

POTENCIAL BIOTECNOLÒGIC DEL CULTIU DE CÈL·LULES VEGETALS PER A L'OBTENCIÓ DE PRODUCTES FARMACÈUTICS

CARLES CODINA, FRANCESC VILADOMAT, JAUME BASTIDA
i JOSEP MANEL LLABRÉS

*Departament de Fisiologia Vegetal. Facultat de Farmàcia.
Universitat de Barcelona.*

Rebut 17 gener 1986

SUMMARY

Plants produce a peculiar group of natural products, particular to the plant kingdom, the secondary metabolites, which are very numerous and structurally diverse. Provided that plant cells can grow "in vitro", their culture offers the possibility of producing some of these compounds of pharmaceutical interest in large quantities. Alkaloids, steroids, cardiotoxic glycosides, quinones and terpenes, for example, are produced by either cell suspension cultures or immobilized cells; sometimes at a higher rate than in the whole plant. These systems are also used to yield several substances by means of a given biotransformation reaction which cannot be achieved in any other way. The use of cell cultures in pharmaceutical industry is just one of the many sides of plant biotechnology, which is proving to become an indispensable technique soon in the future.

INTRODUCCIÓ

Les plantes superiors, a més de constituir una font abundant de productes naturals indispensables per l'home, com ara additius alimentaris, fustes, fibres i olis, són també els productors més importants de productes farmacèutics i de materials de diagnòsi. Això no obstant, l'augment de

les dificultats per a aconseguir un subministrament eficaç de plantes medicinals, degut en molts casos a la seva localització geogràfica, al baix rendiment del principi actiu, subjecte a variacions estacionals, a la dràstica disminució dels recursos vegetals com a conseqüència del trastocament de l'entorn natural per part de l'home, i a l'augment dels problemes tècnics i/o

TAULA 1

Enzims del metabolisme secundari aïllats i purificats a partir de cultius de cèl·lules vegetals

Enzim	Font	Referència
cafeoil-Coa: quinat cafeoil transferasa	<i>Stevia rebaudiana</i>	202
calcona isomerasa	<i>Phaseolus vulgaris</i>	45
calcona sintasa	<i>Petroselinum hortense</i>	98
cinamoil CoA reductasa i cinamil alcohol: NADP ⁺ deshidrogenasa	<i>Glycine max</i>	112
fenilalanina amoni liasa	<i>Petroselinum hortense</i>	225
hidroxicinamoil CoA ligasa	<i>Petroselinum hortense</i>	92
strictosidina glucosidasa	<i>Catharanthus roseus</i>	75
strictosidina sintasa	<i>Catharanthus roseus</i>	198

econòmics en el conreu de les plantes silvestres, ha induït nombrosos laboratoris a utilitzar d'altres fonts alternatives a la producció agrícola, essent una d'elles el cultiu de teixits i cèl·lules en suspensió d'origen vegetal (35).

La metodologia dels cultius de cèl·lules vegetals actualment s'està desenvolupant a un nivell que permet considerar seriosament llur potencial per l'aplicació biotecnològica i la producció farmacèutica, i són nombrosos els treballs que s'han publicat al respecte (4, 13, 17, 21, 37, 56, 58, 116, 166, 167, 194), alguns dels quals han mostrat que un ampli espectre de models citològics i bioquímics de diferenciació poden expressar-se a nivell de cèl·lules indiferenciades en cultius en suspensió (218, 219).

D'entre les principals avantatges que ofereixen els sistemes de cultius de cèl·lules vegetals respecte als cultius convencionals de plantes senceres, poden destacar-se: 1) la producció dels compostos d'interès medicinal sota condicions ambientals controlades, i per tant reproduïbles, independentment dels canvis climàtics i estacionals o de les condicions del sòl; 2) l'asèpticitat d'aquests sistemes experimentals, lliures de microorganismes i/o insectes; 3) la fàcil multiplicació de les cèl·lules

de qualsevol tipus de planta, tropical o alpina, per produir els seus metabòlits específics, i 4) la reducció del cost i augment de la productivitat deguts al control automatitzat del creixement cel·lular i a la regulació racional dels processos metabòlics (184).

Degut a aquestes avantatges, durant la darrera dècada han estat estudiades les capacitats biosintètiques de diversos cultius de cèl·lules i teixits vegetals, tot obtenint-se uns resultats que si bé no són sempre satisfactoris quant als nivells de productes obtinguts, ofereixen una possibilitat única per a la detecció de nous compostos d'interès medicinal no trobats anteriorment en les plantes intactes, alguns dels quals es podran produir en un futur pròxim a nivell industrial (59, 70, 74, 104, 138, 158). Així mateix, aquests sistemes experimentals també són de gran utilitat a l'hora d'efectuar estudis metabòlics, ja que s'evita la possible manca d'uniformitat entre els individus quan les experiències es realitzen amb plantes senceres (52, 102, 177). A més, amb aquesta metodologia són diversos els enzims aïllats fins ara implicats en la biosíntesi de diferents grups de metabòlits secundaris (taula 1).

És ben sabut que els microorganismes han permès la producció a gran escala de

productes farmacèutics i d'altres productes naturals d'interès. No obstant això, les investigacions dels darrers anys mitjançant cultius de cèl·lules vegetals han posat de relleu les diferències fonamentals entre aquests cultius i els microbians, les quals radiquen en el creixement molt més ràpid dels microorganismes i en medis de cultiu menys costosos, la menor sensibilitat d'aquests éssers vius al stress de cisallament produït pels sistemes de fermentació d'agitació mecànica, i la major facilitat per la selecció de les soques interessants (200).

Considerant aquests factors, i en vista de la gran eficàcia biotecnològica basada en fongs i bacteris, així com del paper decisiu que els factors econòmics juguen en tot procés industrial (57, 69), els cultius de cèl·lules vegetals tan sols poden ser comercialment competitius quan s'utilitzin per a la producció de compostos específics d'origen vegetal els quals no es poden obtenir per altres procediments (90, 129). Per això, els cultius de cèl·lules vegetals deuen aplicar-se en algun dels següents aspectes: 1) per a la producció de productes naturals d'interès medicinal si el cultiu cel·lular proporciona una quantitat significativament major que la planta intacta, o bé si no es disposa de suficient quantitat de material vegetal; 2) per a la producció de constituents vegetals interessants per biotransformació a partir de precursors de baix cost els quals no poden ser eficaçment transformats per mètodes químics o microbians; 3) per a la producció de nous compostos, com ara intermediaris biosintètics, si mostren noves propietats biològiques, i 4) per a la producció de compostos vegetals específics, com ara enzims o lectines, que tan sols poden aïllar-se a partir de cèl·lules vives i no de material vegetal intacte.

D'altra banda, el cultiu de teixits, emprat ja des de fa una trentena d'anys amb la finalitat d'aplicar-ho a la producció de substàncies medicinals (29, 31), actual-

ment està augmentant en importància com un instrument per a la propagació a gran escala de plantes individuals prèviament seleccionades, la recuperació a gran escala de plantes individuals prèviament seleccionades, la recuperació de plantes exemptes de malalties específiques, i la producció d'híbrids somàtics (11). Així, la recerca sobre la formació de protoplasts, la recuperació de cèl·lules vegetals haploides, i llur manipulació genètica són, juntament amb la producció de substàncies d'interès medicinal, àrees fructíferes en l'aplicació del cultiu de teixits i cèl·lules en suspensió (68).

En el present treball s'ha estimat més adient exposar alguns temes de recent actualitat, com ara la producció de metabòlits secundaris mitjançant cèl·lules immobilitzades, o la biotransformació de substrats en compostos d'interès medicinal en cultius de cèl·lules en suspensió, entre d'altres, en detriment de la descripció, per raó de la seva extensió, dels factors tant externs (llum, temperatura, condicions nutritives, fitohormones, etc.) com interns (estats de desenvolupament i diferenciació, estabilitat genètica, etc.), que influeixen en la producció i/o acumulació de constituents secundaris en aquests sistemes experimentals, descrits prou àmpliament en diverses publicacions (18, 54, 67, 72, 117, 142, 157).

ALGUNS ASPECTES DE LA TÈCNICA DEL CULTIU DE CÈL·LULES

El primer pas en l'establiment dels cultius de cèl·lules vegetals és l'obtenció dels cultius de call en un medi nutritiu sòlid, el qual cal que contingui tots els nutrients essencials per tal de mantenir el creixement i la divisió cel·lulars, necessitats que poden variar substancialment d'una espècie a una altra.

Un call es caracteritza per ser una associació més o menys lliure de cèl·lules en la qual no s'observa teixit diferenciat, però degut fonamentalment al seu creixement lent, la naturalesa relativament homogènia de les cèl·lules cultivades i la possible formació de centres de diferenciació, com ara traqueïdes, aquests cultius no poden ser utilitzats directament amb finalitats biotecnològiques (91, 217). Això no obstant, també han estat descrits nombrosos treballs amb cultius de call respecte a l'acumulació de constituents vegetals molt diversos com, per exemple, àcids grassos (164), alcaloides (136), aminoàcids (110), diosgenina (165), L-DOPA (22), ginsenosíds (64), glicirricina (190), olis volàtils (39), proteïnes (138), etc. Tots aquests compostos són d'ús medicinal i/o farmacèutic, encara que la producció, igualment mitjançant la tècnica del cultiu de teixits, d'insentícides, condiments, perfums i agents colorants, també han estat objecte d'una atenció especial.

Els cultius de cèl·lules en suspensió representen l'aplicació biotecnològica més avantatjosa dels cultius cel·lulars d'origen vegetal. Consisteixen en cèl·lules aïllades, o petits agregats de 2 a 20 cèl·lules, que poden considerar-se relativament homogènies respecte al creixement i a la diferenciació, havent-se comprovat, a més, que són les millors adaptades tant per la selecció de cèl·lules de ràpid creixement com per l'expressió de diversos programes de diferenciació bioquímica (ex: acumulació de pigments, formació d'enzims, etc.).

Les cèl·lules vegetals, en comparació amb la majoria de microorganismes, requereixen un medi de creixement més complexe, en el qual, a més d'altres sals inorgàniques i elements traça, i l'administració del nitrogen en forma d'ions nitrat i amoni, rutinàriament se suministren tres vitamines: tiamina, piridoxina i àcid nicotínic, encara que la seva necessitat absoluta tan sols ha estat comprovada en alguns

casos. D'altra banda, quant a la font principal de carboni i energia, la qual generalment consisteix en un 2-3 % de sacarosa, glucosa o fructosa, també han estat emprats amb èxit pel creixement de cultius cel·lulars d'altres sucres, com ara la maltoosa, trealosa, rafinosa o estaquiosa, i fins i tot s'han assajat substrats més barats com, per exemple, molases o d'altres residus del processament de la bledarave o de la canya de sucre (187).

Això no obstant, per tal d'aconseguir una adequada combinació de màxim creixement i òptima expressió de models particulars de diferenciació citològics o bioquímics, dos tipus de fitohormones, fonamentalment auxines i citoquinines, són de gran importància per als cultius en suspensió de cèl·lules vegetals, si bé no n'han establert normes definitives quant a la composició qualitativa i quantitativa en que han d'ésser presents en el medi. Degut a que la promoció de creixement i l'acumulació de productes secundaris poden requerir diferents dosis de fitohormones, alguns autors suggereixen de fer créixer prèviament la biomassa necessària en un medi de creixement apropiat i transferir després les cèl·lules a un medi diferent per tal de provocar la màxima acumulació del producte (220, 223).

En l'actualitat, doncs, es poden dur a terme cultius de cèl·lules vegetals en suspensió que mostrin un ampli espectre de models de diferenciació citològics i bioquímics, i que puguin cultivar-se en sèrie en medis standard completament definits, amb una gran probabilitat d'èxit.

D'altra banda, per tal que un cultiu de cèl·lules vegetals en suspensió assoleixi un nivell de producció biotecnològicament rendible, cal augmentar al màxim la velocitat de biosíntesi en la població de cèl·lules cultivades, molt heterogènies respecte al metabolisme secundari. Amb aquesta finalitat, prèviament s'ha d'obtenir una població de cèl·lules de gran capacitat biosin-

tètica mitjançant un programa de selecció eficaç el qual deu complir, segons Tabata i col. (185), les següents condicions: a) gran variabilitat en la població cel·lular inicial per tal de disposar d'un bon material de partida per a la selecció; b) utilització del clonatge de cèl·lules individuals mitjançant plaques com a mètode d'aïllament, i c) utilització d'un mètode senzill, i alhora sensible, de "screening" per tal de detectar els productes secundaris en els diferents clons.

Així, la primera etapa d'aquest procediment seguit en alguns laboratoris consisteix en seleccionar plantes altament productives d'entre una població d'individus d'una mateixa espècie, ja que es pot trobar una gran diversitat quan a l'acumulació de constituents secundaris. Amb l'inici dels cultius de call a partir d'aquestes plantes és d'esperar que els factors genètics, responsables en la planta intacta d'aquesta gran productivitat, es preservaran en el cultiu cel·lular i influenciaran acumulant els metabòlits secundaris en una gran proporció. L'estudi comparatiu dels resultats fins ara obtinguts demostren que aquesta estratègia dóna com a resultat una major probabilitat de trobar una soca de cèl·lules amb un gran contingut de productes secundaris (147, 222).

Els cultius de cèl·lules en suspensió derivats d'aquestes soques de gran productivitat, via cultiu de call, es depositen damunt discs d'agar en un medi adequat i posteriorment s'analitzen les microcolònies o calls desenrotllats respecte a llur contingut de compost secundari. D'aquesta manera es poden seleccionar aquelles soques altament productives i de ràpid creixement les quals posteriorment seran utilitzades per l'establiment dels cultius de cèl·lules en suspensió (213). Aquest tipus de metodologia ha estat aplicat amb èxit durant la selecció de soques de *Lithospermum erythrorhizon* i *Nicotiana tabacum* de gran productivitat en shikonina i nicotina, respec-

tivament (185), i en el cas dels alcaloides serpentina i ajmalicina en *Catharanthus roseus* (222, 223).

L'eficàcia d'aquest procés de selecció depèn en gran mesura de la sensibilitat i rapidesa del mètode analític aplicat per a determinar el metabòlit secundari. En aquest sentit, el radioimmunoassaig és considerat actualment el mètode més precís i sensible, atès que un gran nombre de mostres es poden analitzar quantitativament a nivell de nano- i picomol de forma totalment automatitzada (106, 127, 145, 207, 209). No obstant això, també poden aplicar-se d'altres mètodes alternatius, encara que més molestos, especialment quan s'han d'analitzar mescles de compostos durant un procés de selecció de soques de cultius cel·lulars. Un exemple d'això el constitueix l'anomenat "cell squash method", procediment molt versàtil i econòmic descrit per Tabata i col. (185) i consistent en pressionar el material soluble provinent de petits fragments de call entre làmines de paper de filtre, les quals posteriorment poden ser ruixades amb reactius específics per tal de detectar la presència de metabòlits secundaris (ex: reactiu de Dragendorff per alcaloides). Aquest mètode, encara que tan sols dóna una estimació aproximada del contingut del producte secundari dels calls, s'ha comprovat que és suficientment segur, per exemple, pel "screening" de calls de *Nicotiana tabacum* altament productius en nicotina (130).

Un requeriment previ per l'aplicació biotecnològica dels cultius en suspensió de cèl·lules vegetals és aconseguir una gran estabilitat de les soques quant al creixement i a la capacitat de biosíntesi. Així, mentre que el creixement ha estat considerat fins ara com un factor molt estable, s'ha observat una marcada variabilitat respecte al potencial bioquímic per acumular compostos secundaris, desconeixent-se de moment les causes d'aquesta inestabilitat bioquímica (42).

TAULA 2
Exemples de productes naturals aïllats de cultius de call

Compost	Classe de compost	Planta	Rendiment (% PS)	Referència
shikonina	naftoquinona	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	12,0	184
solasonina	alcaloide	<i>Solanum laciniatum</i>	3,3	223
glicirricina	saponina	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	3,0	190
cafeïna	purina	<i>Coffea arabica</i>	1,6	61
paniculida C	sesquiterpè	<i>Andrographis paniculata</i>	0,9	28
efedrina	fenetilamina	<i>Ephedra gerardiana</i>	0,6	140
visnagina	furocrom	<i>Ammi visnaga</i>	0,3	87

ACUMULACIÓ DE METABÒLITS SECUNDARIS

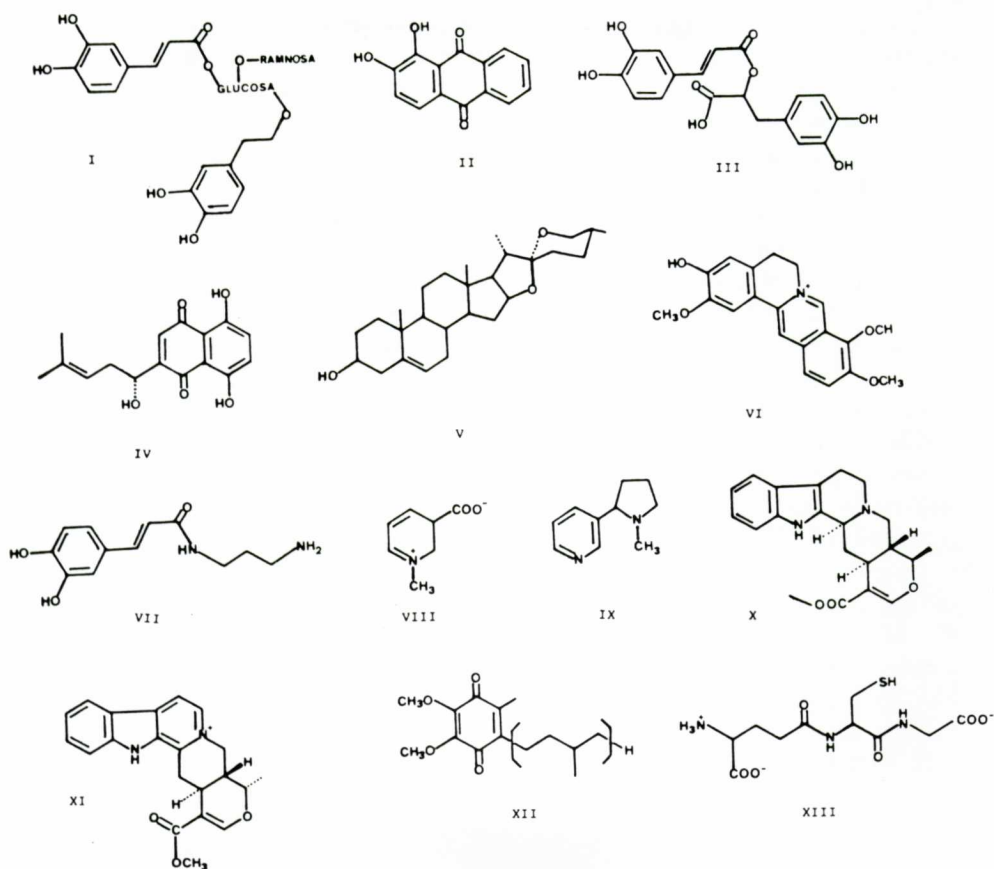
Els cultius de teixits i cèl·lules vegetals, ja des de la seva relativament curta aplicació, han estat contemplats com a fonts potencials de constituents secundaris de diversa utilitat, i especialment de substàncies medicinals. Atès que les plantes superiors són els productors més importants de productes naturals d'interès farmacèutic, una de les principals avantatges que potencialment podria esperar-se dels cultius de cèl·lules i teixits vegetals seria l'acumulació de grans concentracions d'aquests compostos i el descobriment de rutes alternatives per a la producció d'aquestes substàncies medicinals. Així mateix, tot sovint s'ha relacionat aquest potencial amb el recent i impressionant progrés en l'increment de l'acumulació de compostos secundaris d'interès farmacèutic mitjançant sistemes microbians (90). Això no obstant, degut als factors econòmics abans esmentats, la producció industrial d'aquest tipus de compostos mitjançant el cultiu de cèl·lules i teixits vegetals tan sols podrà tenir èxit si els esforços es concentren en productes vegetals específics farmacològicament actius, a partir de plantes rares i/o de difícil adquisició.

En la darrera dècada s'han publicat

nombrosos estudis amb calls i cultius cel·lulars en suspensió de diverses plantes, en els quals s'ha descrit la formació, i a vegades acumulació en concentracions elevades, de molts constituents secundaris diferents, havent-se comprovat la influència del medi, en especial la font de nitrogen i la presència de fitohormones, sobre la producció d'aquests compostos (2, 9, 100, 212).

A la taula 2 es relacionen diversos productes naturals aïllats de cultius de call altament productius. Aquests exemples, i els de la figura 1, indiquen que en els cultius cel·lulars poden acumular-se compostos derivats de rutes biosintètiques molt distintes. No obstant això, encara que en els cultius de call pot assolir-se una gran acumulació de compostos, com ja ha estat indicat anteriorment, aquests sistemes no tenen aplicació biotecnològica. En alguns casos, però, l'elevada acumulació de constituents secundaris en cultius de call o de cèl·lules en suspensió probablement està relacionada amb la presència de models de diferenciació, essent un exemple d'això la producció de glicoalcaloides esteroídics de *Solanum khasianum* (95), o l'acumulació d'alcaloides en cultius de *Papaver somniferum* quan hi ha present un gran nombre de cèl·lules laticíferes especialitzades (125).

Encara que alguns metabòlits secundaris



Compost	Classe de compost	Planta	Rendiment (% PS)	Referència
I	verbacòsid	<i>Syringa vulgaris</i>	16	51
II	alizarina	<i>Morinda citrifolia</i>	15-18	220
III	àcid rosmarínic	<i>Coleus blumei</i>	15	141
IV	shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	12	183
V	diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	7,2	146
VI	jatrorricina	<i>Berberis stolonifera</i>	7	77
VII	cafeoil putrescina	<i>Nicotiana tabacum</i>	6	15
VIII	trigonelina	<i>Trigonella foenun-graecum</i>	5	139
IX	nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	1-3,4	130
X	ajmalicina	<i>Catharanthus roseus</i>	1	223
XI	serpentina	<i>Catharanthus roseus</i>	0,8	223
XII	ubiquinona-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,5	79
XIII	glutatió	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,2	14

Fig. 1. Cultius de cèl·lules vegetals en suspensió de gran rendiment en la producció de diversos productes naturals.

es produeixen en menor proporció en els cultius de cèl·lules en suspensió que en els de call, s'han descrit alguns casos en els quals s'han assolit concentracions molt elevades. En la figura 1 es mostren alguns exemples de productes naturals aïllats de cultius de cèl·lules en suspensió de gran productivitat, destacant-ne pel seu elevat rendiment, considerablement més gran que en la planta intacta, l'acumulació d'antraquinones i verbascòsid en cultius cel·lulars de *Morinda citrifolia* (220) i *Syringa vulgaris* (50), respectivament, i d'àcid rosmarínic en *Coleus blumei* (141, 221), i més recentment en *Anchusa officinalis* (41) i diverses espècies de *Rosmarinus* i *Salvia* (211). D'especial interès també, degut al procediment amb el qual s'han obtingut les soques, és la considerada acumulació de cafeoil-putrescina i feruoil-putrescina en cultius de cèl·lules en suspensió de *Nicotiana tabacum* (15).

Dels altres compostos que són representants a la figura 1, la ubiquinona, constituent de la cadena respiratòria mitocondrial, s'acumula en cultius cel·lulars en suspensió de *Nicotiana tabacum* en un nivell molt més gran que no pas en la planta sencera (79). L'elevada producció del tripeptid glutatió en cultius de cèl·lules fotomixotròfiques en suspensió d'aquesta mateixa espècie és particularment interessant atès que aquest compost és excretat al medi de cultiu (14). El triterpè diosgenina és d'especial interès per a la síntesi parcial d'esteroides i fitosterols (188). Els alcaloides indòlics ajmalicina i serpentina, d'aplicació actual en el tractament de malalties circulatòries, han estat aïllats en cultius de cèl·lules en suspensió de *Catharanthus roseus*, encara que en aquest cas ha estat necessari un procediment rigorós de selecció de soques altament productives per tal d'assolir una acumulació elevada d'aquests metabòlits secundaris (222, 223). Els ginsenòsids s'acumulen també en gran proporció en cultius de cèl·lules de *Panax gin-*

seng (64, 154) i de *P. quinquefolium* (82), havent-se comprovat farmacològicament que l'extracte de call és gairebé tan actiu com el d'arrel de ginseng, la qual té un llarg període de formació.

D'altra banda, els cultius de cèl·lules vegetals poden formar diversos tipus de quinones en quantitat relativament elevades. És el cas, per exemple, de les espècies *Cassia angustifolia*, els cultius de call de la qual produeixen antraquinones i diantrones, amb una notable activitat laxant (60), i de *C. tora*, usada al Japó també com a laxant, la qual acumula antraquinones, com ara el crisofanol o l'emodina, en una proporció deu vegades superior a la de la planta intacta (181). Això no obstant, és de destacar la família de les Rubiàcies com una de les més estudiades actualment en relació a la producció d'aquest tipus de metabòlits secundaris (80, 81, 155, 214).

Un altre grup de compostos d'interès farmacèutic i produïts també per cultius cel·lulars són els pigments del tipus naftoquinona, emprats en alguns països pel tractament de cremades i malalties de la pell. Així, en cultius de cèl·lules en suspensió de *Lithospermum erythrorhizon* s'ha obtingut un nivell de pigments de gairebé vuit vegades superior al de l'arrel usada com a droga *crua* (183, 199), havent-se comprovat així mateix que aquests pigments, derivats de la shikonina, són similars als de l'arrel (180, 183). D'altra banda, els extractes clorofòrmics dels cultius de call han mostrat una activitat antimicrobiana davant germens gram-positius semblant a la de l'extracte clorofòrmic de l'arrel (182).

Els alcaloides, en general, són especialment difícils de produir mitjançant els cultius cel·lulars. La raó per la qual això succeeix no és prou clara, però s'ha suggerit, almenys pel que fa a alguns alcaloides, que la disminució de la seva biosíntesi podria ser deguda a un bloqueig metabòlic d'una reacció específica en la ruta biosintètica.

Així, per exemple, en cultius de cèl·lules indiferenciades de *Datura* i *Scopolia* s'ha demostrat que els baixos nivells alcaloídics són causats principalment per la supressió de la formació d'àcid tròpic, la meitat àcida de la hiosciamina (179). D'altra banda, en cultius cel·lulars de *Stephania cepharantha* s'ha observat que la reacció de metilació i la formació del grup metilendiòxid no tenen lloc en les etapes finals de la ruta biosintètica que condueix a la formació dels alcaloides cefarantina i isotetrandrina, acumulant-se en el seu lloc els alcaloides intermediaris aromalina i berbamina (1). Si fos possible d'eliminar aquesta manca de metilació, els cultius cel·lulars de *S. cepharantha* serien capaços de produir l'alcaloide d'interès medicinal, cefarantina. A vegades també s'han observat resultats negatius en la producció d'alcaloides en cultius cel·lulars de *Catharanthus roseus* (152, 156); això no obstant, amb aquesta mateixa planta, i d'altres com *Stemmadenia tomentosa* i *Voacanga africana* (174), *Berberis wilsoniae* (23), *Solanum dulcamara* (49), *Coptis japonica* (151), *Duboisia leichhardtii* (215), *Ochrosia elliptica* (97), i diverses espècies de *Ruta* (53), s'han dut a terme amb èxit experiències relatives a la producció i/o acumulació d'aquests tipus de metabòlits secundaris.

En qualsevol cas, però, una de les plantes més estudiades des del punt de vista de la seva possible aplicació biotecnològica per a l'obtenció de productes farmacèutics és *Catharanthus roseus*, amb la qual s'han realitzat nombrosos estudis, alguns d'ells ja esmentats, dirigits els uns al coneixement del metabolisme de llurs alcaloides, principals compostos farmacològicament actius d'aquesta espècie, alguns dels quals són emprats clínicament en l'actualitat, i els altres a determinar els factors interns i externs que influeixen en una major acumulació d'aquests metabòlits secundaris en aquests sistemes experimentals (38, 46, 47, 101, 103, 114, 120, 133, 163, 193).

Tots aquests exemples posen de manifest que existeix una sèrie important d'estructures químiques molt diferents i que, òbviament, poden expressar-se moltes rutes biosintètiques distintes a nivell de cultius de teixits i cèl·lules en suspensió d'origen vegetal. Així, doncs, si es considera el notable progrés dels darrers anys en el camp de la producció de metabòlits secundaris en cultius de cèl·lules en suspensió, sembla raonable pensar que alguns d'aquests compostos en el futur es podran acumular en grans quantitats mitjançant l'aplicació biotecnològica d'aquests sistemes (195, 204). A més, no tan sols cal aplicar aquesta biotecnologia als cultius que en l'actualitat ofereixen un baix rendiment, sinó que existeixen encara nombroses plantes d'interès medicinal de les quals llurs capacitats de biosíntesi han d'ésser investigades.

ELS CULTIUS DE CÈL·LULES COM A FONT DE NOUS PRODUCTES

Si l'espectre de constituents secundaris en els cultius de cèl·lules vegetals es compara amb el de la planta intacta i llurs diferents òrgans, s'observa que la planta, en la majoria dels casos, conté un espectre més ampli que les cèl·lules derivades d'ella, observant-se també una diferència en les quantitats relatives d'aquests compostos (20, 185). No obstant això, sorprenentment, en repetides ocasions alguns metabòlits secundaris no trobats en la planta original s'han aïllat dels cultius cel·lulars derivats d'elles. A la taula 3 es relacionen alguns exemples de productes secundaris, entre els quals hi ha diverses classes d'alcaloides, cumarines, antraquinones i sesquiterpens, que es produeixen predominantment en cultius de cèl·lules en suspensió més que en la planta sencera, o fins i tot de manera exclusiva en aquests sistemes experimentals.

TAULA 3

Exemples de metabòlits secundaris produïts en major proporció, o exclusivament, en cultius de cèl·lules en suspensió que no pas en la planta sencera

Compost	Classe de compost	Planta	Referència
edulina	alcaloide	<i>Ruta graveolens</i>	169
isopimpinèlina	furanocumarina	<i>Ruta graveolens</i>	169
rutacultina	furanocumarina	<i>Ruta graveolens</i>	169
armorina	alcaloide	<i>Stephania cepharantha</i>	165
norsanguinarina	alcaloide	<i>Papaver somniferum</i>	63
3-metilpurpurina	antraquinona	<i>Digitalis lanata</i>	62
5-hidroxdigitoluteïna	antraquinona	<i>Tectona grandis</i>	43
lucidina	antraquinona	<i>Morinda citrifolia</i>	107
paniculides	sesquiterpens	<i>Andrographis paniculata</i>	132
pericina, pericalina	alcaloides	<i>Picalima nitida</i>	8
hinokiol, ferruginol	diterpens	<i>Thuja occidentalis</i>	16
vomilenina	alcaloide	<i>Rauwolfia serpentina</i>	173
tarennòsid	iridoide glucòsid	<i>Gardenia jasminoides</i>	201

En els darrers anys, l'equip d'investigadors encapçalat pel Prof. Zenk, ha aconseguit d'elucidar la seqüència biosintètica dels alcaloides heteroyohimbínics ajmalicina i els seus isòmers utilitzant cultius de cèl·lules en suspensió de *Catharanthus roseus* (75, 149, 171, 197, 224). Els estudis amb material de planta intacta no proporcionaren la determinació d'una seqüència biosintètica tan complexa, i ha estat tan sols mitjançant l'aplicació de la tècnica de cultius cel·lulars que s'han pogut aïllar en quantitat suficient els enzims implicats, alhora que s'han pogut elucidar estructuralment per primera vegada diversos intermediaris (84). Així mateix, una altra planta estudiada en aquest sentit es *Dioscorea deltoidea*, els cultius cel·lulars de la qual han permès d'identificar nous intermediaris de la biosíntesi del seu metabòlit d'interès farmacèutic, el triterpè diosgenina (189). Aquests fets, lògicament, ressal-

ten el valor potencial dels sistemes de cultius de cèl·lules en suspensió com a fonts d'enzims intermediaris i/o específics, així com de nous productes vegetals que no s'acumulen en la planta intacta o ho fan en quantitats insuficients.

Estudis realitzats recentment en diversos laboratoris han comprovat l'enorme variabilitat bioquímica de diferents soques de cultius de cèl·lules en suspensió de *Catharanthus roseus*, les quals acumulen diversos intermediaris i alcaloides en quantitats molt diferents (93, 94, 99, 134, 172).

Atès que aquests nous compostos secundaris que es vagin descobrint en els cultius cel·lulars probablement tindran propietats químiques i biològiques desconegudes, seria molt interessant si les diferents soques de cultius cel·lulars en les quals s'acumulen aquests productes naturals fossin sotmeses a bioassaigs convenientment dissenyats. Puix que algunes de les noves subs-

tàncies tindran també noves i interessants propietats fisiològiques, aquests bioassaigs deurien incloure anàlisis per a la determinació d'activitat antimicrobiana, antiinflamatòria, antiviral, antihemorràgica, antiartrítica, anticancerígena i d'altres activitats farmacològicament importants. Per això, el "screening" dels cultius de cèl·lules i teixits vegetals mitjançant bioassaigs d'activitats farmacològiques pot ésser un mètode eficaç per a l'explotació de principis actius produïts per aquests sistemes experimentals.

De fet, aquesta metodologia ha proporcionat ja alguns fruits en el descobriment de substàncies insospitades de possible ús medicinal. Així, per exemple, Veliky i Latta (205) trobaren una certa activitat antimicrobiana en alguns teixits de call aïllats de diverses plantes. En cultius d'*Emblia officinalis* s'ha comprovat que l'activitat antimicrobiana era deguda a la presència de galat d'etil, format per les cèl·lules en una quantitat força considerable (89). Així mateix, s'ha observat inhibició de la secreció del suc gàstric en ratas i millora de les úlceres pèctiques induïdes per l'administració oral d'àcid acètic, com a efecte dels extractes aquosos preparats a partir de cultius de call o de cèl·lules en suspensió d'*Isonodon japonicus*, havent-se comprovat, a més, que aquesta activitat era gairebé la mateixa que la de l'extracte elaborat a partir de la planta intacta (128). A més dels exemples exposats, s'han dut a terme amb èxit diversos "screenings" farmacològics de nombrosos cultius de cèl·lules els quals han permès d'aïllar diverses substàncies amb activitat antitumoral i antiviral (121, 122). Tenint en compte la impressionant varietat de compostos secundaris existents, alguns tan complexes com alcaloides o terpenoids, sembla probable que els cultius de cèl·lules constituïran sistemes eficaços per l'aïllament d'intermediaris fins ara desconeguts, o bé de nous productes naturals.

ESTUDIS AMB CÈL·LULES IMMOBILITZADES

Un procés molt prometedor i fructífer en els darrers anys ha estat la immobilització d'enzims i de cèl·lules bacterianes o fúngiques, tècnica mitjançant la qual les cèl·lules o els enzims són atrapats en els enreixats de polímers, com ara membranes de colagen, poliacrilàmida, alginat càlcic, poliestirè, gel d'agar, derivats de cel·lulosa, poliuretà o d'altres suports (34, 48, 109, 118, 206). Les cèl·lules immobilitzades resten viables durant un cert temps (diverses setmanes) i els enzims actius, degut a que segueixen estant en el seu entorn natural. Aquests biocatalitzadors atrapats són especialment útils perquè es poden utilitzar de forma continuada per a la producció de diversos constituents, havent-se trobat aplicacions d'aquesta tècnica en camps com ara la síntesi orgànica, anàlisis clíniques i químiques, indústria, medicina i d'altres (26, 27, 33, 73, 108, 161).

En contrast amb les reaccions enzimàtiques tradicionals, les quals es duen a terme en processos en sèrie, aquestes cèl·lules immobilitzades es disposen en columnes, on la solució nutritiva i els substrats a transformar són bombejats a través de la capa de cèl·lules de forma que els productes, en la majoria dels casos, s'alliberen dels biocatalitzadors immobilitzats a la solució circulant, i poden, així, separar-se contínuament de l'eluat. A més, les avantatges d'aquests sistemes són múltiples degut, entre d'altres raons, a que els processos d'extracció i/o purificació dels enzims no són necessaris, l'activitat enzimàtica després de la immobilització i l'estabilitat operacional de les cèl·lules immobilitzades són elevades, el cost de l'enzim o del biocatalitzador és baix degut al seu ús prolongat i, finalment, a que poden dur-se a terme reaccions multienzimàtiques.

La immobilització de cèl·lules, a més d'haver-se emprat en experiències amb mi-

croorganismes, també ha estat aplicada amb èxit a cèl·lules vegetals. Així, per exemple, s'ha obtingut una considerable productivitat d'antraquinones i d'alcaloides del grup de l'ajmalicina en sistemes de cèl·lules immobilitzades de *Morinda citrifolia* (24) i *Catharanthus roseus* (25), respectivament, així com la producció d'una citoquinina en cèl·lules immobilitzades de tabac (203) i la modificació de diverses proteïnes vegetals (105). D'altra banda, mitjançant aquesta tècnica s'han assolit reaccions de biotransformació com, per exemple, la conversió de codeïna en codeïna amb cèl·lules de *Papaver somniferum* (66) i la 12 β -hidroxilació de glicòsids cardíacs de *Digitalis lanata* (24, 123, 124). Així, doncs, degut als prometedors resultats obtinguts fins ara amb sistemes microbians, i atès que les cèl·lules vegetals, comparativament més sensibles, romanen enzimàticament actives durant la immobilització, estudis d'aquest tipus fan molt atractives aplicacions similars amb cèl·lules vegetals, en especial si s'utilitzen soques adequadament seleccionades.

BIOTRANSFORMACIÓ DE SUBSTRATS

Els cultius de cèl·lules en suspensió s'han investigat intensament en els darrers anys respecte a llur capacitat per efectuar la transformació parcial de compostos orgànics, naturals o sintètics, i d'estructures molt diverses i complexes, aplicats de forma exògena (5, 100, 143, 144, 148). Aquestes investigacions han demostrat que les cèl·lules vegetals posseeixen un gran potencial bioquímic per a efectuar transformacions específiques de compostos orgànics que donen lloc tot sovint a compostos més complexes i, des del punt de vista farmacèutic, de major utilitat.

Els principals tipus de reaccions que es produeixen durant els processos de bio-

transformació en cultius cel·lulars són oxidacions, reduccions, hidroxilacions, metilacions, demetilacions, glicosilacions, isomeritzacions, etc., les quals mostren una semblança molt considerable amb les reaccions de transformació microbianes, estudiades i aplicades biotecnològicament amb èxit durant més de 50 anys. Això no obstant, les cèl·lules vegetals tenen la capacitat addicional de catalitzar diverses reaccions de conjugació en les quals residus glicosil, acil o aminoacil, compostos amino o estructures peptídil, són afegits a grups funcionals dels substrats. Algunes d'aquestes reaccions característiques de les plantes, com ara la glicosilació en un lloc específic d'un substrat multifuncional, semblen constituir un potencial de gran interès per al desenvolupament biotecnològic, ja que en molts casos aquests glicòsids o bé no poden sintetitzar-se per procediments químics, o tan sols amb la complexa implicació de grups protectors. L'aplicació biotecnològica d'aquest potencial, però, requereix una rigurosa selecció de soques adients atès que en la majoria dels casos les cèl·lules vegetals duen a terme més d'una reacció de biotransformació amb un substrat determinat (9, 10, 12, 170).

En els darrers anys s'ha prestat una considerable atenció a les reaccions de biotransformació utilitzant diversos compostos esteroïdics, com ara el 5 α -pregnan, 5 β -pregnan, testosterona, progesterona, 5 β -pregnan-3,20-diona i d'altres andrògens, així com sapogenines i fitosterols (5, 65, 175, 176). D'entre els nombrosos estudis realitzats recentment cal destacar-ne les transformacions de la testosterona a 4-androsten-3,17-diona, 5 α -androstan-17 β -ol-3-ona, 5 α -androstan-3 β , 17 β -diol, llur dipalmitat i 3- i 17- β monoglucòsids, epiandrosterona, els seus palmitat i glucòsid, i testosterona glucòsid, en cultius de cèl·lules de *Nicotiana tabacum* (65). Alguns d'aquests compostos com, per exemple, l'epiandrosterona plamitat, epiandros-

bé ha estat verificat en estudis sobre la glucosilació d'àcids aromàtics i l'acumulació de compostos fenòlics, respectivament, en cultius de cèl·lules en suspensió de *Nicotina sylvestris* (153) i d'*Acer pseudoplatanus* (208).

Totes aquestes dades indiquen el gran potencial dels cultius de cèl·lules vegetals per l'aplicació biotecnològica, però evidencien també que són necessaris els complexos procediments de selecció per tal d'obtenir aquelles cèl·lules que tenen la màxima capacitat per a catalitzar una reacció específica d'entre una gran xarxa metabòlica. A més, els resultats obtinguts fins ara indiquen que en l'optimització dels processos biotecnològics cal prestar una gran atenció a la condició fisiològica de les cèl·lules, ja que pot influir en gran mesura sobre el nivell de l'enzim responsable.

PERSPECTIVES

Una avaluació crítica de l'actual situació de la tecnologia dels cultius de cèl·lules i teixits vegetals revela que una gran varietat de reaccions bioquímiques específiques de les plantes poden expressar-se a nivell de cèl·lules indiferenciades. Així mateix, una comparació amb els processos biotecnològics microbians permet de contemplar els cultius de cèl·lules vegetals en suspensió com a fructífers en aquells casos en els quals són requerides reaccions característiques dels vegetals (162, 200).

Això no obstant, per l'aplicació industrial dels cultius cel·lulars en la producció de compostos medicinals cal que s'acompleixin, com a mínim, els següents requisits: 1) que la velocitat de creixement cel·lular i de la biosíntesi siguin prou elevades per tal d'obtenir un rendiment considerable del producte final en un període curt de temps; 2) que les cèl·lules cultivades siguin genèticament estables per a proporcionar una quantitat constant del produc-

te; 3) que els metabòlits s'acumulin en les cèl·lules sense que siguin ràpidament catabolitzats o, a ser possible, que s'alliberin al medi líquid, i 4) que els costos de producció, inclosos els medis de cultiu, precursors i extracció química, siguin suficientment baixos per tal que el procés esdevingui rendible.

Respecte al primer requeriment, en general es pensa que les cèl·lules vegetals proliferen massa lentament per fer-les créixer en fermentadors a gran escala. Això no obstant, diverses experiències amb cultius cel·lulars han suggerit que la velocitat de creixement pot accelerar-se considerablement millorant les condicions de cultiu i seleccionant les soques cultivades (86, 159). Encara que ja s'han obtingut algunes dades prometedores, caldran més esforços en la millora o aprofitament de la velocitat biosintètica de compostos medicinals en cultius de cèl·lules en suspensió mitjançant la regulació bioquímica i genètica del metabolisme secundari.

En relació amb el segon requisit, el de l'estabilitat genètica de les cèl·lules cultivades, el mètode d'emmagatzematge per congelació, segons els estudis de diferents autors, podria utilitzar-se per a la conservació de valuosos estocs de cultius (32, 44, 85, 126). Això no obstant, cal destacar la importància del control de les variacions nuclears o citoplasmàtiques que poden tenir lloc en les cèl·lules cultivades en el pas del cultiu en laboratori al processament industrial (119, 178), motiu pel qual són necessaris, a més a més, estudis citogènics i fisiològics dirigits a aconseguir el control de l'estabilitat biosintètica.

L'estudi del tercer problema, relatiu a l'alliberament de metabòlits cel·lulars al medi de cultiu, pot ser important per tal d'evitar possibles repressions metabòliques o controls "feedback" negatius, deguts a l'excés d'acumulació del producte final a la cèl·lula. Atès que les cèl·lules vegetals en general tendeixen a acumular

llurs metabòlits secundaris en vacúols o en el citoplasma, caldria idear un mètode per alterar la permeabilitat de la membrana cel·lular. En aquest sentit, s'ha obtingut algun resultat positiu amb cultius de cèl·lules de *Symphytum officinale* que acumulen fins un 20 % del pes sec de glutamina (192), però la seva aplicació generalitzada requereix encara un nombre més elevat d'experiències.

Finalment, el quart requeriment està relacionat amb els complexos problemes econòmics de la producció industrial, els quals dependen bàsicament del cost de producció i de la demanda del compost. Una part considerable del cost de producció hauria de correspondre a la font de carboni orgànic i a l'electricitat necessària pels processos d'aireació, agitació, regulació de la temperatura, etc. D'altra banda, l'ús del cultiu continu o semicontinu en lloc del sistema de cultiu en sèrie no tan sols pot reduir els costos de producció per la reesterilització del fermentador i la necessitat de propagació de les cèl·lules a partir del stock original, sinó també pot permetre un canvi programat de la composició del medi i regular així l'activitat biosintètica de les cèl·lules (30).

Així, doncs, els principals i més recents avenços en la recerca experimental sobre la producció de substàncies d'interès medicinal mitjançant sistemes de cultius de cèl·lules vegetals són, entre d'altres: 1) el descobriment de diversos cultius cel·lulars capaços de produir compostos medicinals específics a una velocitat igual o superior a la de les plantes intactes; 2) la troballa, mitjançant bioassaigs, de noves substàncies fisiològicament actives d'aplicació terapèutica; 3) el coneixement dels factors de control involucrats en el metabolisme secundari; 4) la demostració que l'activitat biosintètica de cèl·lules cultivades pot augmentar-se regulant els factors ambientals i/o condicions de cultiu, o bé mitjançant la selecció o inducció artificial de clons mu-

tants; 5) la producció d'alguns dels compostos medicinals localitzats en teixits o òrgans morfològicament especialitzats, en sistemes de cultius no tan sols per inducció d'estructures organitzades específiques sinó també per algunes soques de cultius en absència d'organització, i 6) la demostració de l'ús dels cultius de cèl·lules vegetals per a la biotransformació específica de productes naturals.

Atès que les plantes posseeixen un gran nombre de propietats bioquímiques que són específiques dels vegetals, i que encara són absolutament indispensables per a l'obtenció de productes farmacèutics, llurs cèl·lules ofereixen un potencial extremadament interessant per a les aplicacions biotecnològiques dirigides a aquells problemes que no es poden resoldre amb cap altre tipus de cèl·lules vives o per medis estrictament químics.

Això no obstant, a més de l'obtenció de productes d'interès farmacèutic i/o medicinal mitjançant els cultius de cèl·lules vegetals, l'aplicació biotecnològica d'aquests sistemes experimentals també va dirigida envers la millora de plantes d'interès agrícola (19, 40, 76, 210) i forestal (137, 196), a l'obtenció de soques resistents a herbicides o antibiòtics (115), a l'estudi del metabolisme de pesticides i d'altres compostos químics presents en l'ambient (150), etc. Finalment, la biotecnologia marina, encara que en alguns casos no tingui el seu origen en cèl·lules vegetals, actualment és objecte d'intensos estudis per la seva possible aplicació a l'obtenció d'antibiòtics, agents anticancerígens, toxines i productes naturals en general amb activitat farmacològica i/o terapèutica (36, 88, 131, 160).

Encara que els avenços abans esmentats han confirmat l'esperança d'aconseguir en un futur pròxim l'optimització d'alguns sistemes experimentals en la producció industrial dels compostos d'interès farmacèutic, resten encara molts problemes, tant teòrics com pràctics, que haurien de solu-

cionar-se prèviament. Així, d'entre els principals desafiaments amb els quals encara s'han d'afrontar els científics en aquest camp pot citar-se la desrepressió de les cèl·lules, determinar la interdependència de les cèl·lules entre sí, aconseguir l'estabilització dels genotips, i de fer créixer la biomassa uniforme de cèl·lules a baix cost (168). Per això, les activitats de recerca, tant individuals com col·lectives, haurien de comprendre tots els aspectes d'aquests sistemes de cultius per a una millor comprensió del metabolisme secundari i la seva aplicació biotecnològica.

BIBLIOGRAFIA

- AKASU, M., ITOKAWA i FUJITA, M. (1976) Biscoclaurine alkaloids in callus tissues of *Stephania cepharantha*. *Phytochemistry*, 15:471-473.
- ALFERMANN, A.W., MERZ, D. i REINHARD, E. (1975) Induction of anthocyanin biosynthesis in tissue cultures of *Daucus carota*. *Planta Med.*, suppl.: 70-78.
- ALFERMANN, A.W., BOY, H.M., DÖLLER, P.C., HAGEDORN, W., HEINS, M., WAHL, J. i REINHARD, E. (1977) Biotransformation of cardiac glycosides by plant cell cultures. En: *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H., eds.) Springer. Berlin. pp. 125-141.
- ALFERMANN, A.W. i REINHARD, E. (1976) *Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods*. Ges. Strahlen und Umweltforsch. München.
- ALFERMANN, A.W., i REINHARD, E. (1980) Biotransformation by plant tissue cultures. *Bull. Soc. Chim. France, part II*: 35-45.
- ALFERMANN, A.W., SCHULLER, I. i REINHARD, E. (1980) Biotransformation of cardiac glycosides by immobilized cells of *Digitalis lanata*. *Planta Med.*, 40:218-223.
- ALFERMANN, A.W., BERGMAN, W., FIGUR, C., HELMBOLD, U. SCHAWANTAG, D. SCHULLER, I. i REINHARD, E. (1983) Biotransformation of β -methyl digitoxin to β -methyl digoxin by cell cultures of *Digitalis lanata*. En: *Plant Biotechnology* (Mantell, S.H. and Smith, H., eds.) Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 67-74.
- ARENS, H., BORBE, H.O., ULBRICH, B. i STÖCKIGT, J. (1982) Detection of pericine, a new CNS-active indole alkaloid from *Picralima nitida* cell suspension culture by opiate receptor binding studies. *Planta Med.*, 46:210-214.
- BARZ, W. (1977a) Catabolism of endogenous and exogenous compounds by plant cell cultures. En: *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H., eds.) Springer. Berlin. pp. 153-171.
- BARZ, W. (1977b) Degradation of polyphenols in plants and plant cell suspension cultures. *Physiol. Veg.*, 15:261-277.
- BARZ, W., REINHARD, E. i ZENK, M.H. (1977) *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*. Springer. Berlin.
- BARZ, i HÖSEL, W. (1979). Metabolism and degradation of phenolic compounds in plants. *Rec. Adv. Phytochem.*, 12:339-369.
- BARZ, W. i ELLIS, B.E. (1980) Potential of plant cell cultures for pharmaceutical production. En: *Natural Products as Medicinal Agents* (Beal, J.L. and Reinhard, E., eds.) Hippokrates Verlag. Stuttgart. pp. 471-507.
- BERGMAN, L. i RENNENBERG, H. (1978). Efflux and production of glutathione in suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 88:175-186.
- BERLIN, J. i KNOBLOCH, K.H. (1980) Biochemical characterization of a variant tobacco cell line accumulating high levels of cinnamoyl putrescine derivatives. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361:219-220.
- BERLIN, J. (1983) Naturstoffe aus pflanzlichen Zellkulturen. *Chemie i.u. Zeit*, 17:77-84.
- BERLIN, J. (1984) Plant cell cultures - a future source of natural products. *Endeavour*, 8:5-8.
- BHOJWANI, S.S. i RAZDAN, M.K. (1983) *Developments in Crop Science. Vol. 5. Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier. Amsterdam.
- BLISS, F.A. (1984) The application of new plant biotechnology to crop improvement. *HortScience*. 19:43-48.
- BÖHM, H. (1978) Regulation of alkaloid production in plant cell cultures. En: *Frontier of Plant Tissue Culture* (Thorpe, T.A., ed.) Univ. Calgary. Calgary, Canada. pp. 201-212.
- BÖHM, H. (1980) The formation of secondary metabolites in plant tissue and cell cultures. *Int. Rev. Cytol., suppl. 11B*:183-208.
- BRAIN, K.R. (1974) Accumulation of L-DOPA in cultures from *Mucuna pruriens*. 3rd Int. Congr. Plant tissue and Cell Culture. Leicester. Abstr. 73.
- BREULING, M., ROTHENBERGER, S., ALFERMANN, A.W. i REINHARD, E. (1984) Production of protoberberine alkaloids by suspension cultures of *Berberis wilsoniae*. *Farm. Tijd. voor België*, 61:334.

24. BRODELIUS, P., DEUS, B., MOSBACH, K. i ZENZ, M.H. (1979) Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. *FEBS Lett.*, 103:93-97.
25. BRODELIUS, P. i NILSSON, K. (1980) Entrapment of plant cells in different matrices. *FEBS Lett.*, 122:312-316.
26. BRODELIUS, P. (1983) Production of biochemicals with immobilized plant cells: Possibilities and problems. *Ann. NY Acad. Sci.*, 413:383-393.
27. BRODELIUS, P. (1984) Immobilized viable plant cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 434:382-393.
28. BUTCHER, D.N. i CONNOLLY, J.D. (1971) An investigation of factors which influence the production of abnormal terpenoids by callus cultures of *Andrographis paniculata* Nees. *J. Exp. Bot.*, 22:314-322.
29. BUTENKO, R.G. (1967) Tissue culture of medicinal plants and prospective of its usage in medicine. *Probl. Pharmacolog.*, 21:184-191.
30. CALCOTT, P.H. (1981) *Continuous Cultures of Cells*. CRC Press, Florida.
31. CAREW, D.P. i STABA, E.J. (1965). Plant tissue culture: its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies. *Lloydia*, 28:1-26.
32. CHEN, T.H.H., KARTHA, K.K., LEUNG, N.L., KURZ, W.G.W., CHATSON, K.B. i CONSTABEL, F. (1984) Cryopreservation of alkaloid-producing cell cultures of periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Plant Physiol.*, 75:726-731.
33. CHIBATA, I. i TOSA, T. (1980) Immobilized microbial cells and their applications. *Trends Biochem. Sci.*, 5:88-90.
34. CHIBATA, I. i TOSA, T. (1981) Use of immobilized cells. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10:197-216.
35. COLMAN, R. (1984) Biotechnology demands a special strategy. *New Sci.*, 1396:26-27.
36. COLWELL, R.R. (1983) Biotechnology in the marine sciences. *Science*, 222:19-23.
37. CONSTABEL, F., GAMBORG, O.L., KURZ, W.G.W. i STECK, W. (1974) Production of secondary metabolites in plant cell cultures. *Planta Med.*, 25:158-165.
38. CONSTABEL, F., GAUDET-LA PRAIRIE, P., KURZ, W.G.W. i KUTNEY, J.P. (1982) Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. XII. Biosynthetic capacity of callus from original explants and regenerated shoots. *Plant Cell Reports*, 1:139-142.
39. CORDUAN, G. i REINHARD, E. 1972 Synthesis of volatile oils in tissue cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 11:917-922.
40. DALE, P.J. (1984) Tissue culture and forage crop improvement. *Span*, 27:55-57.
41. DE-EKNAMKUL, W. i ELLIS, B.E. (1984) Rosmarinic acid production and growth characteristics of *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. *Planta Med.*, 50:346-350.
42. DEUS-NEUMANN, B. i ZENK, M.H. (1984) Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Med.*, 50:427-433.
43. DHRUVA, B.R., RAMA RAO, A.V., SRINIVASAN, R. i VENKATARAMAN, K. (1972) Structure of a quinone from teak tissue culture. *Ind. J. Chem.*, 10:683-685.
44. DIETRICH, B., NEUMANN, D., SCHINDLER, U. i LUCKNER, M. (1982) Cryopreservation of *Digitalis lanata* cells cultivated in vitro. *Planta Med.*, 45:154.
45. DIXON, R.A., DEY, P.M. i WHITEHEAD, I.M. (1982) Purification and properties of chalcone isomerase from cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta*, 715:25-33.
46. DÖLLER, G., ALFERMANN, A.W. i REINHARD, E. (1976) Production of indole alkaloids in tissue cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.*, 30:14-20.
47. DÖLLER, G. (1978) Influence of the medium on the production of serpentine by suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. En: *Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods* (Alfermann, A.W. and Reinhard, Ed., eds.) Ges. Strahlen und Umweltforsch. München. pp. 109-116.
48. DURAND, G. i NAVARRO, J.M. (1978) Immobilized microbial cells. *Process Biochem.*, 13:14-23.
49. EHMKE, A. i EILERT. (1984) Steroid alkaloids in tissue cultures of *Solanum dulcamara*. *Farm. Tijds. voor België*, 61:333.
50. ELLIS, B.E. (1980) Accumulation of hydroxyphenylethanol glucosides in cultures cells of *Syringa vulgaris*. *Z. Physiol. Chem.*, 361:242.
51. ELLIS, B.E. (1983) Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*. *Phytochemistry*, 22:1941-1943.
52. ELLIS, B.E. (1984) Probing secondary metabolism in plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 62:2912-2917.
53. ENGEL, B. i REINHARD, E. (1984). Acridone-alkaloid formation in suspension cultures of *Ruta* species. *Farm. Tijds. voor België*, 61:335.
54. EVANS, D.A. i SHARP, W.R. (1983) *Handbook of Plant Cell Culture*. Macmillan, London.
55. EVERETT, N.P., WANG, T.L., GOULD, A.R. i STREET, H.E. (1981) Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. 2. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Protoplasts*, 106:15-22.
56. FOWLER, M.W. (1981) Plant cell biotechnology to produce desirable substances. *Chem. Ind.*, 7:229-233.

57. FOWLER, M.W. (1983) Commercial application and economic aspects of mass plant cell culture. En: *Plant Biotechnology* (Mantell, S.H. and Smith, H., eds.) Soc. Exp. Biol., Sem. Series 18. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 3-37.
58. FOWLER, M.W. (1984a) Time for plant cell culture? *Nature* 307:504.
59. FOWLER, M.W. (1984b) Plant-cell cultures: Natural products and industrial application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2:41-68.
60. FRIEDRICH, H. and BAIER, S. (1973) Anthracen-Derivates in Kalluskulturen aus *Cassia angustifolia*. *Phytochemistry*, 12:1459-1462.
61. FRISCHKNECHT, P.M., BAUMANN, T.W. i WANER, H. (1977) Tissue culture of *Coffea arabica* growth and caffeine formation. *Planta Med.*, 31:344-350.
62. FURUTA, T., KOJIMA, H. i KATSUTA, T. (1972a) 3-methylpurpurin and other anthraquinones from callus tissue of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, 11:1073-1076.
63. FURUYA, T., IKUTA, A. i SYONO, K. (1972b) Alkaloids from callus tissue of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 11:3041-4044.
64. FURUYA, T. i ISHII, T. (1973) The manufacturing of *Panax* plant tissue culture containing crude saponins and crude sapogenins which are identical with those of natural *Panax* roots. Jap. Patent N.º 48-31917.
65. FURUYA, T. (1978) Biotransformation by plant cell cultures. En: *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Thorpe, T.A., ed.) Univ. Calgary. Calgary, Canada. pp. 191-200.
66. FURUYA, T., YOSHIKAWA, T. i TAIRA, M. (1984) Biotransformation of codeinone to codeine by immobilized cells of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 23: 999-1001.
67. GAUTHERET, R.J. (1977) *La Culture des Tissus et des Cellules des Végétaux*. Masson. Paris.
68. GAUTHERET, R.J. (1983) Plant tissue culture: a history. *Bot. Mag.*, 96:393-410.
69. GOLDSTEIN, W.E., INGLE, M.B. i LASURE, L. (1980) Product cost analysis. En: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals* (Staba, E.J., ed.). CRC Press. Florida. pp. 191-234.
70. GOLDSTEIN, W.E. (1983) Large-scale processing of plant cell culture. *Ann. NY Acad. Sci.*, 413:394-408.
71. GOULD, A.R. (1984) Control of the cell cycle in cultured plant cells. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1:315-344.
72. GRESSHOFF, P.M. (1978) Phytohormones and growth and differentiation of cells and tissues cultured in vitro. En: *Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise* (Leatham, D.S., Goodwin, P.B. and Higgins, T.J.V., eds.) Elsevier. Amsterdam, pp. 1-29.
73. HAMILTON, R., PEDERSEN, H. i CHIN, C.K. (1984) Immobilized plant cells for the production of biochemicals. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 14:383-396.
74. HEINSTEIN, P.F. (1985) Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.*, 48:1-9.
75. HEMSCHIEDT, T. i ZENK, M.H. (1980) Glucosidases involved in indole alkaloid biosynthesis of *Catharanthus* cell cultures. *FEBS Lett.*, 110:187-191.
76. HESS, C.E. (1984) Biotechnology: Implications for horticulture and society. *HortScience*, 19:620-623.
77. HINZ, H. i ZENK, M.H. (1981) Production of protoberberine alkaloids by cell suspension cultures of *Berberis* species. *Naturwiss.*, 68:620-621.
78. HIROTANI, M. i FURUYA, T. (1980) Biotransformation of digitoxigenin by cells suspension cultures of *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry*, 19:531-534.
79. IKEDA, T., MATSUMOTO, T. i NOGUCHI, M. (1976) Formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Phytochemistry*, 15:568-569.
80. INOUE, K., SHIOBARA, Y., NAYESHIRO, H., INOUE, H., WILSON, G. i ZENK, M.H. (1984a) Biosynthesis of anthraquinones and related compounds in *Galium mollugo* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 23:307-311.
81. INOUE, K., UEDA, S., NAYESHIRO, H., MORITOME, H. i INOUE, H. (1984a) Biosynthesis of naphthoquinones and anthraquinones in *Streptocarpus dunnii* cells cultures. *Phytochemistry*, 23:313-318.
82. JHANG, J.J., STABA, E.J. i KIM, J.K. (1974) American and Korean ginseng tissue cultures: growth, chemical analysis and plantlet formation. *In vitro*, 9:253-259.
83. JONES, A., VELIKY, I.A. i OZUBKO, R.S. (1978) Biotransformation of cardenolides by plant cell suspension cultures. I. Isolation and identification of periplogenin from cultures of *Daucus carota* Ca68 incubated with digitoxigenin. *Lloydia*, 41:476-487.
84. KAN-FAN, CH. i HUSSON, H.-P. (1979) Isolation and biomimetic conversion of 4,21 dehydrogeissoschizine. *J.C.S. Chem. Comm.*, 1015-1016.
85. KARTHA, K.K. (1985) *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press. Florida.
86. KATO, K., SHIOZAWA, Y., YAMADA, A., NISHIDA, K. i NOGUCHI, M. (1972) A jar fermentor culture of *Nicotiana tabacum* L. cell suspensions. *Agr Biol. Chem.*, 36:899-902.

87. KAUL, B. i STABA, E. J. (1967) *Ammi visnaga* tissue cultures. Multi-liter suspension growth and examination for furanochromes. *Planta Med.*, 15:145-156.
88. KAUL, P.N. (1982) Biomedical potential of the sea. *Pure Appl. Chem.*, 54:1963-1972.
89. KHANNA, P. i NAG, T.N. (1973) Isolation, identification and screening of phyllembin from *Embllica officinalis* Gaertn tissue culture. *Indian J. Pharmacy*, 35:23-24.
90. KIESLICH, K. (1980) New examples of microbial transformations in pharmaceutical industry. *Bull. Soc. Chim. Franc. Partie II*:9-17.
91. KING, P.J. (1980) Cell proliferation and growth in suspension cultures. *Int. Rev. Cytol., supp. 11A*:25-24.
92. KNOBLOCH, K.H., HAHLBROCK, K. (1977) 4-Coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm. *Arch. Biochem. Biophys.*, 184:237-248.
93. KHOL, W., VOGELMANN, H. i HÖFLE, G. (1980) Alkaloids from *Catharanthus roseus* tissue cultures. *Planta Med.*, 39:283-284.
94. KOHL, W., WITTE, B., SHELDRIK, W.S. i HÖFLE, G. (1984) Indolealkaloid aus *Catharanthus roseus* Zellkulturen. IV. 16R-19,20-E-Isositsirikin, 16R-19,20-Z-Isositsirikin und 21-Hydroxycycloclchnerin. *Planta Med.*, 50:242-244.
95. KORATE, CH. K. i RADWAN, S.S. (1979) Enrichment of *Solanum khasianum* callus generating rootlets with steroidal glycoalkaloids. *Z. Naturforschg.*, 34c:636-636.
96. KOUADIO, K., RIDEAU, M., GANSER, G., CHENIEUX, J.C. i VIEL, C. (1984) Biotransformation of ellipticine into 5-formyl ellipticine by *Choisya ternata* strains. *Plant Cell Rep.*, 3:203-205.
97. KOUADIO, K., CRECHE, J., CHENIEUX, J.C., RIDEAU, M. i VIEL, C. (1985) Alkaloid production by *Ochrosia elliptica* cell suspension cultures. *J. Plant Physiol.*, 118:277-283.
98. KREUZALER, F. i HAHLBROCK, K. (1975) Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavonone synthase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem.*, 56:205-213.
99. KURZ, W.G.W., CHATSON, K.B. CONSTABEL, F., KUTNEY, J.P., CHOI, L.S.L., KOLODZIECZYK, P., SLEIGH, S.K. i STUART, K.L. (1980) The production of catharanthine and other indole alkaloids by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.*, 39:284.
100. KURZ, W.G.W. i CONSTABEL, F. (1985) Aspects affecting biosynthesis and biotransformation of secondary metabolites in plant cell cultures. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 2:105-118.
101. KUTNEY, J.P. (1982) Studies in plant tissue culture: potential sources of clinically important anti-tumor agents. *Pure Appl. Chem.*, 54:2523-2536.
102. KUTNEY, J.P., AWERYN, B., CHOI, L.S.L., HONDA, T., KOLODZIECZYK, P., LEWIS, N.G., SATO, T., SLEIGH, S.K., STUART, K.L., WORTH, B.R., KURZ, W.G.W., CHATSON, K.B. i CONSTABEL, F. (1983) Studies in plant tissue culture. The synthesis and biosynthesis of indole alkaloids. *Tetrahedron*, 39:3781-3795.
103. KUTNEY, J.P. (1984) Studies in plant tissue culture. Synthesis and biosynthesis of clinically important anti-tumor agents. *Pure Appl. Chem.*, 56:1011-1024.
104. LECLERQ, J. (1984) Plant cells and tissues cultures in vitro and pharmaceutical industry. *J. Pharm. Belg.*, 39:401-408.
105. LEE, J.W. i LOPEZ, A. (1984) Modification of plant proteins by immobilized proteases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 21:289-322.
106. LEHTOLA, T., HUHTIKANGAS, A., LUNDELL, J. i VALLANEN, T. (1982) Radioimmunoassay of lysergic acid derivatives from *Claviceps paspali* fermentation cultures. *Planta Med.*, 45:161.
107. LEISTNER, E. (1975) Isolierung. Identifizierung und Biosynthese von Anthrachiponen in Zellsuspensionskulturen von *Morinda citrifolia*. *Planta Med., suppl.* 214-224.
108. LINDSEY, K. i YEOMAN, M.M. (1983) Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. En: *Plant Biotechnology* (Mantell, S.H. and Smith, H., eds.) Soc. Exp. Biol., Sem. Series 18. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 39-66.
109. LINDSEY, K. i YEOMAN, M.M. (1984) The viability and biosynthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum* immobilized in reticulate polyurethane. *J. Exp. Bot.*, 35:1684-1696.
110. LIU, M.-C. (1974) A post-seminar report to the US-ROC cooperative science program on plant tissue and cell cultures. *Taiwan sugar*, 21:1-6.
111. LUCKNER, M., KUBERSKI, C., SCHEIBNER, H., SCHWIEBODE, C. i DIETRICH, B. (1982) Principles regulating cardenolide formation in cell cultures of *Digitalis lanata*. *Planta Med.*, 45:134.
112. LÜDERITZ, T. i GRISEBACH, H. (1981) Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol: NADP⁺dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Biochem.*, 119:115-124.
113. MC LAUHLAN, W.R., HASAN, M., BAXTER, R.L. i SCOTT, A.I. (1983) Conversion of anhydrovinblastine to vinblastine by cell-free homogenates of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures.

- Tetrahedron* 39:3777-3780.
114. MC CARTHY, J.J., RATCHIFFE, D. i STRETT, H.E. (1980) The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells grown in batch culture. *J. Exp. Bot.*, 31:1315-1325.
 115. MALIGA, P. (1984) Isolation characterization of mutants in plant cell culture. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35:519-542.
 116. MANTELL, S.H. i SMITH, H. (1983) *Plant Biotechnology*. Soc. Exp. Biol., Sem. Series 18. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
 117. MARTIN, S.M. (1980) Environmental factors: B. Temperature, aeration and pH. En: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals* (Staba, E.J., eds.) CRC Press. Florida. pp. 143-148.
 118. MATTIASSON, B. (1983) *Immobilized Cells and Organells*. CRC Press. Florida.
 119. MEINS, F. Jr. (1983) Heritable variation in plant cell culture. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 34:327-346.
 120. MERILLON, J.M., RIDEAU, M. i CHENIEUX, J.C. (1984) Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine, and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells in vitro. *Planta Med.*, 50:497-501.
 121. MISAWA, M., SAKATO, K., TANAKA, H., HAYASHI, M. i SAMEJIMA, H. (1974) Production of physiologically active substances by plant cell suspension cultures. En: *Tissue Culture and Plant Science* (Street, H.E., ed.) Academic Press. London. pp. 405-432.
 122. MISAWA, M., TANAKA, H., CHIYO, O. i MUKAI, M. (1975) Production of a plasmin inhibitory substance by *Scopolia japonica* suspension cultures. *Biotech. Bioeng.*, 17:305-314.
 123. MORITZ, S., ALFERMANN, A.W. i REINHARD, E. (1982) Continuous biotransformation by immobilized cells in bioreactors. *Planta Med.*, 45:154.
 124. MORITZ, S., ALFERMANN, A.W. i REINHARD, E. (1984) Biotransformation of cardenolids by immobilized cells of *Digitalis lanata*. *Farm. Tijd. voor België*, 61:321.
 125. MORRIS, P. i FOWLER, M.W. (1980) Growth and alkaloid content of cell suspension cultures of *Papaver somniferum*. *Planta Med.*, 39:284-285.
 126. NAG, K.K. i STREET, H.E. (1975) Freeze preservation of cultured plant cells. *Physiol. Plant.*, 34:254-265.
 127. NICKEL, S. i STABA, E.J. (1977) RIA-test of *Digitalis* plants and tissue cultures. En: *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H., eds.) Springer. Berlin. pp. 278-286.
 128. NISHI, I. i MITSUOKA, S. (1975) Production of anti-peptic ulcer substance by tissue cultures of *Isodon* plants. Japan Patent Appl. N.º 50-12288.
 129. NOMINE, G. (1980) La place des bioconversions dans l'accès industriel aux stéroïdes. *Bull. Soc. Chim. France. Partie II*: 18-23.
 130. OGINO, T., HIRAOKA, N. i TABATA, M. (1978) Selection of high nicotine-producing cells lines of tobacco callus by single cell cloning. *Phytochemistry*, 17:1907-1910.
 131. OKAMI, Y. (1982) Potential use of marine microorganisms for antibiotics and enzym production. *Pure Appl. Chem.*, 54:1951-1962.
 132. OVERTON, K.H. (1977) Biosynthesis of mevalonoid-derived compounds in cell cultures. En: *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H., eds.) Springer. Berlin. pp. 66-75.
 133. PAREILLEUX, A. i VIÑAS, R. (1983) Influence of aeration rate on the growth yield in suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J. Ferment. Technol.*, 6:429-433.
 134. PETIARD, V. (1980) Antimitotic activities of *Catharanthus roseus* tissue cultures. En: *Natural Products as Medicinal Agents* (Beal, J.L. and Reinhard, E., eds.) Hippokrates Verlag. Stuttgart. pp. 447-469.
 135. PFEIFFER, B., ROOS, W. i LUCKNER, M. (1982) Accumulation of purpureglycoside A in vacuoles of *Digitalis lanata* cells cultivated in vitro. *Planta Med.*, 45:154.
 136. PIÑOL, M.T., PALAZON, J. i SERRANO, M. (1984) Growth and nicotine content of tobacco callus cultures without organogenesis. *Plant Sci. Lett.*, 35:219-223.
 137. POWLEDGE, T.M. (1984) Biotechnology touches the forest. *Bio/technology* 2:763-772.
 138. PUHAN, Z. i MARTIN, S.M. (1971) The industrial potential of plant cell culture. *Prog. Ind. Microbiol.*, 9:13-29.
 139. RADWAN, S.S., i KOKATE, CH. K. (1979) Production of higher levels of trigonelline by cell cultures of *Trigonella foenum-graecum* than by the differentiated plant. *Planta*, 147:340-344.
 140. RAMAWAT, K.G. i ARYA, H.C. (1979) Effect of amino acids on ephedrine production in *Ephedra gerardiana* callus cultures. *Phytochemistry*, 18:484-485.
 141. RAZZAQUE, A. i ELLIS, B.E. (1977) Rosmarinic acid production in *Coleus* cells cultures. *Planta*, 137:287-291.
 142. REINERT, J. i BAJAJ, Y.P.S. (1977) *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer. Berlin.
 143. REINHARD, E. (1974) Biotransformation by plant tissue cultures. En: *Tissue Culture and Plant Science* (Street, H.E., ed.) Academic Press. London. pp. 433-459.
 144. REINHARD, E. i ALFERMANN, A.W. (1980) Biotransformation by plant cell cultures. *Adv. Bio-*

- chem. Eng.*, 16:49-83.
145. ROBINS, R.J., WEBB, A.J., RHODES, M.J.C., PAYNE, i MORGAN, M.R.A. (1984) Radioimmunoassay for the quantitative determination of quinine in cultured plant tissues. *Planta Med.*, 50:235-238.
 146. ROKEM, J.S., TAL, B. i GOLDBERG, I. (1985) Methods for increasing diosgenin production by *Dioscorea* cells in suspension cultures. *J. Nat. Prod.*, 48:210-222.
 147. ROLLER, U. (1978) Selection of plants and plant tissue cultures of *Catharanthus roseus* with high content of serpentine and ajmalicine. En: *Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods* (Alfermann, A.W. and Reinhard, E., eds.) Ges. Strahlen und Umweltforsch. München. pp. 95-108.
 148. ROSAZZA, J.P. (1982) *Microrbial Transformations of Bioactive Compounds*. CRC Press. Florida.
 149. RUEFFER, M., KAN-FAN, C., HUSSON, H.-P., STÖCKIGT, J. i ZENZ, M.H. (1979) 4,21-dehydrogeissoschizine, an intermediate in heteroyohimbine alkaloid biosynthesis. *J.C.S. Chem. Comm.*, 1016-1018.
 150. SANDERMANN, H. Jr., SCHEEL, D. i TRENCK, T.V.D. (1984) Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 8:167-182.
 151. SATO, F. i YAMADA, Y. (1984) High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, 23:281-285.
 152. SCHALLENBERG, J. i BERLIN, J. (1979) 5-Methyltryptophan resistant cells of *Catharanthus roseus*. *Z. Naturforsch.*, 34c:541-545.
 153. SCHLEPPHORST, R. i BARZ, W. (1979) Metabolism of aromatic acids in plant cell suspension cultures. *Planta Med.*, 36:333-342.
 154. SCHÖNBERGER, G. i REINHARD, E. (1984) Production of saponins in cell cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Farm. Tijd. voor België*, 61:329.
 155. SCHULTE, U., EL-SHAGI, H. i ZENK, M.H. (1984) Optimization of 19 Rubiaceae species in cell culture for the production of anthraquinones. *Plant Cell Rep.*, 3:51-54.
 156. SCOTT, A.I., MIZUKAMI, H. i LEE, S.-L. (1979) Characterization of a 5-methyltryptophan resistant strain of *Catharanthus roseus* cultured cells. *Phytochemistry*, 18:795-798.
 157. SEIBER, M. i KADKADE, P.G. (1980) Environmental factors: A. Light. En: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals* (Staba, E.J., ed.) CRC Press. Florida. pp. 123-142.
 158. SAHARGOOL, P.D. (1985) Future uses of plant cell culture techniques. *Biochem. Educ.*, 13: 50-54.
 159. SHIMIZU, Y. i NOGUCHI, M. (1973) Tank culture of tobacco cells. *Kagaku To Kogyo* 26:231-234.
 160. SHIMIZU, Y. (1985) Bioactive marine natural products, with emphasis on handling of water-soluble compounds. *J. Nat. Prod.*, 48:223-235.
 161. SHULER, M.L., SAHAI, O.P., i HALLSBY, G.A. (1983) Entrapped plant cell tissue cultures. *Ann. NY.Acad. Sci.*, 413:373-382.
 162. SHULER, M.L., PYNE, J.W. i HALLSBY, G.A. (1984) Prospects and problems in the large scale production of metabolites from plant cell tissue cultures. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 61:1724-1727.
 163. SMART, N.J. i FOWLER, M.W. (1984) Mass cultivation of *Catharanthus roseus* cells using a non-mechanically agitated bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 9:209-216.
 164. SENER, F., STABA, E.J. i MANGOLD, H.K. (1974) Lipids in plant tissue cultures. II. Unusual fatty acids in lipids of *Hydnocarpus anthelminthica* cultures. *Chem. Phys. Lipids*, 12:344-350.
 165. STABA, E.J. i KAUL, B. (1971) Production of diosgenin by plant tissue culture technique. U.S. Patent N.º 3.628. 287.
 166. STABA, E.J. (1977) Tissue culture and pharmacy. En: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S., eds.) Springer. Berlin. pp. 694-702.
 167. STABA, E.J. (1980) *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*. CRC Press. Florida.
 168. STABA, E.J. (1985) Milestones in plant tissue culture systems for the production of secondary products. *J. Nat. Prod.*, 48:203-209.
 169. STECK, W., BAILEY, B.K., SHYLUK, J.P. i GAMBORG, O.L. (1971) Coumarins and alkaloids from cell cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 10:191-194.
 170. STECK, W. i CONSTABEL, F. (1974) Biotransformation in plant cell cultures. *Lloydia*, 37:185-191.
 171. STÖCKIGT, J. (1980) Enzymatic formation of intermediates in the biosynthesis of ajmalicine: strictosidine and cathenamine. *Phytochemistry*, 18:965-971.
 172. STÖCKIGT, J. (1980) Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* and *Catharanthus ovalis*. *Planta Med.*, 39:285-286.
 173. STÖCKIGT, J., PFITZNER, A. i FIRL, J. (1981) Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Plant Cell Rep.*, 1:36-39.
 174. STÖCKIGT, J. i PAWELKA, K.-H. (1982) Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Stemmadenia tomentosa* and *Voacanga africana*. *Planta Med.*, 45:155.
 175. STOHS, S.J. i ROSENBERG. (1976) Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures. *Loy-*

- dia, 38:181-194.
176. STOHS, S.J. (1977) Metabolism of steroids in plant tissue cultures. En: *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H., eds.) Springer. Berlin. pp. 142-152.
 177. STREET, H.E. (1973) Plant cell cultures: their potential for metabolic studies. En: *Biosynthesis and its Control in Plants* (Milborrow, B.V., ed.). Academic Press. London. pp. 93-125.
 178. STREET, H.E. (1977) Applications of cell suspension cultures. En: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S., eds.) Springer. Berlin. pp. 649-667.
 179. TATABA, M., YAMAMOTO, H., i HIRAOKA, N. (1971) Alkaloid production in the tissue cultures of some solanaceae plants. En: *Les Cultures de Tissus des Plantes*. C.R.N.S. Paris. pp. 389-402.
 180. TABATA, M., MIZUKAMI, H., HIRAOKA, N. i KONOSHIMA, M. (1974) Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry*, 13:927-932.
 181. TABATA, M., HIRAOKA, N., IKENOUE, M., SANO, Y. i KONOSHIMA, M. (1975a) The production of anthraquinones in callus cultures of *Cassia tora*. *Lloydia*, 38:131-134.
 182. TABATA, M., MIZUKAMI, H., NODE, i KONOSHIMA, M. (1975b) Antimicrobial activity of *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. *Yakugaku Zasshi*, 95:1376-1379.
 183. TABATA, M., MIZUKAMI, H., HIRAOKA, N. i KONOSHIMA, M. (1976) The production and regulation of shikonine derivatives in cultured cells. Abstr. 12th. Phytochem. Symp. Japan, Kyoto. pp. 1-8.
 184. TABATA, M. (1977) Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. En: *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H., eds.) Springer. Berlin. pp. 3-16.
 185. TABATA, M., OGINO, T., YOSHIOKA, K., YOSHIKAWA, N. i HIRAOKA, N. (1978) Selection of cell lines with higher yield of secondary products. En: *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Thorpe, T.A., ed.) Univ. Calgary. Calgary, Canada. pp. 213-222.
 186. TABATA, M., UMETANI, Y., SHIMA, K. i TANAKA, S. (1984) Glucosylation of esculetin by plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 3:3-10.
 187. TAKAYAMA, S., MISAWA, M., KO, K. i MISATO, T. (1977) Effect of cultural conditions on the growth of *Agrostemma githago* cells in suspension culture and the concomitant production of an anti-plant virus substance. *Physiol. Plant.*, 41:313-320.
 188. TAL, B., ROKEM, J.S. i GOLDBERG, I. (1984a) Timing of diosgenin appearance in suspension cultures of *Dioscorea deltoidea*. *Planta Med.*, 50:239-241.
 189. TAL, B., TAMIR, I., ROKEM, J.S. i GOLDBERG, I. (1984b) Isolation and characterization of an intermediate steroid metabolite in diosgenin biosynthesis in suspension cultures of *Dioscorea deltoidea* cells. *Biochem. J. Mol. Aspects*, 219:619-624.
 190. TAMAKI, E., MORISHITA, I., NISHIDA, K., KATO, K. i MATSUMOTO, T. (1973) Process for preparing licorice extract-like material for tobacco flavouring. U.S. Patent N.º 3.710.512.
 191. TANAHASHI, T., NAGAKURA, N., INOUE, H. i ZENK, M.H. (1984) Radioimmunoassay for the determination of loganin and the biotransformation of loganin to secologanin by plant cell cultures. *Phytochemistry*, 23:1917-1922.
 192. TANAKA, H., MACHIDA, Y., MUKAI, N. i MISAWA, M. (1974) Accumulation of glutamine by suspension cultures of *Symphytum officinale*. *Agr. Biol. Chem.*, 38:987-992.
 193. TAYLOR, W.I. i FARNSWORTH, N.R. (1975) *The Catharanthus Alkaloids*. Marcel Dekker. New York.
 194. TEUSCHER, E. (1973) Probleme der Sekundärstoffbildung in pflanzlichen Zellkulturen. *Pharmazie*, 28:6-18.
 195. THORPE, T.A. (1978) *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Univ. Calgary. Calgary, Canada.
 196. THORPE, T.A. (1983) Biotechnological application of tissue cultures to forest-tree improvement. *Biotechnol. Adv.*, 1:263-278.
 197. TREIMER, J.F. i ZENK, M.H. (1979a) Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation. *Eur. J. Biochem.*, 101:225-233.
 198. TREIMER, J.F. i ZENK, M.H. (1979b) Strictosidine synthase from cell cultures of Apocynaceae plants. *FEBS Lett.*, 97:159-162.
 199. TSUKADA, M. i TABATA, M. (1984) Intracellular localization and secretion of naphthoquinone pigments in cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Planta Med.*, 51:338-341.
 200. TUDGE, C. (1984) Drugs and dyes from plant cell cultures. *New Sci.*, 101:25.
 201. UEDA, S., KOBAYASHI, K., MURAMATSU, T. i INOUE, H. (1981) Studies on monoterpene glucosides and related natural product. Part XL. Iridoid glucosides of cultured cells of *Gardenia jasminoides* f. *grandiflora*. *Planta Med.*, 41:186-191.
 202. ULBRICH, B. i ZENK, M.H. (1979) Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-

- Coa: quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry*, 18:929-933.
203. VANKOVA, R., VANEK, T., MACEK, T., JIRKU, V. i KAMINEK, M. (1983) Production of a cytokinin (trans-zeatin) by cytokinin-dependent and cytokinin-autonomous tobacco cells immobilized on polyhenyleneoxide. Abstr. 2nd. Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Active Nat. Prod. Budapest. pp. 218.
204. VASIL, I.K. (1980) *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*. Academic Press. London.
205. VELIKY, I.A. i LATTA, R.K. (1974) Antimicrobial activity of cultured plant cells and tissues. *Lloydia*, 37:611-620.
206. VENKATSUBRAMANIAN, K. (1979) *Immobilized Microbial Cells*. ACS Symp. Series N.º 106. Am. Chem. Soc. Washington.
207. WEILER, E.W. (1977) Radioimmuno-screening methods for secondary plant products. En: *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H., eds.) Springer. Berlin. pp. 266-277.
208. WESTCOTT, R.J. i HENSHAW, G.C. (1976) Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudo-platanus* L. *Planta*, 131:67-73.
209. WESTEKEMPER, P., WIECZOREK, U., GUERITTE, F., LANGLOIS, N., LANGLOIS, N., POITIER, P. i ZENK, M.H. (1980) Radioimmunoassay for the determination of the indole alkaloid vindoline in *Catharanthus*. *Planta Med.*, 39:24-37.
210. WET, J.M.J. de (1983) Biotechnology and the future of agriculture. *Ill. Res.*, 25:3-5.
211. WHITAKER, R.J., HASHIMOTO, T. i EVANS, D.A. (1984) Production of the secondary metabolite rosmarinic acid, by plant cell suspension cultures. *Ann. NY Acad. Sci.*, 435:364-366.
212. WICHERS, H.J., WIJNSMA, R., VISSER, J.F., MALINGRE, T.M. i HUIZING, H.J. (1985) Production of L-DOPA by cell suspension cultures of *Macuna pruriens*. II. Effect of environmental parameters on the production of L-DOPA. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 4:75-82.
213. WIDHOLM, J.M. (1980) Selection of plant cell lines which accumulate compounds. En: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals* (Staba, E.J., ed.) CRC Press. Florida. pp. 99-114.
214. WIJNSMA, R., VERPOORTE, R., HARKES, P.A.A. i BAERHEIM-SVENDSEN, A. (1984) The production of secondary metabolites in callus cultures of *Cinchona ledgeriana* Moens. *Farm. Tijd. voor België*, 61:328.
215. YAMADA, Y. i ENDO, T. (1984) Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell Rep.*, 3:186-188.
216. YAMADA, Y. i OKADA, N. (1985) Biotransformation of tetrahydroberberine to berberine by enzymes prepared from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, 24:63-65.
217. YEOMAN, M.M. i FORCHE, E. (1980) Cell proliferation and growth in callus cultures. *Int. Rev. Cytol.*, suppl. 11A:1-24.
218. YEOMAN, M.M., MIEDZBYRODZKA, M.B., LINDSEY, K. i MC LAUHLAN, W.R. (1980) The synthetic potential of cultured plant cells. En: *Plant Cell Cultures: Results and Perspectives* (Sala, F., Parisi, B., Cella, R. and Ciferri, O., eds.) Elsevier. Amsterdam. pp. 327-343.
219. YEOMAN, M.M., LINDSEY, K., MIEDZBYRODZKA, M.B. i MC LAUHLAN, W.R. (1982) Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant cell and tissue cultures. En: *Differentiation In Vitro* (Yeoman, M.M. and Truman, D.E.S., eds.) Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 65-82.
220. ZENK, M.H., EL-SHAGI, H. i SCHULTE, U. (1975) Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med.*, suppl.: 79-101.
221. ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., UBRICH, B. (1977a) Production of rosmarinic acid by cell-suspension cultures of *Coleus blumei*. *Naturwiss.*, 64:585-586.
222. ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W. i DEUS, B. (1977b) Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. En: *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application* (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H. eds.) Springer. Berlin. pp. 27-43.
223. ZENK, M.H. (1978) The impact of plant cell culture on industry. En: *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Thorpe, T.A., ed.) Univ. Calgary. Calgary, Canada. pp. 1-13.
224. ZENK, M.H. (1980) Enzymologie und Metabolismus von Alkaloiden in *Catharanthus roseus* Zellkulturen. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361:354-355.
225. ZIMMERMANN, A. i HAHLBROCK, K. (1975) Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. Purification and some properties of phenylalanine ammonia lyase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 166:54-62.