

Un problema adicional es el aumento en la viscosidad de los cultivos, los cuales, por esa razón, deben estar bien agitados. Sin embargo, la agitación no se puede hacer por sistemas que produzcan gran turbulencia, debido a la presencia de vacuolas (más marcada en las últimas fases de crecimiento) y a la baja resistencia que las paredes celulares de las células vegetales ofrecen a la agitación; la ruptura del tonoplasma en particular ocasiona la liberación de sustancias tóxicas que afectan tanto el crecimiento como la producción de las células. Por todo esto, la agitación debe ser lo más suave posible y con poca turbulencia.

El lento crecimiento, con tiempos de generación que fluctúen entre 25 y 100 horas, conduce a períodos de incubación de días o semanas durante los cuales los fermentadores deben ser inaccesibles a microorganismos del exterior, ya que con el crecimiento de éstos no podrían competir las células vegetales.

En este caso, tal vez la mejor solución disponible está en los fermentadores agitados por corriente de aire. Usados por primera vez por Wagber et al. (1977), fueron mejorados por Fowler (1983), quien empleó un sistema cerrado de circulación del medio de cultivo, impulsado por aire. Este sistema tiene la ventaja de dañar poco las células y de no poseer uniones de piezas que faciliten la contaminación.

Se está investigando acerca de otros sistemas promisorios de agitación. El rendimiento más elevado, hasta la fecha, de un cultivo de células vegetales es el de Ulbrech et al. (1985), quienes obtuvieron 5 g (21% de peso seco) de ácido rosmarínico por litro de cultivo de *Coleus blumei* en un reactor agitado por un agitador en espiral.

**Estrategia general.** Como se aprecia, ha habido considerables avances en la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos de tejidos vegetales; en general, esto se ha logrado mediante la manipulación del medio de crecimiento y la aplicación de métodos de producción en gran escala. Esta es una estrategia que consume mucho tiempo, sobre todo porque las condiciones óptimas son características de cada especie y se deben determinar en cada caso; sin embargo, tal estrategia ha permitido obtener cultivos que producen algún compuesto específico en cantidades mayores que las producidas por la planta original (Constabel et al., 1982; Staba, 1982).

Deus et al. (1982) y Heinstejn (1985) han propuesto una estrategia que ofrece las mejores posibilidades de obtener líneas celulares con alto rendimiento; es la siguiente:

1. Selección de plantas con alto rendimiento para el metabolito deseado.
2. Establecimiento de una(s) línea(s) celular(es) a partir de la planta seleccionada.
3. Desarrollo de un medio óptimo de crecimiento (no considera la producción de metabolitos secundarios).
4. Desarrollo de condiciones para inducir la síntesis de los productos secundarios.
5. Selección clonal de las líneas celulares de alto rendimiento.
6. Desarrollo de un medio óptimo para la producción de los metabolitos secundarios.

Esta estrategia ha permitido a Deus et al. (1982) obtener líneas celulares de *Catharanthus roseus* cuyo rendimiento de ajmalicina es del orden de 369 mg/litro, así como una elevada frecuencia de colonias (23%) con más de 1% (peso fresco) de serpentina.

### **Micropropagación**

Aunque en este trabajo se ha discutido únicamente el empleo de células cultivadas in vitro, no se debe olvidar otra forma en que el cultivo de tejidos vegetales puede contribuir a la obtención de metabolitos importantes: la selección y la micropropagación en gran escala de plantas sobreproductoras, que son la fuente natural de ciertos compuestos. Esta alternativa es particularmente importante para los países del tercer mundo que, como se discute más adelante, se verán seriamente afectados por el desarrollo biotecnológico a nivel mundial.

## **Cultivo in Vitro para Producir Metabolitos Secundarios**

Algunos de los compuestos químicos de importancia económica cuya producción por células cultivadas in vitro se está investigando se presentan en el Cuadro 9.1. Los beneficios esperados de la industrialización de estos cultivos se pueden resumir así:

- Producción, en escala industrial, de algunas sustancias naturales.

- Producción de sustancias difíciles de obtener por extracción o por síntesis química.
- Reducción de los costos de producción de estas sustancias, a largo plazo.
- Eliminación de la dependencia en materia de importación.
- Producción continua y controlada de sustancias, independientemente de los factores del medio ambiente.
- Precios estables.
- Posibilidad de realizar la producción cerca de las fábricas de procesamiento final y de los mercados.

Cuadro 9.1. Productos naturales obtenidos de plantas y sus usos industriales.

Producto	Especie vegetal	Uso industrial
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Anticonceptivo
Quinina	<i>Chinchona ledgeriana</i>	Antimalárico
		Amargorizante
Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico
Escopolamina	<i>Datura stramonium</i>	Antihipertensivo
Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antileucémico
Piretreína	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium;</i> <i>Pyrethrum</i> sp.	Insecticida
Taumatina	<i>Thaumatococcus daniellii</i>	Edulcorante
Jasmina	<i>Jasminum</i> sp.	Perfume
Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Colorante
Teobromina	<i>Theobroma cacao</i>	Saborizante
Reserpina	<i>Ranwolfia serpentina</i>	Antihipertensivo
Vainillina	<i>Vainilla planifolia</i>	Saborizante
Menta	<i>Mentha piperita, M. viridis</i>	Saborizante
Capsaicina	<i>Capsicum frutescens</i>	Saborizante
Esteriosida	<i>Stevia rebaudiana</i>	Edulcorante

La biosíntesis de la shikonina y la biotransformación de precursores, que se describen enseguida, son ejemplos que indican la posibilidad de lograr, en un futuro no muy lejano, grandes producciones de un gran número de sustancias de importancia industrial, médica y agronómica mediante esta técnica, y bajo condiciones económicamente factibles.

## Biosíntesis de shikonina

La shikonina es un pigmento que se extrae de las raíces de *Lithospermum erythrorhizon*, una planta perenne nativa de Japón, China y el sureste asiático, donde crece en forma silvestre. Esta planta está sufriendo una rápida disminución en su población, y además su rendimiento en shikonina depende de la distribución geográfica y del clima, lo que hace muy variable la disponibilidad de este pigmento. Aunque éste se puede sintetizar químicamente, el proceso es económicamente impracticable, ya que requiere doce pasos y tiene un rendimiento final de sólo 0.7%.

La biosíntesis de shikonina por medio de cultivos celulares de *L. erythrorhizon* es el mejor ejemplo que se puede dar sobre la aplicabilidad de la tecnología para la producción de metabolitos secundarios. Por un lado, las dificultades para la obtención y la síntesis química del pigmento caracterizan el tipo de problemas que el cultivo in vitro puede resolver, y por otro, la metodología empleada ejemplifica el uso de las técnicas descritas aquí. La shikonina ya entró en la etapa de producción en gran escala: la produce la compañía petroquímica Mitsui del Japón y constituye el primer producto industrial de esta tecnología.

La estrategia para la producción de shikonina por células cultivadas in vitro (Yamada et al., 1983) consistió primero en el desarrollo de un sistema de cultivo en dos fases, una de rápido crecimiento celular y otra de producción del pigmento; las dos fases dieron como resultado un incremento cuatro veces mayor que el obtenido en el sistema de una sola fase. Luego se hizo la optimización de las condiciones del medio de cultivo de cada fase, lo que aumentó 13 veces la productividad. Posteriormente, se hizo la selección de las líneas celulares derivadas de protoplastos, cuyas elevadas velocidades de crecimiento y producción de shikonina incrementaron aún más la productividad.

La optimización de la oxigenación de los cultivos (a nivel de planta piloto) para alcanzar una densidad celular elevada constituyó el último paso en un proceso de optimización que produce cantidades de shikonina 800 veces superiores a las obtenidas de la planta natural. Según investigadores de Mitsui, la cantidad de pigmento producido en un fermentador de 750 litros en 14 días equivale a la que podría extraerse de las plantas en una superficie de aproximadamente 18 ha.

La shikonina producida in vitro se está vendiendo actualmente a US\$4000 por kilogramo.

## Biotransformación de precursores

La biotransformación de precursores mediante cultivo de tejidos vegetales permite la síntesis de compuestos de interés económico, como también elucidar las vías de la biosíntesis; en este último sentido se ha trabajado más arduamente. El potencial de esta técnica para producir moléculas marcadas específicamente en alguna posición clave, o productos estereoquímicamente puros, permite suponer que habrá un incremento muy marcado en el estudio de los productos secundarios.

La biotransformación se lleva a cabo empleando varias de las metodologías descritas; por ejemplo, Furuya et al. (1984), usando alginato de calcio, inmovilizaron células de *P. somniferum* capaces de transformar codeinona (-) en codeína (-), con una eficiencia del 70.4% en suspensiones agitadas; en un biorreactor la eficiencia fue del 42%.

Se han utilizado cultivos en suspensión de *Cannabis sativa* L. para transformar el cannabidiol en cannabielsoína y en un compuesto aún no identificado; ésto constituye otra posible aplicación de la biotransformación, o sea, la producción de metabolitos hasta ahora desconocidos (Loh et al., 1983).

La 1-O-(1-<sup>14</sup>C)hexadecil-2-acetil-glicero-3-fosfolina es un factor de activación de las plaquetas, que se emplea en la investigación biomédica y que es extremadamente difícil de sintetizar químicamente. Aunque las plantas no producen esta clase de compuestos, las células cultivadas in vitro se pueden usar como biorreactores para transformar sus precursores; Weber et al. (1985) emplearon cultivos celulares de *Brassica napus* para convertir los 1-O-alkil-sn-gliceroles en sus correspondientes 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolinas, con una eficiencia del 70 al 78%; la hidrólisis alcalina y la acetilación posteriores producen el derivado final. Adicionalmente, tales cultivos producen los compuestos esteroquímicamente uniformes a partir de muestras racémicas, reducen en cuatro pasos la síntesis total y permiten marcar con <sup>14</sup>C las cadenas alquilo que antes solamente habían podido ser marcadas con <sup>3</sup>H.

Un último ejemplo de biotransformación es el trabajo de Alferman et al. (1984), quienes han desarrollado una metodología para la biotransformación de β-metil digitoxina en β-metil digoxina por medio de células de *Digitalis lanata* inmovilizadas en alginato. En un reactor de 200 lt, estas células llevan a cabo la conversión, por más de 170 días, a una velocidad constante; en un lapso de 13 días se pueden extraer 430 mg de β-metil digoxina por litro de cultivo, lo cual representa el 70% del sustrato añadido y la base para producir 800,000 tabletas cardiovasculares.

## **Producción de Metabolitos Secundarios en los Países en Desarrollo**

Como se ha visto, son muy grandes los beneficios potenciales de la síntesis de productos químicos por células cultivadas en reactores biológicos. No se debe subestimar el atractivo que sobre los métodos convencionales de producción agrícola y farmacéutica tiene la nueva tecnología para las empresas de los países industrializados, particularmente en lo que se refiere a la obtención de la materia prima de los países en desarrollo. La mayoría de las sustancias cuya producción *in vitro* se está considerando actualmente provienen de plantas nativas de los países en vías de desarrollo.

La industrialización del cultivo de tejidos vegetales podría representar dos tipos de situaciones para el tercer mundo: a) el desplazamiento de algunas de sus exportaciones de productos naturales, lo que parece ser una consecuencia inevitable de la revolución biotecnológica en general; y b) un aumento de su dependencia de los países industrializados (Kenney et al., 1983).

Al considerar el impacto socioeconómico de la biotecnología no se puede hablar de hechos, ya que la situación actual no tiene precedente comparable. Sin embargo, dada la importancia y el alcance de este campo, parece conveniente intentar hacer algunas predicciones basadas en la experiencia adquirida y en el análisis de las tendencias actuales.

Las instituciones nacionales deberían disponer de toda la información posible al respecto, para anticipar a tiempo y de manera adecuada la dirección de los cambios rápidos provocados por la biotecnología. La acción rápida es necesaria para evitar el crecimiento de la brecha tecnológica con los países industrializados, por dos causas principales: a) las grandes inversiones de capital que demanda la investigación básica para desarrollar un producto biotecnológico hasta llevarlo al mercado; b) la alta especialización de los conocimientos científicos y tecnológicos que se requieren para desarrollar esos procesos, y que implicaría dificultades para adquirir recursos humanos adecuadamente capacitados.

La privatización de la biotecnología tendría los siguientes efectos:

1. Se restringirá el acceso a la información en este campo.
2. Habría competencia para los mercados de los nuevos productos, y los países sin suficientes recursos se sentirían afectados.

3. Posiblemente estos países tendrían que adquirir sustancias que anteriormente provenían de cultivos nativos.

En resumen, todo lo anterior parece indicar que los países menos desarrollados no sólo perderían algunos de sus mercados tradicionales, sino que también tendrían dificultades para establecer su propia industria biotecnológica. Sin embargo, es necesario insistir en que en este momento el futuro no está determinado.

Es necesario planear a corto y largo plazo la tecnología del cultivo de tejidos vegetales y de la biotecnología en general. Es esencial que cada país en vías de desarrollo tenga una idea clara acerca de los últimos adelantos de la biotecnología a nivel mundial, y con este propósito debería disponer de una lista de todas las especies sobre las cuales se está investigando, y conocer los objetivos de estas investigaciones.

Por otra parte, las instituciones nacionales no deben ignorar la vulnerabilidad de los sectores campesinos y de los pequeños productores ante los posibles efectos negativos de la biotecnología. Es importante que se creen a tiempo alternativas para evitar dichos efectos negativos.

La estrategia más importante para los países en vías de desarrollo sería desarrollar su propia infraestructura, y los conocimientos necesarios, para la utilización del cultivo de tejidos vegetales. Esto les permitirá hacer una investigación básica acorde con sus necesidades. Para un análisis más profundo sobre este tema ver Eastmond (1985).

## **Consideraciones Finales**

Los autores del presente capítulo no consideran apropiados los análisis y las evaluaciones tecnológicas que se han hecho sobre el estudio del metabolismo secundario de las células vegetales. Es ésta una disciplina biológica que, aunque se encuentra aún en una fase temprana de su desarrollo, posee un enorme potencial para generar conocimientos que pueden aplicarse al desarrollo de tecnologías económicamente factibles (Goldstein et al., 1980; Fowler, 1983).

Tomando como ejemplo la biología molecular, se observa que ella se desarrolló felizmente desde los años cuarentas hasta 1972 sin que nadie sospechara cómo iba a ayudar a la comprensión de problemas médicos como el cáncer, ni mucho menos cuál sería su potencial económico en la ingeniería genética. A pesar de lo anterior, nadie puso en duda la conveniencia de llevar a cabo investigaciones en ese campo, ni nadie tomó en

cuenta los costos de la misma. Se trataba de una investigación por el conocimiento mismo, mientras que la investigación biotecnológica actual es, en muchos casos, una investigación por el desarrollo comercial tecnológico.

## Referencias

- Alfermann, A. W.; Bergmann, W.; Figur, C.; Helimbold, U.; Schwantag, D.; Schuller, I. y Reinhard, E. 1984. Biotransformation of  $\beta$ -methylidigitoxin to  $\beta$ -methylidigoxin by cell cultures of *Digitalis lanata*. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). Plant biotechnology. Crambridge University Press, Londres. p. 67-74.
- Bell, E. A. 1981. The physiological role(s) of secondary (natural) products. En: Conn, E. E. (ed.). The biochemistry of plants; 7: Secondary plant products. Academic Press, Nueva York. p. 1-19.
- Berling, J. 1984. Plant cultures, a future source of natural products. Endeavor 8:5-8.
- Brodelius, P.; Deus, B.; Mosbach, K. y Zenk, M. H. 1979. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. FEBS Letters 103:93-97.
- Brown, S.; Renaudin, J. P.; Prevot, C. y Guern, J. 1984. Flow cytometry and sorting of plant protoplasts: Technical problems and physiological results from a study of pH and alcaloids in *Catharantus roseus*. Physiol. Veg. 22:541-554.
- Chaprin, N. y Ellis, B. E. 1984. Microspectrophotometric evaluation of rosmatinic acid accumulation in single cultured plant cells. Can J. Bot. 62:2278-2282.
- Cloetta, M. 1980. Chemistry and pharmacology of digitoxin and its cleave products. Arch. Exptl. Path. Pharm. 88:113-157.
- . 1926. Preparation and chemical composition of the active substances of *Digitalis* leaves, their pharmacological and therapeutic properties. Arch. Exptl. Path. Pharm. 112:261-342.
- Constabel, F.; Kurz, W. G. W. y Kutney, J. P. 1982. Variation in cell cultures of perwinkle, *Catharantus roseus*. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue and cell culture: Proceedings of the 5th International Congress, Tokio. p. 301-304.
- Courtois, D. y Guern, J. 1980. Temperature response of *Catharantus roseus* cells cultivated in liquid medium. Plant Science Lett. 17:473-482.
- Davies, M. E. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Planta 104:50-65.

- Deus, B. y Zenk, M. H. 1982. Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotech. Bioengin.* 24:1965-1974.
- Dougall, D. K. 1980. Nutrition and metabolism. En: Staba, E. J. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 21-58.
- Douglas, G. C.; Wetter, L. R.; Nakamura, C.; Keller, W. A. y Setterfield, G. 1981. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*; 3: Biochemical morphological and cytological analysis of somatic hybrids. *Can. J. Bot.* 59:228-237.
- Drew, J. W. y Demain, A. L. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:346-356.
- Eastmond, A. 1985. Probables efectos socioeconómicos de la industrialización del cultivo de tejidos vegetales sobre los países en vías de desarrollo. En: Robert, M. L. (ed.). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.
- Elliot, D. C. 1983. Accumulation of cytokinin induced betacyanin in specific cells of *Amaranthus tricolor* seedlings. *J. Exp. Bot.* 34:67-73.
- Endress, R.; Jager, A. y Kreis, R. W. 1984. Catecholamine biosynthesis dependent on the dark in betacyanin *Portulaca* callus. *J. Plant Physiol.* 115:291-295.
- Flores, H. y Filner, P. 1985. Hairy roots of Solanaceae as a source of alkaloids. *Plant Physiol.* 77:125.
- Fowler, M. W. 1983. Commercial applications and economic aspects of mass plant cells culture. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). *Plant biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Fujita, Y.; Tabata, M.; Nishi, A. y Yamada, Y. 1982. New medium and production of secondary compounds with two-staged culture method. En: Fujiwara, A. (ed.). *Plant tissue and cell culture*. Proceedings of the 5th International Congress, Tokio. p. 399-400.
- Fukui, H.; Yoshikawa, N. y Tabata, M. 1984. Induction of benzoquinone formation by active carbon in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Phytochemistry* 23:301-305.
- Furuya, Y.; Yoshikawa, T. y Taira, M. 1984. Biotransformation of codeinone to codeine by immobilized cells of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 23:999-1001.
- Galbraith, D. W. et al. 1984. Flow sorting and culture of protoplasts: Conditions for high frequency recovery, growth and morphogenesis from sorted protoplast of suspension cultures of *Nicotiana*. *Plant Cell Reports* 3:151.

- Gates, M. y Tschudi, G. 1952. The synthesis of morphine. J. Am. Chem. Soc. 74:1109-1110.
- . 1956. The synthesis of morphine. J. Am. Chem. Soc. 78:1381-1393.
- Goldstein, W. E.; Lasaure, L. C. y Ingle, M. B. 1980. Product cost analysis. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.
- Gorman, M.; Neuss, N. y Svoboda, G. H. 1959. *Vinca* alkaloids: Structural features of leurosine and vincalublastine, representatives of a new type of indole indoline alkaloids. J. Am. Chem. Soc. 81:4745-4746.
- Griffin, L. R.; Cutler, A. J.; Shargool, P. D. y Fowke, L. C. 1985. Isoelectric focusing of plant cell protoplasts. Plant Physiol. 77:765-769.
- Hagimori, M.; Takashi, M. y Obi, R. Y. 1982. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture; 2: Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. Plant Physiol. 69:653-656.
- Heinstein, P. F. 1985. Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cells suspension cultures. J. Nat. Prod. 48:1-9.
- Kenney, M. J.; Kloppenburg Jr. J., R.; Buttel, E. H. y Cowan, J. T. 1983. Genetic engineering and agriculture: Socioeconomic aspects of biotechnology in development and developing countries. En: Biotech 83: Proceedings of the International Conference on the Commercial Applications and Implications of Biotechnology. On-line Conferences, Middlesex, Inglaterra.
- ; Buttel, F. H. y Kloppenburg Jr., J. 1984. Advance technology alert system; 1: Tissue culture technology for development. Centre for Science and Technology for Development, United Nations, Nueva York.
- Knobloch, J. H. y Berlin, J. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Cathartus roseus* (L.) G Don. Z. Naturforsch. 35:551-556.
- Lindsey, K. y Yeoman, M. M. 1983a. Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 39-66.
- y ———. 1983b. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. J. Exp. Bot. 34:1055-1065.
- y ———. 1984. The viability and biosynthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum* immobilized in reticulate polyurethane. J. Exp. Bot. 35:1684-1696.

- Linsefors, L. y Brodelius, P. 1985. Immobilization of plant protoplasts: Viability studies. *Plant Cell Reports* 4:23-27.
- Lipskii, A. Kh. y Chernyak, N. D. 1983. Effect of temperature on a cell culture of *Dioscorea deltoidea* wall during submerged cultivation. *Sov. Plant. Physiol.* 30:329-337.
- Loh, W. H. T.; Hartsel, S. C. y Robertson, L. W. 1983. Tissue culture of *Cannabis sativa* L. and in vitro biotransformation of phenolics. *Z. Pflanzenphysiol.* 111:395-400.
- Loyola-Vargas, V. M. 1984. Obtención de productos secundarios de interés farmacológico en cultivo de tejidos; 1: Consideraciones generales y proposición de un modelo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 14:26-36.
- . 1985. Efecto del stress en la síntesis de productos secundarios. En: Loyola-Vargas, V. M. (ed.). Cuadernos de posgrado. Facultad de Química; Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- ; Gómez, I.; López, M. E.; Reyes, J.; Fierro, M y Robert, M. L. 1984. Nitrogen metabolism and alkaloid content in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 75:144s.
- MacCarthy, J. J.; Ratcliffe, D. y Street, H. E. 1980a. The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don cells grown in bath culture. *J. Exp. Bot.* 31:1315-1325.
- y Stumpf, P. K. 1980b. Effect of different temperatures on fatty acid synthesis and polyunsaturation in cell suspension cultures. *Planta* 147:389-395.
- Mantell, S. H. y Smith, H. 1983. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue culture. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). *Plant biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Marker, R. E. y Krueger, J. 1940. Sapogenins; 41: The preparation of trillin and its conversion to progesterone. *J. Am. Chem. Soc.* 62:3349-3350.
- ; Tsukamoto, T. y Turner, D. L. 1940. Diogenin. *J. Am. Chem. Soc.* 62:2525-2532.
- ; Turner, D. L. y Ulshafer, P. R. 1942. Sapogenins; 63: The position of the hydroxyl groups in digitogenin. *J. Am. Chem. Soc.* 64:1843-1847.
- Martin, S. M. 1980. Mass culture systems for plant cell suspensions. En: Staba, J. E. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Raton, Florida, E. U.
- Mosbach, K. y Mosbach, R. 1966. Entrapment of enzyme and microorganisms in synthetic crosslinked polymers and their application in column techniques. *Acta Chemica Scandinavica* 20:2807-2810.

- Muhitch, M. J. y Fletcher, J. S. 1985. Influence of culture age and spermidine treatment on the accumulation of phenolic compounds in suspension cultures. *In vitro* 21(3):53A.
- Nakagawa, K.; Konagai, A.; Fukui, H. y Tabata, M. 1984. Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cells suspension cultures. *Plant Cell Reports* 3:254-257.
- Nettleship, L. y Slaytor, M. 1984. Adaptation of *Paganum harmala* callus to alkaloids production. *J. Exp. Bot.* 25:1114-1123.
- Noble, R. L.; Beer, C. T. y Cutts, J. H. 1958. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. *Ann. New York Acad. Sci.* 76:882-894.
- Parr, A. J.; Robins, R. J. y Rhodes, M. J. C. 1984. Permeabilization of *Cinchona ledgeriana* cells by dimethylsulphoxide: Effects of alkaloid release and long term membrane integrity. *Plant Cell. Rep.* 3(6):262-265.
- Reyes, J.; Oropeza, C.; Robert, M. L.; Ríos, P.; Alpízar, L.; Robles, M. L. y Loyola-Vargas, V. M. 1985. Alkaloids in *Catharantus roseus* cultures. *Plant Cell Reports* 3:262-265.
- Seibert, M. y Kadkade, P. G. 1980. Environmental factors; A: Light. En: Staba, E. J. (ed). *Plant tissue culture as a resource of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 123-141.
- Staba, E. J. 1982. Production of useful compounds from plant tissue cultures. En: Fujiwara, A. (ed.). *Plant cell culture: Proceedings of the 5th International Congress, Tokio*, p. 25-30.
- Stafford, A.; Smith, L. y Fowler, M. W. 1985. Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharantus roseus* (L.) G Don. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 4:83-94.
- Stoll, A. y Kreis, W. 1934. Acetyldigitoxin, acetylgitoxin and acetyldigoxin. *Helv. Chim. Acta* 17:592-613.
- Tabata, M.; Yamamoto, H. y Hiraoka, N. 1971. Alkaloid production in the tissue cultures of some solanaceous plants. En: *Les cultures de tissu de plantes*. Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), París.
- Tschesche, R. 1985. Neutral saponins; conversion of digitogenin, gitogenin and tigogenin into identical derivatives. *Ber.* 68B:1090-1094.
- y Hagedorn, A. 1936. Saponins of the cyclopentanehydrophenantrene group; 4: Constitution of gitogenin and digitogenin. *Ber.* 69B:797-805.
- Ulbrech, B. y Wiesner, W. 1985. High yield rosmarinic acid production from plant cell culture in a stirred bioreactor system. *In vitro* 21(3):60A.
- Veliky, I. A. 1977. Effect of pH on triptophol formation by cultures of *Ipomoea* sp. plant cells. *Lloydia* 40:482.

- Wagner, F. y Vogelmann, H. 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). Plant tissue culture and its biotechnological applications. Springer-Verlag, Berlín.
- Weber, N. y Mangold, H. K. 1985. Semisynthesis preparation of 1-O-(1-<sup>14</sup>C)hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocoline (platelet activating factor) using plant cell cultures. J. Lipid Res. 26:495-500.
- Wilson, G. y Marron, P. 1978. Growth and entharquinose biosynthesis by *Gallium mollugo* (L.) cells in bath and chemostat culture. J. Exp. Bot. 29:837-851.
- Windaus, A. y Freese, C. 1925. Digitoxin. Ber. 58B:2503-2510.
- Woodward, R. B. y Doerin, W. E. 1944. The total synthesis of quinine. J. Am. Chem. Soc. 66:849.
- . 1945. The total synthesis of quinine. J. Am. Chem. Soc., 67:860-874.
- Yamada, Y. y Fuhita, Y. 1983. Production of useful compounds in culture. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture; 1: Techniques for propagation and breeding. MacMillan Publishing, Nueva York.
- Zeleneva, I. y Khavrin, E. E. 1980. Rearrangement of enzyme patterns in maize callus and suspension cultures: Is it relevant to the changes in the growing cells on the intact plant? Planta 148:108-115.
- Zenk, M. H.; El-Shagi, H.; Arens, H.; Stockigt, J.; Weiler, E. W. y Deus, B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension culture of *Catharanthus roseus*. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). Plant tissue culture and its biotechnological applications. Springer-Verlag, Berlín. p. 27-43.