cultured cells. *Biochem.* 18: 3760-3763.

Harel, E., Lea, P.J. and Mifflin, B.J. (1977) The localization of enzymes of nitrogen assimilation in maize leaves and their activities during greening. *Planta* 134: 195-200.

Haystead, A. (1973) Glutamine synthetase in the chloroplasts of Vicia faba. *Planta* 11: 271-272.

Hemscheidt, T. and Zenk, M.H. (1979) *Eur. J. Biochem.* 101: 225-227.

Hirel, B. and Gadal, P.I. (1980) Glutamine synthetase from rice. *Plant Physiol.* 66: 619-623.

Huang, L.C. and Murashige, T. (1977) Plant tissue culture media: major constituents, their preparation and some applications. *Tissue Culture Assoc. Man.* 3: 539.

Joy, K.W. (1973) Control of glutamate dehydrogenase from Pisum sativum roots. *Phytochem.* 12: 1031-1040.

Kanamori, T. and Matsumoto H. (1972) Glutamine synthetase from rice plant roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 404-412.

Kaplan A. (1965). Urea nitrogen and urinary ammonia. Standard methods, *Clin. Chem.*, 5: 245-256.

Knobloch, K.H., Hansen, B. and Berlin J. (1981) Medium induced formation of indole alkaloids and concomitant changes. *Z. Naturforsch.* 379: 347-349.

Knobloch, K.H. and Berlin J. (1980) *Z. Naturforsch.* 350: 551-555.

Kretovich, L.W., Eustigneiva, G.Z. and Dzhokharidze, Z. (1981) Two forms of glutamine synthetase in leaves of Cucurbita pepo. *Phytochem.* 20: 625-629.

Kunkel, L.O. (1941) Heat cure of aster yelloques in periwinkles. *Am. J. Bot.* 28: 761-769.

Kurz, K.B., Chatson, F., Costabel, J.P., Kutney, K.L., Stuart, S.K., Sleigh. (1980) Alkaloid production in C. roseus cell cultures. *Helv. Chim. Acta* 63: 1981-1983.

Kurz, K.B., Chatson, F., Costabel, J.P., Kutney, K.L., Stuart, S.K., Sleigh (1981) Alkaloid production in Catharanthus roseus cell cultures VIII. *Planta médica* 42: 22-31.

Kutney, J.P., Choid S.L. and Stuart K.L. (1981). Alkaloid production in C. roseus cell cultures V. Alkaloids from the 176 G, 229 V, 340 V and 951 G cell lines. *Natural Products*, vol. 4, No. 5: 536-540.

Loyola-Vargas, V.M., Sánchez de Jiménez, E. and Murillo, E. (1981) El metabolismo del nitrógeno en las plantas. *Naturaleza* 2: 112.

Loyola-Vargas, V.M. (1983) La fijación del nitrógeno. *Boletín de Educación Bioquímica* 2: 16-23.

Loyola-Vargas, V.M. (1984) Metabolismo nitrogenado en maíz. Tesis de Doctorado. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

Loyola-Vargas, V.M. (1984) En: Cuadernos de Posgrado, V.M. Loyola-Vargas, ed., DEPE, Fac. Química, UNAM.

Loyola-Vargas, V.M. (1984) Obtención de productos secundarios de interés farmacológico a partir de cultivos de tejidos. Consideraciones generales y proposición de un modelo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 14: 26-30.

Mifflin, B.J. and Lea, P.J. (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochem.* 15: 873-885.

Murashige, T. and Skoog, F.A. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473.

Naven, W. and Hartmann, T. (1980) Glutamate dehydrogenase from Pisum sativum L. Localization of the multiple forms of glutamate formation in isolated mitochondria. *Planta* 158: 7-16.

Nicholas, D.J., and Nason, A.C. (1971). Determination of nitrate and nitrite. *Methods of Enzymology* 23: 491-503.

Oaks, A., Jones, K. and Misra, S. (1980) A comparison of glutamate synthetase obtained from maize roots. *Planta* 148: 477-484.

- Oaks, A., Stulen, I., Jones, K. and Misra, S. (1980) Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. *Plant Physiol.* 63: 793-795.
- O'Neal, D. and Joy, K.W. (1973) Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization and pH optima. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 113-122.
- O'Neal, D. and Joy, K.W. (1974) Glutamine synthetase of pea leaves. *Plant Physiol.* 54: 773-779.
- Radin, J. (1975) Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants. *Plant Physiol.* 55: 178-182.
- Rathman, C.K.M. and Edwards, G.E. (1976) Distribution of nitrate-assimilating enzymes between mesophyll protoplasts and bundle sheath cells in leaves of three groups of C<sub>4</sub> plants. *Plant Physiol.* 57: 881-885.
- Rhodes, D., Rendon, F.A. and Stewart, G.R. (1976) The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor*. *Planta* 129: 203-210.
- Roberts, L.H. and Dodds, J.H. (1982) Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, p. 1-65.
- Roller V. (1978). In Production of Natural Compounds by cell culture *Methods GFSU, Munich* p. 95-108.
- Scott, D.B. and Neyra, C.A. (1979) Glutamine synthetase and nitrate assimilation in sorghum (*Sorghum vulgare*) leaves. *Can. J. Bot.* 57: 754-758.
- Seabrook, J.E.A., Cumming, B.G. and Dionne, L.A. (1976) The *in vitro* induction of adventitious shoot and root apexes *Narcissus* cultivar tissue. *Can. J. Bot.* 54: 814.
- Smith, F.W. and Thompson, J.F. (1971) Regulation of nitrate reductase in excised barley roots. *Plant Physiol.* 48: 219-223.
- Staba, J.E. (1980) Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
- Stearn, T.W. (1966) *Catharanthus roseus*. The correct name for the Madagascar periwinkle. *Lloydia* 29: 196-200.
- Stockigt, J. and Zenk, M.H. (1977) Isovincoiside (strictosidine): the key intermediate in the enzymatic formation of indole alkaloids. *FEBS Lett.* 79.
- Storey, R. and Reporter, M. (1978) Aminoacid metabolism in developing soybeans: glutamate synthase in the cotyledons.

Can. J. Bot. 56: 1349-1356.

Stuart, K.L. and Honda, T. (1978) Studies on the biosynthesis of bisindole alkaloids. The final stage in biosynthesis of vinblastine, leurosine and catharine. *Heterocycles* 9: 1391-1395.

Tabata, M. (1977) Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*, B.W. Reinhard, ed., Springer-Verlag, Berlin.

Takanashi, Y. and Farhashi, K. (1983). Properties of glutamate dehydrogenase purified from green tobacco callus tissue. *Plant Cell Physiol.* 21: 1067-1075.

Taylor, W.I. and Farnsworth, N.R. (1973) The Catharanthus alkaloids of *Vinca rosea*. *Botany, Chemistry and Pharmacology*, Marcel Becher, N.Y.

Treimer, J.F. and Zenk, M.H. (1979) *Eur. J. Biochem.* 101: 225-227.

Vanner, J.E. (1960) The optical specificity of glutamine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* 90: 7-11.

Waller, G.R. and Deimer, D.E. (1981) Enzymology of alkaloid metabolism in plants and microorganisms. In: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 7, Academic Press, N.Y. pp. 371-381.

Wallsgrave, R.M., Lea, P.J. and Mifflin, B.J. (1977) Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiol.* 65: 232-236.

Wallsgrave, R.M., Lea, P.J. and Mifflin, B.J. (1982) The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxine-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta* 154: 473-476.

Yamasaky, K. and Suzuki, Y. (1969) Some properties of glutamate dehydrogenase from pea seedlings. *Phytochem.* 8: 963-969.

Yue, S.B. (1969) Isoenzymes of glutamate dehydrogenase in plants. *Plant Physiol.* 44: 433-437.

Zeleneva, I.V. and Khavkina, E.E. (1980) Rearrangement of enzyme patterns in maize callus and suspension cultures. *Planta* 148: 105-115.

Zenk, M.H., Husso, H.P. and Kanfan, C. (1977) Cathenamine. *J.C.S. Chem. Comm.* 164.

Zenk, M.H., El-Shagi, H., Arens, J., Stockigt, E.W., Weiler

and B. Deus. Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applications. W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk eds., Springer-Verlag, Berlin. p. 27.