UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD AUXINICA DE ALGUNAS PENICILINAS EN CULTIVO IN VITRO DE BOUVARDIA TERNIFOLIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

MARTHA ROBLES FLORES

MEXICO D.F., 1985

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

I N D I C E

I.-ANTECEDENTES Y OBJETIVO

II.-INTRODUCCION

2.1 Cultivo de tejidos y requerimientos hormonales

2.2 Reguladores de crecimiento

2.2.1 Auxinas

2.2.1.1 Características

2.2.1.2 Efectos de la auxina sobre el metabolismo de ácidos nucleicos y proteínas

2.2.1.3 Modelos de acción de las auxinas

2.2.2 Citocininas

2.3 Antibióticos

2.3.1 Antecedentes de su relación con plantas

2.3.2 Penicilinas: estructura química e hidrólisis enzimática.

III.-MATERIALES Y METODOS

3.1 Material biológico

3.2 Equipo

3.3 Reactivos

3.4 Obtención y mantenimiento de cultivos *in vitro* de *B. ternifolia*

3.5 Parámetros de crecimiento

3.6 Degradación de las penicilinas en el medio de cultivo.

3.6.1 Ensayo microbiológico

3.6.2 Curva de crecimiento - pH de cultivo en suspensión de *B. ternifolia*.

3.7 Determinación de la actividad de penicilina amidasa *in vitro*.

3.8 Determinación de actividad de penicilina amidasa *in vivo*.

3.9 Determinación de actividad de penicilina amidasa en protoplastos y en extractos celulares.

3.9.1 Medición con protoplastos

3.9.2 Medición con extracto celular

3.9.2.1 Pre-purificación de penicilina amidasa con sulfato de amonio.

3.9.2.2 Determinación de proteínas.

3.10 Determinación de actividad de penicilina amidasa por identificación de 6-APA en cromatografía en placa fina.

IV.-RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Cinética de crecimiento de Bouvardia ternifolia

4.2 Crecimiento de cultivos de B.ternifolia en medios suplementados con carbenicilina.

4.3 Efecto del ácido 6-APA y de varias penicilinas en cultivos de B. ternifolia.

4.4 Degradación de las penicilinas en el medio de cultivo.

4.5 Determinación de actividad de penicilina amidasa in vivo

4.6 Determinación de actividad de penicilina amidasa in vitro y utilizando la técnica empleada para E. coli

4.7 Determinación de actividad de penicilina amidasa en protoplastos y en extractos celulares.

4.8 Determinación de actividad de penicilina amidasa con proteína total.

4.9 Determinación de actividad de penicilina amidasa in vitro utilizando la técnica modificada para B. ternifolia.

4.10 Determinación de actividad de penicilina amidasa por identificación de 6-APA en cromatografía en placa fina.

4.11 Efecto del ácido fenil acético en el crecimiento de cultivos de B. ternifolia

4.12 Discusión final.

V.-CONCLUSIONES

VI...-APENDICE

VII.-BIBLIOGRAFIA.

I.- ANTECEDENTES Y OBJETIVO

I.- ANTECEDENTES Y OBJETIVO

El tumor de agalla o "crown gall" es una enfermedad neoplásica de las plantas dicotiledóneas y de algunas monocotiledóneas, causada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Las células de las plantas infectadas son transformadas genéticamente mediante la integración de un fragmento de DNA bacteriano a su genoma. Esta transformación las convierte en células tumorales que presentan nuevas características tales como la síntesis de aminoácidos raros denominados opinas y prototrofía con auxinas y citocininas.

Al cultivar los tumores *in vitro* es necesario eliminar la bacteria del medio de cultivo para lo cual la penicilina semisintética carbenicilina ha sido ampliamente usada. Este antibiótico, sin embargo, produjo resultados confusos en los medios carentes de auxinas y citocininas empleados para cultivar células de *Bouvardia ternifolia* transformadas con *A. tumefaciens* ya que los cultivos celulares usados como control, que nunca habían estado en contacto con la bacteria, presentaron también un crecimiento acelerado en presencia del antibiótico.

Los reguladores de crecimiento tales como las auxinas y las citocininas son indispensables para inducir la división en células vegetales en cultivo. Esto hizo suponer que la carbenicilina tenía un efecto de tipo auxínico sobre las células de *Bouvardia ternifolia* por lo que se decidió investigar los siguientes puntos:

a) Determinar si la carbenicilina tiene actividad auxínica en los cultivos de *Bouvardia ternifolia*.

b) ¿Qué otras penicilinas producen este efecto?

c) ¿A qué se debe este efecto?

En el presente trabajo, se describen los experimentos diseñados para tratar de responder a estas preguntas, así como los resultados obtenidos, con la discusión de los mismos.

II.- INTRODUCCION

II.- INTRODUCCION

2.1 Cultivo de tejidos y requerimientos hormonales.

En la actualidad, la técnica del cultivo de tejidos proporciona una valiosa herramienta en la investigación en fisiología, bioquímica, genética, fitomejoramiento, fisiopatología, organogénesis y morfogénesis vegetales. Esto ha sido el resultado del desarrollo, cada vez más intenso, de técnicas altamente especializadas para el cultivo de células aisladas, células en suspensión y protoplastos.

Fué Haberlandt, en 1902, el primer botánico que se dió cuenta del significado y la importancia de la totipotencialidad de las células vegetales aisladas. Sin embargo, sus intentos por cultivar células vegetales tropezaron con grandes dificultades tales como la contaminación, la selección de medios de cultivo apropiados y de un material vegetal adecuado, y en general carecieron de las condiciones para lograr un crecimiento con éxito de los tejidos. Sin embargo, a partir de 1938, cuando se cultivaron por primera vez los tejidos tumorales de un híbrido de tabaco y callos de zanahoria, siguieron una serie de éxitos en el desarrollo de medios y de metodologías para el cultivo de callos y órganos de muchas especies vegetales.

Los cultivos de callo se pueden definir como de tejidos que proliferan continuamente de una manera desorganizada so

bre un medio semisólido que origina una masa amorfa de células. Dentro de esta definición entran varios tipos morfológicos que varían de acuerdo a la apariencia exterior, textura y composición celular. Esta diversidad celular varía a su vez de acuerdo con factores tales como origen, edad de los cultivos y composición del medio.

Los cultivos en suspensión consisten de mezclas de agregados celulares, paquetes celulares y células aisladas que se desarrollan en un medio líquido con agitación. La velocidad de crecimiento de tales cultivos es generalmente más alta que la de aquellos que crecen sobre agar, y la técnica permite así mismo un mejor control de las condiciones de crecimiento, ya que la mayoría de las células se encuentran en un medio más homogéneo, y por esta razón, el material celular puede ser fisiológicamente más uniforme. (Fig.2.1).

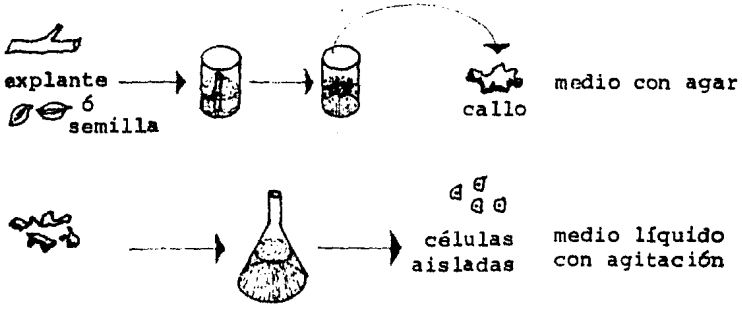


Fig.2.1 Diagrama sobre el procedimiento para iniciar cultivos en suspensión y callos (Torrey, 1967)

Al cultivar células, órganos, o tejidos vegetales *in vitro*, debe proveérseles con una serie de elementos esenciales para su crecimiento. No existe un medio único para cultivar todos los diferentes tipos de células, tejidos u órganos, ya que los requerimientos metabólicos son diferentes en cada tejido. Asimismo las condiciones para el crecimiento cambian frecuentemente durante el mantenimiento de un cultivo. Los cambios son más frecuentes en células que han sido cultivadas por largos períodos de tiempo, se requieren alteraciones en las concentraciones de factores de crecimiento en el medio. El medio de cultivo más adecuado para cada tipo celular debe, por lo tanto, determinarse empíricamente.

Un medio de cultivo debe, sin embargo, contener un mínimo de nutrientes y factores de crecimiento esenciales. Los macroelementos inorgánicos más importantes son N, P, S, K, Ca, Na, Mg y Cl. Los microelementos son I, B, Mo, Co, Mn, Cu, Zn y Fe. El carbono se adiciona en forma de azúcar como sacarosa, pues las células verdes se convierten en heterótrofas cuando se cultivan *in vitro*. Entre las sustancias orgánicas que debe llevar un medio están las vitaminas tales como el inositol, el ácido nicotínico, la tiamina, la piridoxina, algunos aminoácidos como la cisteína y la glicina; puede también adicionarse hidrolizado de caseína y extracto de levadura para enriquecer los medios aunque en estos casos no se conocerá la composición exacta del medio.

Los reguladores de crecimiento son necesarios para inducir la división celular, por lo que su adición al medio de cultivo es esencial para mantener el crecimiento. La mayoría de los cultivos requieren de una auxina, una citocinina o ambas, y algunas veces se necesita la adición de una giberelina. Las auxinas más frecuentemente usadas son los ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y naftalenacético (NAA) los cuales se emplean a concentraciones molares de 10^{-7} a 10^{-5} M. El ácido indolacético (AIA) también induce división celular, pero es sumamente inestable y es degradado por enzimas liberadas al medio por las células, mientras que el 2,4-D y el NAA, son degradados muy lentamente por las células vegetales y además, son estables a la esterilización por autoclave.

Las citocininas más usadas son la kinetina (6 furfuril aminopurina), 6-BAP (6-bencilamino-purina) y la Zeatina (6-(4-hidroxi-3metil-trans-2-butenilamino) purina). El balance de las hormonas requerido para inducir y mantener el crecimiento, depende del balance de los reguladores endógenos presentes en el órgano o tejido al momento de tomarlo de la planta.

Una vez que se ha inducido un cultivo de células vegetales a partir de explantes es decir, de pequeños segmentos de planta o de semillas, los callos obtenidos pueden ser resembrados en medio con agar o pueden ser tranferidos a un medio líquido con agitación. La suspensión de células puede propagarse transfiriendo una alícuota del cultivo a medio fresco.

El crecimiento de células en cultivo se puede determinar por varios métodos como son: número de células por cultivo; peso fresco total, peso seco total, volumen del paquete celular empacado (PCV), cantidad de proteína, cantidad de ADN ó índice mitótico. La curva que típicamente describe el cambio de tamaño de un organismo, órgano, tejido o población celular que crece es de forma sigmoidal, y muestra, en el caso de los cultivos celulares, 4 fases características (Fig.2.2). Después de la primera inoculación se presenta una fase "lag" en donde las células se preparan a dividirse; posteriormente las células entran en una fase exponencial de crecimiento en donde su velocidad de división es máxima, la cual es seguida de una fase de crecimiento lineal. Finalmente, la división celular disminuye durante una fase de desaceleración progresiva seguida de una fase estacionaria en donde el número de células se mantiene más o menos constante por un período de tiempo hasta que comienza a disminuir por lisis celular.

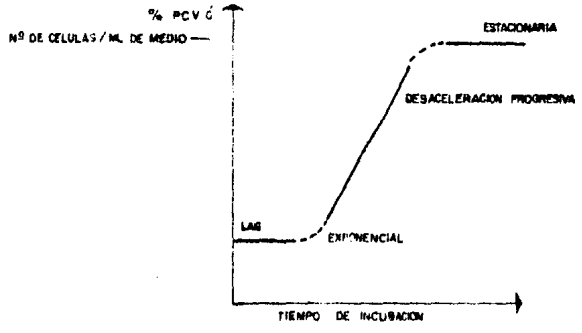


Fig.2.2. Cinética de crecimiento de un cultivo de células

2.2 Reguladores de crecimiento.

Un regulador del crecimiento vegetal puede definirse como una substancia orgánica activa en pequeñas cantidades ($<$ 1 mM, frecuentemente $<$ 1 μM) el cual es sintetizado en alguna parte de la planta, y translocado a otros sitios en los que provoca respuestas bioquímicas que incluyen cambios fisiológicos y/o morfológicos específicos. "Un regulador de crecimiento es un compuesto orgánico que en bajas concentraciones ($<$ 1 mM), promueve, inhibe o cualitativamente modifica el crecimiento y el desarrollo" (45). Existe también un sinnúmero de substancias orgánicas sintéticas que presentan estos efectos y que son empleadas como herbicidas, retardantes del crecimiento, etc.

Los inhibidores del crecimiento son compuestos que retardan el crecimiento sin producir estimulación a ninguna concentración.

Existen cinco grupos de reguladores: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abcísico y etileno.

2.2.1 Auxinas

2.2.1.1 Características

El término auxina fue usado por vez primera por Frits Went, quien en 1926 descubrió que un compuesto no identificado causaba el encurvamiento de los coleoptilos de avena hacia la luz. La auxina de Went se conoce ahora como ácido indolático (AIA) y representa, para muchos expertos, la única verdadera auxina natural. Sin embargo, se han hecho demostraciones ocasionales de que las plantas contienen otros compuestos que producen respues

tas similares a las del AIA y que tal vez debieran ser consideradas como auxinas.

El ácido fenilacético, está ampliamente distribuido entre las plantas, frecuentemente es más abundante que el AIA, aunque su actividad de auxina es mucho menor; sin embargo, se conoce muy poco de las características de su transporte y de su función natural como auxina.

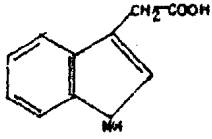
Existen muchos compuestos sintéticos que pueden ser llamados auxinas puesto que exhiben una acción fisiológica similar a la del AIA. Todos estos compuestos, aunque son químicamente muy diversos, poseen las siguientes características estructurales: un anillo aromático y un grupo carboxilo, que son esenciales para tener actividad de auxina Por conveniencia, estos compuestos se han dividido en cinco grupos principales: ácidos indólicos, ácidos naftalénicos, ácidos clorofexónicos, ácidos-benzoicos y derivados del ácido picolínico. (Fig.2.3).

TABLA I.- Efectos de auxinas (Salisbury & Ross, 1978; Moore, 1979)

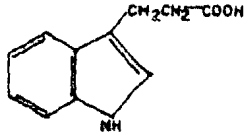
- Alargamiento celular en tallo a concentraciones cercanas a 10^{-3} M. Con altas concentraciones se deprime este alargamiento y según la concentración, puede actuar como herbicida.
- Estimulación del alargamiento celular en las raíces a concentraciones de 10^{-7} a 10^{-13} M, pero a concentraciones mayores, produce inhibición del crecimiento de éstas.
- Inhibición del desarrollo de yemas laterales.
- Estimulación de la producción de etileno

- Aumento de la actividad del cambium vascular en tallos.
- Conversión de procambium en cambium en las raíces.
- Estimulación del desarrollo de raíces adventicias en tallos.
- Fototropismo positivo de tallos y coleoptilos como resultado de la migración de la auxina a la región sombreada de éstos por efecto de la luz.
- Producción de una aceleración de la respiración que repercute en un intenso metabolismo.

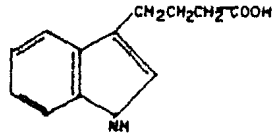
ACIDOS INDOLICOS:



Ac. Indolacético

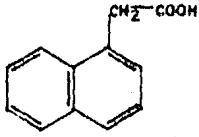


Ac. Indolpropiónico

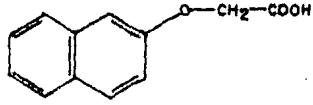


Ac. Indolbutírico

ACIDOS NAFTALENICOS:

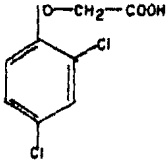


Ac. Naftalenacético

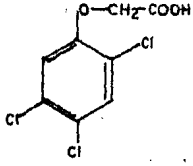


Ac. B- Naftoxiacético

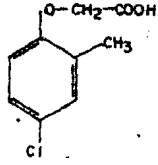
ACIDOS CLOROFENOXICOS:



Ac. 2,4- Diclorofenoxi-acético (2,4-D)

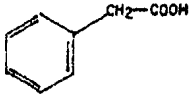


2,4,5-T

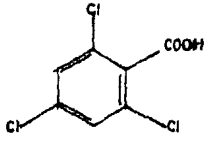


Ac. 2 metil-4 clorofenoxiacético

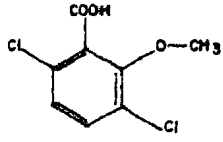
ACIDOS BENZOICOS:



Ac. fenilacético *

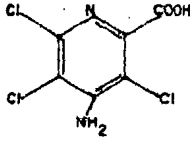


Ac. 2,4,6-Triclorobenzoico



Ac. 2-Metoxi-3,6-diclorobenzoico

ACIDOS PICOLINICOS:



Ac. 4-Amino-3,5,6-tricloropicolínico

Fig. 2.3 Ejemplos de auxinas naturales (*), sintéticas y de herbicidas tipo auxina. (Moore, 1979).

2.2.1.2 Efectos de la auxina sobre el matabolismo de los ácidos nucleicos y las proteínas.

Estudios de inducción y represión enzimática en bacterias han mostrado que la transcripción del ADN requiere de 2 a 10 minutos, y de la traducción del ARN mensajero de 1.5 a 5 minutos adicionales.

Las auxinas, sin embargo presentan un tipo de respuestas llamadas "rápidas" que ocurren a tal velocidad, que excluyen la posibilidad de que el fenómeno sea mediado por transcripción, traducción y acción de un producto génico. Algunos ejemplos de respuestas rápidas son: la circulación protoplásmica, que aparece en 2 minutos o menos, el aumento en la velocidad de respiración, y alargamiento de coleoptilos o secciones del tallo, que pueden observarse en menos de 1 minuto, después de aplicada la auxina.

No obstante, el alargamiento celular continuado requiere de la síntesis de ARN y de proteínas. La evidencia de esto se deriva de los estudios con inhibidores de dichos procesos, en los que también se inhibe el alargamiento celular, lo que indica que una de las acciones de las auxinas es la activación específica de los genes a nivel de transcripción

En las investigaciones conducidas por Matthysse y Phillips en 1969 (41) sobre los efectos de las auxinas en la síntesis de ARN, en núcleos y cromatina aislados se encontraron evidencias de un factor proteico nuclear reque

rido como intermediario en el efecto de la auxina sobre la síntesis de ARN. En presencia de este mediador o receptor hormonal, la auxina incrementaba la velocidad de síntesis de ARN en ambos sistemas; este aumento en la síntesis de ARN ocurría también en presencia de cantidades saturantes de polimerasa. Matthysse y Phillips concluyeron que la auxina interactúa con una proteína receptora con la que forma un complejo, que a su vez interactúa con la cromatina y causa un aumento en el molde de ADN disponible para la transcripción (45).

2.2.1.3 Modelos de acción de las auxinas.

Una de las funciones auxínicas que más se ha investigado es la inducción del alargamiento celular. Las auxinas se requieren específicamente para ablandar la pared celular, pero no para el alargamiento celular en sí.

Peter Albersheim y colaboradores (32) formularon la siguiente hipótesis de la expansión celular inducida por auxina: el movimiento de las cadenas de xiloglucano a lo largo de las microfibrillas de celulosa, puede estar acompañado por un mecanismo, enzimático o no, que cataliza el rompimiento y reformación de enlaces de hidrógeno, lo que permite que se deslicen unos con respecto a otros. La velocidad a la cual los polímeros de xiloglucano se mueven a lo largo de las microfibrillas de celulosa puede aumentarse bajando la temperatura, o disminuyendo el pH, pues la alta concentración de iones hidrógeno debilitaría

la fuerza de los enlaces de H que unen a los polímeros. Además, se concibe este deslizamiento como unidireccional, puesto que los polímeros de xiloglucano están convalentemente unidos en sus extremos reductores a componentes no celulósicos de la pared. Por lo anterior, Albersheim sugiere que la auxina puede activar una bomba de iones hidrógeno en el plasmalema, que provoca en última instancia el "ablandamiento" de la pared y permite el alargamiento celular bajo la presión de turgencia de la célula.

En 1972, Hardin, y colaboradores en la Universidad de Purdue (25), propusieron que las membranas plasmáticas de células de soya, contienen un factor regulatorio que es específicamente liberado por las auxinas, el cual aumenta la actividad de la ARN polimerasa. Además, la interacción de la auxina con este receptor, estaría acompañada de una liberación de H^+ del plasmalema a la pared celular, cuyos efectos parecen estar directamente relacionados con el "ablandamiento" de la pared.

En 1977 Ray (62) encontró que existen sitios de unión con alta afinidad por las auxinas en el retículo endoplásmico rugoso de la células de los coleoptilos de maíz, y esto sugiere un modelo alternativo para explicar la acción auxínica, con el cual, la acción auxínica primaria ocurre en las membranas del RE. La combinación de la auxina con sus receptores en el RE puede inducir un transporte de protones del citoplasma a las cisternas del retículo, y los

protones contenidos allí dentro, pueden ser entonces transportados junto con proteínas de secreción contenidas en estas cisternas del RE, a la pared celular vía el sistema de Golgi. Este modelo de acción auxínica vía receptores en el RE sugiere una posible conexión entre las llamadas respuestas rápidas y a largo plazo de la hormona.

2.2.2 Citocininas:

En 1920, Haberlandt descubrió que cierto compuesto presente en los tejidos vasculares de varias plantas estimulaba la división celular. Esta fue la primera demostración de que las plantas contienen compuestos, llamados ahora citocininas, que estimulan la citocinesis.

A principios de 1950, Skoog (64) encontró que las células de secciones de médula de los tallos de tabaco, se dividían más rápidamente si se colocaba encima de ellas un pedazo de tejido vascular, corroboró así los resultados de Haberlandt. Skoog trató de identificar el factor químico de los tejidos vasculares, usando un cultivo de células de médula de tallo de tabaco como sistema de bioensayo y probando todo tipo de substancias que pudieran estimular la división celular. En 1953, Skoog y Miller encontraron un compuesto parecido a una purina en los extractos de levadura, que resultó ser muy activo. Esto llevó a investigar si el ADN tenía la capacidad de promover la citocinesis y al descubrimiento, en 1954, de que la 6-furfurilaminopurina aislada a partir de una muestra de ADN de esperma de arenque tratada en un autoclave, era muy activa

para promover la mitosis y la citocinesis de células de tabaco cultivadas *in vitro*. Esta substancia recibió el nombre de kinetina.

A partir de entonces, se han identificado en numerosas plantas, otras citocininas con estructura similar a la adenina tales como la zeatina y el ribósido de zeatina. Ninguno de estos compuestos son constituyentes del ADN ni son tampoco productos de su degradación sino que existen como citocininas libres o como bases raras en ciertos ARNt de plantas superiores.

Las citocininas existen en los ARNt, como nucleótidos (base + ribosa + fosfato). Las bases incluyen a la zeatina, isopentenil adenina, 2-metiltiozeatina y 2 metiltioisopentenil adenina.

Se ha encontrado que todas las citocininas que existen naturalmente, son derivados de la isopenteniladenina por lo que solamente aquellos compuestos de adenina sustituidos en el N de la posición 6 poseen actividad de citocinina, mientras que la cadena lateral unida a este N^6 de

la adenina puede variar considerablemente en longitud, grado de isaturación y sustituyentes.

Algunos ejemplos de citocininas son los siguientes:

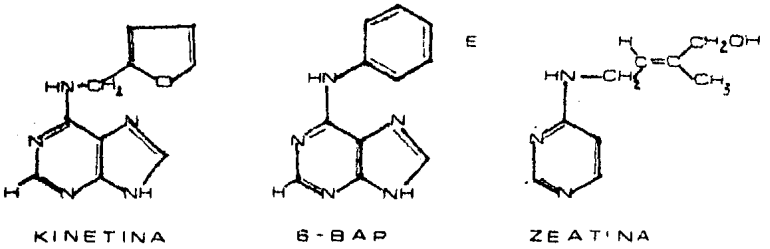
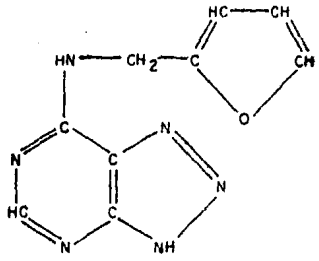


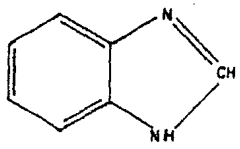
Fig.24 Ejemplos de citocininas.

Se ha reportado de que algunos compuestos no purínicos tienen actividad de citocinina y varios autores han sugerido que estos debieran ser considerados verdaderas citocininas, pero de todos ellos, sólo la N, N^1-difenilurea existe naturalmente mientras que los demás son sintéticos. La difenil urea se encuentra en el agua de coco,pero en 1968 Miller(43) mostró que la mayor actividad de citocinina en ésta se debe a la presencia de la zeatina, por lo que probablemente las llamadas urea-citocininas no sean activas como tales, sino que sirven como compuestos inductores o precursores por ejemplo como donadores de la cadena lateral, para la formación de citocininas tipo adenina N^6 sustituida. Existe también duda acerca de si el ácido 2-benztiazoliloxiacético posee realmente actividad de citocinina o la tiene de auxina.

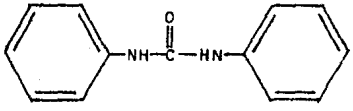
Ejemplos de estos compuestos no purínicos con actividad de citocinina son:



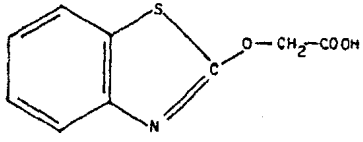
8- AZAKINETINA



BENZIMIDAZOL



N, N' - DIFENILUREA



ACIDO 2- BENZTIAZOLILOXIACETICO

Las citocininas producen efectos variables en las plantas: promueven la formación de órganos, retardan la senescencia, promueven el desarrollo de brotes laterales así como el desarrollo de cloroplastos lo que implica que ejercen diferentes mecanismos de acción en distintos tejidos. Como otras hormonas, están presentes en muy bajas concentraciones (0.01 a 1 µM), por lo que debe ocurrir una amplificación del efecto inicial.

Cuando las citocininas promueven la citocinesis, hay un aumento en el tamaño nucleolar, lo que sugiere un aumento en la síntesis del ARN ribosómico pero este efecto ocurre solamente después de varias horas y es una respuesta

secundaria. Estas hormonas podrían estimular la formación de algunas proteínas necesarias para la citocinesis pero no necesarias para la síntesis de ADN.

Existe evidencia de que las citocininas presentes en los ARNt son significativas funcionalmente y que afectan la conducta de tales moléculas de ARNt en el proceso de síntesis proteica. En 1966 Fittler y Hall (45) descubrieron que las citocininas de los ARNt presentan alta afinidad de unión con el complejo ARNr-ribosoma, por lo que parece que estas citocininas de los ARNt pueden tener un efecto modulador en las síntesis de proteínas a nivel de la transcripción lo que sugiere que el sitio primario de acción de las citocininas sería la síntesis proteica en los ribosomas que produce un cambio en los patrones enzimáticos del cual depende el crecimiento y desarrollo. Sin embargo, permanece sin responder la pregunta de si esta acción observada en las citocininas presentes en los ARNt está relacionada directamente o indirectamente con la acción hormonal de las citocininas libres.

2.3 Antibióticos

2.3.1 Antecedentes de su relación con plantas.

Desde el comienzo de la era de los antibióticos, se han probado los efectos que algunos de éstos ejercen sobre el crecimiento de las plantas. En general, los efectos encontrados han sido inhibitorios. Además, pocos investiga

dores probaban concentraciones por debajo de 50 ppm y muchas preparaciones eran impuras.

Sin embargo, desde 1949 se ha reportado que ciertos antibióticos pueden estimular el crecimiento de levaduras, bacterias, hongos (11, 28, 36), protozoarios (4, 24) y plantas superiores (13, 27, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 58). En plantas superiores, el efecto estimulatorio de varios antibióticos se ha demostrado tanto en sistemas *in vivo* en siembra (48), como *in vitro*, en cultivos de tejidos. Entre las principales evidencias sobre este efecto están las siguientes:

a) En 1952, Nétien y colaboradores, mostraron que 10 ppm de dihidroestreptomicina, estimulaban el crecimiento *in vitro* de tejido de zanahoria (46). En el mismo año, Nickell, reportó en tres tipos de experimentos (cultivo *in vitro* de tejido tumoral de *Rumex acetosa*, germinación *in vitro* de semillas de *Agave toumeyana* y de maíz, y germinación *in vivo* con subsecuente crecimiento en el suelo de semillas de maíz), que la penicilina, terramicina, bacitracina y tiolutina, incrementaban notablemente el crecimiento (47)

b) En 1954, Nickell y Finlay, trabajando con cultivos *in vitro* de *Lemna minor*, reportaron que la penicilina G y la bacitracina estimulan el crecimiento, pero no explicaron por qué ocurre esto. (48).

c) En 1965, Nickell y Celmer, trataron de establecer una relación estructura-actividad de penicilinas sobre el crecimiento de cultivos *in vitro* de *Lemna minor*. Estos autores probaron algunos reguladores de crecimiento solos como 2,4-D, AIA, ANA, AFA, así como sus derivados penicilínicos (núcleo de 6-aminopenicilánico en el que la cadena lateral es el regulador en cuestión), y encontraron que solamente un 10% de todas las penicilinas probadas tienen un efecto estimulatorio del crecimiento, que el AFA por sí solo no produce crecimiento, mientras que su derivado penicilínico (penicilina G) es muy activo, y que el AIA y el ácido fenoxiacético, que por sí solos son activos, lo son mucho más en sus derivados penicilínicos (53).

Se observó además que existe una gran especificidad, pues el ácido 6-trans-esterilmercaptoacetamido penicilánico es mucho más activo que su isómero cis el cual casi no ejerce un efecto en el crecimiento. La hipótesis que sugieren para explicar la acción de estas substancias es que el metabolismo hormonal puede estar afectado, o que se trata de un fenómeno en el que están involucradas anti-auxinas. (53)

d) En 1967, Zukowski, y Eckstein, observaron una dependencia entre la estructura química y la acción biológica de diversos productos de acilación del 6-APA en

los que la cadena lateral es un derivado del ácido fenoxiacético o del fenoxi-α-propiónico. Varios de estos productos, pero no el 6-APA estimularon el crecimiento de raíces de pepino y plántulas de tomate. Estos autores compararon los ácidos fenoxiacéticos y fenoxipropiónicos con sus derivados penicilínicos observando que las penicilinas derivadas de esos ácidos ejercen un estímulo de crecimiento mayor que los ácidos nativos. Como estas penicilinas son resistentes a penicilinasa, y como el anillo de penicilina (6-APA) por sí solo no tiene actividad, concluyeron que esta actividad no debe estar basada en una hidrólisis enzimática ya que ésta daría lugar a los ácidos nativos menos activos (75).

e) En 1983, Pollock y colaboradores investigando el uso de antibióticos para la eliminación de contaminantes en cultivos de células de Nicotiana plumbaginifolia, reportaron que las penicilinas y cefalosporinas no son tóxicas para protoplastos o para células derivadas de ellos, y que algunas muestran un efecto estimulatorio del crecimiento; sin embargo, concluyen que desconocen la razón por la cual ocurre esto (58).

Hasta la fecha, se han seguido investigando los efectos que ejercen diversos antibióticos tales como

la penicilina, aureofungina, oxitetraciclina, etc., reportándose influencias sobre el crecimiento, germinación y productiviad, así como estimulación de la síntesis de ácidos nucleicos, sin que haya podido aclararse cómo actúan los antibióticos sobre las plantas, y por qué ejercen tales efectos.

2.3.2 Penicilinas: estructuras química e hidrólisis enzimática.

Los antibióticos son substancias químicas producidos por varias especies de microorganismos (bacterias y hongos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos o que pueden destruirlos. Son un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista químico que difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas, farmacológicas, en su espectro antibacteriano así como en sus mecanismos de acción. Es con base en esta última característica, que se pueden clasificar en cinco grupos principales:

1. Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana.
2. Agentes que afectan la permeabilidad de la membrana celular.
3. Agentes que primariamente inhiben la síntesis proteica por sus efectos sobre los ribosomas.
4. Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos.
5. Los antimetabolitos (sulfas).

Las penicilinas pertenecen al primer grupo de esta clasi

ficación ya que inhiben específicamente la terminación de la síntesis de la pared celular bacteriana, la cual contiene un complejo "mucopéptido" que consiste de polisacáridos y de polipéptidos entrecruzados, conocido como peptidoglucano. Las penicilinas inhiben la reacción terminal de transpeptidación (entrecruzamiento) de glucopéptidos lineales, bloqueando así la síntesis del complejo mucopéptido (peptidoglicano), que ocurre fuera de la membrana celular.

Químicamente, la estructura básica de las penicilinas (Fig.2.5) consiste de un anillo de tiazolidina (A), unido a un anillo β-lactámico (B) al cual está unida una cadena lateral (R). El núcleo, conocido como ácido 6-aminopenicilánico, constituye la parte principal para la actividad biológica, aunque la cadena lateral determina también muchas de las características antibacterianas y farmacológicas de un tipo particular de penicilina. Todas las penicilinas, por lo tanto, pueden ser consideradas como N-acil derivados del núcleo común 6-APA.

Las penicilinas en general, son bastante estables en estado seco, pero una vez en solución pueden, dependiendo de las condiciones, dar lugar a diferentes productos de degradación. La degradación espontánea de las penicilinas en solución ácida consiste principalmente en un rearreglo a ácidos penílicos. En soluciones acuosas y alcalinas, la degradación resulta en la formación de ácidos

A ANILLO B-LACTAMATO

B ANILLO THIOZOLIDINA

1 SITIO DE ACCION DE LA AMIDASA

2 SITIO DE ACCION DE LA PENICILINASA O B-LACTAMASA

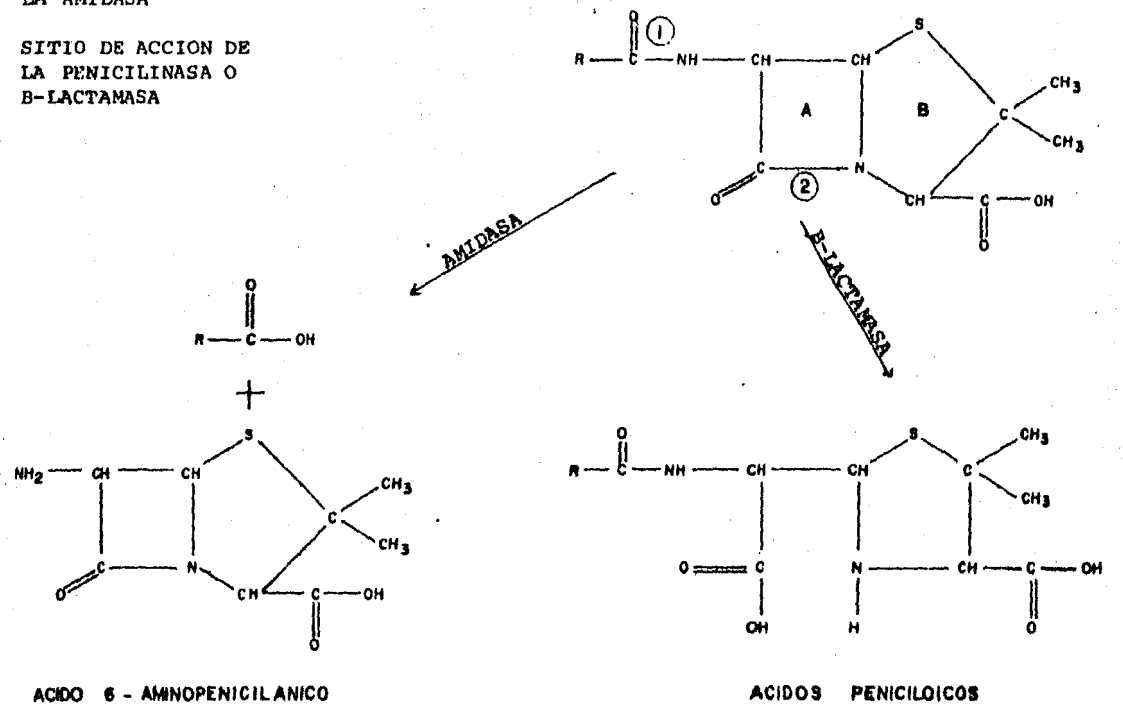


Fig.2.5 ESTRUCTURA DE LAS PENICILINAS Y PRODUCTOS DE SU HIDROLISIS ENZIMATICA.

peniciloicos, los cuales pueden descarboxilarse a ácidos peniloicos.

Según Batchelor y Cameron-Wood (2), las penicilinas se hidrolizan espontáneamente a 6-APA en un porcentaje muy bajo (0.2%), por lo que la degradación a éste es principalmente de tipo enzimática.

La actividad enzimática de la β-lactamasa (o penicilinasa) sobre el enlace β-lactámico da como resultado la formación de ácidos peniciloicos provocando la pérdida de la actividad antibacteriana. La molécula de penicilina también es hidrolizada enzimáticamente en el enlace amida liberándose la cadena lateral R unida al núcleo de ácido penicilánico. La enzima responsable de la ruptura de este enlace recibe diferentes nombres: "penicilina amidasa", "penamidasa", "penicilina-acilasa" ó "penicilina amidohidrolasa". En este trabajo emplearemos el nombre de <u>penicilina amidasa</u>.

La amidasa es una enzima de gran importancia comercial ya que el 6-APA que se produce por su acción, constituye la materia prima para la producción de penicilinas semisintéticas en escala industrial.

La desacilación de penicilinas por enzimas específicas, ha sido reportada en bacterias, mohos, levaduras, actinomicetos, y también en tejidos vegetales y animales (24). Las amidasas difieren en sus propiedades de acuerdo al organismo de procedencia, pero en general, fueron

clasificadas por Claridge y colaboradores (15) en dos clases: tipo I o fungoso y tipo II o bacteriano, según el tipo de penicilina hidrolizado preferencialmente (bencilpenicilina ó fenoximetilpenicilina).

Se ha encontrado actividad de penicilina-amidasa tipo I no sólo en bacterias, sino también en homogenados de riñón (16, 24), hígado, bazo o pulmón de ganado vacuno y de cerdos (Weitnauer, U.S. patent 3,070,511,1964). También, Alburn, Grant y Clark, en 1962 (U.S. patent 3,032,473), encontraron que preparaciones de ficina, una enzima proteolítica obtenida de árboles del género Ficus, hidroliza la fenoximetilpenicilina a 6-APA (24).

Actualmente, aunque el descubrimiento de la penicilina amidasa ha abierto las puertas a la producción de penicilinas semisintéticas, existen todavía muchas preguntas que no han sido aclaradas con respecto a su modo de acción y al papel fisiológico que juegan en los organismos que las poseen.

III.- MATERIALES Y METODOS

III.- MATERIALES Y METODOS.

3.1 Material biológico

Se utilizó como modelo biológico Bouvardia ternifolia por poseer las siguientes características (20):

- Proliferación rápida del cultivo en medio sólido, sin acumulación de productos tóxicos.
- Tiempo de doblaje celular corto (24-30 hrs.).
- Capacidad de producir protoplastos viables en cultivo.
- Callo y cultivo en suspensión con una alta viabilidad celular en el cultivo al entrar en fase estacionaria.

Se usaron cultivos en suspensión y callos de Bouvardia ternifolia obtenidos a partir de semilla y mantenidos por resiembras sucesivas durante un año.

Para los ensayos microbiológicos con antibióticos, se utilizó la bacteria Gram negativa Agrobacterium tumefaciens (ACH-5).

3.2 Equipo

- Campana de flujo laminar "Vecco"
- Plataforma de agitación rotacional (125 rpm)
- Cámara de crecimiento a 28°C con intensidad luminosa de 1000 lux
- Potenciómetro
- Centrífuga clínica
- Centrífuga Beckman modelo J-21
- Baño con agitación constante de 125 rpm y 40°C de temperatura.
- Espectrofotómetro "Zeiss"

- Colorímetro Bausch & Lomb.
- Homogenizador "Potter" de vidrio con émbolo de teflón
- Cámara de cromatografía en capa fina
- Placas de gel de sílice

3.3 Reactivos.

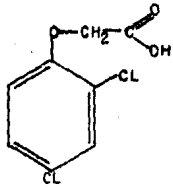
Los reactivos y las hormonas utilizadas en los medios fueron todos grado analítico obtenidos de las casas Sigma y Merck. (Figura 3.1).

Las penicilinas semisintéticas que se emplearon para este estudio, fueron proporcionadas por Quinonas de México, S. A., excepto la carbenicilina, obtenida de los Laboratorios Sanfer. Todas las penicilinas se usaron en su forma de sal de sodio o de potasio. (Figura 3.2)

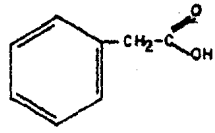
3.4 Obtención y mantenimiento de cultivos in vitro de B. ternifolia

El callo de Bouvardia, se indujo a partir de semillas (radícula) previamente esterilizadas, las cuales fueron sembradas en medio sólido Murashige Skoog suplementado con 1 mg/l de 2,4-D y 0.005 mg/l de kinetina. (Fig.2.1)

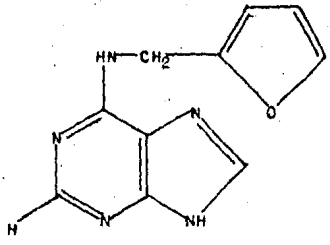
Una vez obtenido el callo, tanto los cultivos en suspensión como los callos de B. ternifolia fueron crecidos en medio basal de Murashige & Skoog (1962), cuya composición aparece en la Tabla 1 del apéndice. Este medio basal fué suplementado con 1 mg/l (4.5×10^{-6}M) de 2,4-D y con 0.05 mg/l (2.32×10^{-7}M) de Kinetina para mantener el crecimiento normal de los cultivos.



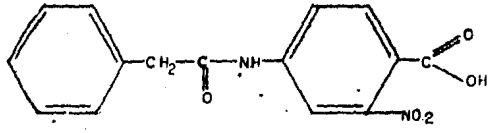
2,4-D



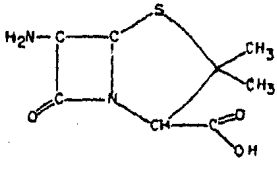
ACIDO FENILACETICO.



KINETINA

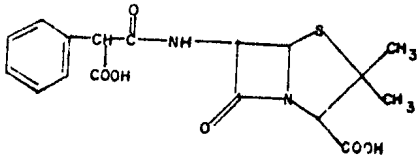


N-FENILACETIL NITROANILINA

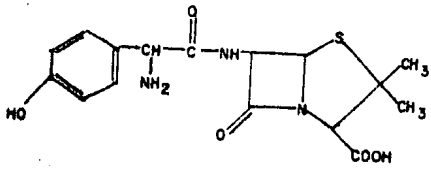


ACIDO 6-AMINOPENICILANICO

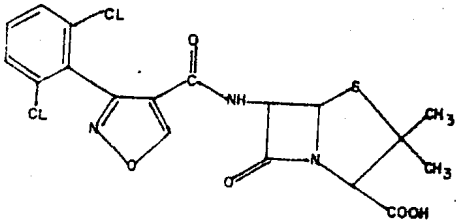
Fig. 3.1 Reguladores de crecimiento y compuestos utilizados



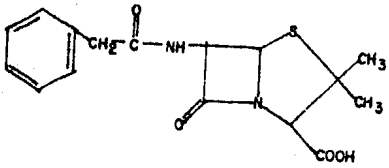
CARBENICILINA



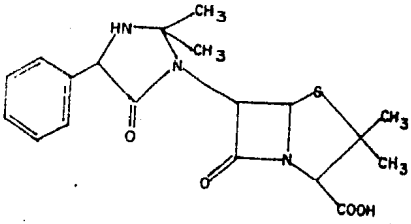
AMOXILINA



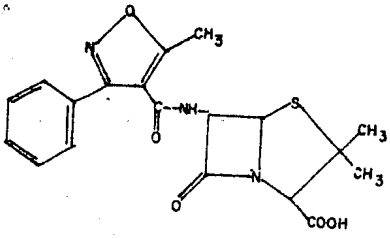
DICLOXACILINA



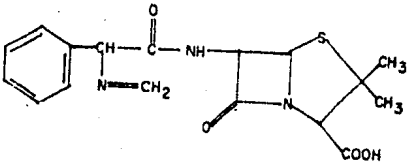
PENICILINA G



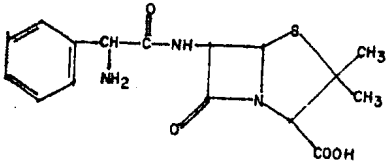
HETACILINA



OXACILINA



METAMPICILINA



AMPICILINA

Fig.3.2 Penicilinas probadas

El medio se prepara siguiendo el orden indicado en la Tabla 2 del apéndice para evitar precipitación de las sales. Las soluciones stock se añaden a un volumen de agua determinado, y con agitación constante.

Una vez que se han mezclado las soluciones, se adiciona el 2,4-D y la kinetina (que son estables a la esterilización por autoclave) y la sacarosa, y el pH se ajusta a 5.7, con NaOH ó con HCl 1.0 N. Si se requiere medio sólido (para los callos), se adiciona 1% de agar, y se esteriliza en autoclave en frascos de 100 ml de capacidad con 30 ml de medio por frasco. Para los cultivos en medio líquido (cultivos en suspensión), se distribuye en matraces de 250 ml colocando 50 ml de medio por matraz. Tanto los frascos como los matraces se tapan con papel aluminio y se esterilizan en autoclave a 120° C por 15 minutos.

Cuando el medio basal es suplementado con penicilina, en forma de sal sódica o potásica, con ácido fenilacético o con otro compuesto problema, solamente se esteriliza en autoclave el medio basal, y una vez que éste se ha enfriado (a temperatura ambiente), se le agrega la penicilina o el compuesto en cuestión, disuelta en agua desionizada, esterilizada por filtración con Millipore de 0.22 µ. Si el medio de cultivo es sólido, se deja difundir la solución estéril en el agar, antes de sembrar el tejido.

Una vez preparados los medios, se procede a sembrar el material vegetal en condiciones estériles. Para los culti-

vos en suspensión, se inoculan los matraces de 250 ml que contienen 50 ml de medio cada uno, con una alícuota de 5 ml de una suspensión de células de 10 días de incubación (2 X 10^5 células/ml); se incuban a temperatura ambiente a 125 rpm de agitación rotacional, con luz continua de aproximadamente 100 lux, durante 10 días. Mediante transferencias sucesivas, el cultivo puede manterse por períodos largos.

Para el cultivo de callos, se inocula cada frasco que contiene 30 ml de medio, con aproximadamente 1 g de peso fresco de callo de 30 días de edad. Los frascos se incuban entonces a 28° C con iluminación continua de 1000 lux y se dejan crecer durante 30 días.

3.5 Parámetros de crecimiento.

Los parámetros utilizados para medir el crecimiento fueron:

a) Peso fresco

b) Volumen celular empacado (PCV).

Para evaluar el crecimiento por aumento en el PCV en cultivos en suspensión, se inoculan matraces de 250 ml que contienen 50 ml del medio en cuestión, con una alícuota de 5 ml de suspensión celular de 10 días (lavada 3 veces y resuspendida en medio basal sin hormonas). Los matraces se incuban en las condiciones ya mencionadas. Se toman diariamente muestras de 2 ml de cada matraz, durante 14 días, recolectando cada muestra en tubo de centrífuga graduado de 15 ml; se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos para empaquetar las células, y el

resultado se reporta como porcentaje de paquete celular por volumen.

Para determinar el crecimiento por incremento en peso fresco en callos, se procede a pesar primero los frascos que contienen el medio (tapados y esterilizados) ; se inoculan entonces con 1 g de peso fresco de callo de 30 días de edad, y se vuelven a pesar. El peso fresco inicial se obtiene por la diferencia entre el peso del frasco con tejido y el peso del frasco sin tejido; los frascos se incuban a 28° C con iluminación constante de 1000 lux, durante 30 días, al término de los cuales se destapan los frascos y se pesa el callo obtenido. El resultado se expresa como incremento de peso fresco, que se obtiene por la diferencia entre el peso final menos el inicial.

Las fórmulas de los reguladores, compuestos y penicilinas empleados aparecen en las figuras 3.1 y 3.2 respectivamente.

3.6 Degradación de las penicilinas en el medio de cultivo

Para estudiar la estabilidad de las penicilinas en el medio de cultivo, se diseñaron dos experimentos:

3.6.1 Ensayo microbiológico

Consiste en detectar la presencia o ausencia de halo de inhibición de crecimiento en placas que contienen una bacteria sensible, usando la penicilina disuelta en diferente pH. Si la penicilina sufre degradación al disolverse en el medio a un determinado pH, no debe presentarse halo de inhibición, pues con la degradación pierde su ac

tividad biológica, permitiendo el crecimiento de la bacteria.

Se usó carbenicilina, a la que es sensible Agrobacterium tumefaciens. Las placas se preparan de la siguiente manera:

- Se llena cada caja de Petri con 15 ml de medio estéril YEB o Luria (Tabla 4 del apéndice) con agar.
- Se pone a incubar A. Tumefaciens en medio YEB o Luria 12 horas a 25°C; se toma una alícuota de este cultivo transcurridas las 12 horas que es cuando las bacterias están en fase logarítmica, y se mezcla con otra alícuota de medio más agar estéril a 40°C. La mezcla se mantiene a una temperatura de 40 a 45°C para evitar su solidificación.
- Cada caja de Petri se inocula con 2 ml de la mezcla de bacterias + medio con agar repartiéndolo homogéneamente sobre el medio sólido.
- Una vez sembrada la bacteria se colocan sobre la superficie, tres círculos dde papel Whatman 3 MM de 10 mm de diámetro previamente esterilizados, y embebidos con 15 µl de una solución de 100 µg/ml de carbenicilina en medio M y S ajustado a diferentes pH y esterilizado por Millipore (0.22µ).

Se cierran las cajas y se ponen a incubar a 25°C durante 12 horas al término de las cuales se mide el halo de inhibición.

3.6.2 Curva de crecimiento-pH de cultivo en suspensión de B. ternifolia.

Para ello se evalúa el crecimiento por aumento en PCV en cultivos en suspensión incubados en medio basal suplementado o no con 1 mg/ml de penicilina. Se ponen además como control matraces con los mismos medios de cultivo pero sin células.

Diariamente se toman 2 ml de muestra de cada medio y se centrifuga a 2500 rpm durante 10 min. para medir el porcentaje de PCV. En el sobrenadante obtenido se mide el pH para la obtención de la curva de crecimiento contra pH del cultivo.

3.7 Determinación de la actividad de penicilina amidasa in vitro

La actividad de esta enzima se ha determinado por varios métodos: Niedermayer (1964) y Chiang y Bennett (1967) determinaron la liberación de la cadena lateral de la penicilina por medio de cromatografía de gases como una medida de la actividad de penicilina amidasa (17). Cole (1969), Sjoberg et al (1967) y Vanderhaeghe et al (1968) estimaron el 6-APA cuantitativamente por titulación de la cadena lateral ácida liberada, midiendo la liberación de protones durante el proceso de hidrólisis. Sin embargo la actividad de penicilina amidasa se demuestra más claramente por medio de la detección de su producto final de reacción, el 6-APA (4,74).

Bomstein y Evans en 1965 (5) diseñaron un ensayo específico para 6-APA que depende de la reacción del grupo amino en la posición 6 del 6-APA con el p-dimetilaminobenzaldehido (reactivo de Ehrlich) para formar una base coloreada de Schiff que se mide colorimétricamente. El cromógeno es estable solamente por un tiempo corto, por lo que el método de ensayo debe hacerse

con equipo automático. Este método es muy útil para el ensayo de la penicilina amidasa, ya que las penicilinas intactas no reaccionan para formar el cromógeno, y porque puede ser aplicado directamente a la mezcla de reacción sin que sea necesario ningún paso anterior de extracción. Sin embargo, el ensayo no es específico para el 6-APA, puesto que muchos otros compuestos con grupos amino, incluyendo los ácidos penicilóicos, pueden reaccionar y dar productos coloreados. Este método por lo tanto debe combinarse con algún otro como la cromatografía en placa fina.

La técnica usada para detectar 6-APA libre es la siguiente:

Parámetros:

Temperatura de la mezcla de reacción	40° C
pH inicial " " " " "	8.0
Buffer de fosfatos	0.03 M
Concentración de penicilina "	25 mM
Tiempo de reacción	30 min.
Longitud de onda	415 nm

- Se toma una alícuota de 10 ml de cada matraz de cultivo en suspensión de B. ternifolia.
- Se centrifuga a 2500 rpm, durante 15 min.
- Se decanta y se agrega al precipitado 1 ml de buffer. Se agrega 0.1 ml de penicilina para tener una concentración final en la reacción de 25 mM. Se deja la mezcla de reacción por espacio de 30 min. en un baño a temperatura constante (40° C) con agitación.
- Después de este tiempo, se toma una muestra de 0.2 ml y se

agregan 4.8 ml de etanol absoluto y se centrifuga a 3000 rpm por 10 min.

- Se decanta y se agregan al sobrenadante 2.5 ml del reactivo de Enhlich (PDAB). Se agita unos segundos en vórtex y se deja reposar 10 min. Se lee a 415 nm.
- El control de las células se hace tomando 0.2 ml de la mezcla de reacción (con y sin penicilina) en el momento en que se mete al baño de 40°C; se le agregan 4.8 ml de etanol, se centrifuga a 3000 rpm 10 min., se decanta y se le agregan 2.5 ml de PDAB. Se determina la DO a 415 nm.
- El blanco para ajustar a cero el colorímetro se prepara con 0.2 ml de buffer, a los que se agregan 4.8 ml de etanol, se centrifuga a 3000 rpm 10 minutos, se decanta y se le añaden 2.5 ml de reactivo PDAB.

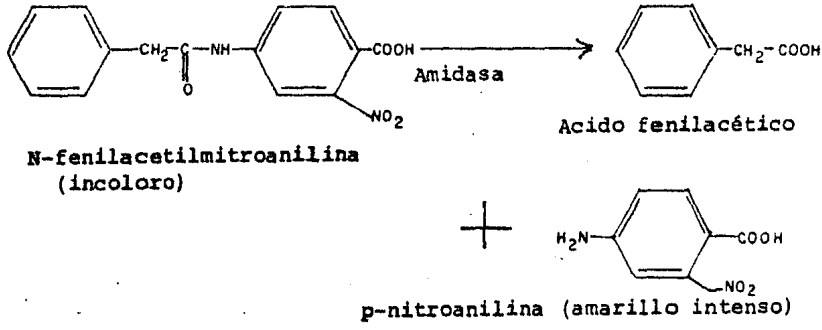
Para determinar la concentración de 6-APA correspondiente a la absorbancia obtenida, se utiliza una curva patrón de concentración contra absorbancia que es virtualmente lineal por lo menos en un intervalo de 600 a 4000 µg/ml de 6-APA por mililitro.

Las indicaciones para la preparación del reactivo de Ehrlich (PDAB) aparecen en la Tabla 5 del apéndice.

NOTA: Esta técnica, basada en estudios de actividad de penicilina amidasa de *Escherichia coli* y cuya sensibilidad es aproximadamente de 50 µg de 6APA/ml, se tomó como base para la determinación de la enzima en *B. ternifolia.*

3.8 Determinación de penicilina amidasa in vivo.

Este procedimiento de ensayo para la detección de penicilina amidasa, es un método indirecto, basado en la liberación de p-nitroanilina (compuesto que colorea intensamente de amarillo el medio de cultivo) a partir de N-fenilacetil-nitroanilina (incoloro), por acción de una amidasa según la siguiente reacción: (Dra. Carmen Giral, comunicación personal):



Para esto, se preparan tubos de cultivo conteniendo cada uno 10 ml de medio basal sin hormonas. Se hacen dos lotes, uno de tubos con medio basal M y S y otro de tubos a los que se les adiciona 1 mg/ml de N-fenilacetilnitroanilina. Posteriormente se inoculan la mitad de los tubos de cada lote, con 0.5 g de peso fresco de callo de B. ternifolia de 30 días de edad, de tal manera que se tienen controles con y sin células, y controles con y sin N-fenilacetilnitroanilina.

Se tapan todos los tubos y se incuban a 25°C con luz continua de 1000 lux por 20 días, durante los cuales se obser

va la presencia o ausencia de color amarillo en el medio de cultivo.

3.9 Medición de actividad de penicilina amidasa en protoplastos y en extractos celulares.

3.9.1 Protoplastos.

Se siembran 5 ml de células de un cultivo en suspensión de *B. ternifolia* en fase estacionaria temprana (Fig. 2.2 en matraces de 250 ml que contiene 50 ml de medio MyS sin hormonas más penicilina G, ó MyS con hormonas sin penicilina G. Se dejan crecer durante 7 días con luz continua y en agitación, después de los cuales se procede a aislar los protoplastos de la siguiente manera:

Solución enzimática:

Celulasa Onozuka R-10	2%	
Driselasa ó Pectinasa	2%	Disuelto en CPW
Manitol	13%	

Solución CPW: ajustada a pH 5.8

KNO_3	101.0	mg/l
$CaCl_2 12H_2O$	1480	"
KH_2PO_4	27.2	"
$MgSO_4 . 7H_2O$	246	"
KI	0.16	"
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025	"
Sorbitol	21%	

a) Se centrifuga la solución enzimática en la centrífuga J-21 Beckman con el rotor JA-20 a 10,000 rpm, a 4°C por 15 minutos.

b) Se filtra el sobrenadante en Millipore de 0.45 µm

c) Se incuban las células de 7 días en la solución enzimática.

d) Se cosechan los protoplastos a 100 g (590 rpm)

e) Se desecha la solución enzimática con pipeta Pasteur

f) Se hace flotar a los protoplastos en CPW con 21% de sorbitol, a 100 g (590 rpm) durante 5min.

g) Se toma la banda superior y se lleva al volumen que se desea de medio MyS con 9% de manitol.

Una vez que se han aislado los protoplastos, se mide en ellos la actividad de penicilina amidasa siguiendo la técnica descrita en el punto 3.7 de este capítulo pero con las siguientes modificaciones:

- Se toma una alícuota de 2 ml de la suspensión de protoplastos aislados a partir de los cultivos tipo I (crecidos con penicilina) o tipo II (crecidos sin penicilina pero con hormonas)
- Se le agrega directamente sin centrifugar 3 ml de buffer de fosfatos 0.03 M pH 8.0 y 0.2 ml de penicilina G
- Se pone a incubar la mezcla en un baño a temperatura constante (40°C) con agitación
- Se toman muestras (0.2 ml) a distintos tiempos, a las cuales se les agrega 4.8 ml de etanol absoluto
- Se centrifugan a 3000 rpm 10min. se decanta y al sobrenadante se le adiciona 2.5 ml del reactivo PDAB. Se agita en vórtex unos segundos.

- Se deja reposar 10 min. y se lee a 415 nm.
- Los controles se preparan con la mezcla de reacción sin poner a incubar en el baño a los que se añade inmediatamente el alcohol absoluto y el PDAB. Se preparan controles con y sin penicilina.

3.9.2 Medición con extractos celulares.

Se siembran 5 ml de células de un cultivo en suspensión de Bouvardia ternifolia en fase estacionaria temprana en matraces de 250 ml con 50 ml de medio MyS (suplementado con penicilina o con hormonas). Se deja crecer las células durante 7 días con luz continua y en agitación, después de los cuales se hace lo siguiente:

a) Se lavan las células centrifugando a 3000 rpm durante 10 min.

b) Se descarta el sobrenadante y se rompen las células con un homogenizador (a 4°C) durante 3 min a máxima velocidad.

c) Se centrifuga a 3000 rpm 10 min a 4°C para bajar restos celulares.

d) Se decanta y se obtiene el sobrenadante (citosol), en el cual se mide la actividad de penicilina amidasa siguiendo la técnica descrita en el punto 3.7 de este Capítulo.

3.9.2.1 Pre-purificación de penicilina amidasa con sulfato de amonio.

Se siguen todos los pasos descritos en el punto anterior para la obtención de un extracto, partiendo de un cultivo en fase log crecido con o sin antibiótico.

Una vez que se han eliminado los restos celulares se procede a lo siguiente:

- Se determinan proteínas en el sobrenadante por el método de Lowry y se precipita la proteína total por saturación con sulfato de amonio al 80%, usando agua caliente
- Se determina la cantidad de proteína total por Lowry. Se disuelve en una mínima cantidad de buffer de fosfatos 0.03M pH 8.0 y se pone a dializar contra este buffer toda la noche haciendo al menos dos cambios.
- Se mide la actividad de penicilina amidasa según la técnica descrita en el punto 3.7

3.9.2.2 Determinación de proteínas.

Se llevó a cabo por el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951), utilizando albúmina sérica bovina como patrón (Sigma) para hacer una curva de concentración de proteína contra absorbancia a una densidad óptica de 590 nm, la cual aparece en el apéndice.

3.10 <u>Determinación de actividad de penicilina amidasa por identificación de 6-APA en cromatografía en placa fina</u>.

Esta técnica permite separar, aislar e identificar compo

nentes de mezclas,con base en las diferencias de velocidad a la cual migran estos componentes a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil.

La separación, en este caso, basada en la adsorción, reside en el equilibrio que gobierna la distribución de las diversas especies de soluto entre el solvente y la superficie del sólido que constituye la fase estacionaria. Los solutos son adsorbidos con diferente intensidad dependiendo ésto de sus propiedades químicas, y de la naturaleza del adsorbente.

Los materiales adsorbentes usados en cromatografía en placa fina incluyen entre otros, gel de sílice, alúmina y celulosa pulverizada. La fase móvil es acuosa, y puede consistir de un solvente puro o de una mezcla de solventes los cuales son al menos parcialmente inmiscibles con la fase estacionaria.

Para detectar la aparición de 6-APA como medida de la actividad de penicilina amidasa, se usaron placas de gel de sílice de 20 X 15 cm como fase estacionaria, y como fase móvil se usaron cuatro sistemas de solventes: A) n-butanol-etanol-agua (12:8:2), B) metanol-acetona (90:10 y 50:50) y C) acetato de etilo-butanol-ácido acético (80:15:40). Las placas se desarrollaron en una dimensión, de la siguiente manera:

- Se satura la cámara en la que se va a colocar la placa, con el sistema de solvente que se va a emplear.

- Se coloca una gota (aproximadamente 5 µl) de la solución muestra a una distancia de unos 3 cm de el borde de la placa; se dejan secar las muestras.
- Se coloca la placa dentro de la cámara; se deja que ocurra la migración, como resultado del flujo ascendente de la fase móvil causado por fuerzas de capilaridad. Una vez que el solvente ha alcanzado una altura de 12 cm se saca de la cámara y se seca.
- Para detectar las manchas de 6-APA la placa se mete a una cámara que contiene vapores de yodo. Las manchas pardas indican las posiciones de los solutos. Se mide el Rf de cada soluto y se identifica con base en los valores de retención.

La detección también puede estar basada en la absorción de radiación ultravioleta, de fluorescencia o de radioactividad.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Cinética de crecimiento de Bouvardia ternifolia.

Como se planteó al principio de este trabajo, el primer objetivo a lograr fue determinar si la carbenicilina usada en la eliminación de la bacteria transformante Agrobacterium tumefaciens, tenía algún efecto en el crecimiento de los cultivos celulares de Bouvardia ternifolia.

Lo primero que se hizo fue determinar la cinética de crecimiento del cultivo de Bouvardia ternifolia en su medio de mantenimiento, con el fin de conocer las características de crecimiento de éste. Para la determinación de la curva de crecimiento, se procedió de la siguiente forma: Se prepararon 15 matraces de 250 ml con 50 ml de medio basal MyS cada uno; a 5 matraces se les agregó 2,4-D y kinetina en una concentración de $4.5X10^{-6}M$ y $2.3X10^{-7}M$ respectivamente (Fig.4.1a); a otros 5 se les puso 2,4-D y kinetina a la mitad de la concentración usada en A (Fig.4.1b) y a los 5 últimos no se les agregó ninguna hormona (Fig.4.1c). Se inocularon todos los matraces con 5 ml de una suspensión de células de 10 días de incubación ($2X10^5$ células/ml).Se incubaron a 25° C y 125 rpm durante 15 días, durante los cuales se fueron tomando muestras para determinar el porcentaje de PCV.Fig. 4.1 muestra la curva de crecimiento obtenida; cada punto graficado representa el promedio de por lo menos tres determinaciones. Como puede apreciarse en esta gráfica, Bouvardia

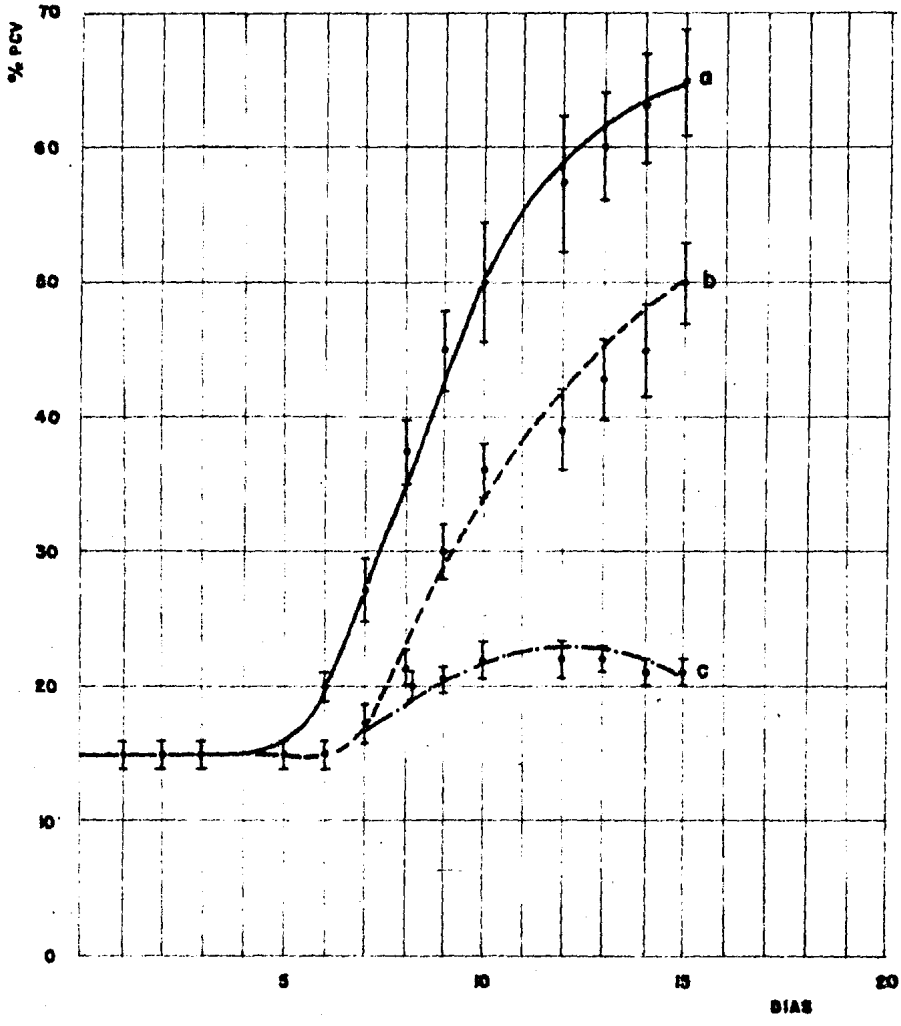


Fig.4.1 Curva de Crecimiento de Bouvardia ternifolia en medio líquido (cultivo en suspensión). Las condiciones de incubación fueron 25°C, 125 rpm de agitación rotacional y luz continua de 100 lux de intensidad Los puntos representan el promedio de al menos 3 repeticiones y las barras verticales indican la desviación estándard de la muestra.

a) 2,4-D ($4.5X10^{-6}$M) y kinetina ($2.3X10^{-7}$M)
b) 2,4-D ($2.2X10^{-6}$M) y kinetina ($1.1X10^{-7}$M)
c) Medio basal sin hormonas.

ternifolia no crece en un medio carente de hormonas (Fig.4.1c) y se obtiene un crecimiento acelerado con la concentración usada en la letra a) alcanzándose la fase estacionaria a los 13 días de cultivo, mientras que si se utiliza la mitad de esta concentración, el cultivo crece lentamente (Fig.4.1b).

4.2 Crecimiento de cultivos de B.ternifolia en medios suplementados con carbenicilina.

Una vez que se conocieron cuáles eran las condiciones óptimas de crecimiento del cultivo, se procedió a investigar el efecto que produce la carbenicilina en el crecimiento de Bouvardia ternifolia evaluando el crecimiento del cultivo en suspensión por determinación del porcentaje de PCV en las siguientes condiciones:

I medio MyS con carbenicilina en una concentración de 1 mg/ml (2.6×10^{-3}M).

a) Sin hormonas

b) Sin auxina, sólo con kinetina

c) Con auxina y kinetina

II Medio MyS sin carbenicilina

d) Sin hormonas

e) Con auxina y kinetina

Las condiciones II d) y e) fueron los controles. En todos los casos en los que se agregó auxina, se usó 2,4-D a una concentración de 4.5×10^{-6}M. Igualmente, en los casos en los que se agregó kinetina, fué a una concentración de 2.3×10^{-7}M.

La figura 4.2 muestra las curvas de crecimiento de B. ternifolia obtenidas en estas condiciones, y los puntos graficados representan el promedio de al menos tres determinaciones. Como puede observarse, los cultivos que contienen carbenicilina, crecen normalmente en un medio carente de auxina, suplementado o no con kinetina (Fig. 4.2 letras a) y b), aunque en el período de la fase exponencial, crecen menos rápido que los cultivos control que fueron suplementados sólo con hormonas (Fig.4.2 letra e). La fase "lag" es más larga cuando se adiciona kinetina además de penicilina (letra b); la carbenicilina no es tóxica para el cultivo y también hay crecimiento cuando se agrega al medio además de ésta, las hormonas auxina y kinetina (Fig.4.2 letra c). Adicionalmente, se observa que no hay crecimiento en un medio sin hormonas y sin carbenicilina (Fig.4.2 letra d), pero sí lo hay en el medio carente completamente de hormonas suplementado con carbenicilina (Fig.4.2 letra a), por lo que este experimento mostró que la presencia de la carbenicilina es determinante para el crecimiento, pues en ausencia de hormonas estaba siendo usada de alguna manera por los cultivos en suspensión de B. ternifolia como fuente hormonal probablemente auxínica.

Otra observación hecha con este experimento fue que los matraces correspondientes a los cultivos en suspensión crecidos con antibiótico tenían un color amarillento mientras que los que no tenían antibiótico presentaban color blanco. Se pensó que esta diferencia de color podría deberse a la acumulación de algún compuesto de desecho, ya que en la literatura sobre cultivo de tejidos se ha reportado que la acumulación de ácidos fenólicos por ejemplo, da

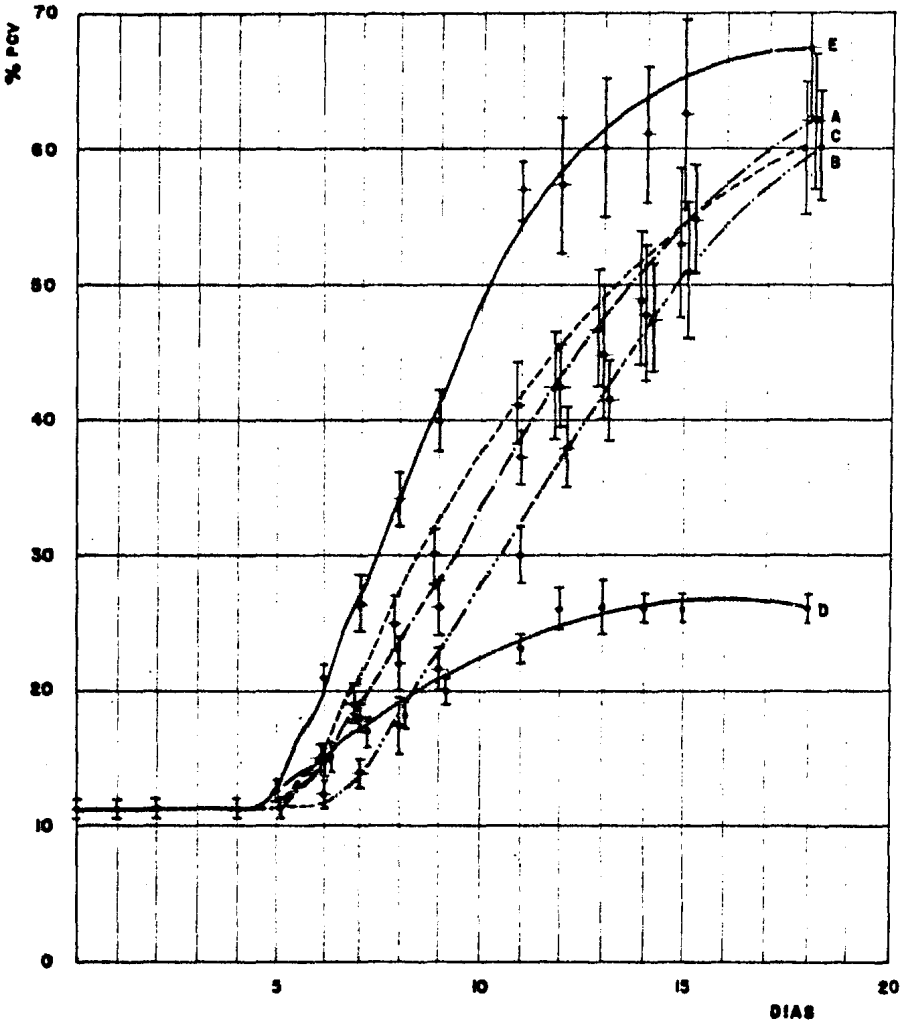


Fig. 4.2 Curva de Crecimiento de B.ternifolia en medio líquido con y sin carbenicilina. Las condiciones de incubación fueron 25°C, 125 rpm de agitación rotacional y luz continua de - 100 lux de intensidad. Los puntos representan el promedio de al menos 3 determinaciones y las barras verticales indican la desviación estándard de la muestra.

I a) Sin hormonas + 1 mg/ml de carbenicilina
b) Con 1mg/ml de carbenicilina + $2.3X10^{-7}$M de kinetina
c) Con $4.5X10^{-6}$M de 2,4-D + $2.3X10^{-7}$M de kinetina + 1mg/ml de carbenicilina.

II d) Sin hormonas y sin carbenicilina
e) Sin carbenicilina, con $4.5X10^{-6}$M de 2,4-D y $2.3X10^{-7}$M de kinetina.

una coloración amarillo-café a los cultivos, lo que indica muerte celular.

Se determinó el porcentaje de viabilidad celular de los cultivos con azul de tripano una vez alcanzada la fase estacionaria (18 días), para ver si los que tenían antibiótico (condiciones I) eran menos viables por la presencia de algún compuesto que les fuera tóxico, que los de las condiciones II, y se obtuvo lo siguiente:

	CON ANTIBIOTICO: I		SIN ANTIBIOTICO: II	
	MyS SIN HORMONAS	MyS CON HORMONAS	MyS SIN HORMONAS	MyS CON HORMONAS
Coloración	amarillenta	amarillenta	blanca	blanca
Crecimiento a los 18 días (% de PCV Fig.4.2)	62% (crecimiento rápido)	60% (crecimiento rápido)	20% (no hubo crecimiento)	65% (crecimiento muy rápido)
% de viabilidad.	92%	95%	50 %	95%

Como se ve, la viabilidad es casi la misma en todos los casos en que hubo crecimiento, por lo que el color amarillento de los cultivos que crecieron con carbenicilina no indica lisis celular, y es posible que se deba a la liberación al medio de cultivo de algún catabolito de desecho cuya acumulación no llega a ser tóxica para el cultivo con la concentración de antibiótico usada (1 mg/ml=2.6×10^{-3}M) (Fig.4.6).

Se hicieron también estudios sobre el efecto de la carbenicilina en el crecimiento de callos de B.ternifolia, eva

luando el crecimiento por incremento en el peso fresco a los 30 días de cultivo. La Tabla 5 del apéndice y la Fig. 4.3 muestran los resultados obtenidos utilizando tres concentraciones de carbenicilina (0.5 mg/ml, 1 mg/ml y 2 mg/ml) en callos crecidos en medio suplementado con 2,4-D y kinetina, y en callos crecidos en medio basal sin hormonas. Con estos resultados se observa que:

- la carbenicilina produce el mismo efecto que el producido por 2,4-D y kinetina juntos, pues los callos crecidos en un medio carente de hormonas suplementado con carbenicilina, presentan crecimiento cuantitativamente semejante a los callos crecidos con hormonas sin carbenicilina. (Foto de la Fig. 4.4)
- La carbenicilina no es tóxica para los cultivos crecidos en un medio con hormonas.
- Los callos no crecen sin hormonas y sin antibiótico. (Fig. 4.5A)
- La concentración de carbenicilina con la que se obtuvo mayor crecimiento es con la de 1 mg/ml (2.6×10^{-3}M).

En este experimento, al igual que el anterior realizado con cultivos en suspensión, se observó que la apariencia de los callos crecidos con carbenicilina era diferente solamente en cuanto a coloración con respecto a los callos crecidos con hormonas sin carbenicilina. Los callos crecidos con antibiótico presentaron una coloración blanco-amarillenta, la cual fué más intensa con la concentración más alta usada de carbenicilina (2 mg/ml), incluso presentándose zonas amarillo-café en el callo. Los callos crecidos solamente con hor-

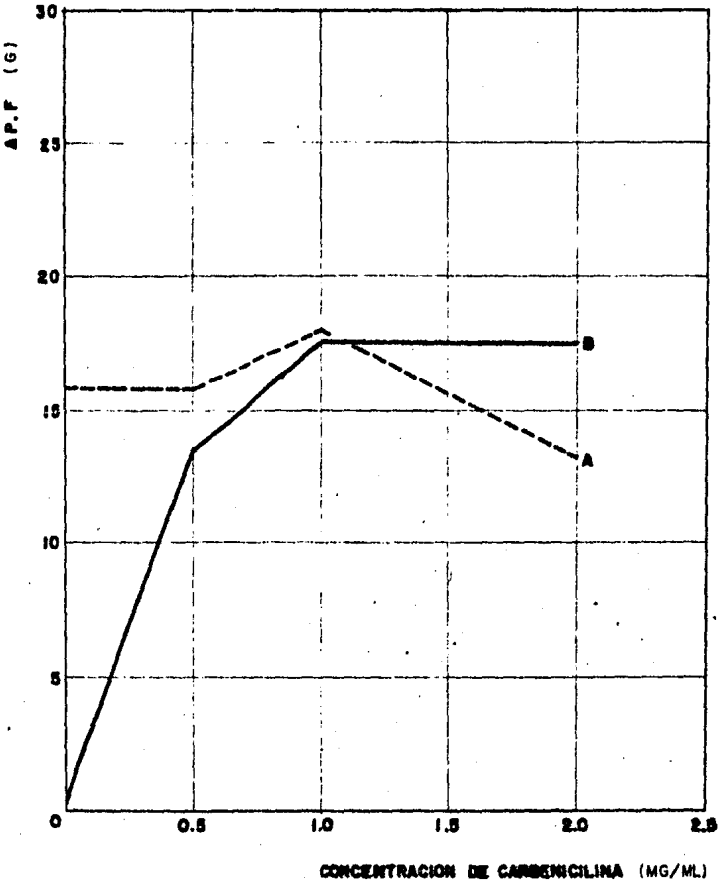


Fig.4.3 Efecto de la carbenicilina en el crecimiento de B. ternifolia.

A.MyS + K + 2,4-D

B.MyS

Los resultados representan el promedio de 5 repeticiones ΔP.F.= incremento en peso fresco, después de 30 días de incubación a 28°C y luz continua de 1000 lux de intensidad. Concentración de K= 2.3 X 10^{-7}M y de 2,4-D= 4.5 X 10^{-6}M.

Fig. 4.4.-Fotografía que muestra dos cultivos de 30 días de edad de B.ternifolia crecidos en medio MyS con hormonas 2,4-D y kinetina (A) y en medio sin hormonas suplementado con 1 mg/ml de carbenicilina (B). Obsérvese que la coloración del cultivo que tiene antibiótico (B) es amarillenta con zonas pardas.

Fig.4.5 Fotografía que muestra dos cultivos de 30 días de edad de B.ternifolia incubados a 28°C y 1000 lux de intensidad luminosa en medio MyS sin hormonas (A) y en medio MyS sin hormonas suplementado con 1 mg/mL de carbenicilina (B). Como puede observarse, B.ternifolia no crece en ausencia de hormonas (A) pero sí lo hace en presencia de carbenicilina (B).

monas presentaron una coloración blanca.

En otro experimento con callos de B.ternifolia se variaron las concentraciones de auxina y de carbenicilina, manteniendo la concentración de kinetina constante. La Tabla 6 del apéndide y la Fig. 4.6 muestran los resultados obtenidos por evaluación del incremento en peso fresco a los 30 días de cultivo y representan el promedio de 5 repeticiones. Se usaron dos tipos de medio de cultivo: medio basal sin hormonas (M/S-H) y medio basal suplementado con $2.3X10^{-7}M$ (0.05 mg/l) de kinetina (M/S+K). Las concentraciones de carbenicilina y de la auxina 2,4-D probadas fueron:

Carbenicilina:
- 2 = 2 mg/ml ($5.2 \times 10^{-3}M$)
- 1 = 1 mg/ml ($2.6 \times 10^{-3}M$)
- 1/2 = 0.5 mg/ml ($1.3 \times 10^{-3}M$)
- 1/4 = 0.25 mg/ml ($0.65 \times 10^{-3}M$)

2,4-D:
- 2 aux = 2 mg/l ($9.04 \times 10^{-6}M$)
- 1 aux = 1 mg/l ($4.52 \times 10^{-6}M$)
- 1/2 aux = 0.5 mg/l ($2.25 \times 10^{-6}M$)
- 1/4 aux = 0.25 mg/l ($1.13 \times 10^{-6}M$)

En la Fig. 4.6 se puede observar lo siguiente:

- Las concentraciones de carbenicilina de 1 mg/ml y 2 mg/ml produjeron un crecimiento cuantitativamente igual tanto en presencia de kinetina como en ausencia de ella.
- Es interesante notar que con la concentración de 0.5 mg/ml de carbenicilina sí hubo diferencia de crecimiento en ausencia o presencia de kinetina, pues los que sólo tenían 0.5 mg/ml de carbenicilina crecieron significativamente más que los que además de esta concentración de antibiótico tenían

0.5 mg/l de kinetina.

- Con la concentración de 0.25 mg/ml de carbenicilina se obtuvo muy poco crecimiento, tanto con kinetina como sin ella.

En la Fig. 4.7 se ve que se obtuvo mayor crecimiento con la concentración más baja de 2,4-D usada que fué la de 1.13×10^{-6}M (0.25 mg/l) manteniendo constante la concentración de kinetina.

Estos resultados sugieren que con concentraciones mayores de 1 mg/ml de carbenicilina no importa la presencia ó ausencia de kinetina para producir crecimiento, mientras que si se usan concentraciones menores de 1 mg/ml de antibiótico junto con 0.05 mg/l de kinetina, se obtiene un crecimiento lento.

Los cultivos de B.ternifolia crecen aceleradamente como callo desdiferenciado si se mantiene una relación de auxina/citocinina alta (que es la relación que se usa con las concentraciones de 1 mg/l de 2,4-D y 0.05 mg/l de kinetina para mantener el cultivo). Si la relación auxina/citocinina es baja, el cultivo crece lentamente, y pueden formarse brotes (datos no presentados). Por tanto los resultados sugieren que la carbenicilina puede estar siendo usada como auxina por el cultivo, ya que las concentraciones bajas de esta penicilina darían una relación auxina/citocinina baja que produjo un crecimiento lento.

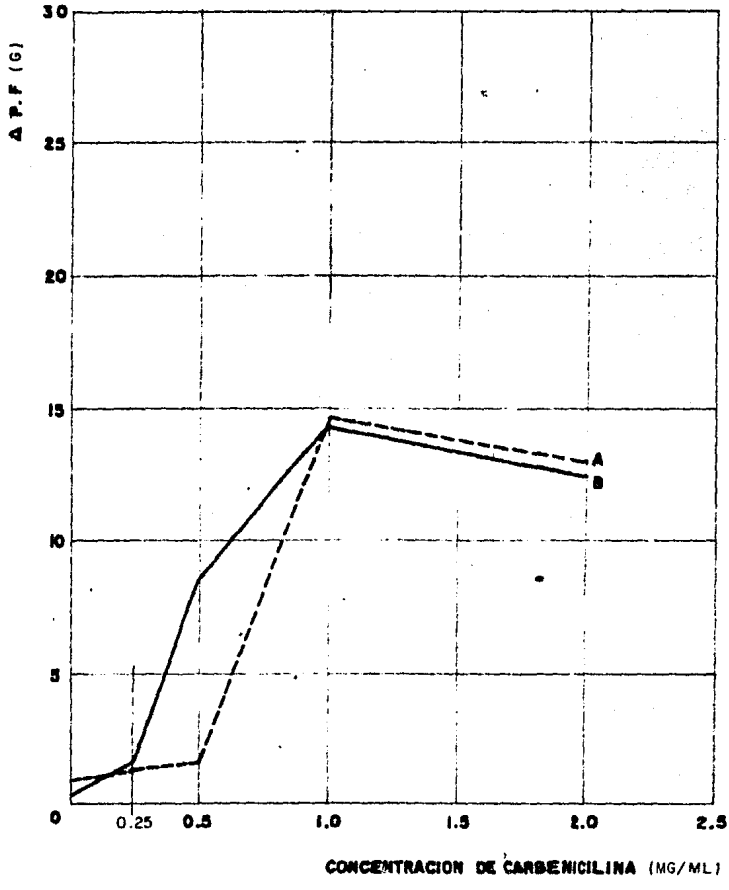


Fig.4.6 Efecto de la carbenicilina en el crecimiento de B. ternifolia.

A. MyS + K

B. MyS

Los resultados representan el promedio de 5 repeticiones. ΔPF= incremento en peso fresco después de 30 días de incubación a 28°C y luz continua de 1000 lux de intensidad. Concentración de kinetina= 2.3×10^{-7} M

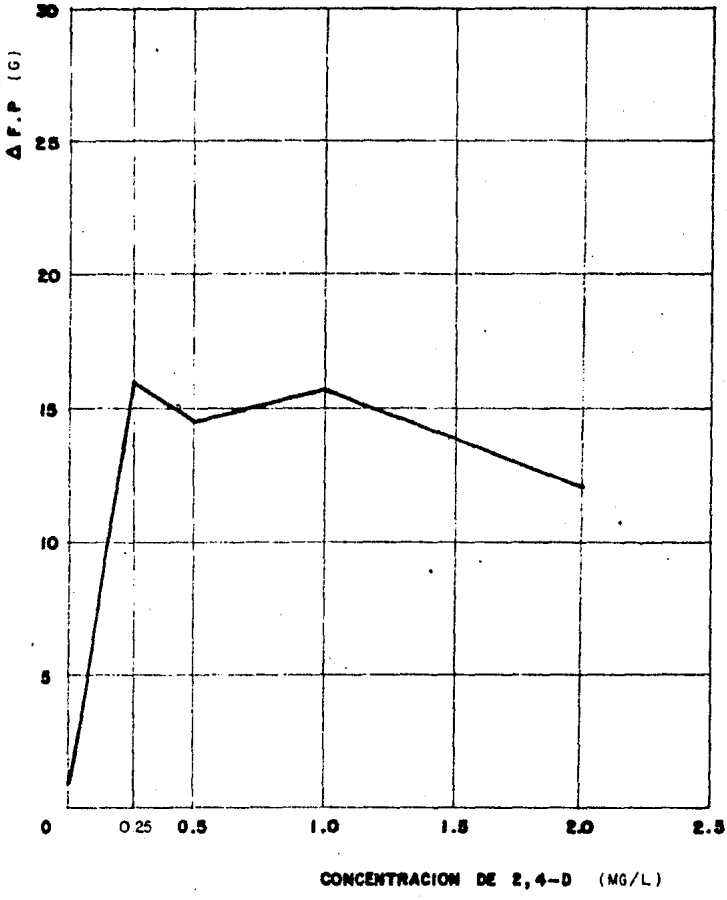


FIG. 4.7 Efecto de diversas concentraciones de 2,4-D manteniendo constante la concentración de - kinetina (2.3×10^{-7}M).

ΔP.F = incremento en peso fresco después de 30 días de incubación a 28°C y luz - continua de 1000 lux de intensidad.

4.3 Efecto del ácido 6-aminopenicilánico y de varias penicilinas en cultivos de B. ternifolia.

Una vez que se hubo investigado el efecto que produce la carbenicilina en el crecimiento de B. ternifolia, las siguientes preguntas a responder fueron las siguientes: ¿existen otras penicilinas que ejerzan un efecto auxínico en el crecimiento de cultivos de B. ternifolia? ¿por qué tienen esta actividad?

Se analizó primero la estructura química de la carbenicilina, para tratar de averiguar qué características de la molécula podrían ser las de una auxina. Sabemos que todas las auxinas deben poseer para su actividad un anillo aromático y un grupo carboxilo, características presentes en la cadena lateral de la molécula de carbenicilina (Fig.3.2) unida por un enlace amida al ácido 6-amino-penicilánico (6-APA).

Se pensó que esta cadena lateral podría ser la parte de la molécula en donde residiera la actividad auxínica, pues la estructura de la cadena lateral de la carbenicilina corresponde de hecho al ácido fenilacético (pues el fenilmalónico fácilmente se descarboxila a ácido fenilacético) el cual se sabe que posee actividad auxínica (46, 64), y la porción de 6-APA, aunque tiene un grupo -COOH no tiene anillo aromático y por lo tanto, no sería un buen candidato. Si la cadena lateral es la responsable del crecimiento, el 6-APA no debería ser activo, y para investigar esto, se probó primero si éste tiene alguna actividad en el crecimiento de los cultivos de

B. ternifolia por sí sólo.

Se diseñó un experimento en el que se probaron diversas concentraciones de 6-APA en el crecimiento de callos de B. ternifolia, tanto en medio MyS suplementado con hormonas como en medio MyS sin hormonas. Se evaluó el incremento en peso fresco a los 30 días de cultivo. En la Tabla 8 del apéndice y la Fig. 4.8 se muestran los resultados obtenidos, en los que puede apreciarse que:

- El ácido 6-APA no ejerce ningún efecto auxínico en los cultivos de B. ternifolia con ninguna de las concentraciones probadas, ya que los callos crecidos en un medio sin hormonas no crecieron con 6-APA; los valores negativos en el incremento de peso fresco se debieron a pérdida de agua del tejido.

- El ácido 6-APA sin embargo, no es tóxico para los cultivos, ya que los callos crecidos en medio suplementado con hormonas crecieron normalmente a pesar de la presencia de 6-APA.

Se observó también que tanto el tejido como el medio de cultivo de los callos a los que se les agregó 6-APA, presentaron una coloración amarillenta, a diferencia de los que no se les puso 6-APA en los que la coloración se mantuvo blanca.

Los resultados obtenidos con este experimento, sugieren que la porción de 6-APA de la molécula de la penicilina, no es la responsable de la actividad auxínica, pero sí probable-

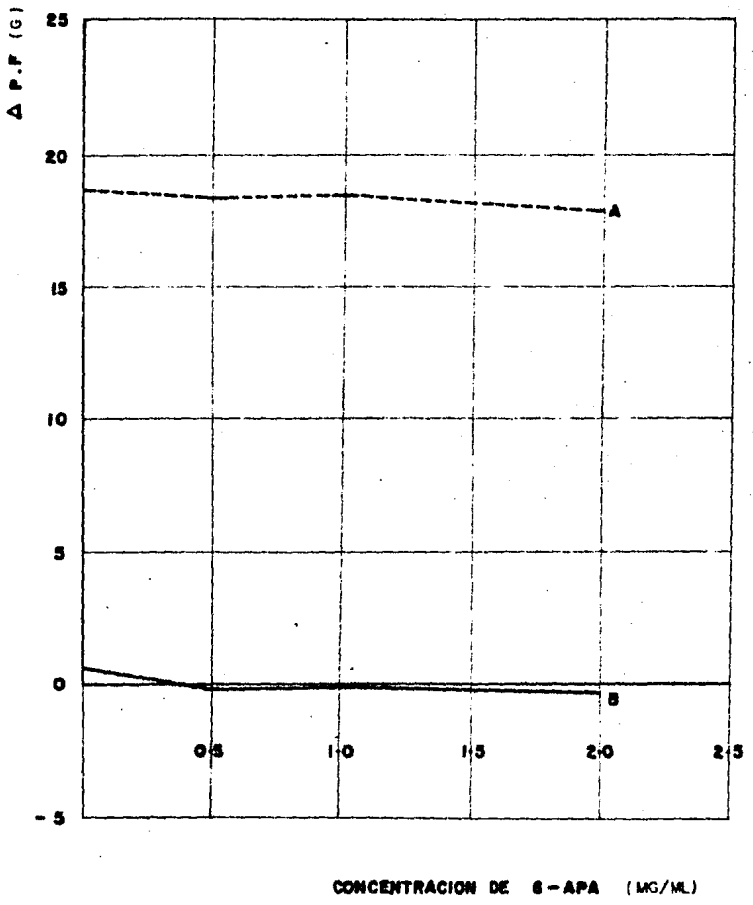


Fig. 4.8 Efecto del ácido 6-APA en el crecimiento de B. ternifolia.

A. MyS + K + 2,4-D

B MyS

Los resultados representan el promedio de 5 repeticiones ΔP.F= incremento en peso fresco después de 30 días de incubación a 28°C y - luz continua de 1000 lux de intensidad. Con- tración de K=2.2 X 10^{-7}M y de 2,4-D=4.5 X 10^{-6}M.

mente la responsable de la coloración amarillenta que toman los cultivos cuando se incuban con carbenicilina.

Con base en los resultados anteriores se formuló la siguiente hipótesis "La cadena lateral, puede liberarse por ruptura del enlace amida que la une al 6-APA y es la responsable de la actividad auxínica; por lo tanto, toda variación estructural en ella que lleve a la pérdida de alguno de los caracteres esenciales de una auxina (grupo -COOH y anillo aromático), deben producir una penicilina inactiva para el crecimiento de cultivos de Bouvardia ternifolia".

Según esto, penicilinas como la ampicilina cuya cadena lateral posee un anillo aromático pero en vez del grupo carboxilo posee un grupo amino, sería inactiva, y la penicilina G (bencil-penicilina), cuya cadena lateral corresponde al ácido fenil acético sería activa (Fig. 4.9).

Se probaron estas dos penicilinas en callos de B. ternifolia evaluando el incremento en peso fresco a los 30 días de cultivo. Para ambos casos, se emplearon tres concentraciones diferentes (0.5 mg/ml, 1 mg/ml y 2 mg/ml) de penicilina en medio MyS sin hormonas y en medio MyS con hormonas (2,4-D y Kinetina).

La Tabla 9 del apéndice y la Fig. 4.10 nos muestran los resultados obtenidos con ampicilina:

- Los callos sembrados en medio MyS sin hormonas no crecen en presencia de ampicilina.

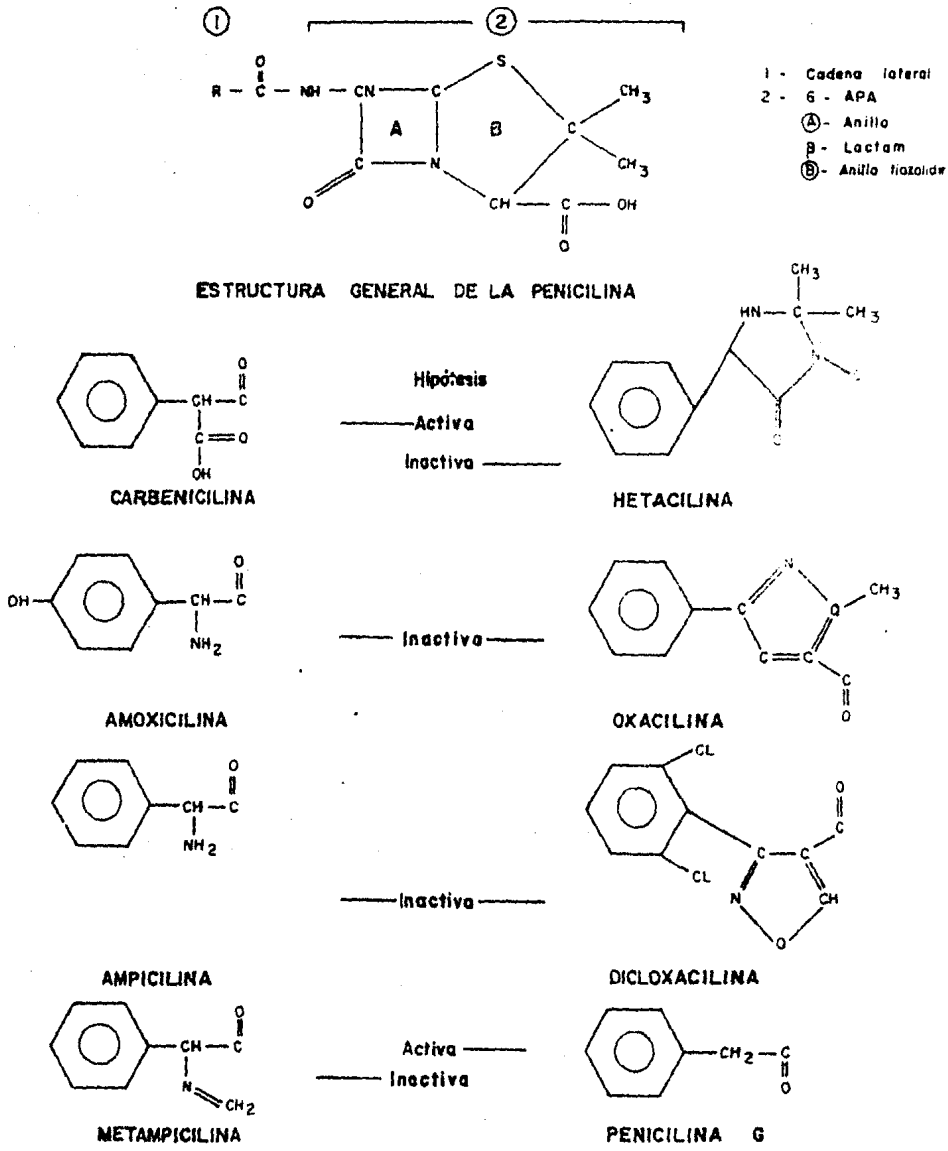


FIG. 4.9 Estructura de varias penicilinas.

- A mayor concentración de ampicilina, el incremento en peso fresco fue menor que en los controles con hormonas, sugiriendo que la ampicilina es ligeramente tóxica para el cultivo. En el caso de los cultivos sembrados en medio MyS sin hormonas, también se observa la toxicidad de la ampicilina con respecto al control que carecía de ésta, pues con los callos a los que se les agregó en el medio de cultivo ampicilina, se obtuvieron valores negativos de incremento en peso fresco debido a la pérdida de agua del tejido.

Los resultados obtenidos con penicilina G (bencil-penicilina) se muestran en la Tabla 10 del apéndice, así como en la Figura 4.11.Como se puede apreciar, la penicilina G produjo crecimiento de los callos sembrados en un medio carente de hormonas, cuantitativamente semejante al crecimiento producido por las hormonas 2,4-D y kinetina juntas. La concentración de penicilina G con la que se obtuvo un mayor incremento en peso fresco fue la de 1 mg/ml ($3X10^{-3}$M), que es la misma concentración con la que se obtuvo mayor crecimiento usando carbenicilina.

Los resultados obtenidos con ampicilina y con penicilina G están de acuerdo con la hipótesis planteada.

Para corroborar lo anterior se probaron otras penicilinas en callos de B. ternifolia en medio MyS sin hormonas. A cada lote de 6 frascos de cultivo se les adicionó 1 mg/ml de la penicilina a probar, y como control, a 6 frascos no se

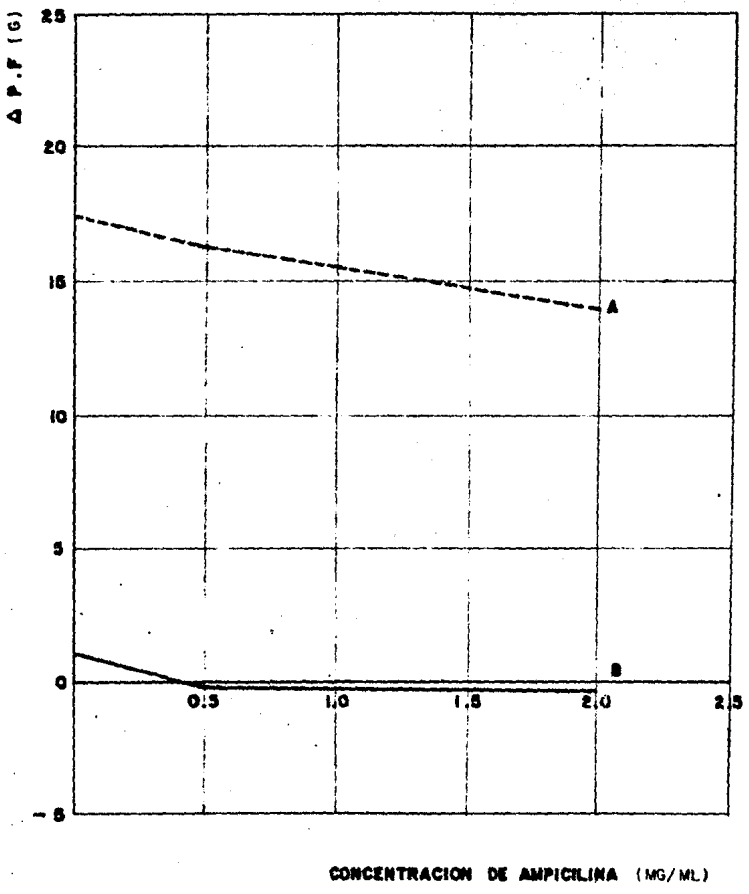


Fig. 4.10 Efecto de la concentración de Ampicilina:

A. M/S + K + 2,4-D

B. M/S

Los resultados representan el promedio de 5 repeticiones
ΔP.F= incremento en peso fresco después de 30 días de incubación a 28°C y luz continua de 1000 lux de intensidad.
Concentración de K= $2.3X10^{-7}$M y de 2,4-D= $4.5X10^{-6}$M.

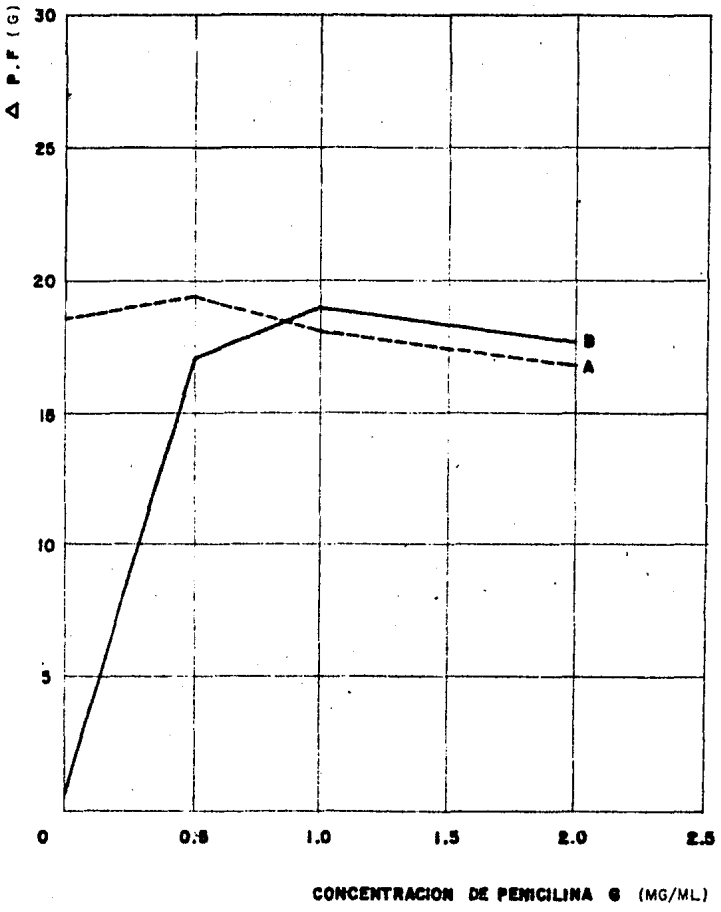


Fig. 4.11 Efecto de la Penicilina G.

A. M/S + K + 2,4-D
B. M/S

Los resultados representan el promedio de 5 repeticiones AP.F.= incremento en peso fresco después de 30 días de incubación a 28°C y luz continua de 1000 lux de intensidad. Concentración de K= $2.3X10^{-7}M$ y de 2,4-D= $4.5X10^{-6}M$.

les agregó antibiótico. Todos los frascos fueron incubados en las mismas condiciones, y a los 30 días de cultivo, se evaluó el incremento en peso fresco producido. La Tabla VI del apéndide y la Figura 4.12 nos muestran los resultados que se obtuvieron, en los que podemos observar que solamente la carbenicilina y la penicilina G producen un efecto hormonal en los cultivos de Bouvardia ternifolia. Si observamos las estructuras químicas de estas penicilinas, vemos que en ellas la cadena lateral consta exclusivamente de un anillo aromático y de grupo carboxilo que correspondería, en el caso de la carbenicilina, al ácido fenil malónico, y en el caso de la penicilina G al ácido fenil acético, por lo que estos resultados concuerdan con la hipótesis de que la actividad auxínica reside en la cadena lateral de la molécula de penicilina pues los cambios estructurales en ella modifican la actividad producida.

El ácido fenil malónico no posee actividad de auxina per se pero es fácilmente convertido en ácido fenil acético por descarboxilación.

Con estos resultados, se decidió buscar la causa de la hidrólisis de las penicilinas en el cultivo, así como probar el efecto del ácido fenil acético solo en el crecimiento de B. ternifolia.

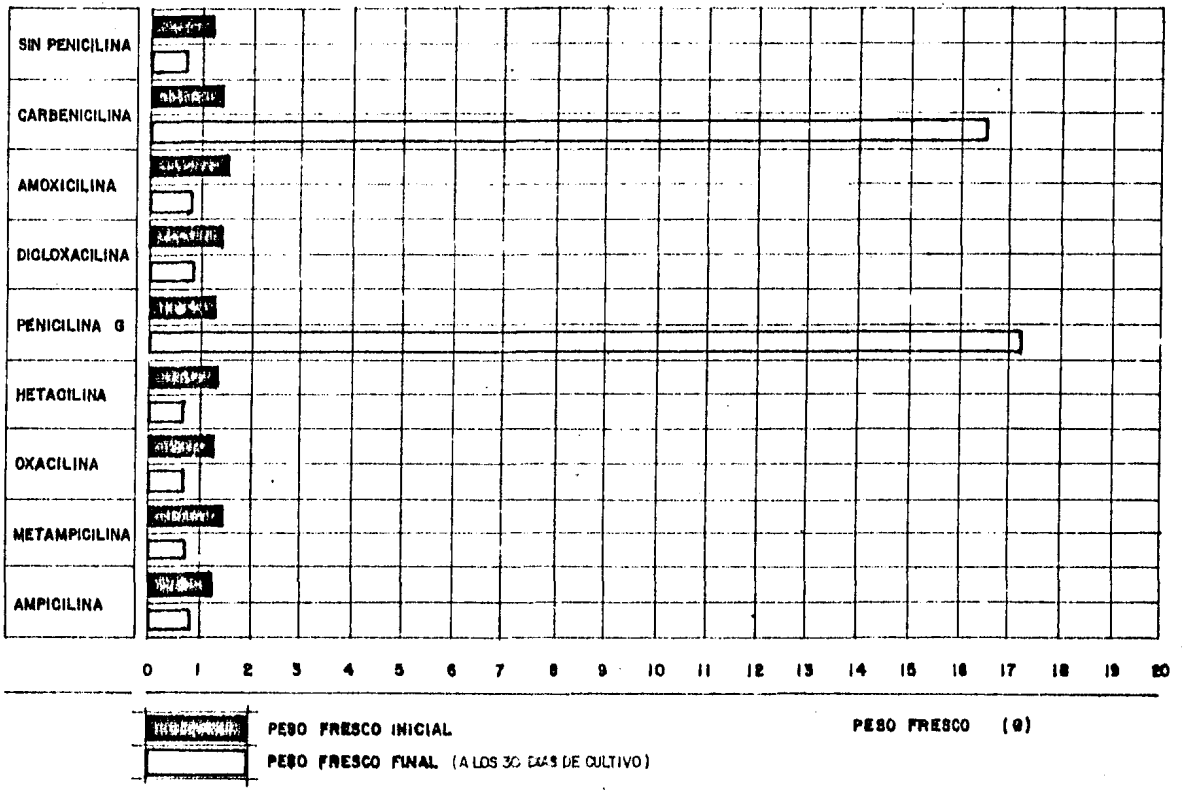


FIG. 4.12 Efecto de varias penicilinas en el crecimiento de B. ternifolia.

4.4 Degradación de las penicilinas en el medio de cultivo.

Con base en los resultados anteriores se formuló la siguiente hipótesis: "la actividad hormonal de la carbenicilina y penicilina G se debe a la presencia en el cultivo de una amidasa que libera la cadena lateral unida al 6-APA y esta cadena lateral es transformada en auxina".

Si la cadena lateral de la penicilina G y la carbenicilina es usada como auxina, suponemos que ocurre una ruptura de la molécula de penicilina que libera a la cadena lateral del 6-APA. La siguiente pregunta a responder sería entonces si en las células del cultivo ocurre esto debido a la presencia de un enzima o se debe a una degradación espontánea de la penicilina en el medio de cultivo.

En general, las penicilinas son bastante estables en estado sólido "seco", pero una vez en solución, pueden producirse diferentes productos de degradación, dependiendo de las condiciones. En solución ácida, se pueden degradar espontáneamente a ácido penílico, mientras que en una solución alcalina se pueden degradar a ácidos peniciloicos, que pueden a su vez descarboxilarse a peniloicos (Fig.4.13), con la consecuente pérdida de la actividad antibacteriana. Se sabe poco sobre la estabilidad de las penicilinas en medios de cultivo microbiológicos, pero según Ryan y colaboradores (63), la estabilidad de distintos antibióticos incluyendo penicilinas es muy buena en medio nutritivo con agar, comparable a la del producto en seco. De acuerdo con Batchelor y Cameron-Wood (2), las

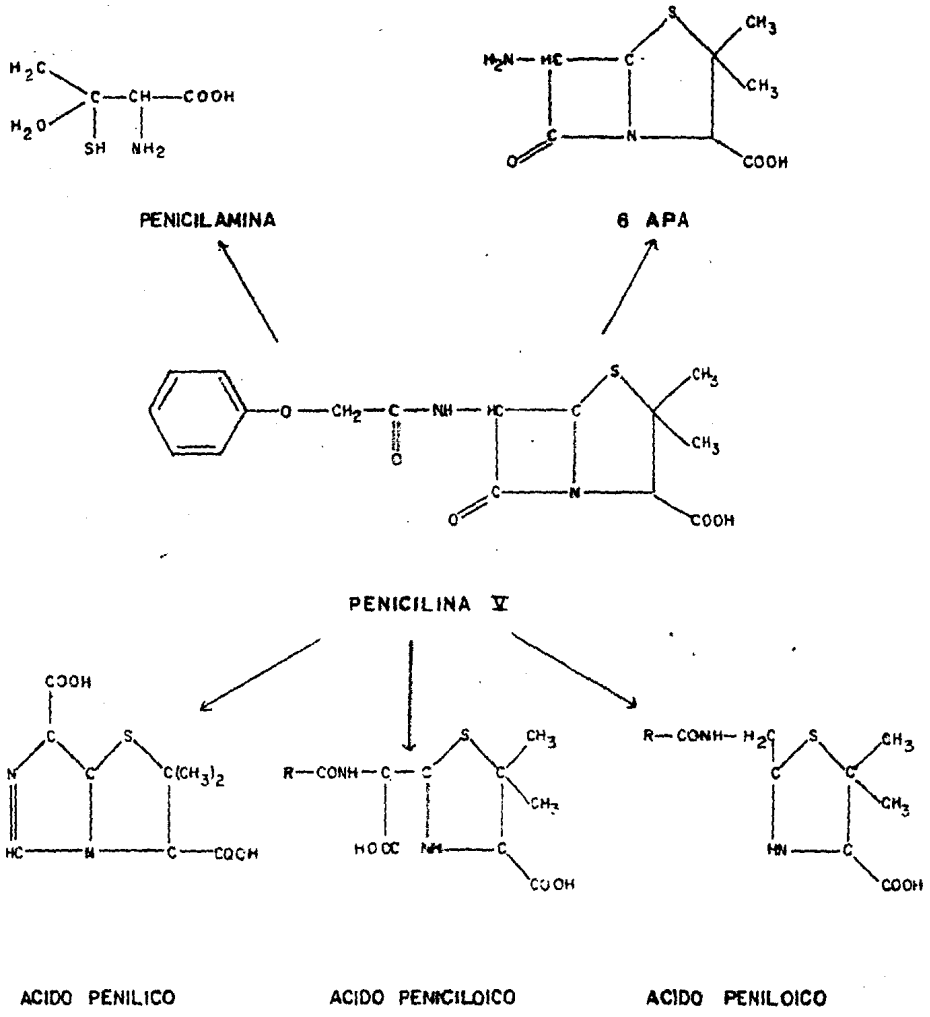


Fig. 4.13 Productos de degradación de las penicilinas (74)

penicilinas se pueden hidrolizar espontáneamente a 6-APA sólo en un 0.2%.

Para investigar esto se diseñaron dos experimentos:

Experimento 1:

3.6.1 Ensayo microbiológico de detección de la presencia o ausencia de halo de inhibición del crecimiento de Agrobacterium tumefaciens (LBA 4001) que es sensible a la carbenicilina.

La ruptura de la molécula de penicilina provoca la pérdida de su actividad antibacteriana, por lo que si ocurriera una degradación espontánea no se presentaría halo de inhibición de crecimiento bacteriano en las placas que tuvieran soluciones ácidas o alcalinas de carbenicilina. Se prepararon 30 placas, en las que se probaron cinco concentraciones de carbenicilina (1, 2, 3, 4 y 5 mg/ml), disueltas en agua desionizada y ajustadas con NaOH ó con HCl 1.0 N a cinco pH diferentes (3, 4, 5.7, 8 y pH 9). Se prepararon también 5 placas como control a las que no se les puso carbenicilina.

Todas las placas se incubaron a 25°C durante 12 horas al término de las cuales se midió el halo de inhibición, obteniéndose los siguientes resultados:

- Hubo halo de inhibición en todas las placas excepto en las placas control.

- El tamaño de halo de inhibición fué el mismo en todos los pHs de cada una de las concentraciones de carbenicilina probadas.
- A mayor concentración de carbenicilina, mayor fué el tamaño del halo de inhibición presentado, en todos los pH probados.

La actividad bactericida en todas las placas conteniendo carbenicilina indica que ésta no se degradó significativamente en las soluciones en el intervalo de pH de 3 a 9.

Experimento 2:

3.6.2 Curva de crecimiento — pH de cultivo en suspensión de B. ternifolia.

Se determinaron los cambios que sufre el pH del medio de cultivo durante el crecimiento, a fin de investigar si ocurría algún cambio brusco que pudiera producir la degradación espontánea de la penicilina G. Se usaron cultivos en suspensión con tres tipos de medios: a) Medio MyS + H (con 2,4-D y kinetina) b) Medio MyS suplementado con 1 mg/ml de penicilina G y c) Medio MyS sin hormonas. Como control se emplearon matraces sin células con y sin penicilina G (Fig. 4.14 letras d) y e) respectivamente). Todos los matraces fueron incubados a 25°C y 125 rpm por 20 días durante los cuales se fueron tomando muestras para evaluar el porcentaje de PCV y el pH. La Figura 4.14 muestra las curvas de crecimiento - pH obtenidas, en las que podemos hacer las siguientes observaciones:

- Los controles sin células se mantuvieron en el período de 20 días a un pH más o menos constante que fué de 4.3 a 5.1, siendo el pH del control sin células con penicilina ligeramente más ácido que el del medio sin células sin penicilina.
- En medio MyS con hormonas, el pH aumenta durante el período de incubación, desde 4.6 hasta 6.7.
- En medio MyS sin hormonas, no hubo crecimiento y el pH promedio hasta los 14 días de incubación fue de 4.6, después de los cuales aumentó hasta 5.5.
- En medio MyS con 1 mg/ml de penicilina G el pH fué aumentando desde 4.5 hasta 5.5 en los primeros 15 días de incubación después de los cuales bajó hasta 4.4.

Los resultados muestran que el pH se mantuvo ácido durante el crecimiento en todas las condiciones probadas, en un intervalo de 4.3 a 6.7, por lo que no hubo ningún cambio brusco que pudiera provocar una degradación espontánea de la penicilina.

Estos resultados, junto con los del experimento anterior, demuestran con claridad que aunque pudiera haber algo de degradación espontánea de la penicilina durante el cultivo no es lo suficientemente significativa como para suponer que ésta pueda ser la causa de la liberación de la auxina de la cadena lateral.

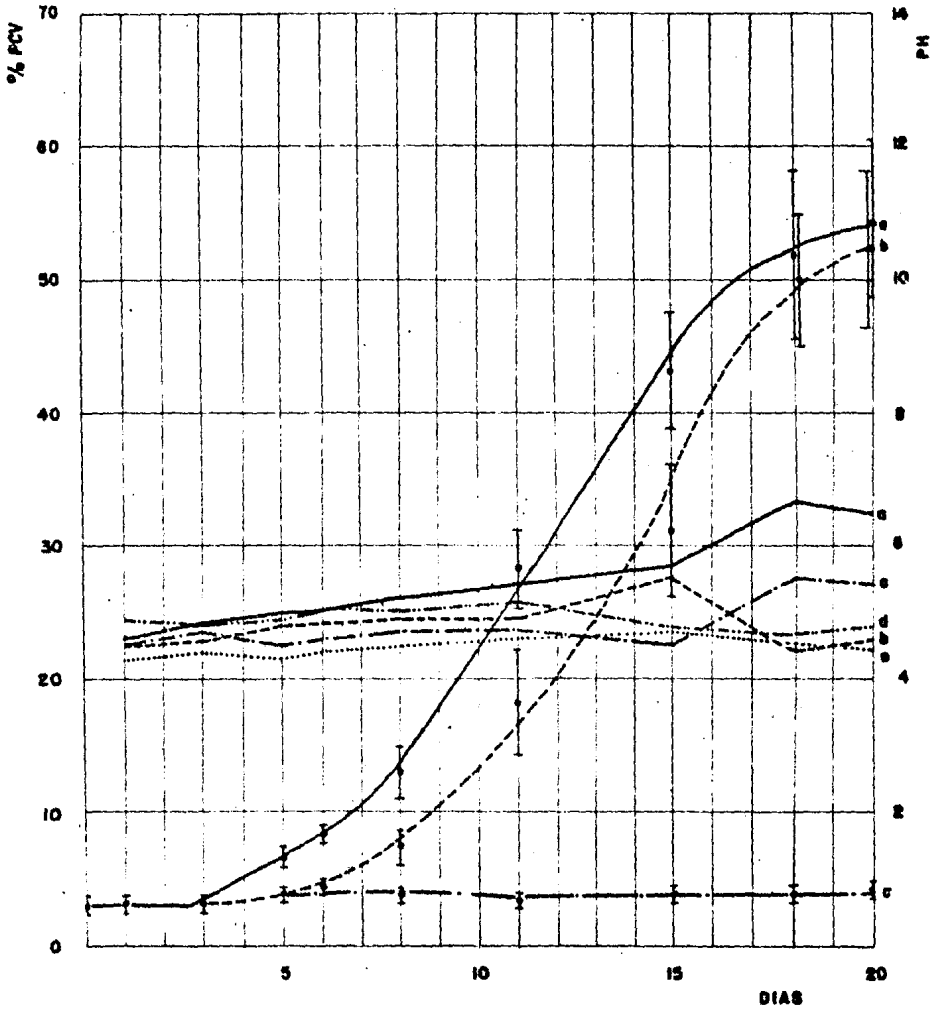


Fig. 4.14 Curva de crecimiento - pH de cultivo en suspensión de B. ternifolia

a) M&S + H (2,4-D y kinetina)
b) M&S + Penicilina G (1mg/ml)
c) M&S sin hormonas
d) Control sin células, M&S
e) Control sin células, M&S+penicilina G

Los puntos representan el promedio de al menos 3 determinaciones.

Las barras verticales indican la desviación estándard de las muestras.

4.5 Determinación de actividad de penicilina amidasa in vivo.

Una vez establecido que la ruptura de la molécula de penicilina no ocurre espontáneamente en el medio de cultivo, se procedió a investigar la posible presencia de un enzima amidasa que degrade a la penicilina liberando la cadena lateral.

Dicha enzima se detectó indirectamente utilizando el sistema de bioensayo basado en la liberación del compuesto p-nitroanilina de color amarillo intenso a partir del compuesto inconoloro N-fenil-acetilnitroanilina, por la acción de una acilasa o amidasa (Dres.Carmen Giral y Rodolfo Quintero, comunicación personal).

La Figura 4.15 nos muestra la reacción que ocurriría si las células de ensayo tuvieran una enzima que produjera la ruptura del enlace amida que une al ácido fenilacético con la p-nitroanilina. La liberación de enzima al medio produciría una coloración amarilla intensa.

Para probar si había este tipo de hidrólisis en nuestro cultivo de Bourvardia ternifolia, se inocularon 10 tubos de cultivo con 0.5 g de peso fresco de callo de 30 días de edad (fase estacionaria), otros 10 tubos sin tejido fueron empleados como control. Todos los tubos contenían 6 ml de medio basal M_y3 sin hormonas. A 5 tubos de cada grupo (con y sin células) se les agregó 1 mg/ml de N-fenilacetilnitroanilina, para tener controles con y sin células y con y sin compuesto. Todos los tubos fueron incubados a 28°C con luz contínua. A

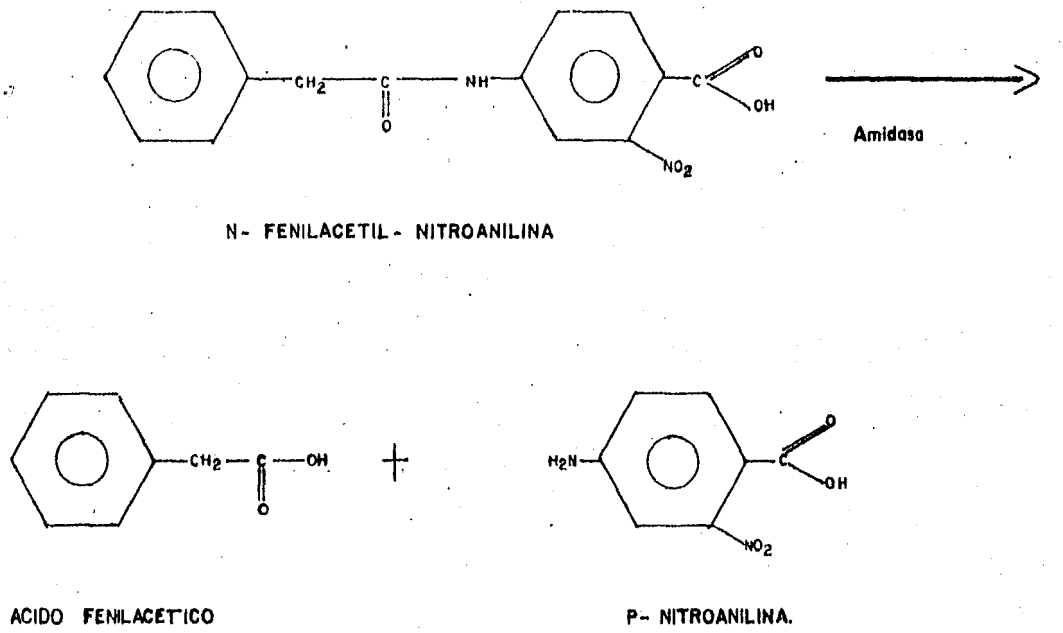


Fig. 4.15 Hidrólisis de N-fenil-acetilnitroanilina por una amidasa.

partir de los 8 días se observó en color amarillo únicamente en los 5 tubos que tenían células y N-fenilacetilnitroanilina. El color amarillo se fué haciendo más intenso a partir del 9º día de cultivo en estos tubos, como puede apreciarse en la fotografía de la Figura 4.16 Estos resultados sugirieron que en los cultivos de B. ternifolia ocurre una hidrólisis enzimática de tipo amidasa debida a la presencia de las células.

Es importante hacer notar que debido a la falta de hormonas, no hubo crecimiento en ningún tubo con células, a pesar de que los que tenían N-fenilacetilnitroanilina liberan ácido fenil-acético, que es una auxina.

4.6 Determinación de actividad de penicilina amidasa *in vitro* utilizando la técnica empleada para E. coli.

Con excepción del reporte de Alburn y colaboradores (1962, U.S. Patent 3,032, 473) sobre la ficina, una enzima proteolítica que hidroliza fenoximetilpenicilina a 6-APA, en árboles del género Ficus, la revisión de la literatura no produjo ningún otro reporte hasta la fecha (mayo,1985) sobre la presencia de penicilina-amidasas en vegetales.

Para estudiar la posible presencia de una penicilina amidasa en B. ternifolia se decidió emplear el método ideado por Bomstein y Evans (5) para la determinación colorimétrica del 6-APA y empleado por diversos autores en estudios de actividad de penicilina amidasa de Escherichia coli (25, 74).

Fig. 4.16 Fotografía que muestra la hidrólisis de N-fenilacetilnitroanilina liberando p-nitroanilina que tiñe el medio de cultivo en color amarillo. Como puede observarse, esto ocurre solamente en el tubo que tiene células y N-fenilacetilnitroanilina (c)

Los tres tubos contienen el mismo medio de cultivo MyS sin hormonas con la variable de que:

A: carece de N-fenilacetilnitroanilina
B: carece de células pero sí tiene N-fenilacetilnitroanilina.
C: tiene células y tiene N-fenilacetilnitroanilina

Esta técnica mide el 6-APA producido por medio de la base de Schiff coloreada que se forma por la reacción de su grupo amino con el reactivo de Ehrlich (p-dimetil amino benzaldehido). La reacción se mide colorimétricamente a 415 mm (ver metodología, Capítulo III).

Se aplicó esta metodología como prueba preliminar de la detección de penicilina amidasa en cultivos en suspensión de B. ternifolia de 14 días de edad. Se emplearon células cultivadas en tres tipos de medios: 1) MyS con hormonas, 2) MyS con hormonas con 1mg/ml de carbenicilina y 3) MyS sin hormonas con 1mg/ml de carbenicilina.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.17 en la que podemos observar que:

- Hubo actividad de penicilina amidasa en las células provenientes de los tres tipos de medio de cultivo, detectándose mayor actividad en las células que habían crecido en un medio sin hormonas suplementado con carbenicilina.

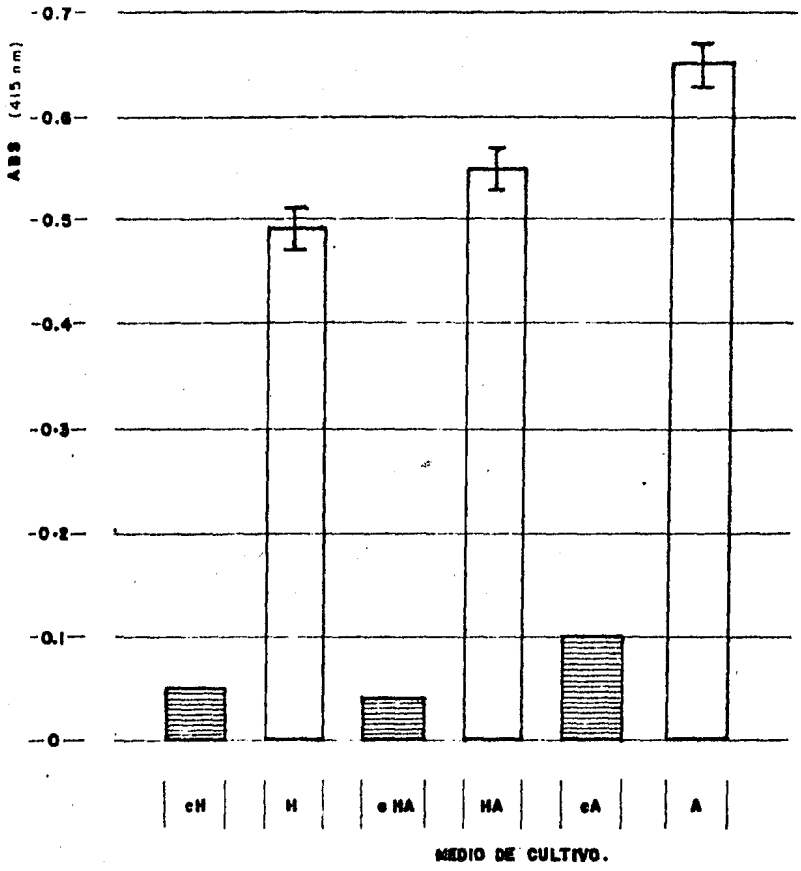


Fig. 4.17 Estimación colorimétrica de 6-APA basada en la absorbancia del cromógeno formado por la reacción del grupo amino del 6-APA con el p-dimetil-aminobenzaldehido (PDAB). Se usaron células de 14 días de edad. Las barras representan la absorbancia obtenida con células cultivadas en tres medios de cultivo y corresponden al promedio de al menos tres repeticiones.

cH = control, medio M&S + Hormonas
H = medio M&S + Hormonas
cHA = control, medio M&S con hormonas con carbenicilina
HA = medio M&S + Hormonas con antibiótico
cA = control, medio M&S sin hormonas + carbenicilina
A = medio basal M&S con carbenicilina

Condiciones de reacción: pH=8.0, (carbenicilina)=25 mM, tiempo de reacción = 30', buffer de fosfatos 0.03 M.

- También se detectó actividad, aunque mucho menor, en los tubos control, a pesar de que se les adicionó alcohol para parar la reacción en el tiempo cero y de que no fueron puestos a incubar en el baño a 40°C con agitación constante. Esto pudo deberse a que el alcohol no penetra bien a las células y de todos modos hay reacción.

Estos resultados indican que las células de Bouvardia ternifolia, forman un producto que posee un grupo amino que reacciona con el PDAB, cuando han sido cultivadas en un medio suplementado con antibiótico. Sin embargo, éste no es un reactivo específico para el 6-APA ya que otros compuestos con grupo amino libre incluyendo los ácidos peniciloicos pueden reaccionar y formar productos coloreados. Los resultados por lo tanto, no excluyen la posibilidad de una reacción inespecífica. Para tratar de descartar esta posibilidad, se diseñó un segundo experimento con los medios de cultivo solos y con células. Se incluyó penicilina G y se suprimió la glicina del medio MyS.

SERIE A: 1) M&S con hormonas (2,4-D y kinetina)

2) M&S con hormonas + 1mg/ml de carbenicilina

3) M&S con hormonas y 1mg/ml de penicilina G

SERIE B: 4) M&S sin hormonas

5) M&S sin hormonas + 1mg/ml de carbenicilina

6) M&S sin hormonas + 1mg/ml de penicilina G

SERIE C: 7) M&S sin hormonas y sin glicina

8) M&S sin hormonas, sin glicina + 1mg/ml de carbenicilina

9) M&S sin hormonas, sin glicina + 1mg/ml de penicilina G.

Se prepararon tres matraces de 125 ml con 25 ml de cada uno de los distintos medios con y sin células. A los 8 días se midió la absorbancia a 415 mm de la siguiente manera;

10 ml de cada uno de los matraces con células se centrifugaron a 3000 rpm durante 10'. A 0.2 ml de sobrenadante se les agregaron 4.8 ml de etanol absoluto y 2.5 ml de PDAB (técnica descrita en el punto 3.7 del Capítulo III). Esto se hizo por triplicado. De los matraces sin células se tomaron alícuotas directamente sin centrifugar.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1) No hubo reacción con PDAB en ninguno de los medios sin células; la absorbancia fue en todos los casos cero.

2) En la Fig. 4.18 se puede ver que se encontraron rastros de cromógeno formado por reacción del PDAB con el grupo amino de algún compuesto presente en el sobrenadante co

rrespondiente a los cultivos de células de 8 días de edad incubadas con antibiótico (Serie A 2 y 3 y Serie B 5 y 6. Aunque los resultados sugieren la formación de 6-APA producidos enzimáticamente a partir de la penicilina, los resultados no son concluyentes por lo que se procedió a la identificación de éste por cromatografía en placa fina.

4.7 Determinación de actividad de penicilina amidasa en protoplastos y en extractos celulares.

Los protoplastos se aislaron a partir de cultivos en suspensión de *B. ternifolia* de 7 días de edad (fase de crecimiento lineal) a los cuales se les determinó actividad de penicilina amidasa, siguiendo las técnicas descritas en el punto 3.8 del Capítulo III, con la única variante de que la preparación de protoplastos no fue lavada para evitar que sufrieran lisis antes de hacer la mezcla de reacción.

La mezcla consistió de 2 ml de la preparación de protoplastos en medio MyS + 9% de manitol, 3 ml de buffer de fosfatos 0.03 M pH 8.0 y 0.2 ml de Penicilina G. La actividad enzimática fué determinada por triplicado.

Al mismo tiempo se determinó la actividad de penicilina amidasa en células intactas y en extractos celulares para lo cual se utilizaron células de cultivo en suspensión de 7 días de edad crecidas en medio MyS sin hormonas suplementado con 1 mg/ml de penicilina G.

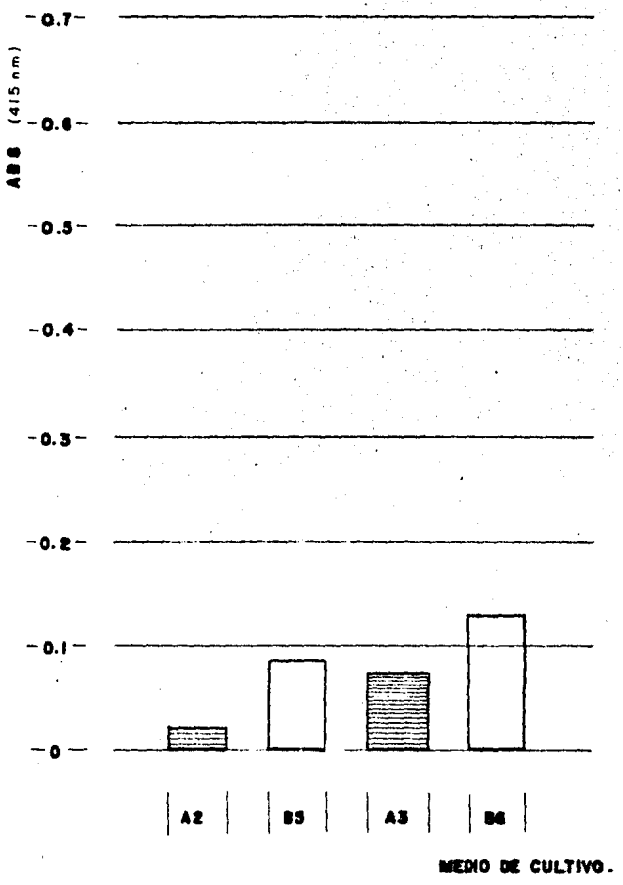


Fig. 4.18 Estimación colorimétrica de 6-APA en el sobrenadante correspondiente a cultivos de células en diferentes medios.

Serie A2 - M&S con hormonas y 1 mg/ml de carbenicilina
A3 - M&S con hormonas y 1 mg/ml de penicilina G
Serie B5 - M&S sin hormonas y 1 mg/ml de carbenicilina
B6 - M&S sin hormonas y 1 mg/ml de penicilina G

Para la obtención del extracto, las células fueron lavadas y homogenizadas a 4°C durante 3 minutos a máxima velocidad. Se centrifugó para bajar restos celulares y la actividad de penicilina amidasa se determinó en el sobrenadante según la técnica empleada para células intactas (Capítulo III 3.8), tomando muestras a los 30 y los 90 minutos de reacción.

Los resultados de las mediciones aparecen en la Figura 4.19 A (células), B (citosol) y C (protoplastos), en los que se puede apreciar lo siguiente:

-- A mayor tiempo de reacción se obtuvo mayor absorbancia.
- Sólo se detectó actividad de penicilina amidasa en células intactas y en extracto celular. No se detectó en protoplastos, debido, probablemente, a que la enzima está asociada a la pared celular de las células de B. ternifolia.

4.8 Determinación de actividad de penicilina amidasa con proteína total.

Para determinar si la enzima está asociada a la pared celular, se midió la actividad de penicilina amidasa en la proteína total obtenida por precipitación con sulfato de amonio al 80% proveniente de 3 tipos de extractos:

a) Un extracto de células de 7 días cultivadas con o sin 1mg/ml de penicilina G homogenizadas a 4°C durante 3 minutos y centrifugado a 3000 rpm para eliminar los restos celulares. El sobrenadante fué saturado con sulfato de amonio al 80% para precipitar la proteína total, la cual fué dia

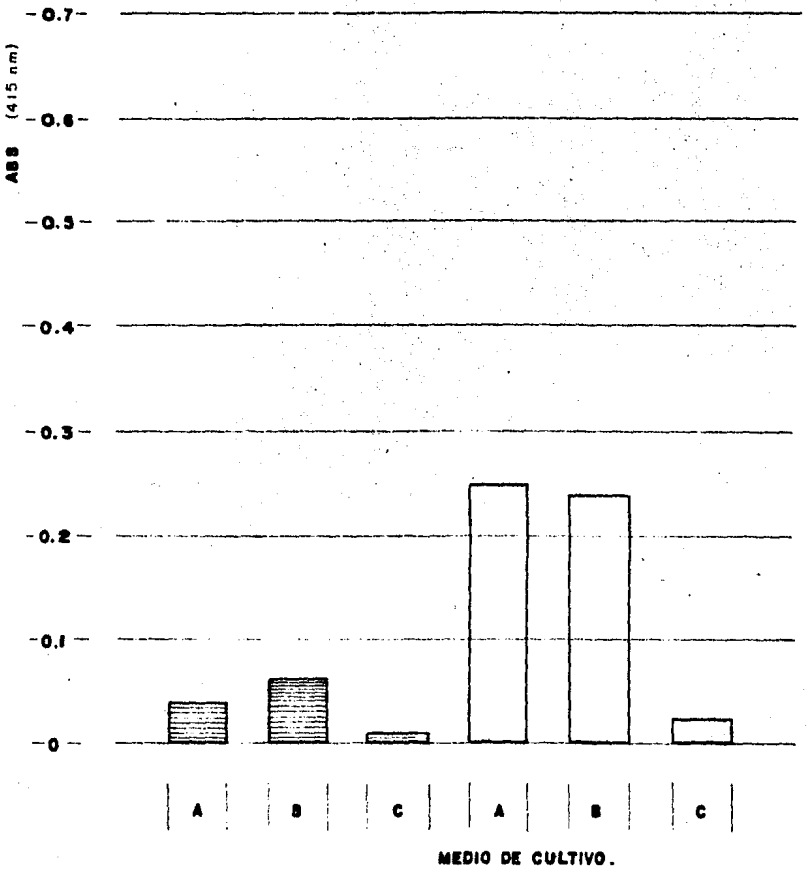


Fig. 4.19 Determinación de actividad de penicilina amidasa en células (A), extracto o citosol (B) y en protoplastos (C) de B. ternifolia.

Tiempo de reacción = 30 minutos

Tiempo de reacción = 90 minutos

lizada contra buffer de fosfatos 0.03 M y cuantificada por el método de Lowry.

b) Un extracto de proteína de la pared celular obtenido del sobrenadante de una preparación de protoplastos saturado con sulfato de amonio al 80%. Esta fracción, que contenía la solución enzimática para la producción de protoplastos más los restos de degradación de la pared celular, recibió el mismo tratamiento que la proteína total obtenida del extracto celular. La solución enzimática consistió de celulasa, driselasa, manitol, sales minerales y sorbitol (ver punto 3.8 del Capítulo III).

c) Un extracto de protoplastos homogenizado a 4°C en buffer de fosfatos 0.03 M pH 8.0. El homogenado fue saturado con sulfato de armonio al 80% para precipitar la proteína total, la cual fue también dializada y cuantificada por el método de Lowry.

La determinación de la actividad de penicilina amidasa se hizo por triplicado para los tres casos por el método empleado con células intactas (técnica descrita en el punto 3.6 del Capítulo III).

La Fig. 4.20 muestra los resultados obtenidos en los que se observa que se detectaron en general rastros de cromógeno con la proteína de los tres tipos de extractos, siendo mayor la cantidad de absorbancia obtenida con la fracción de proteína correspondiente a la solución enzimática + pa-

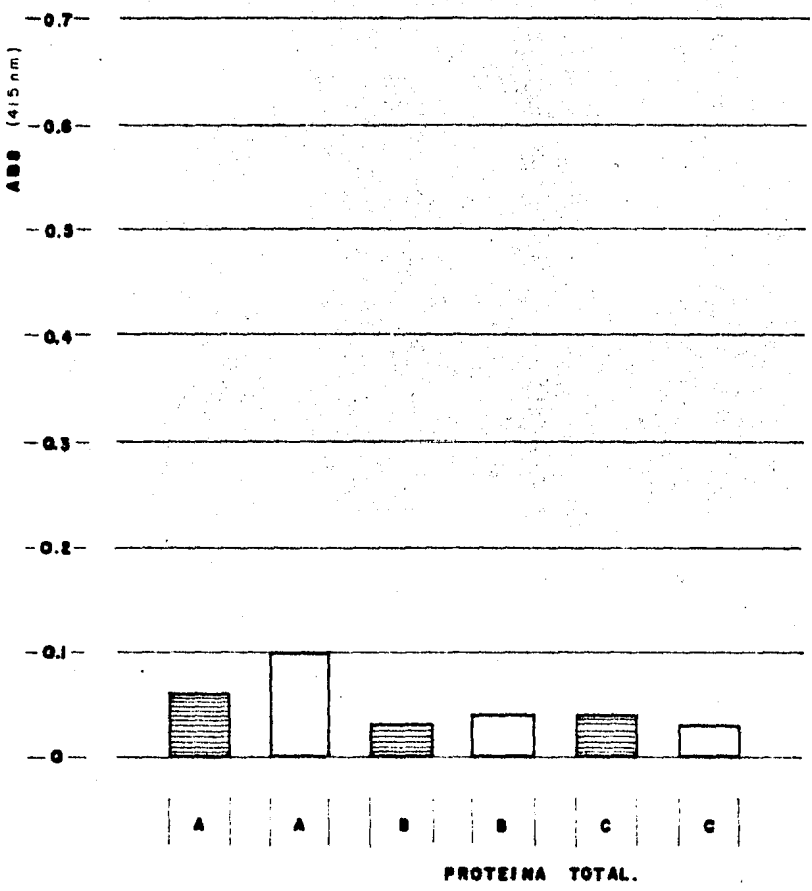


Fig. 4.20 Determinación de actividad de penicilina amidasa en proteína total de pared celular (A), de protoplastos (B) y de extracto celular (C).

Controles: tiempo cero de reacción

Tiempo de reacción: 30 minutos

red celular, tanto en el tiempo cero (control) como a los 30 minutos de reacción.

Esto sugiere nuevamente que la enzima está asociada a la pared de las células de B. ternifolia, pero en tanto no se aumente la sensibilidad del método empleado, estos resultados no son concluyentes puesto que también se detectaron rastros de actividad de penicilina amidasa en protoplastos.

4.9 Determinación de actividad de penicilina amidasa in vitro utilizando la tecnica modificada para B. ternifolia.

En los experimentos anteriores se pudo detectar de una manera indirecta la formación de 6-APA en los cultivos de B. ternifolia al incubarlos con penicilina G y carbenicilina, mediante la técnica de Bomstein y Evans (5) en la cual, el 6-APA reacciona con p-dimetilaminobenzaldehido para formar una base coloreada de Schiff. Sin embargo, el uso de esta técnica, muy utilizada en E. coli, en células de Bouvardia ternifolia presentó varios problemas que pudieran provocar que la estimación de la actividad de penicilina amidasa fuera subestimada o no detectada. Estos problemas fueron:

a) Rango de sensibilidad.

Se observó que esta técnica proporcionaba baja sensibilidad ya que algunas veces sólo se detectaban rastros de cromógeno. Se vió que concentrando un mayor volumen de muestra se detectaba 6-APA, pero si éste era pequeño, no se manifestaba absorbancia, por lo que la presencia

de la enzima algunas veces no era detectada. Además, si la mezcla de reacción se diluía demasiado con buffer o con etanol absoluto, se provocaba una disminución en la sensibilidad del método.

Analizando las determinaciones de la actividad de penicilina amidasa hechas, se puede ver que en todos los casos en los que sólo se detectaron "rastros" de cromógeno, se hicieron las mediciones utilizando células de 7 a 8 días de edad, es decir en inicio de la fase de crecimiento exponencial (Figuras 4.18, 4.19 y 4.20), mientras que cuando se determinó la presencia de 6-APA usando células de 14 días de edad es decir, de fase estacionaria, sí se obtuvo mayor absorbancia (Fig. 4.17).

La actividad de la amidasa puede entonces subestimarse al buscar 6-APA libre en los medios de cultivo de 7 a 8 días de edad debido a que la sensibilidad del método tiene un límite; la curva patrón de concentración de 6-APA contra absorbancia, sólo es lineal en un rango de 600-4000 µg de 6-APA por ml y en células de esta edad, que empiezan a crecer y por lo tanto a utilizar la penicilina como fuente hormonal, la cantidad de 6-APA que podría ser liberado al medio es muy pequeña y no alcanza a ser detectada por el método empleado.

Esta observación también puede indicar que la presencia de la penicilina en el medio de cultivo es lo que estimula la biosíntesis de la penicilina amidasa, y hace que la etapa "lag" de crecimiento sea más larga.

b) Efecto del alcohol absoluto

Se observó que el etanol absoluto, no detiene completamente la reacción, ya que los controles con penicilina a los que se agrega alcohol al tiempo cero, siempre forman cromógeno, pues absorben a 415 nm. Para verificar esto se hicieron algunos experimentos en los que se añadió alcohol desde el tiempo cero de incubación a 40°C y, tanto en los tubos a los que se añadió desde el principio como en los que sólo se agregó para detener la reacción, hubo absorbancia a 415 nm, aunque ésta fué considerablemente menor en los que tenían alcohol desde el tiempo cero. Estos resultados sugieren que debía existir algún problema de permeabilidad que impidió al alcohol penetrar a las células y detener la reacción.

c) Tiempo de reacción.

Se observó que si se aumentaba el tiempo de reacción a 72 horas, se obtenía mayor absorbancia a 415 nm.

d) El desconocimiento de las condiciones óptimas para la medición de la enzima en los cultivos de Bourvardia ternifolia, tales como pH óptimo, concentración de sustrato óptimo, etc., ya que excluyendo este trabajo, no existen reportes hasta esta fecha de la existencia de esta enzima en vegetales, con excepción del reporte de Alburn, Grant y Clark sobre la ficina en árboles del género Ficus (24, 25).

Para tratar de resolver estos problemas y demostrar

con mayor certeza la presencia de penicilina amidasa en *Bouvardia ternifolia*, se decidió hacer cambios a la metodología empleada en la estimación colorimétrica del 6-APA y combinarlo con cromatografía en placa fina, ya que el método colorimétrico no es específico para el 6-APA producido.

Se hicieron dos experimentos de determinación de actividad de penicilina amidasapor estimación colorimétrica del 6-APA, modificando los parámetros de reacción de la siguiente manera:

- Experimento 1, parámetros:

Temperatura de la mezcla de reacción	40°C
pH inicial	8.0
Buffer de fosfatos	0.03 M
Concentración de penicilina	25 mM
* Tiempo de reacción	70 Hrs.

* = Modificación

- Se tomaron alícuotas de 15 ml de cultivos de *B. ternifolia* en suspensión en fase estacionaria crecida en un medio con hormonas sin penicilina (caso I) o en un medio sin hormonas suplementado con penicilina G (caso II), y se centrifugaron a 3000 rpm 15 min. Se prepararon 2 mezclas de reacción para cada caso resuspendiendo el paquete celular empacado en los siguientes medios:

a) Buffer de fosfatos + penicilina G

b) Buffer de fosfatos + penicilina G + DMSO

- Se pusieron 3 tipos de mezclas sin penicilina, sin celulas y con alcohol desde el principio. Todas las mezclas de reacción fueron colocadas en matraces de 250 ml y puestas a incubar en un baño de 40°C con agitación constante por espacio mínimo de 70 horas.

Se tomaron 2 muestras de 2 ml cada una de cada matraz a partir de las 70 horas de reacción. A una muestra se le agregaron 4.8 ml de etanol absoluto, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min, se decantó y al sobrenadante se le adicionó 2.5 ml de PDAB. A la otra muestra no se le agregó alcohol, sólo se le adicionó 2.5 ml de PDAB.

En la Figura 4.21 se presentan los resultados que se obtuvieron con las muestras a las que no se les agregó etanol absoluto para detener la reacción y la Figura 4.22 los resultados obtenidos con las muestras a las que sí se les agregó alcohol absoluto. Tanto las muestras de los controles como las tomadas en el tiempo cero al inicio de la incubación a 40°C, no presentaron absorbancia. En estas gráficas podemos observar que:

- El etanol absoluto agregado para detener la reacción, provoca una gran disminución en la detección de 6-APA, y por tanto en la sensibilidad de la técnica, (Fig.4.22). Esto puede deberse a problemas de permeabilidad a nivel de pared y membrana, o a que se diluye la muestra de reacción al agregarle alcohol.
- Se observa un pico máximo de absorbancia en todos los casos, a las 70 horas de reacción.
- Las células que provenían de cultivos mantenidos en un me

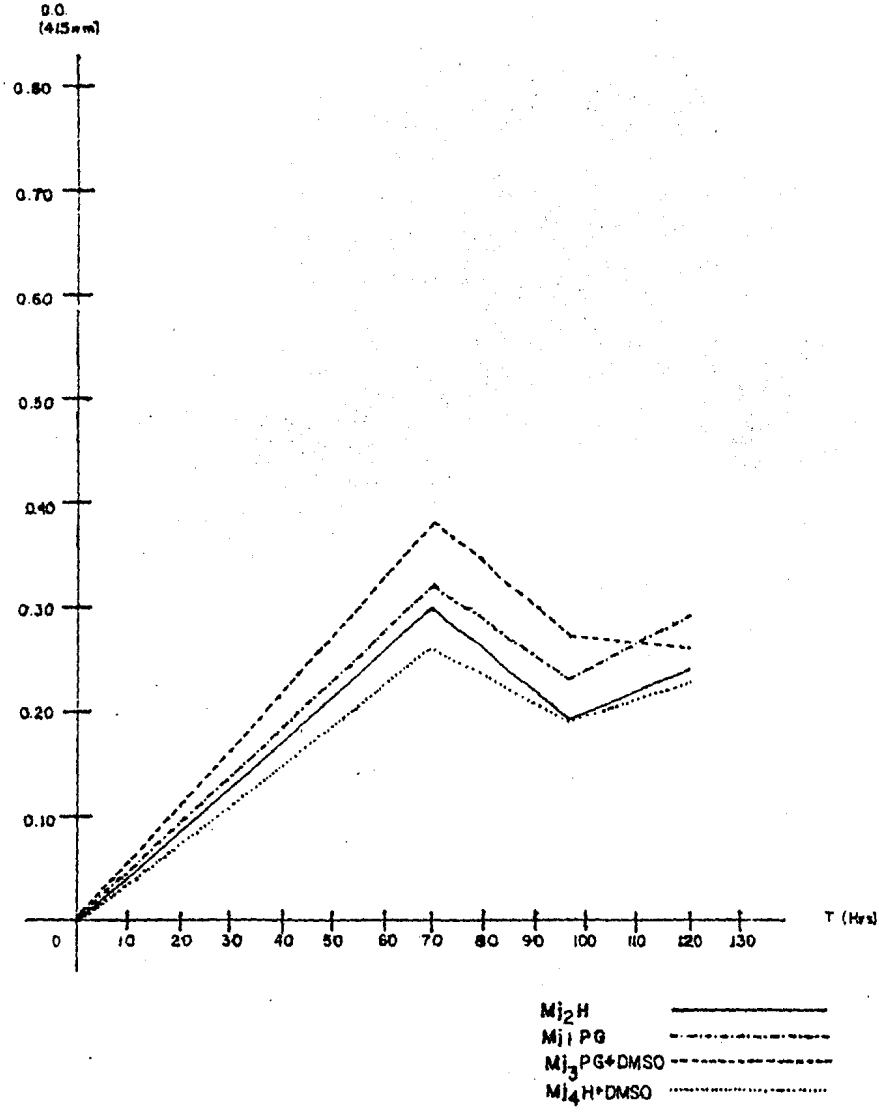


Fig. 4.21 Determinación de actividad de penicilina amidasa en cultivos en suspensión de B.ternifolia sin agregar alcohol absoluto para parar la reacción.
pH de reacción = 8.0

Mezclas de reacción:

1	con penicilina G
2	con hormonas
3	con penicilina G + DMSO
4	con hormonas + DMSO

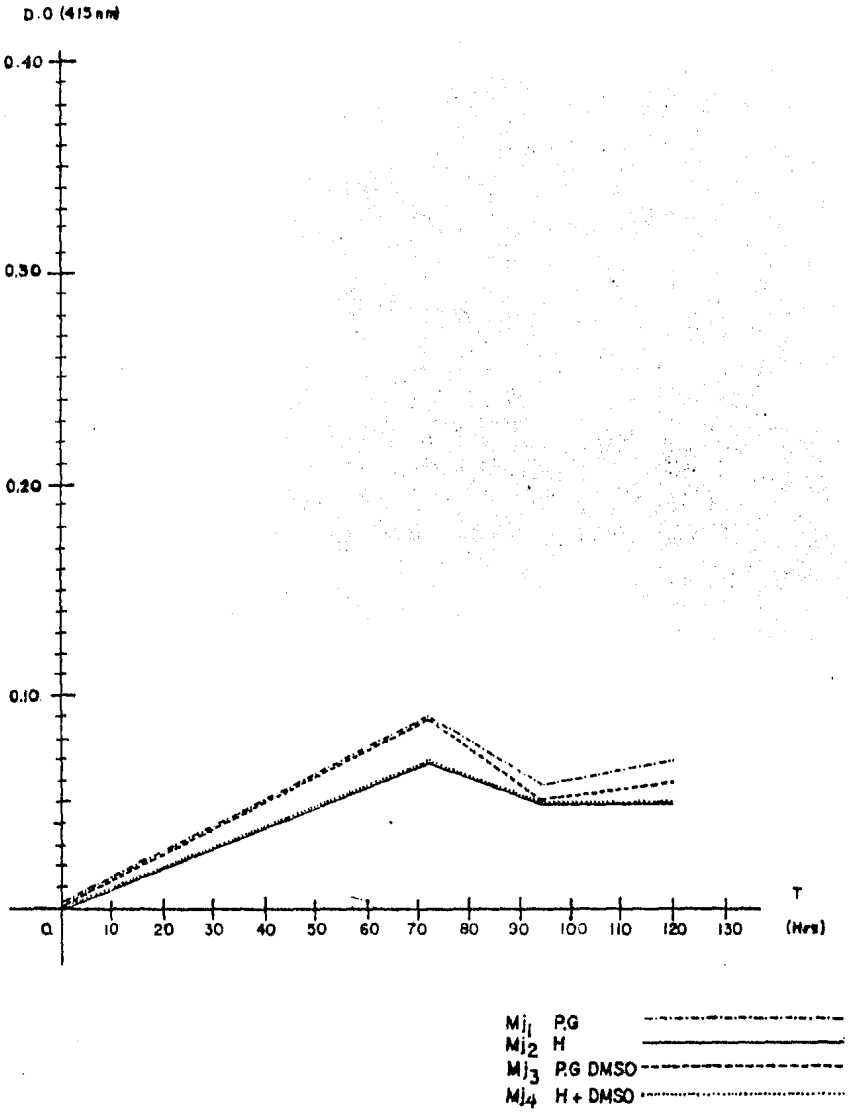


Fig. 4.22 Determinación de actividad de penicilina acilasa en cultivos en suspensión de B. ternifolia agregando alcohol absoluto para parar la reacción.
pH de reacción = 8.0

Mezclas de reacción:

1 con penicilina G
2 con hormonas
3 con penicilina G + DMSO
4 con hormonas + DMSO

dio carente de hormonas suplementado con penicilina, son las que presentan una mayor absorbancia, y por tanto, las que producen mayor cantidad de 6-APA, tanto en presencia de DMSO como en ausencia de éste. La mayor absorbancia se presentó en las que se les agregó DMSO.

- El DMSO no resuelve el supuesto problema de permeabilidad ya que aunque sí se obtuvo una mayor absorbancia al agregar éste a las células que habían sido crecidas con penicilina, no ocurrió lo mismo al agregarlo a las células que habían sido crecidas con hormonas.

- Experimento 2, parámetros:

Temperatura de la mezcla de reacción	40°C
* pH inicial	6.0
Buffer de fosfatos	0.03 M
Concentración de penicilina	25 mM
* Tiempo de reacción	70 hrs.

* = Modificaciones

- Se tomaron alícuotas de 15 ml de cultivos de B. ternifolia en suspensión en fase estacionaria cultivada en un medio con hormonas sin penicilina (caso I) o en un medio sin hormonas suplementado con penicilina G (caso II). Se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. y se resuspendieron en buffer de fosfatos 0.03 M pH 6.0 + penicilina G.

Se pusieron como control 2 mezclas que contenían células I ó II y buffer, pero sin penicilina. Todas las mezclas de reacción fueron colocadas en matraces de 250 ml y puestas a incubar al mismo tiempo que todas las mezclas del experimento 1, en un baño a 40°C con agitación constante durante un mínimo de 70 horas.

Se tomaron también 2 muestras de 2 ml cada una de cada matraz a partir de las 70 horas de incubación. A una muestra se le agregó etanol absoluto y PDAB y a la otra se le agregó solamente PDAB. La Fig. 4.23 muestra los resultados obtenidos con las muestras a las que no se les agregó etanol absoluto para parar la reacción, mientras que la Fig. 4.24 muestra los resultados obtenidos con las muestras a las que sí se les agregó alcohol. Debido a que este experimento se realizó al mismo tiempo que el experimento 1, y por tanto, en las mismas condiciones, podemos hacer una comparación entre los resultados de ambos, destacando las siguientes observaciones:

- Se obtiene mayor absorbancia con las mezclas de reacción a pH 6.0 (experimento 2) que a pH 8.0 (experimento 1).

- Los controles en ambos experimentos, así como las muestras tomadas en el tiempo cero al inicio de la incubación, no presentaron absorbancia.

- Al igual que en el experimento 1, se observa en el experimento 2 un pico máximo de absorbancia a las 70 horas de reacción así como el que las células que habían sido cultivadas con penicilina (caso II), son las que presentan una mayor absorbancia, es decir, presentan mayor actividad de penicilina amidasa.
- El etanol absoluto agregado para detener la reacción provocó también en el experimento 2 una disminución en la detección de 6-APA (Fig. 4.24).

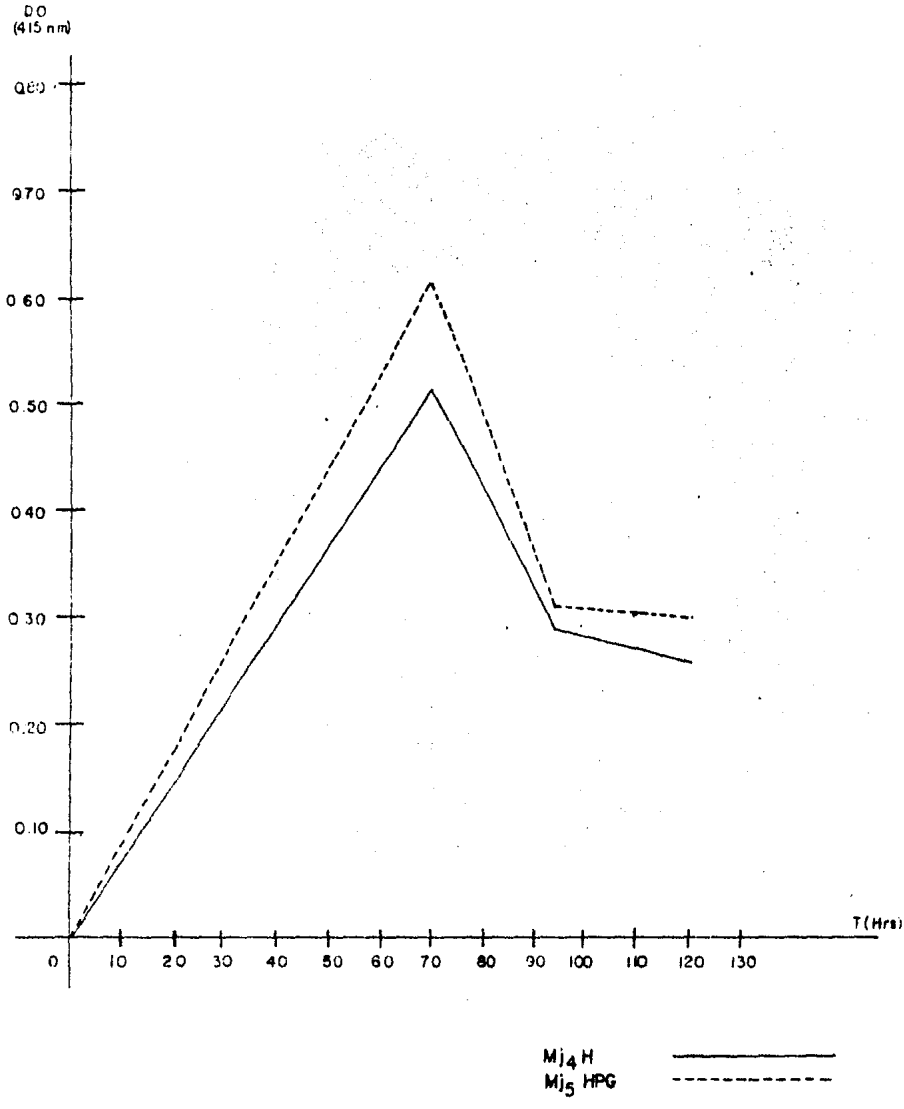


Fig. 4.23 Determinación de actividad de penicilina amidasa sin utilizar etanol absoluto.
pH de reacción = 6.0

Mezclas de reacción:

Mj4 con hormonas

Mj5 con penicilina G

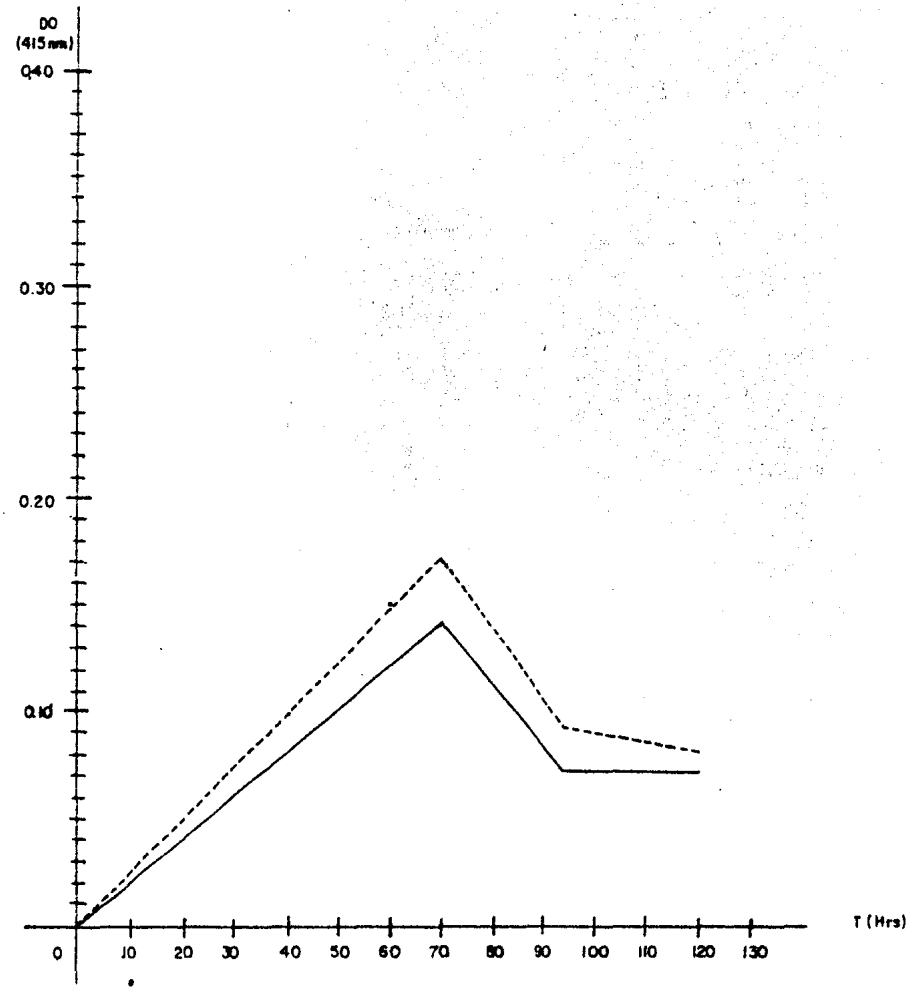


Fig. 4.24 Determinación de actividad de penicilina amidasa utilizando etanol absoluto.
pH de reacción = 6.0

Mezclas de reacción:

con hormonas + alcohol ————————

con penicilina G + alcohol - - - - - - - - - - -

Por lo tanto, estos dos experimentos realizados simultáneamente, nos mostraron que para la detección de 6-APA como producto de reacción de una acilasa presente en Bouvardia ternifolia, debíamos cambiar el pH de reacción a 6.0 y que debíamos utilizar otra sustancia o método para detener la reacción que no fuera alcohol absoluto, ya que éste disminuye la sensibilidad de detección de la técnica con PDAB.

4.10 Determinación de actividad de penicilina amidasa por identificación de 6-APA en cromatografía en placa fina.

Para detectar la aparición de 6-APA como medida de la actividad de penicilina amidasa, se incubaron células de B. ternifolia con penicilina G en diferentes condiciones, y el producto de las reacciones se identificó directamente por cromatografía en placa fina.

Se utilizaron células de cultivos en suspensión de 13 días de edad, en fase estacionaria, que habían sido crecidas en un medio carente de hormonas suplementado con 2 mg/ml de penicilina G. Se prepararon 5 tubos de cada mezcla de reacción con las siguientes condiciones:

2 ml de celulas resuspendidas en buffer	2×10^5 celulas/ml
Temperatura de la mezcla de reacción	40°C
pH inicial	5.0,6.0,7.0 y 8.0
Buffer de fosfatos	0.3 M
0.1 ml de penicilina	25 mM
Tiempo de reacción	30', 60' y 90'

Se pusieron también controles sin céiulas y sin penicilina G.

Se tomaron alícuotas de 0.2 ml de cada tubo en el tiempo cero y a los 30', 60' y 90 min de reacción. Se apartaron 5 µl de cada muestra para utilizarlas como problema a identificar por cromatografía.

Para la identificación del producto de reacción se utilizó la técnica descrita en el punto 3.9 del Capítulo III. Cada placa se dividió en carriles, y en cada uno se puso la muestra problema de 5 ul a una distancia de 3 cm del borde de la placa. Se pusieron también 5 µl de solución de 6-APA, 5 ul de solución de penicilina G y 5 µl de solución de ácido fenil acético como testigos.

Los resultados obtenidos fueron:

- En todos los carriles con muestra problema aparecieron manchas con el mismo Rf que la mancha correspondiente a la solución de 6-APA puesta como testigo.
- Las manchas más intensas y grandes se observaron con las muestras correspondientes a los pH de reacción 8.0 y 7.0, mientras que a pH 5.0 y 6.0 aparecen más pequeñas y presentan además una mancha con igual Rf que la penicilina testigo.
- No se detectó ninguna mancha de ácido fenilacético.

Es interesante hacer notar que el pH con el que se detectó mayor cantidad de producto con el método de cromatografía en placa fina no es el mismo que el pH con el que se detectó mayor cantidad de cromógeno utilizando la técnica colorimétri

ca con PDAB, ya que con las cromatoplacas se obtuvo más 6-APA a pH 7.0 y 8.0, mientras que con PDAB, el pH 6.0 fué con el que se obtuvo mayor absorbancia. Esto puede indicar que el pH óptimo de acción de la penicilina amidasa, es diferente del pH al cual reacciona el PDAB con el producto 6-APA para formar la base de Schiff que se mide colorimétricamente.

La detección directa de 6-APA en cromatografía en placa fina, indica que las células de Bouvardia ternifolia rompen la penicilina liberando 6-APA, debido a la acción de una penicilina amidasa.

4.11 Efecto del ácido fenil acético en el crecimiento de cultivo de B. ternifolia.

Una vez que se detectó que B. ternifolia posee una enzima con actividad de penicilina amidasa, que uno de los productos de reacción es el 6-APA y que éste por sí sólo no produce crecimiento de los cultivos (punto 4.3 de este capítulo), la hipótesis siguió siendo la misma " la actividad auxínica de la carbenicilina y de la penicilina G se debe a que una amidasa libera la cadena lateral la cual es transformada en auxina". El siguiente punto a investigar fué entonces en qué compuesto auxínico es transformada la cadena lateral de la molécula de penicilina.

Como se había mencionado anteriormente, si se separa la cadena lateral de la carbenicilina por acción de una ami

dasa, el producto liberado es el ácido fenil malónico el cual es fácilmente descarboxilado para producir ácido fenil acético. En el caso de la penicilina G, la cadena lateral separada del 6-APA correspondería al ácido fenil acético. Existen reportes en la literatura (46, 64) que indican que este ácido posee actividad auxínica, por lo que este producto se convirtió en el principal candidato para explicar la actividad auxínica de estas penicilinas.

Sin embargo, en un experimento anterior obtuvimos resultados contradictorios:

- En la determinación de penicilina amidasa *in vivo* usando N-fenilacetilnitroanilina, no hubo crecimiento en ningún tubo con células de *B. ternifolia*, a pesar de que se libera ácido fenil acético por acción de una amidasa, que hace que se rompa el enlace que une a éste con la p-nitroanilina que tiñó intensamente de amarillo el medio de cultivo, aunque posiblemente el compuesto coloreado pudo haber producido efecto inhibitorio sobre el cultivo.

  En la determinación de la actividad de penicilina amidasa por identificación de los productos de reacción en cromatografía en placa fina, no se pudo detectar ácido fenil acético ya que los vapores de yodo utilizados para la identificación de las manchas son retenidos fuertemente por 6-APA, y en menor grado por la penici

lina, pero no son retenidos por el ácido fenil acético ya que tampoco se identificó la mancha correspondiente a este ácido puesto como testigo.

Para descartar la hipótesis de que la auxina que se produce es el ácido fenil acético se investigó si este ácido por sí sólo tiene alguna actividad en el crecimiento de Bouvardia ternifolia. Se diseñó un experimento en el que se probaron primero concentraciones de ácido fenil acético del orden de 10^{-6} M, equivalentes a la concentración de 2,4-D que se usa para el mantenimiento de los cultivos (4.5×10^{-6}M). Las concentraciones de ácido fenil acético probadas en callos fueron 2×10^{-6}M, 4×10^{-6}M y 8×10^{-6}M, en forma de sal de sodio, en medio basal MyS sin hormonas. Estas concentraciones se probaron también en medio MyS con hormonas (2,4-D y kinetina); como control se prepararon también 5 frascos sin hormonas + ácido fenilacético. En cada uno de los frascos se sembró 1g de peso fresco de callo de B.ternifolia en fase estacionaria y se evaluó el crecimiento por incremento en el peso fresco a los 30 días de cultivo.

La Tabla 12 del apéndice y la Fig. 4.25 muestran los resultados en los que podemos apreciar que:

- No hubo crecimiento en los callos de B. ternifolia con ninguna de las concentraciones probadas de ácido fenil acético como única fuente de auxina.
- El ácido fenil acético redujo levemente el crecimiento de los cultivos tanto en medio suplementado con hormonas como

carente de ellas.

Estas concentraciones de ácido fenil acético pudieron haber sido muy bajas para mostrar una actividad auxínica, por lo que se procedió a probar concentraciones mayores.

Si la penicilina fuera degradada al 100% por la acción de la penicilina amidasa, la cantidad de ácido fenil acético que podría liberarse al medio sería de 1.5×10^{-3}M con 2 mg/ml de penicilina, 0.8×10^{-3}M con 1 mg/ml de penicilina y 4×10^{-4}M con 0.5 mg/ml de penicilina.

Se probaron por lo tanto, concentraciones de 1×10^{-3}M, 1×10^{-4} y 1×10^{-5}M de ácido fenil acético solo y, puesto que el 6-APA es uno de los productos de la reacción al agregar penicilina, se añadió éste en concentraciones equimolares.

Todos los frascos fueron inoculados con 1 g de peso fresco de callo en fase estacionaria y se incubaron a 28°C y 1000 lux de intensidad luminosa; la Tabla 13 del apéndice y la Fig. 4.26 muestran los resultados del incremento en peso fresco a los 30 días de cultivo:

- No hubo un crecimiento significativo en ningún caso excepto en los frascos que tenían medio MYS suplementado con hormonas (2,4-D y kinetina). Sin embargo sí hubo una pequeña estimulación del crecimiento a concentraciones de 1×10^{-3}M y 1×10^{-4}M; los resultados, sin embargo, no nos permiten concluir que el ácido fenil acético solo ejerza alguna actividad auxínica a las concentraciones

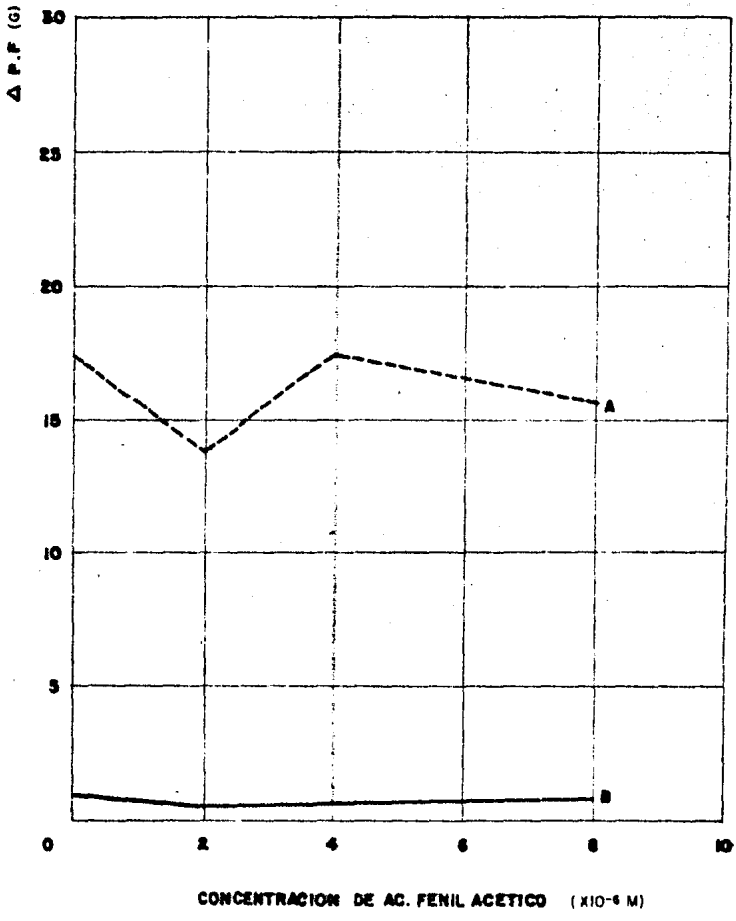


Fig. 4.25 Efecto del ácido fenilacético en el crecimiento de cultivos de B. ternifolia.

A - M&S + hormonas (1 mg/l de 2,4-D y 0.05 mg/l de kinetina).

B - M&S

ΔP.F = incremento en peso fresco a los 30 días de cultivo a 28°C y luz continua de 1000 lux.

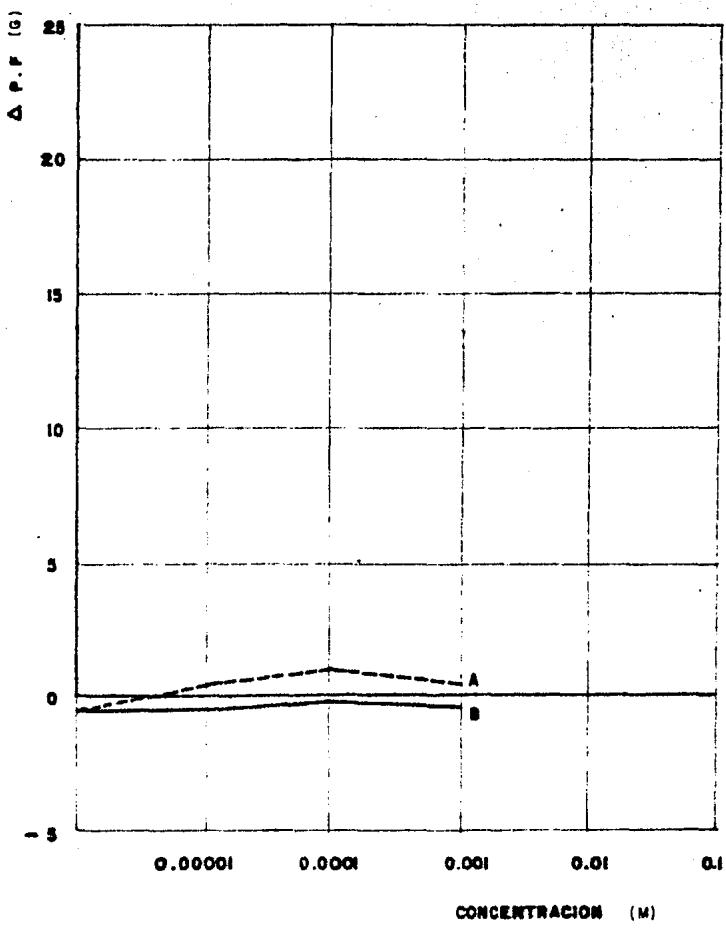


Fig. 4.26 Efecto del ácido fenil acético solo y con 6-APA en el crecimiento de callos de B. - ternifolia.

A M/S + ácido fenilacético

B M/S + ácido fenilacético + 6-APA (equimolares)

P.F = incremento en peso fresco a los 30 días de cultivo.

probadas.

- Tampoco hubo un crecimiento significativo con ácido fenil acético + 6-APA en cantidad equimolar con respecto al control.

Estos resultados no concuerdan con la hipótesis de que la actividad auxínica de la penicilina G se deba a la liberación de ácido fenil acético y abre nuevas interrogantes que serán discutidas en el siguiente punto de este Capítulo.

4.12 Discusión final

En los experimentos anteriores, se obtuvo que las células de B. ternifolia poseen una penicilina amidasa que les permite utilizar a ciertas penicilinas como fuente hormonal para su crecimiento. Sin embargo no está claro cuál es la auxina o los compuestos que se producen a partir de la penicilina responsables del crecimiento de los cultivos. Existen varias interrogantes con respecto a estos resultados, que son las siguientes:

A) ¿La cadena lateral de la penicilina es transformada en otro catabolito con actividad auxínica que no necesariamente sea el ácido fenil acético?

Obviamente esto es muy posible, pero antes de descartar al ácido fenil ácetico como la auxina probable resultante de la liberación de la cadena lateral de la penicilina G y de la carbenicilina es necesario probar si concentraciones más altas (10^{-2}M) de éste, sí muestran

actividad auxínica. También debe investigarse si el ácido fenil acético necesita la presencia de una citocinina para mostrar actividad auxínica.

Existen reportes de varios autores (46) de que en muchos tejidos vegetales la citocinina es inactiva para promover la división celular en ausencia de auxina, y de que ésta a su vez, en ausencia de una citocinina, sólo produce alargamiento celular pronunciado pero no se dividen las células, es decir, los cultivos requieren de ambas para su crecimiento. Por tanto, el siguiente paso sería investigar qué ocurre a las células de B. ternifolia si se las cultiva con ácido fenil acético más kinetina, y también probar la actividad de otras penicilinas tales como la penicilina V, ya que ésta sería hidrolizada en 6-APA y ácido fenoxiacético, que como se sabe, tiene actividad auxínica.

B) ¿Indica la penicilina la síntesis de otros reguladores? Es probable que toda la molécula de penicilina sea importante y que no sólo sirva como precursora de auxina sino también de alguna citocinina, puesto que la penicilina sola produce el mismo efecto que la auxina y kinetina juntas. Además, con los resultados de varios experimentos se observa que se retarda la fase lag del crecimiento al agregar penicilina y esto podría ocurrir porque se estuvieran formando hormonas a partir del antibiótico precursor o porque la penicilina activara a procesos de biosíntesis de hormonas. Nickell y Finlay (49) en 1954

estudiando la estimulación del crecimiento con oxitetraciclina en Lemna minor encontraron que cuando aumentaban los períodos de crecimiento, aumentaba considerablemente la estimulación resultante, y que esto sugiere que la estimulación del crecimiento obtenida puede ser debida a los productos de degradación de la oxitetraciclina más bien que a la molécula de antibiótico por sí misma. Observaron además que el metabolismo hormonal de la planta tratada estaba afectado.

C) ¿ Incrementa de alguna manera la actividad auxínica la unión al 6-APA (el enlace amida)?

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que esto ocurre en las células de B.ternifolia, ya que el ácido fenil acético sólo no es significativamente activo a las concentraciones probadas pero sí lo es unido al 6-APA (penicilina G). Nickell y Celmer en 1965 (54) reportaron que el AIA y el ácido fenoxiacético que por sí solos son auxinas activas, lo son mucho más en forma de sus derivados penicilínicos al estudiar el efecto de algunos antibióticos in vitro de Lemna minor. Reportan también que el ácido fenil acético sólo no produce crecimiento pero en unión con el 6-APA (penicilina G) sí es activo; y que el 6-APA por sí sólo también estimula el crecimiento.

¿Quiere decir esto que las penicilinas son más permeables, es decir, entran más fácilmente las auxinas a las células en forma de penicilina que solas? nuestros resultados concuerdan con esto, pero no con el reporte de

que el 6-APA estimula el crecimiento, por lo que es necesario probar si hay crecimiento en B. ternifolia al suplementar el medio con 6-APA en presencia de kinetina.

La solubilidad en lípidos de moléculas no ionizadas es uno de los factores importantes que determinan el paso de drogas a través de membranas biológicas.

La penetración de moléculas a través de éstas puede depender de los cambios en el carácter lipofílico del compuesto (3). ¿Son entonces más lipofílicas las auxinas en forma de derivado penicilínico? aunque también podría ocurrir que hubiera receptores a nivel de membrana o de pared celular que reconocieran a compuestos tipo penicilina.

Con respecto a la actividad de penicilina amidasa encontrada en los cultivos de B. ternifolia existen varios problemas muy interesantes de resolver, como el de que cuál es el papel fisiológico que juega esta enzima en los organismos que no producen antibiótico. Aunque podría pensarse que juega un papel de protección contra penicilinas producidas naturalmente en el suelo por hongos.a cuya influencia, podrían estar expuestas las raíces, se ha reportado que en general les confiere una ventaja nutricional en presencia de algunos sustratos fenilacetilados (25,74). Acevedo y Cooney (1) encontraron que la penicilina amidasa de Bacillus megaterium se produce como un metabolito asociado con el crecimiento. Nyiri (55) comparó la desacilación de la penicilina G y de la fenilacetilglicina en E. coli y encontró que la actividad de la penicilina amidasa era inherente a la fase de crecimiento exponencial. Los resultados presentados en este trabajo concuerdan con estas observanciones reportadas.

Gotovtseva y colaboradores (23, 74) detectaron actividad de penicilina amidasa en Bacterium faecalis alcaligenes y encontraron que el triptofano y otros derivados indólicos así como el ácido antranílico estimulaban la biosíntesis de penicilina amidasa. También Cole (16), Kaufmann y Bauer (32) y Lucente (38), reportan en bacterias que la enzima es una fenilacetilasa o una amidasa que puede interferir en el metabolismo de acilamidas y derivados, así como en el matabolismo del triptofano.

En células vegetales hasta la fecha no existen reportes de esto, sin embargo, si la enzima tiene relación con el metabolismo del triptofano y otros derivados indólicos en bacterias, es posible que ocurra lo mismo en las células de B. ternifolia y que como estos compuestos son precursores del AIA, la penicilina amidasa sintetice auxina.

Con respecto al sitio de acción de la penicilina amidasa, existen varios reportes en bacterias: de acuerdo a Lepidi y colaboradores (36), la hidrólisis de la penicilina G a 6-APA, está acoplada con la transferencia del grupo fenil acetil a receptores celulares principalmente a constituyentes de la pared celular. También Pruess y Johnson (60) encontraron en estudios de fraccionación con la penicilina amidasa de E. coli, que la mayor actividad está en la fracción correspondiente a la pared celular. Los resultados obtenidos en esta tesis con células vegetales concuerdan con esto, ya que en la prepurificación de la penicilina amidasa por saturación con sulfato de amonio se obtuvo mayor actividad en la fracción correspondiente a la pared celular.

V.- CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

El objetivo inicial de esta tesis fue el de investigar los siguientes puntos:

a) Determinar si la carbenicilina tiene actividad auxínica en los cultivos de *B. ternifolia*.

b) ¿Qué otras penicilinas producen este efecto?

c) ¿ A qué se debe este efecto?

La respuesta a estas preguntas está dada por las siguientes conclusiones:

1) *B. ternifolia* no crece en un medio carente de hormonas.

2) La presencia de carbenicilina o de penicilina G son determinantes para el crecimiento en un medio carente de hormonas.

3) Las penicilinas que fueron activas para producir crecimiento fueron únicamente aquellas en las que la cadena lateral correspondía a una auxina (carbenicilina y penicilina G) por lo que los cambios en la cadena lateral de la penicilina modifican la actividad producida.

4) En los cultivos de *B. ternifolia* suplementados con penicilina, no ocurre una degradación espontánea significativa. La degradación es principalmente de tipo enzimático debido a una penicilina amidasa.

5) El 6-APA es uno de los productos de la reacción catalizada por la penicilina amidasa de *B. ternifolia*.

6) Los resultados obtenidos sugieren que el sitio de acción de la penicilina amidasa es principalmente a nivel de la pared celular.

VI APENDICE

TABLA 1. Medio utilizado para el cultivo de tejidos de *Bouvardia ternifolia* (Murashige y Skoog 1962)

COMPUESTO		CONCENTRACION (mg/l)
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	1650
Nitrato de potasio	KNO_3	1900
Cloruro de calcio	$CaCl_2.H_2O$	440
Fosfato de potasio	KH_2PO_4	170
Sulfato de magnesio	$MgSO_4.7H_2O$	370
Acido bórico	H_3BO_3	6.2
Cloruro de cobalto	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Sulfato de cobre	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Sulfato de manganeso	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
Sulfato de zinc	$ZnSO_4.4H_2O$	8.6
EDTA (2Na)		37.3
Sulfato ferroso	$FeSO_4.7H_2O$	28.8
Glicina		2.0
Meso-inositol		100
Acido nicotínico		0.5
Piridoxina HCl		0.5
Tiamina HCl		0.1
Sacarosa		30000.0
Agar		1.0%
pH 5.7		

+ Este medio se referirá como medio basal M&S

TABLA 2. Soluciones concentradas del medio MyS

SOLUCION	mg/l
Solución A	
$CaCl_2.2H_2O$	44000
Solución B	
NH_4NO_3	16500
KNO_3	19000
Solución C	
KI	83
$CoCl_2.6H_2O$	2.5
Solución D	
KH_2PO_4	17000
H_3BO_3	620
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25
Solución E	
$MgSO_4.7H_2O$	37000
$MnSO_4.4H_2O$	1700
$CuSO_4.5H_2O$	2.5
$ZnSO_4.7H_2O$	0.86
Solución F	
$FeSO_4.7H_2O$	5570
Na_2EDTA	7450
Solución G	
Glicina	50
Piridoxina HCl	12.5
Acido nicotínico	12.5
Tiamina HCl	2.5
Meso-inositol	2500

TABLA 3. Cantidades necesarias de las soluciones concentradas para preparar 1 litro de medio MyS.

SOLUCION	ml/l DE MEDIO
A	10.0
B	100.0
C	10.0
D	10.0
E	10.0
F	5.0
G	40.0

PREPARACION DEL PDAB (REACTIVO DE EHRLICH):

Pesar 1 g de p-dimetilaminobenzaldehido (Baker) y disolver en 50 ml de etanol al 60%. Adicionar 0.5 ml de H_2SO_4 concentrado y aforar a 100 ml con el alcohol etílico al 60% (p/v).

TABLA 4

Preparación del medio YEB:

Extracto de levadura	1.0 g/l
Extracto de carne	5.0 "
Peptona	5.0 "
Sacarosa	5.0 "
$MgSO_4.7H_2O$	2 ml/l de una solución 1 M.

Preparación del medio Luria:

Bacto triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 "
NaCl	10 "

Llevar a pH = 7.0

Para medio Luria o YEB sólido:

agregar bacto-agar 15 g/l

TABLA 5

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CARBENICILINA EN EL CRECIMIENTO DE BOUVARDIA TERNIFOLIA

	0 mg/ml		.5 mg/ml		1 mg/ml		2 mg/ml	
	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2
MS - H	1.19g	1.22g	1.02g	14.39g	1.1g	18.78g	1.15g	18.69g
	σ=0.12	σ=1.1	σ=0.25	σ=1.13	σ=0.18	σ=3.17	σ=0.22	σ=0.68
	ΔP=0.03g		ΔP=13.37g		ΔP=17.68g		ΔP= 17.54g	
MS + H	1.16g	17.00g	1.2g	17.02g	1.0g	19.5g	0.99g	14.26g
	σ=0.21	σ=3.15	σ=0.16	σ=4.46	σ=0.17	σ=0.57	σ=0.23	σ=3.54
	ΔP=15.84g		ΔP=15.82g		ΔP=18.05g		ΔP=13.27g	

MS-H: Medio basal sin hormonas

MS+H: Medio basal con hormonas (1mg/l de 2,4-D y 0.05 mg/l de kinetina)

P.F.1= peso fresco inicial (promedio de al menos 5 repeticiones)

P.F.2= peso fresco a los 30 días de cultivo (promedio de por lo menos 5 repeticiones).

ΔP = incremento en peso fresco

σ = desviación standard

TABLA 6

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CARBENICILINA Y DE 2,4-D EN EL CRECIMIENTO DE BOUVARDIA TERNIFOLIA

	0 ANT.		1/4 ANT.		1/2 ANT.		1 ANT.		2 ANT.	
	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2
MS - H	0.655g	0.996g	1.483	3.09g	1.457g	9.722g	1.4g	15.732g	1.6g	14g
	σ=0.276	σ=0.211	σ=0.201	σ=0.58	σ=0.099	σ=0.336	σ=0.5g	σ=0.567	σ=0.4g	σ=0.68
	ΔP=0.340g		ΔP=1.607g		ΔP=8.265g		ΔP=14.332g		ΔP=12.40g	
MS + K	0.53g	1.26g	1.50g	2.50g	1.62g	3.11g	1.36g	15g6g	1.6gg	14.58g
	σ=0.27	σ=0.36	σ=0.23	σ=0.38	σ=0.33	σ=0.26	σ=0.18	σ=1.35	σ=0.57	σ=2.20
	ΔP=0.72g		ΔP=1.0g		ΔP=1.488g		ΔP=14.6g		ΔP=12.89g	

MS-H: Medio basal sin hormonas
MS+K: Medio basal con kinetina (o.05 mg/l)
P.F.1: Peso fresco inicial (promedio de al menos 5 repeticiones)
P.F.2: Peso fresco a los 30 días de cultivo(promedio de 5 repeticiones)
σ: Desviación standard
ΔP: Incremento en peso fresco

TABLA 7

EFECTO DE VARIAS CONCENTRACIONES DE 2,4-D EN EL CRECIMIENTO DE *B. TERNIFOLIA*

MEDIO	0 mg/l		0.25 mg/l		0.5 mg/l		1 mg/l		2 mg/l	
	Pi	Pf	Pi	Pf	Pi	Pf	Pi	Pf	Pi	Pf
MS + K	0.53g	1.26g	0.64g	16.66g	0.52g	14.97g	0.55g	16.25g	0.52g	12.6g
	σ=0.27	σ=0.36	σ=0.09	σ=0.78	σ=0.15	σ=0.47	σ=0.13	σ=1.11	σ=0.09	σ=2.54
	ΔP=0.72g		ΔP=16.02g		ΔP=14.447g		ΔP=15.7g		ΔP=12.08g	

MS+K: Medio basal con kinetina (0.05 mg/l)
Pi: Peso inicial (promedio de al menos 5 repeticiones)
Pf: Peso final (promedio de al menos 5 repeticiones)
ΔP: Incremento en peso fresco a los 30 días de cultivo
σ: Desviación standard

TABLA 8

EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILÁNICO EN EL CRECIMIENTO DE BOUVARDIA TERNIFOLIA

	0 mg/ml		0.5 mg/ml		1 mg/ml		2 mg/ml	
	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2
MS - H	1.07g	1.47g	1.70g	1.46g	1.55g	1.44g	2.12g	1.84g
	σ=0.19g	σ=0.16	σ=0.59g	σ=0.62	σ=0.41	σ=0.52	σ=0.25	σ=0.4
	ΔP=0.4g		ΔP=-0.24g		ΔP=-0.11g		ΔP=-0.28g	
MS + H	0.98g	19.61g	1.49g	19.81	1.91	20.4g	1.8g	19.69g
	σ=0.02	σ=0.10	σ=0.17	σ=0.25	σ=0.36	σ=0.51	σ=0.23	σ=0.9g
	ΔP=18.63g		ΔP=18.32g		ΔP=18.49g		ΔP=17.89g	

MS-H: Medio basal sin hormonas

MS+H: Medio basal con hormonas (1mg/l de 2,4-D y 0.05 mg/l de kinetina)

P.F.1: Peso fresco inicial (promedio de al menos 5 repeticiones)

P.F.2: Peso fresco a los 30 días de cultivo (promedio de 5 repeticiones)

σ = Desviación standard

ΔP: Incremento en peso fresco

TABLA 9

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AMPICILINA EN EL CRECIMIENTO DE BOUVARDIA TERNIFOLIA

	0 mg/ml		0.5 mg/ml		1 mg/ml		2 mg/ml	
	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2
MS-H	0.459g	1.395g	1.489g	1.33g	1.426g	1.24g	1.547 g	1.30g
	σ=0.115	σ=0.13	σ=0.227	σ=0.357	σ=0.272	σ=0.426	σ=0.305	σ=0.395
	ΔP= 0.935g		ΔP= -0.159g		ΔP= -0.186g		ΔP= -0.247g	
MS+H	0.876g	18.40g	1.627g	17.90g	1.324g	16.83g	1.51g	15.55g
	σ=0.210	σ=0.758	σ=0.101	σ=0.317	σ=0.158	σ= 1.25	σ=0.224	σ=1.12
	ΔP= 17.52g		ΔP= 16.27g		ΔP= 15.51g		ΔP= 14.04g	

MS-H: Medio basal sin hormonas
MS+H: Medio basal con hormonas (1 mg/l de 2,4-D y 0.05 mg/l de kinetina)
P.F.1: Peso fresco inicial (promedio de al menos 5 repeticiones)
P.F.2: Peso fresco a los 30 días de cultivo (promedio de al menos 5 repeticiones
σ: Desviación standard
ΔP: Incremento en peso fresco

TABLA 10

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PENICILINA G (BENCIL-PENICILINA) EN EL CRECIMIENTO DE BOUVARDIA TERNIFOLIA

	0 mg/ml		0.5 mg/ml		1 mg/ml		2 mg/ml	
	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2
MS-H	1.07 g	1.47g	0.89g	17.9g	1.16g	20.2g	1.11g	18.8g
	σ=0.19g	σ=0.16	σ=0.16	σ=1.10	σ=0.16	σ=0.81	σ=0.12	σ=0.74
	ΔP=0.4g		ΔP=17.01g		ΔP=19.03g		ΔP=17.77g	
MS+H	0.98g	19.61g	0.91g	20.3g	1.09g	19.14g	1.27g	18.06g
	σ=0.02	σ=0.10	σ=0.05	σ=0.46	σ=0.29	σ=0.75	σ=0.38	σ=1.65
	ΔP=18.63g		ΔP=19.39g		ΔP=18.05g		ΔP=16.79g	

MS-H: Medio basal sin hormonas
MS+H: Medio basal con hormonas (2,4-D y kinetina)
P.F.1: Peso fresco inicial*
P.F.2: Peso fresco a los 30 días de cultivo*
σ : Desviación standard
ΔP: Incremento en peso fresco
* Promedio de al menos 5 repeticiones

TABLA 11.- Efecto de varias penicilinas en el crecimiento de *B. ternifolia*.

MS-H	1 mg/ml	
	P.F.1	P.F.2
CARFENICILINA	1.414g	16.52g
	σ=0.397	σ=1.11
	ΔP=15.106g	
AMOXICILINA	1.568g	0.848g
	σ=0.211	σ=0.24
	ΔP=-0.72g	
DICLOXACILINA	1.432g	0.87g
	σ=0.198	σ=0.13
	ΔP=-0.56g	
PENICILINA-G	1.294g	17.242
	σ=0.04	σ=1.46
	ΔP=15.95g	
ETACILINA	1.32g	0.702g
	σ=0.14	σ=0.13
	ΔP=-0.61g	
OXACILINA	1.27g	0.698g
	σ=0.428	σ=0.35
	ΔP=-0.57	
METAMPICILINA	1.478g	0.76g
	σ=0.259	σ=0.14
	ΔP=-0.70g	
AMPICILINA	1.23g	0.82g
	σ=0.09	σ=0.10
	ΔP=-0.41	

Medio basal M/S-H	0 mg/ml	
SIN PENICILINA	1.184g	0.68g
	σ=0.185	σ=0.14
	ΔP=-0.50	

MS-H: Medio basal sin hormonas
P.F.1: Peso fresco inicial *
P.F.2: Peso fresco a los 30 días de cultivo *
σ: Desviación standard
ΔP: Incremento en peso fresco

* Promedio de al menos 5 repetición.

TABLA 12

EFECTO DEL ACIDO FENIL-ACETICO EN EL CRECIMIENTO DE

BOUVARDIA TERNIFOLIA

	0		2×10^{-6} M		4×10^{-6} M		8×10^{-6} M	
	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2
MS-H	0.318g	1.97g	0.202g	0.652g	0.295g	0.962g	0.29g	1.056g
	σ=0.121	σ=0.19	σ=0.048	σ=0.10	σ=0.128	σ=0.23	σ=0.09	σ=0.20
	ΔP=0.654g		ΔP=0.45g		ΔP=0.667g		ΔP=0.766g	
MS+H	0.292g	17.83g	0.243g	14.03g	0.336g	17.55g	0.25g	15.855g
	σ=0.17	σ=0.70	σ=0.09	σ=0.44	σ=0.16	σ=0.63	σ=0.06	σ=0.39
	ΔP=17.538g		ΔP=13.787g		ΔP=17.214g		ΔP=15.60g	

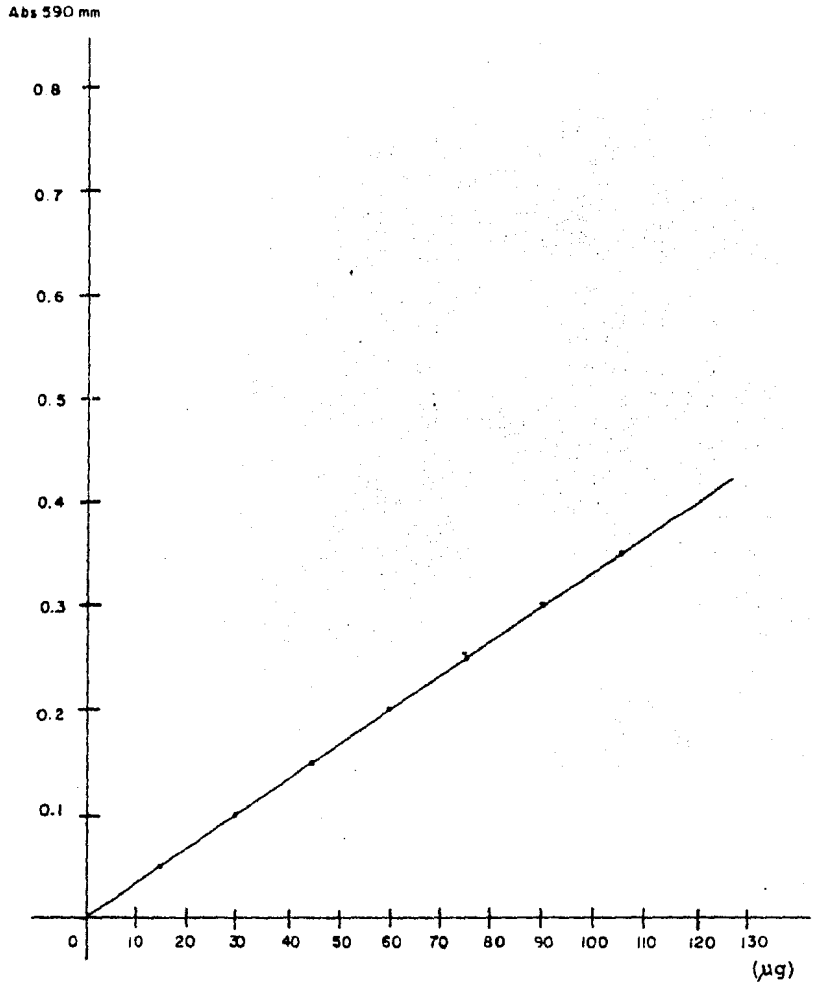
MS-H: Medio basal sin hormonas
MS+H: Medio basal con hormonas (1 mg/l de 2,4-D y 0.05 mg/l de kinetina)
P.F.1: Peso fresco inicial (promedio de al menos 5 repeticiones)
P.F.2: Peso fresco a los 30 días de cultivo (" " ")
σ: Desviación standard
ΔP: Incremento en peso fresco

TABLA 13

EFECTO DEL ACIDO FENIL ACETICO SOLO Y CON 6-APA EN EL CRECIMIENTO DE CALLOS DE BOUVARDIA TERNIFOLIA

MEDIO M&S SIN HORMONAS	CONTROLES		MEDIO BASAL M&S SIN HORMONAS	AC. FENIL ACETICO						
	0	M		1×10^{-3} M		1×10^{-4} M		1×10^{-5} M		
	P.F.1	P.F.2		P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	
	1.184g	0.68g		0.396g	0.76g	0.37g	1.33g	0.37g	0.74g	
	σ=0.185	σ=0.143		σ=0.009	σ=0.1	σ=0.002	σ=0.32	σ=0.003	σ=0.001	
	ΔP=-0.504g			ΔP=0.37g		ΔP=0.96g		ΔP=0.37g		
MEDIO M&S CON HORMONAS	0	M		AC. FENIL ACETICO + 6 - APA						
				1×10^{-3} M		1×10^{-4} M		1×10^{-5} M		
	P.F.1	P.F.2		P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	P.F.1	P.F.2	
	0.49g	19.38g		1.185g	0.715g	1.495g	1.285g	1.195g	0.83g	
	σ=0.39	σ=1.06		σ=0.115	σ=0.125	σ=0.055	σ=0.065	σ=0.105	σ=0.06	
	ΔP=18.89g			ΔP=-0.47g		ΔP=-0.21		ΔP=-0.365		

P.F.1 Peso fresco inicial* P.F.2 Peso fresco a los 30 días de cultivo*
σ = Desviación standard y ΔP= Incremento en peso fresco
* Promedio de al menos 5 repeticiones



CURVA PATRON DE ALBUMINA

Abs		µg
0.4	=	120
0.35	=	105
0.3	=	90
0.25	=	75
0.2	=	60
0.15	=	45
0.1	=	30
0.05	=	15

VII.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

(1) Acevedo, F. y Cooney, C.L. Penicillin Amidase production by Bacillus megaterium Biotechnol Bioeng 15:493 (1973)

(2) Batchelor, F.R. y Cameron-Wood, J. Formation of 6-APA by alkaline hydrolysis of penicillins.-Nature 195: 1000 (1962)

(3) Biagi, G.L., Barbaro, A.M. y Guerra, M.C.The infuence of pH in buffered reversed-phase thin-layer chromatography.- J. Chromatog 51:548-552 (1970)

(4) Blumberg, A.J., y Loefer, J.B.-Effect of neomycin on two species of free living protozoa.-Physiol Zool. 25 (3): 276-82 (1952)

(5) Bomstein, J. y W.G. Evans.-Automated colorimetric determination of 6-Aminopenicillanic acid in fermentation media.-Anal Chem. 37:576-578 (1965)

(6) Brassart, C., Eb, Ph Plichon, B. et Dubois, J.-Utilisation D'Antibiotiques en vue de la realisation de cultures cellulaires de Silene en fermenteur.-Actes du 101e Congrés national des Sociétés Savantes, Lille.-Sciences, fasc. I P. 455-463 (1976).

(7) Brian, P.W. Effects of Antibiotics on Plants.-Ann Rev. Plant Physiol. 8:413-426 (1957)

(8) Brown, D.M, C.L. Croom, M. Cvitanik, M. Brown, J.L. Cooper y J. Arditti.-Effects of fungicides and bactericides on orchid seed germination and shoot tip cultures in vitro.-Plant Cell Tissue Organ Culture 1: 165-180 (1982)

(9) Burger Alfred- Medical Chemistry (1973)

(10) Butler,J.-carbenicillin: Chemistry and mode of action.-J. Infec. Dis. 122, suppl 81 (1970)

(11) Campbell, C.C.y Saslaw S.-Enhancement of growth of certain fungi by streptomycin.-Proc.Soc.Exptl. Biol. Med., 70:562-563 (1949)

(12) Carew, D.P. y Patterson, B.D.-The effect of antibiotics on the growth of Catharanthus roseus tissue cultures.- Lloydia 33:275-277 (1970)

(13) Cercós, A.P.,Actividad antimicrobiana de la vinalina alcaloide del vinal (Prosopsis ruseifolia Griseb).-Rev. Arg. Agron. 18:200-209 (1951)

(14) Ciegler, A.B.- Microbial, Toxins VI A: 414, Ciegler et al Eds-Academic Press, New York (1971).

(15) Claridge, C.A., J.R.Luttinger y J. Lein.-Specificity of penicillin amidases.-Proc. Soc. Exptl. Biol. Med 113: 1008-1012.

(16) Cole, M.-Properties of the penicillin deacylase enzyme of Escherichia coli-Nature 203: 519-520 (1964)

(17) Chiang, D. y Bennett, R.E. Purification and properties of penicillin amidase from Bacillus megaterium.-J. Bacteriol 93:302 (1967)

(18) Christen A.A., M.A.Kirkpatrick y P.F.Lurquin.-Antibiotics and bacterial auxotrophic mutants in the co-cultivation of plant protoplasts and bacterial cells or spheroplasts.-Z. Pflanzenphysiol Bd. 113(3):213-221 (1984)

(19) Ellis, R.J. y Mac Donald, I.R. Specificity of cicloheximide in higher plant systems.-Plant Physiology 46:227-232 (1970)

(20) Fernández, B.L.-Metabolismo nitrogenado en cultivo de tejidos de Bouvardia ternifolia.-Tesis de Maestría en Bioquímica.-DEPg Fac. Química (1979).

(21) Ghuysen, J.M., Frere, J.M., Leyh-Bouille, M., Coyette, J; Dusart, J. y Nguyen-Disteche, M.-Use of model enzymes in the determination of the mode of action of penicillins and Δ^3-cephalosporins.-Ann. Rev. Biochem. 48:73-101 (1979).

(22) Goodman, L.S. and Gilman, A.-The Pharmacological Basis of Therapeutics. p. 1090-1159 (1976)

(23) Gotovtsèva, V.A., Gorchenko, G.L. y Suvorov, N.N.-Penicillin Amidase production by Bacterium faecalis alcaligenes.-Mikrobiologiya 37: 683 (1968).

(24) Grant, N.H. Clark, D.E. y Alburn, H.E.-D-y-6-Aminopenicillanic Acid.-J. Amm. Chem. Soc.84: 876 (1962).

(25) Hamilton-Miller, J.M.T. Penicillinacylase.-Bacteriological Reviews 30 (4): 761-771 (1966)

(26) Hardin, J.W., Cherry, J.H. Morré D.J., y Lembi, C.A.-Echancement of RNA polymerase activity by a factor released by auxin from plasma membrane.-Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:3146-3150 (1972)

(27) Hash, K.-Antibiotics-Methods in Enzymology 43: 837 Kaplan, N.O. (eds.), Academic Press N.Y.-S.Fco., London.(1975)

(28) Hessayon, D.G.-Fungitoxins in the soil: 1 Historical.-Soil Sci. 75(4):317-327 (1953)

(29) Hessayon, D.G. Double-Action of trichothecin and its production in soil.-Nature 168: 998 (1951)

(30) Huang, H.T., English, A.R., Seto, T.A., Shull, G.M. y Sobin, B.A. Enzymatic hydrolisis of the side chain of penicillins.-J. Am. Chem. Soc. 82: 3790 (1960)

(31) Kaufmann, W. The possible implication of a bacterial enzyme in the biochemical mode of action of penicillins on Gram negative bacteria.-Biochem Biophys Res Commun 14:458-462 (1964.

(32) Kaufmann, W. y Bauer, K.-Variety of substrates for a bacterial benzylpenicillins splitting enzyme.- Nature 203: 520 (1964)

(33) Keegstra K; Talmadge, K.W.; Bauer W.D. y Albersheim, P.- The structure of plant cell walls.-Plant Physiol.51:188-196 (1973)

(34) Key, J.L.-Ann Rev. of Plant Physiol 20.-Hormones and nucleic acid metabolism. 449-474 (1968).

(35) Kornfeld, J.M.-A new colorimetric method for the determina tion of 6-Aminopenicillanic acid.-Anal. Biochem 86:118-126 (1978)

(36) Lepidi, A.A. y Nuti, M.P.-Spectrophotometric determination of the hydrolytic cleavage of the β lactam ring in penicillins and penicillin-like antibiotics, Ann Microbial 21: 125 (1970)

(37) Loefer, J.B., Bierberdorf, F.W., y Weichlein, R.G.- Inhibition and enhancement of the growth of fungi with streptomicin.- Bull Torrey Botan.Club, 79: 242-50 (1952)

(38) Lucente, G., Romeo, A. y Rossi, D.-Use of Escherichia coli ATCC 9637 for the asymmetric hydrolisis of amino acid derivatives-Experientia 21: 317 (1965).

(39) Lugay, J.C. y Aronson, J. N.-Palo Verde (Parkinsonia aculeata) seed aminoacylase.-Biochim Biophys. Acta 191:397 (1969)

(40) Matsumoto, T., Okunishi, K., Nishida, K., Noguchi, M.- Effects of physical factors and antibiotics on the growth of higher plant cells in suspension culture.-Agric. Biol. Chem 36 (12): 2177-2183 (1972)

(41) Matthyse, A.G. y C. Phillips.-A Protein intermediary in the interaction of a hormone with the genome.-Proc. Natl Acad. Sci. USA 63: 897-903 (1969)

(42) Mc Neil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. y Albersheim, P.- Estructure and function of the primary cell walls of plants.- Ann Rev. Biochem 53: 625-638 (1984).

(43) Meyers, F.H., Jawetz, E and Goldfien, A.-Penicillins and Cephalosporins.-Review of Medical Pharmacology p.544-552 (1974)

(44) Miller, C.O.-Ribosyl-trans-zeatin, a major cytokinin produced by crown gall tumour tissue.-Proc.Natl. Acad. Sci. USA 71:334-338 (1974)

(45) Misato, T; Ko, K; Yamaguchi, I.-Use of antibiotics in Agriculture.-Adv. appl Microbiol 21:53-88 (1977)

(46) Moore, T.C. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones.-Springer-Verlag (1979)

(47) Nétien G. Carraz, M y Sotty, L.- Action des antibiotiques sur la croissance des végétaux.-Compt. rend soc. biol. (Lyon) 146:1339-41 (1952).

(48) Nickell, L.G. Stimulation of plant growth by antibiotics.-Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 80:615-17 (1952)

(49) Nickell, L.G. y Finlay, A.C. Antibiotics and their effects on plant growth.-J. Agric. Food Chem. 2:178-182 (1954)

(50) Nickell, L.G. Antibiotics in the growth of plants.-Antib. and Chemoth. 3:449-459 (1953)

(51) Nickell, L.G. Antimicrobial activity of vascular plants.-Econ. Bot. 13:281-318 (1959)

(52) Nickell, L.G. Growth effects of antibiotics on plant cells and their reaction to a modified Gram stain.-Phyton 11:93-96 (1958)

(53) Nickell, L.G. y Celmer, W.D. A potent non toxic plant-growth inhibitor from an antibiotic fermentation.-Nature 192: 1098 (1961).

(54) Nickell, L.G. y Celmer, W.D. Structure-phytoactivity relationships in the penicillins.-Nature 206: 302 (1965)

(55) Nyiri, L. Change in the rate of deacylation of benzyl penicillin and phenylacetyl glycine during submerged cultivation of E. coli. -Nature 214: 1347 (1967)

(56) Nyiri, L. Etudes des propietés des enzymes penicillinase et pénicilline-acylase á l'ocassion de leur coexistence.-Acta Microbiol Acad. Sci Hung 10:261-269 (1963)

(57) Owens, Lowell D.-Kanamycin promotes morphogenesis of plant tissues.-Plant Science Letters 16: 225-230 (1979)

(58) Pokorny, M., Vitezic, N. y Japelj, M.-Detection of penicillins with chloroplatinic acid on thin-layer chromatoplates.-Journal of Chromatography 77:458-460 (1973)

(59) Pollock, K, Barfield, D.G. y Shields, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures.-Plant Cell Reports 2:36-39 (1983)

(60) Pruess, D.L. y Johnson, M. J.-Enzymatic deacylation of S^{35} benzylpenicillin.-Journal of Bacteriology 90(2): 380-383 (1965)

(61) Ray, P.M. Auxin-binding sites of maize coleoptiles are localized on membranes of the endoplasmic reticulum.-Plant Physiol 59:594-599 (1977)

(62) Rolinson, G.N., Batchelor, F.R., Butterworth, D., Cameron-Wood J., Cole, M., Eustace, G.C., Hart, M.V. Richards M. y Chain, E.B.-Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymic hydrolysis.-Nature 187:236-237 (1960)

(63) Ryan, K.F., Needham, G.M., Dunsmoor, C.L. y Sherris, J.C.-Stability of antibiotics and chemotherapeutics in Agar plates. Appl. Microbiol 20: 447-453 (1970).

(64) Salisbury, F.B. y Ross, C.W.-Plant Physiology.-Second edition.-Wadsworth Publishing Company Inc. (1978)

(65) Skoog, F. y C.O. Miller.-Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro.-Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-131 (1957).

(66) Spliid, N.H. y Emborg, C.-Measurement of penicillin acylase and cephalosporin acylase in fermentation broths.-Biotechnology Letters pp 389-394 (1978).

(67) Susuki, T. Antitumor and antiviral properties of penicillic acid.-Agr. Biol. Chem.35:287 (1971)

(68) Svedas V.K. Margolin, A.L. y Berezin, I.V.-Enzymatic modification of β-lactam antibiotics: problems and perspectives.-Candidate of Chemical Sciences Disservation, Moscow (1979)

(69) Szentirmai, A.-Properties of penicillin acylase isolated from Escherichia coli.-Acta Microbiol Acad. Sci Hung.12:395-405 (1966)

(70) Szewozuk, A., Siewinski, M. y Siowinska, R.-Colorimetric assay of penicillin amidase activity using phenylacetyl-aminobenzoic acid as substrate.-Clin Chim Acta 103:166-169 (1978)

(71) Tulemisova, K.A.; Tulegenova, B.T.: Mynbaeva, B.M.-Study of the amount of protein and nucleic acid in cabbage plants on the effect of antibiotic 1618.-Izv. Akad. Nauk Kaz. SSR, Ser. Biol. (1):46-51 (1980)

(72) Uhliar, J. y Bucko, M.-Possibility of using industrial wastes from antibiotic production in crop production.-Rostlinná výroba (Praha) 20(9):923-930 (1974)

(73) Ursic, D.J., D. Kemp y J.P.Helgeson.-A new antibiotic with known resistance factors, G 418 inhibits plant cells.-Biochem.-Biophys. Res. Commun. 101 :1031-1037 (1981).

(74) Vandamme, E.J. y Voets, J.P.-Microbial penicillin acylases.-Advances in applied Microbiology 17:311-369 (1974)

(75) Wolf, F.T. Effects of chemical agents in inhibition of chlorophyll synthesis and chloroplasts development in higher plants.-Botanical Review 43(4): 395-425 (1977)

(76) Zukowski, E.; Eckstein, Z. y Dománska, H.-Brodening the biological activity spectrum of 6-aminopenicillanic acid derivatives.-(Université Agronomique, Varsovie) Medelelingen Rijksfaculteit Landbouwwetenschappen Gent 32 (3-4):1050-1061 (1967).