



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

**Estudio acerca de la correlación
entre el contenido de K⁺, actividad arginina
y ornitina descarboxilasa, y niveles de aminoácidos
libres, putrescina y nicotina en cultivos
de callo de tabaco**

Teresa Altabella Artigas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

ESTUDIO ACERCA DE LA CORRELACION ENTRE
EL CONTENIDO DE K⁺, ACTIVIDAD ARGININA
Y ORNITINA DESCARBOXILASA, Y NIVELES
DE AMINOACIDOS LIBRES, PUTRESCINA Y NI-
COTINA EN CULTIVOS DE CALLO DE TABACO

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700082917

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

CATEDRA DE FISIOLOGIA VEGETAL

Memoria presentada por
D^a Teresa Altabella Artigas para
optar al grado de Doctor en Far-
macia, por la Universidad de
Barcelona

Dirigida por la Dra. M^a
Teresa Piñol Serra y el Dr. Ja-
vier Palazón Barandela.

Barcelona, julio de 1986

Expreso mi más sincero agradecimiento

A los Directores de esta Tesis, Dra. M^a Teresa Piñol Serra y Dr. Javier Palazón Barandela, por su valiosa ayuda y estímulo.

Al Dr. Manuel Serrano García por sus acertados consejos y por la revisión de este trabajo.

A Mariano Marín Loscertales por su inestimable colaboración.

A todos los demás Profesores y compañeros del Departamento.

A mis padres

INDICE

	Págs.
1 . INTRODUCCION	6
1.1. Funciones del K ⁺ significativas para el cultivo <u>in vitro</u>	6
1.1.1. Estado hídrico	8
1.1.2. Activación de enzimas	9
1.2. Aminoácidos presentes en especies de <u>Nicotiana</u> y su control biosintético	11
1.2.1. Aminoácidos presentes en <u>Nicotiana</u> .	11
1.2.2. Control de la biosíntesis de aminoácidos	14
1.3. Significación y metabolismo de poliaminas en plantas	18
1.3.1. Metabolismo de las poliaminas en plantas	19
1.3.2. Biosíntesis y degradación de poliaminas	19
1.3.3. Compartimentación subcelular de los enzimas biosintéticos de las poliaminas	23
1.3.4. Regulación de la biosíntesis de poliaminas en plantas superiores por fitohormonas	24
1.3.5. Papel de las poliaminas en el crecimiento y desarrollo de las plantas	26
1.3.6. Metabolismo de poliaminas en plantas en "stress"	29
1.4. Síntesis de nicotina en plantas de tabaco .	33

1.4.1. Biosíntesis de nicotina y su regulación enzimática	34
1.4.2. Regulación de la producción de nicotina <u>in vitro</u>	40
1.5. Formación de metabolitos secundarios en cultivo <u>in vitro</u>	47
1.6. Organogénesis del cultivo de callo	53
1.6.1. Potencial morfogénético en relación al subcultivo.....	58
2. PARTE EXPERIMENTAL	61
2.1. Obtención del cultivo de callo	61
2.1.1. Condiciones para el cultivo de <u>N. tabacum</u>	61
2.1.2. Medio de cultivo	63
2.1.3. Separación de los explantes e inducción del tejido de callo	63
2.1.4. Subcultivo del callo inicial	65
2.2. Toma de muestra de los cultivos de callo ..	68
2.3. Determinación de peso seco y contenido en agua	70
2.4. Determinación del contenido en K ⁺	71
2.5. Extracción y análisis de aminoácidos libres	73
2.6. Extracción y análisis de putrescina	79
2.7. Extracción y análisis de nicotina	82
2.8. Extracción y ensayo de ADC y ODC	83
2.9. Extracción y ensayo de ARG	85

2.10. Determinación de proteína	87
2.11. Extracción de proteína soluble y electroforé- sis en geles de poliacrilamida en pre- sencia de SDS	88
2.11. Análisis estadístico de los resultados ..	92
3. RESULTADOS Y SU DISCUSION	93
3.1. Consideraciones preliminares	93
3.2. Caracteres morfológicos, crecimiento y contenido de K^+	96
3.3. Contenido de alcaloides y putrescina	113
3.4. Actividades ADC, ODC y ARG	127
3.5. Análisis por PAGE-SDS	134
3.6. Aminoácidos libres	139
4. CONCLUSIONES	165
5. BIBLIOGRAFIA	171

Los reguladores del crecimiento vegetal, no sólo afectan al crecimiento y diferenciación de los cultivos vegetales in vitro, sino también a su metabolismo secundario. El efecto de las auxinas sobre la biosíntesis de nicotina en cultivos de callo de tabaco ha sido estudiado por varios investigadores. Furuya y colab. (1971) identificaron pequeñas cantidades de nicotina y anatabina en tejidos de callo de Nicotiana tabacum var. Bright Yellow, cultivados en un medio que contenía ácido indol-3-acético (AIA), pero no detectaron alcaloides cuando los callos habían crecido en un medio con 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en vez de AIA. Tabata y colab. (1971) indicaron que la síntesis de nicotina en células de callo de N. rustica var. Bright Yellow era fuertemente inhibida por 2,4-D y, por el contrario, estimulada por quinolina (6-furfurilaminopurina), a la vez que estaba íntimamente asociada con la formación de yemas en los callos. Posteriormente, Tabata e Hiraoka (1976), en cultivos de callo de N. rustica var. Brasilia crecidos en un medio con 2,4-D 1 μ M y quinolina 1 μ M, detectaron nicotina durante los primeros subcultivos siguientes a la inducción del tejido de callo, disminuyendo después rápidamente el contenido en nicotina de los callos hasta cantidades traza en asociación con el descenso de su capacidad para formar raíces. Ohta y colab. (1978) informaron que la producción de nicotina en los cultivos de callo de N. tabacum var. Bright Yellow, era regulada por los reguladores del crecimiento vegetal presentes en el medio de cultivo, y también afectada, sorprendentemente, por la luz. En cultivos de callo de N. tabacum var. Burley

21, derivados de diferentes partes de la planta y crecidos en idénticas condiciones -sobre medio de Murashige y Skoog (1962) suplementado con ácido α -naftalenacético-, Kinnersley y Dougall (1982) encontraron que el contenido de nicotina variaba significativamente. Este resultado está en contradicción con la idea general de que los explantes de diferentes partes de una planta desarrollan cultivos con rendimientos similares de compuestos específicos producidos por la especie. Kinnersley y Dougall encontraron también una fuerte correlación entre la producción de nicotina y la formación de raíces en los callos del cultivo.

En nuestro Laboratorio se ha demostrado, en cultivo de callo de N. tabacum var. Burley 21 sin organogénesis que, en presencia de una cantidad constante de quinina, la concentración de auxina en el medio de cultivo controlaba la proporción de síntesis de nicotina, la cual seguía un curso casi paralelo a aquel del crecimiento del callo (Piñol y colab. 1984). Estos resultados experimentales demostraron también que la organización morfológica visible puede no ser un prerrequisito para la diferenciación bioquímica a la cual está usualmente unida (Bohm 1980), puesto que en cultivos de callo, sin organogénesis observable, los niveles de nicotina eran altos. Sin embargo, el examen histológico del tejido de callo permitió observar cambios microscópicos en la organización indicadores de una correlación entre la síntesis de nicotina y el desarrollo de áreas meristemáticas en los cultivos.

Las consideraciones precedentes pueden ser de interés para el problema de la biosíntesis de nicotina en cultivo de callo de tabaco. Recientemente, en ensayos previos, nosotros hemos observado que la concentración de auxina en el medio de cultivo, óptima para la síntesis de nicotina por el tejido de callo de tabaco Burley 21 ($1 \mu\text{M}$ ANA), condiciona en

los callos crecidos en este medio una severa deficiencia de K^+ , mientras que una concentración supra-óptima de auxina en el medio (11,5 μM ANA) se traduce en una reducción de la síntesis de nicotina y del grado de deficiencia de K^+ de los callos crecidos en el segundo medio. Esta respuesta puede ser de importancia central en la regulación de la síntesis de nicotina en el tejido de callo de tabaco por la concentración de auxina en el medio de cultivo, si consideramos la probable acumulación en los callos deficientes en K^+ de la diamina putrescina, el intermediario clave de la biosíntesis de nicotina (Lamberts y colab. 1959, Yoshida y Mitake 1966).

En el trabajo que presentamos como Tesis, para optar al grado de Doctor, hemos determinado el contenido de nicotina y de los aminoácidos libres, y a la vez establecido las relaciones entre la producción del alcaloide y los niveles de sus aminoácidos precursores iniciales (ácido glutámico, ornitina y arginina del anillo de pirrolidina, y ácido aspártico del anillo de piridina), en tejido de callo de tabaco Burley 21 crecido sobre dos medios: uno bajo en auxina (ANA 1 μM , la concentración óptima para la síntesis de nicotina) y otro alto en auxina (ANA 11,5 μM , concentración supra-óptima), siendo en lo demás idénticos. También hemos determinado, además de la actividad del enzima arginasa, el contenido de K^+ y putrescina (libre y ligada), y la actividad de los enzimas biosintéticos de putrescina arginina y ornitina descarboxilasas, a fin de comprobar nuestra hipótesis, según la cual, en tejido de callo de tabaco, la toma de K^+ , las actividades de las dos descarboxilasas (ADC y ODC), la acumulación de putrescina libre y la síntesis de nicotina son procesos relacionados y dependientes de la concentración de auxina en el medio. Finalmente, hemos separado la fracción proteica soluble por PAGE-SDS para: a) determinar a lo largo de los geles las actividades ADC y ODC, b) calcular el peso

molecular aproximado y el porcentaje de proteína, referido a proteína soluble total, que corresponde a los dos enzimas, con el objeto de aportar nuevos datos en apoyo de nuestra hipótesis, y para el estudio de la significación de los enzimas ADC y ODC en la acumulación de putrescina en los tejidos de callo, en las condiciones en que hemos efectuado el experimento. Los tejidos de callo de tabaco Burley 21 utilizados crecieron en la oscuridad a 25°C, durante 6 semanas, momento en que la producción del alcaloide es máxima de acuerdo con un trabajo previo realizado en nuestro Laboratorio (Piñol y colab. 1984).

El trabajo se ha dividido en cinco partes fundamentales:

Introducción

Parte experimental

Resultados y su discusión

Conclusiones

Bibliografía

En la Introducción figura la información bibliográfica disponible acerca de: a) Funciones del K^+ significativas para el cultivo in vitro, b) Aminoácidos presentes en especies de Nicotiana y su control biosintético, c) Significación y metabolismo de poliaminas en plantas, d) Síntesis de nicotina en tabaco Burley 21, e) Formación de metabolitos secundarios en cultivo in vitro, y f) Organogénesis del cultivo de callo.

En la Parte experimental, se describen con detalle las condiciones para el cultivo hidropónico de las plantas, el aislamiento y el cultivo de los explantes para la obtención del tejido de callo y el subcultivo del callo inicial sobre los dos medios de cultivo utilizados. En esta parte se describen también los métodos seguidos para el estudio del crecimiento y organogénesis de los tejidos de callo y para la determinación cuantitativa en ellos de K^+ , aminoácidos li-

bres, putrescina, proteina soluble, actividades enzimáticas (ARG, ADC y ODC) y nicotina, y para la separación de la fracción proteica soluble por PAGE-SDS.

En las restantes partes del trabajo, se describen los resultados, expresados en forma de tablas y figuras, se hace una amplia y detallada discusión de los mismos, y se da un resumen de las principales conclusiones.

1. INTRODUCCION

1.1. Funciones del K^+ significativas para el cultivo "in vitro"

El potasio es un elemento esencial para todos los organismos vivos. En los vegetales, el K^+ es el catión más importante no sólo por su concentración en los tejidos sino también por sus funciones fisiológicas y bioquímicas. Los tejidos vegetales toman altas proporciones de K^+ por un mecanismo dependiente de energía. De acuerdo con diversos investigadores, es el único catión mineral esencial transportado en los tejidos vegetales en contra de gradiente electroquímico (Spanswick y Williams 1964, Dunlop y Bowling 1971, Ansari y Bowling 1972). Experimentos recientes han demostrado que, en presencia de bajas concentraciones de K^+ (menores de 0,5 mM) en la solución nutritiva, este catión es transportado al interior de la célula vegetal por una ATPasa, y que este mecanismo es inhibido en altas concentraciones de K^+ (Cheesman y Hanson 1979). El transporte pasivo de K^+ es inducido, a su vez, por el gradiente electroquímico producido por una bomba de H^+ , una ATPasa localizada en la membrana. La proporción de K^+ tomada depende también de su concentración interna.

Una cuestión interesante es establecer si los enzimas localizados en la membrana plasmática son afectados por el turgor, el cual hace que la membrana presione sobre la pared celular. Zimmermann (1978), sugiere que la presión origina

un cambio del espesor de la membrana que podría, consecuentemente, influenciar a los enzimas en ella localizados. Así, sería factible que la actividad ATPasa de la membrana estuviese controlada, en algún grado, por el turgor, lo que implica también que los potenciales de membrana dependan de este último. Zimmermann y Beckers (1978) suponen que estos cambios en los potenciales de membrana sean un medio general por el cual los tejidos vegetales puedan controlar las reacciones fisiológicas, es decir, la toma de solutos. De acuerdo con Zimmermann (1978), en Valonia utricularis, se pudo determinar una relación entre el turgor y la toma de K^+ ; la toma de este catión incrementaba cuando el turgor celular descendía y viceversa, lo cual indica que el turgor celular controla finalmente la toma de K^+ . Así parece que la presión de turgor ejerce una doble función en los procesos de crecimiento. Efectivamente, la presión de turgor se requiere para la extensión de las paredes y para facilitar la rotura de los enlaces químicos, y en una fase siguiente además controla la toma de solutos necesaria, a su vez, para que se efectue crecimiento.

El K^+ es un elemento muy móvil, transportado preferentemente desde los órganos más viejos hacia los tejidos jóvenes en activo crecimiento, los meristemos, probablemente debido, además de a su alta proporción de crecimiento, a su síntesis de proteínas y a su provisión de citoquininas (Jacoby y colab.1973). Esta suposición está apoyada por el reciente trabajo de Cocucci y Dalla Rosa (1980), los cuales han demostrado que el efecto estimulante de AIA (ácido β -indolacético) sobre el crecimiento en extensión celular de coleoptilos de maíz, estaba estrechamente relacionado con la liberación de H^+ , la toma de K^+ y la síntesis de proteínas. Estos investigadores observaron también que la cicloheximida -inhibidor de la síntesis de proteínas- y la canavanina -análo-

go de arginina-, inhibían fuertemente la elongación, liberación de H^+ y toma de K^+ inducidas por AIA. Estas sustancias inhibían también, aunque en menor grado, los mismos fenómenos inducidos por la sustancia fúngica fusicocina. Cicloheximida inhibía fuertemente la incorporación de leucina en las proteínas, mientras que canavanina, posiblemente se incorporaba en lugar de arginina, conduciendo a la síntesis de proteínas no funcionales. Los datos obtenidos confirmaron que la elongación, liberación de H^+ y toma de K^+ por las células podían ser procesos estrechamente relacionados entre sí. También se sugirió que la síntesis normal de proteínas era esencial para el crecimiento inducido por AIA, mientras que la esenciabilidad era sólo parcial para el crecimiento inducido por fusicocina.

El hecho de que el potasio sea tomado en tan altas proporciones por la célula vegetal, condiciona que este elemento constituya un fuerte competidor para la toma de otros cationes minerales, cuya proporción de absorción, por el contrario, se incrementa considerablemente cuando la toma de K^+ es baja (Grimme y colab. 1974). Además, la toma y retención de K^+ por la célula vegetal son también afectadas de manera competitiva por H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ (Elzman y Hodges 1967).

1.1.1. Estado hídrico

El potasio es de la mayor importancia para el estado hídrico del vegetal. Arneke (1980) observó que el turgor en hojas jóvenes de Phaseolus vulgaris dependía de su contenido en K^+ . Con una concentración baja de K^+ en la solución nutritiva, el turgor era de 5,05 bars, significativamente más bajo que el correspondiente, de 7,17 bars, observado cuando la concentración de este elemento en la solución era alta. Por otra parte, la baja concentración de K^+ condicio-

naba una reducción en la proporción de crecimiento, el tamaño celular y el contenido en agua de los tejidos de la hoja. Estos resultados llevaron a la conclusión de que en los tejidos jóvenes el K^+ es indispensable para la obtención del turgor celular óptimo requerido, a su vez, para el crecimiento en extensión de la célula vegetal. El turgor en los tejidos jóvenes parece ser el parámetro indicador más sensible de su contenido en K^+ . Otros procesos relacionados con el K^+ , como la asimilación de CO_2 , la fosforilación y la síntesis de proteínas, son menos sensibles frente a un aporte inadecuado de este elemento.

1.1.2 Activación de enzimas

La principal función bioquímica del K^+ es la activación de varios sistemas enzimáticos (Evans y Sorger 1966). Experimentos in vitro han revelado que a concentraciones de K^+ comprendidas entre 40-80 mM, se da el máximo de activación por este elemento. Sin embargo, de acuerdo con Suelter (1970), para la activación in vivo sólo se requieren concentraciones de K^+ del orden de 2 mM. Esto significa que incluso bajo condiciones de deficiencia de K^+ , este elemento está en concentración suficiente como para provocar una activación máxima. Generalmente, las concentraciones en el citoplasma son del orden de 100-200 mM (Pierce y Higinbotham 1970), y en tejidos deficientes en K^+ probablemente sobre 50 mM. Por esta razón, la importancia del K^+ para la activación de enzimas es más teórica que práctica. En tejidos en activo crecimiento existen procesos más sensibles a K^+ , y por ello estrechamente relacionados con los niveles de este ión en los mismos, entre estos procesos figuran la toma y retención de agua y la fosforilación. El hallazgo de que compuestos de bajo peso molecular, como los aminoácidos y los azúcares, se acumulan en tejidos deficientes en K^+ , se

debe probablemente a una reducción de la síntesis de ATP en estas condiciones, más que a una activación enzimática inadecuada. Una reducción en el aporte energético puede condicionar una disminución de la síntesis proteica, y consecuentemente de enzimas. Esto se ha demostrado para nitrato reductasa (Pflüger y Wiedmann 1977) y para ribulosa difosfato carboxilasa (Peoples y Koch 1979).

Por otra parte, deficiencias severas de K^+ conducen a la síntesis de aminos, como putrescina y agmatina (Smith y Sinclair 1967), pero este problema se trata más ampliamente en el apartado correspondiente a "Significación y metabolismo de poliaminas en plantas". Las reacciones que conducen a la acumulación de estas aminos son favorecidas a pH celular bajo (Smith y Sinclair 1967), lo que ocurre probablemente bajo deficiencia de K^+ . Otra consecuencia de las condiciones ácidas en la planta, debidas a deficiencia de K^+ , es la inducción de la síntesis de prolina (Göring y Bui Huy Thien 1979).

1.2. Aminoácidos presentes en especies de Nicotiana y su control biosintético

En este apartado se recogen los datos, indicados en la bibliografía, acerca de la naturaleza y proporción de los aminoácidos presentes en las plantas de Nicotiana, a fin de compararlos con los hallados en los callos crecidos en los medios alto y bajo en auxina, de nuestro trabajo.

1.2.1. Aminoácidos presentes en Nicotiana

La cantidad y la clase de los aminoácidos de tabaco cambian con la variedad de planta, el estado de crecimiento, las condiciones ambientales y las manipulaciones a que se someten.

En las plantas de tabaco se hallan presentes los aminoácidos glicina, cistina (cisteína), leucina e isoleucina, ácido aspártico y ácido glutámico, lisina, arginina, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina, prolina e hidroxiprolina.

Los aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina y leucina e isoleucina constituyen el 65% de los aminoácidos presentes en la proteína de la hoja. Michl y Kuhn (1954) encontraron cantidades apreciables de α -alanina, ácido γ -aminobutírico, ácido aspártico y ácido glutámico libres en todas las hojas de tabaco. Las cantidades de los otros aminoácidos diferían según las clases de tabaco.

Burde y colab. (1963) efectuaron un estudio comparativo de los aminoácidos en varias clases de tabaco. En todas ellas (Bright, Burley, Turkish) encontraron en cantidad apreciable leucina, isoleucina, serina, tirosina y lisina. Los aminoácidos principales de tabaco Bright eran prolina,

asparraguina, ácido glutámico y ácido aspártico. En tabaco Burley, la concentración de prolina era baja, siendo los aminoácidos principales asparraguina, ácido aspártico y ácido glutámico. En tabaco Turkish, la composición y distribución relativa de los aminoácidos libres era similar a tabaco Bright, pero sustancialmente menor la cantidad total.

Un examen de los aminoácidos libres y proteicos de varias especies de Nicotiana e híbridos, realizado por Weybrew y Matzinger (1969), reveló significantes diferencias entre las especies. Hidroxiprolina y homocisteína se hallaban presentes en considerable cantidad en N. tabacum, pero en una proporción sólo detectable en otras especies, mientras que sucede lo contrario para cistina y α -alanina. Además N. tabacum contiene menos lisina, histidina, amonio, arginina, ácido aspártico, STAG (mezcla de serina, treonina, asparraguina y glutamina), glicina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina y ácido γ -aminobutírico, y más taurina, metionina-S-óxido, prolina, ácido α -amino-adípico, tirosina y galactosamina. En los híbridos de la F_1 , la concentración de la mayoría de los aminoácidos libres es, con algunas excepciones, menor que en los progenitores.

Noguchi y colab. (1961) estudiaron los compuestos nitrogenados del jugo de tabaco, e informaron que las amidas y los aminoácidos básicos constituían una gran parte del N-amino y amido. Entre los aminoácidos y aminos, glutamina se encuentra en mayor cantidad, seguida de asparraguina, y después de lisina, leucina y serina.

Se conocen muchos factores que afectan a los niveles y composición de aminoácidos libres y proteicos en tabaco. La hora del día, el estado de crecimiento y desarrollo de la planta, la infección patológica o el desorden fisiológico, el estado nutritivo y la edad fisiológica se ha demostrado que juegan papeles importantes en el contenido de aminoáci-

dos y proteínas. Por ejemplo, el nitrógeno proteico usualmente decrece durante la noche (De Bonis 1951). También los aminoácidos libres experimentan variación diurna.

Noguchi y Tamaki (1962) informaron que en las hojas de tabaco verde, los aminoácidos ácido γ -aminobutírico, ácido glutámico, prolina, serina, alanina, glicina y treonina alcanzaban sus máximos contenidos de cerca de 2 ppm. Serina, glicina y arginina incrementaban rápidamente durante el día, mientras que el ácido aspártico tenía su máximo contenido durante la noche. El contenido de ácido γ -aminobutírico varía irregularmente con el tiempo, pero predomina siempre sobre los otros aminoácidos.

Mizusaki y colab. (1964) observaron que la biosíntesis de prolina, formada de glutamina, era muy activa durante el día, pero muy lenta por la noche. Las características físicas, reflejan en parte la composición de la hoja. En el caso del tabaco Bright de buena calidad, la consistencia del cuerpo de la hoja parece afectar la cantidad de aminoácidos libres. Esta influencia es muy pronunciada en el tabaco Burley.

Se conoce bien que el desorden fisiológico afecta al contenido de aminoácidos y proteínas de tabaco. Cualquier perturbación en el desarrollo de la planta, desviándolo de su curso normal, ocasiona un mayor nivel de aminoácidos, excepto, probablemente, aquella causada por deficiencia de nitrógeno (Tso y Burk 1962, Tso y colab. 1962, Tso y McMurtrey 1960).

Steinberg y colab. (1950) encontraron un agudo incremento en el contenido de aminoácidos libres en plantas deficientes en Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y P.

En un estudio de campo de tabaco Burley 21, tabaco de hojas delgadas, Bortner y Hamilton (1966) observaron que limi-

tando cualquiera de los nutrientes nitrógeno, fósforo ó potasio se reducía en gran medida el contenido de aminoácidos, especialmente ácido glutámico, prolina, arginina y lisina.

El incremento de nitrógeno aumentaba en proporción a la concentración de aminoácidos totales, particularmente treonina, asparraguina, ácido glutámico, prolina y arginina.

Noguchi y colab. (1967) revelaron que la proporción de prolina y serina, y el contenido total de aminoácidos en las hojas era considerablemente mayor en cultivos con nitrógeno en forma amónica que de nitrato, mientras que para ácido γ -aminobutírico, alanina y glicina sucedía al revés.

1.2.2. Control de la biosíntesis de aminoácidos

De los caminos biosintéticos se deduce que en la síntesis de algunos aminoácidos puede intervenir un determinado precursor. Por ejemplo, el glutamato es un precursor en la biosíntesis de prolina y arginina; pero estos aminoácidos se acumulan en diferentes proporciones, lo que sugiere que el paso de glutamato a prolina o arginina está regulado y no es un fenómeno al azar.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la síntesis de diferentes productos a partir de un precursor común. En el caso de prolina y arginina se ha sugerido, aunque no hay evidencia experimental disponible en plantas superiores, que la contribución relativa de glutamato para la formación de uno u otro aminoácido, depende del grado de acetilación del glutamato; se ha postulado que el glutamato sustituido pudiera servir como sustrato preferente para la biosíntesis de arginina mientras que el ácido libre sería utilizado para la síntesis de prolina.

La regulación de la biosíntesis de aminoácidos derivados

de aspartato es también compleja, y no se conocen todavía los factores que determinan la conversión relativa de aspartato en treonina, metionina, isoleucina y lisina, se ha sugerido que la regulación sería ejercida a nivel de aspartilquinasa. De ser así, el control de este enzima por lisina regularía también la conversión de aspartato en treonina, metionina e isoleucina.

Durante la biosíntesis de alanina, valina y leucina, hay una competición potencial por el carbono derivado de piruvato; de nuevo quedan por resolver los factores que controlan la derivación del carbono del piruvato en cualquiera de estos aminoácidos. Se ha demostrado, sin embargo, que en algunos casos la corriente de carbono a un aminoácido particular, es una función de la concentración de aquel aminoácido. Se han efectuado, con éxito, experimentos de nutrición, para demostrar que aminoácidos exógenos suministrados previenen la entrada de glucosa o acetato en aminoácidos específicos.

Este tipo de regulación por renutrición en el que el producto final previene la entrada de metabolitos, es decir, carbono, en una secuencia metabólica particular, puede ser atribuida a dos causas: inhibición por el producto final ó represión por el producto final. En el caso de inhibición por el producto final, el producto final de un camino metabólico particular inhibe la actividad de enzimas implicados en las reacciones iniciales de aquel camino. En la represión por el producto final, un producto final particular causa una determinación de la síntesis de enzimas requeridos para las reacciones iniciales de una secuencia metabólica.

En plantas superiores, la evidencia hasta ahora, aunque limitada, indica que la inhibición por el producto final es el principal mecanismo para regular el metabolismo aminoácido.

Enzimas implicados en la biosíntesis en plantas que han mostrado estar sujetos a al inhibición por el producto final son:

<u>Enzima</u>	<u>Inhibidor</u>
Ac. acetohidroxi-sintetasa	{ Isoleucina Leucina Valina
Homoserina-deshidrogenasa	Treonina
Treonina-desaminasa	Isoleucina
Isopropil-malato-sintetasa	Leucina
Antralinato-sintetasa	Triptófano
Aspartato-quinasa	{ Lisina Treonina

Los experimentos de Fletcher y Beevers (1971) indican que este tipo de renutrición y regulación por el producto final, es un aspecto normal del metabolismo y no un artefacto, que es inducido por los aminoácidos exógenos. En estos estudios, la aplicación del inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida, inhibía la síntesis proteica, y entonces se restringía marcadamente la incorporación de precursores en los aminoácidos arginina, lisina, isoleucina, valina y prolina. El cese rápido de síntesis de estos aminoácidos era interpretado como debido a una acumulación transitoria de los aminoácidos, cuando su incorporación en proteína era evitada. Los aminoácidos acumulados por el proceso de inhibición por el producto final prevenían la entrada de carbono marcado en secuencias metabólicas que conducen a su síntesis.

Se han publicado datos que parecen demostrar que la inhibición de los niveles enzimáticos por el producto final, en cultivos de tejidos vegetales, no se produce en los casos de

treonina-desaminasa (Dougall 1970) y antralinato-sintetasa (Widholm 1971). Según la demostración de Davies (1971) de que la actividad de treonina-desaminasa varía drásticamente durante el crecimiento de Rosa "Paul's Scarlet", la aparente pérdida de inhibición del enzima por el producto final, por adición de isoleucina exógena (Dougall 1970) es inesperada. Una interpretación de estos datos es que las células vegetales, que crecen rápidamente en un medio de cultivo usual, tienen la suficiente capacidad enzimática para cubrir sus necesidades biosintéticas, y que este nivel de capacidad enzimática es el mismo, o muy aproximado, al nivel de inhibición total del enzima. Los productos finales de las rutas biosintéticas se mantienen al nivel suficiente para llevar a cabo la inhibición total, o casi total, de los niveles enzimáticos.

Los aminoácidos solubles libres se originan como consecuencia de biosíntesis o como resultado de la hidrólisis de proteínas; la interrupción de la síntesis de proteínas podría resultar (igualmente) en una acumulación de aminoácidos solubles. Sin embargo, la observación que la composición de aminoácidos de la fracción soluble difiere de aquella de las proteínas, indica que los aminoácidos solubles no son necesariamente precursores de la síntesis proteica, ni productos directos de la degradación proteica. Actualmente se piensa en la existencia de pools de aminoácidos, algunos de ellos son metabólicamente activos y contribuyen directamente a la síntesis proteica, mientras que otros están localizados en pools de acumulación (Bidwell y colab. 1964). Así, la composición de los aminoácidos solubles no tiene porque guardar relación con los aminoácidos presentes en las proteínas. Adicionalmente, la composición de los aminoácidos de la fracción soluble puede fluctuar sin alterar notablemente la composición de aminoácidos de las proteínas.

1.3. Significación y metabolismo de poliaminas en plantas

En la actualidad se conoce bien que la diamina putrescina y las poliaminas espermidina y espermina, presentes en la célula vegetal en estado libre y conjugado (Smith 1981), son componentes omnipresentes en las células de plantas superiores. Por otra parte, existe evidencia experimental reciente, en sistemas vegetales, que apoya su función como reguladores de la proliferación y diferenciación celular, propuesta previamente para las células animales y bacterias (Bachrach y colab. 1983). Así, se ha demostrado que las poliaminas promueven la síntesis de macromoléculas y estimulan la división nuclear en protoplastos de cereales (Galston 1983), están implicadas en el primer estado proliferativo del desarrollo del fruto de tomate (Cohen y colab. 1982) y en la formación de embriones en cultivos en suspensión de células de zanahoria (Feirer y colab. 1984). Además, las poliaminas ejercen otras funciones, entre ellas el retardo efectivo de la senescencia en mono- y dicotiledoneas (Galston 1983), y pueden tener un importante papel en las respuestas al "stress" de la planta. Finalmente, en tabaco, donde las poliaminas están frecuentemente conjugadas con ácidos cinámicos y sus derivados (Cabanne y colab. 1977, Mizusaki y colab. 1971), su formación ha sido correlacionada con el paso al estado reproductivo (Cabanne y colab. 1981) y resistencia a virus (Martin-Tanguy y colab. 1976), pero no con la síntesis de alcaloides.

En este apartado trataremos de los principales caminos de biosíntesis y degradación de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) y la localización subcelular de los enzimas de su metabolismo, de la regulación de la biosíntesis de poliaminas por fitohormonas, y finalmente del papel de las poliaminas en el crecimiento y desarrollo de las plantas

en condiciones normales y de "stress".

1.3.1. Metabolismo de las poliaminas en plantas

La diamina putrescina ocupa una posición central en la ruta de biosíntesis de poliaminas, debido a que es el precursor obligado de espermidina y espermina en todos los organismos vivos hasta ahora examinados, y también en la ruta de biosíntesis del alcaloide nicotina, y de una variedad de otros productos secundarios (Smith 1970, Yoshida y Mitake 1966, Slocum y colab. 1984).

En las plantas, los mecanismos de regulación de la biosíntesis y degradación de putrescina y de las poliaminas en general, son menos conocidos que en otras especies de eucariotas y bacterias, sin embargo en los últimos años se ha progresado mucho en el conocimiento de estos procesos, debido a la purificación y caracterización bioquímica de algunos de los enzimas mayoritarios del metabolismo de las poliaminas en los organismos vegetales. Además, el análisis del metabolismo de arginina y ornitina marcadas radioactivamente han aportado datos adicionales sobre la naturaleza de la biosíntesis de poliaminas en distintas condiciones de crecimiento.

1.3.2. Biosíntesis y degradación de poliaminas

En células de mamíferos (Pegg y McCann 1982) y en hongos (Tabor y colab. 1982), la etapa inicial y limitante de la velocidad en la biosíntesis de poliaminas, es la descarboxilación de ornitina para formar putrescina. Esta etapa es catalizada por el enzima dependiente de piridoxal fosfato, ornitina descarboxilasa (ODC).

En plantas y bacterias (Tabor y Tabor 1983) la biosínte-

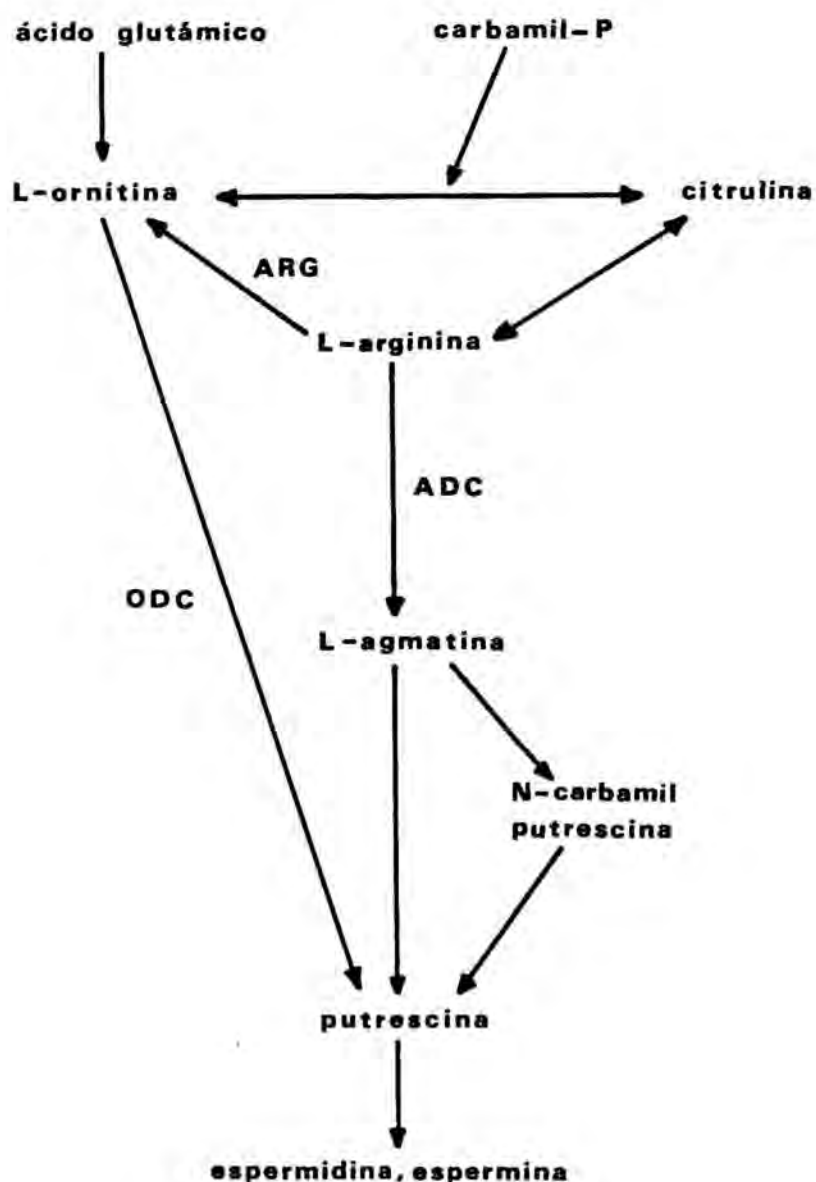
sis de poliaminas es más compleja debido a la existencia de dos caminos que conducen a la síntesis de putrescina. Putrescina puede formarse directamente, mediante descarboxilación de ornitina por ODC, o indirectamente, a través de una serie de intermediarios que siguen a la descarboxilación de arginina (Fig. 1). A pesar de que se han identificado los intermediarios clave, existen todavía dudas sobre algunos aspectos de la síntesis de putrescina a partir de arginina en distintas plantas. La descarboxilación de arginina para producir agmatina es catalizada por otro enzima dependiente de piridoxal fosfato, arginina descarboxilasa (ADC) (Smith 1979). Agmatina es hidrolizada después a N-carbamoylputrescina (NCP) por agmatina iminohidrolasa (Sindhu y Desai 1979). Además hay también evidencias sobre la existencia de dos caminos, aparentemente no relacionados, para la síntesis de putrescina a partir de NCP. En uno de ellos, la mitad carbamoyl de NCP es metabolizada a CO_2 y NH_3 por NCP aminohidrolasa, formando directamente putrescina (Yanagisawa y Suzuki 1982). El mecanismo alternativo propuesto para la síntesis de putrescina sería vía un enzima multifuncional, putrescina sintetasa (Srivenugopal y Adiga 1981).

En plantas superiores, el enzima arginasa (ARG) puede convertir directamente arginina en ornitina, la cual puede utilizarse posteriormente en la síntesis de putrescina por ODC ó metabolizarse a arginina a través del ciclo de la ornitina (Fig. 1).

Las poliaminas espermidina y espermina se sintetizan a partir de putrescina por adiciones consecutivas de grupos aminopropilo cedidos por S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAM). Las adiciones de grupos aminopropilo son catalizadas por aminopropiltransferasas específicas, denominadas comúnmente espermidina y espermina sintetetas (Baxter y Coscia 1973, Hirasawa y Suzuki 1983, Sindhu y Cohen 1984). En plan-

tas y otros organismos se acepta que las actividades espermidina y espermina sintetasa se efectúan por dos enzimas diferentes; sin embargo, sólo se ha caracterizado la espermidina sintetasa (Sindhu y Cohen 1984).

Figura 1.



Mediante estudios con compuestos marcados, se ha observado que la mitad aminopropil incorporada a las poliaminas deriva de metionina vía SAM (Torget y colab. 1979, Cohen y colab. 1981), la cual es descarboxilada por el enzima SAM descarboxilasa (Baxter y Coscia 1973, Suresh y Adiga 1977, Suzuki e Hirasawa 1980) y utilizada en la biosíntesis de poliaminas. Alternativamente, SAM puede metabolizarse sucesivamente a ácido 1-aminopropil-1-carboxílico (ACC) y etileno, una hormona de la senescencia de la planta (Adams y Yang 1979, Lieberman 1979). Puesto que poliaminas y etileno compiten por un precursor común -SAM- (Even-Chen y colab. 1982, Roberts y colab. 1984), SAM ocupa un lugar crucial en los caminos metabólicos importantes que regulan la senescencia.

La degradación de poliaminas en plantas se efectúa por diamino oxidasas (DAO) y poliamino oxidasas (PAO). En legumbres y otras especies vegetales, la putrescina es oxidada directamente a H_2O_2 , NH_3 y pirrolina por DAO (Yanagisawa y colab. 1981, Floris y colab. 1983, Chaudhuri y Ghosh 1984). En las Solanáceas, que contienen muchas poliaminas como amidas conjugadas del ácido cinámico (Smith y colab. 1983), no se ha detectado actividad amino oxidasa (Flores 1983), por lo que se especula con la posibilidad de que los niveles de poliaminas libres en estos tejidos puedan estar regulados a través de la formación de conjugados reversibles, u otros tipos de cambios metabólicos, más bien que a través del catabolismo oxidativo. Experimentos recientes sugieren que pirrolina es metabolizada a succinato vía un intermediario -ácido γ -aminobutírico- (Terano y Suzuki 1978, Flores y Filner 1984), mientras que el diaminopropano es degradado a β -alanina (Terano y Suzuki 1978).

Aparte de su biosíntesis y degradación, se conoce relativamente poco sobre el metabolismo adicional de las poliaminas consideradas, aunque en algunas plantas parecen actuar

como precursores en la formación de metabolitos secundarios. En tabaco, putrescina, derivada de arginina u ornitina (Yoshida 1969) se incorpora al anillo de N-metilpirrolidina de nicotina (Mizusaki y colab. 1973) como se considera ampliamente en el apartado 1.4.1. (pag. 34). Putrescina también actúa como precursor en la síntesis de alcaloides del tropano (Schoofs y colab. 1983). En numerosas especies vegetales se ha observado la producción de amidas inusuales del ácido cinámico conjugadas de poliaminas (Martin-Tanguy y colab. 1978), y parece que estos compuestos pueden estar implicados en ciertos procesos del crecimiento y desarrollo, tales como la floración (Smith y colab. 1983).

1.3.3. Compartimentación subcelular de los enzimas biosintéticos de las poliaminas

Se conoce muy poco sobre la compartimentación subcelular de las poliaminas y la localización de sus enzimas metabólicos en plantas. En general, los enzimas del metabolismo de los aminoácidos, en las células vegetales, están compartimentados (Mifflin y Lea 1977), y los resultados de algunos estudios han indicado que este puede ser también el caso de los enzimas del metabolismo de las poliaminas. Por ejemplo, el efecto metabólico de la arginina aplicada exógenamente puede ser totalmente distinto al de la arginina endógena en la biosíntesis de poliaminas (Schuber y Lambert 1974). Un problema similar, que puede encontrarse al demostrar que las poliaminas limitan el crecimiento u otros procesos en investigación, es que ni siquiera las poliaminas suministradas exógenamente se metabolizan siempre de igual manera que las poliaminas endógenas (LeRudulier y Goas 1977).

Aunque las observaciones precedentes apoyan la idea de que los enzimas del metabolismo de las poliaminas están fun-

cionalmente compartimentados en la célula, no se conoce prácticamente nada referente a su localización en los compartimientos celulares.

1.3.4. Regulación de la biosíntesis de poliaminas en plantas superiores por fitohormonas

Existen evidencias de que, en animales, la biosíntesis de poliaminas es una respuesta a hormonas (Seely y colab. 1982) u otros activadores moleculares (Perella y colab. 1983, Seely y Pegg 1983, Veldhuis 1982).

En vegetales, se ha demostrado también que las hormonas reguladoras del crecimiento pueden producir, en tejidos específicos, cambios en el metabolismo de las poliaminas, y se ha propuesto que las poliaminas, que pueden o no ser móviles en las plantas (Young y Galston 1983b), pudieran actuar como "mensajeros secundarios" actuando sobre procesos hormonales intracelulares (Galston 1983).

En tejidos de tubérculos de Heliantus tuberosus en letargo, en los cuales el crecimiento parece hallarse limitado por los niveles endógenos de poliaminas, la aplicación de una auxina, 2,4-D, activa la biosíntesis de poliaminas endógenas, la síntesis de macromoléculas y el crecimiento (Bagni y colab. 1980). Las poliaminas exógenas pueden sustituir a la auxina en sus respuestas (Bagni y colab. 1978). Estos hechos apoyan la idea de que las respuestas hormonales se efectúan por medio de poliaminas. La formación de raíces adventicias inducida por auxina, en plántulas de judía mung implica también un incremento de la biosíntesis de poliaminas (Friedman y colab. 1982, Jarvis y colab. 1983). La inhibición de esta respuesta por metilglioxal bis(guanilhidrazona) (MGBG), y su reversibilidad por aplicación de arginina u ornitina, apoyan igualmente la idea de que para que esta

respuesta se efectúe es necesaria la biosíntesis de poliaminas (Friedman y colab. 1982).

Otras respuestas del crecimiento y desarrollo vegetal debidas a las hormonas, también parecen implicar cambios en el metabolismo de las poliaminas. Por ejemplo, Dai y colab. (1982) observaron que el incremento, inducido por giberelinas, de la elongación de los entrenudos de guisante enano está acompañado de un incremento simultáneo en los niveles de poliaminas y en la actividad de ADC. También Cho (1983b) indicó que la síntesis de putrescina incrementa durante la elongación de los hipocotilos de letuca inducida por GA_3 . La síntesis de α -amilasa inducida por giberelinas, en tejidos de aleurona de cebada, puede ser inhibida por α -difluorometilarginina (DFMA, un inhibidor irreversible) (Bernal-Lugo 1983), aunque la naturaleza de algunas poliaminas implicadas en esta respuesta todavía no está clara. Lin (1984) observó que los niveles de poliaminas en las células de la capa de aleurona no se alteraban en respuesta a la promoción, por GA_3 , o a la inhibición, por ácido abscísico, de la α -amilasa. Sin embargo, un descenso previo de los niveles de espermidina, por inhibición de la SAM descarboxilasa, por MGBG, hacía disminuir la subsiguiente inducción de la actividad α -amilasa por GA_3 , lo que sugiere que las poliaminas desempeñan alguna función desconocida en la inducción hormonal de este enzima. Recientemente, Kyriakidis (1983) ha demostrado que GA_3 y AIA incrementan 4 veces la actividad ODC en plántulas de cebada germinantes.

También se ha observado, que las citoquininas activan la biosíntesis de poliaminas en algunos sistemas vegetales. Quinetina y benziladenina incrementan la síntesis de putrescina en cotiledones de letuca crecidos en la luz (Cho 1983a). Suresh y colab. (1978) indicaron que, en tejidos de cotiledones de pepino, la actividad ADC y el contenido de putrescina incrementaban en respuesta al tratamiento con benziladenina.

Las citoquininas pueden revertir también la inhibición de esta respuesta por otras hormonas vegetales, como el ácido abscísico (ABA), indicando, posiblemente, que la biosíntesis de poliaminas en estas plántulas está bajo control de múltiples hormonas. La actividad ADC en yemas de guisante etiolado, irradiado con luz roja, incrementa también, cuando tratado con bajas concentraciones de benciladenina, que no afectan al crecimiento (Palavan y colab. 1984).

De las hormonas vegetales mayoritarias, el etileno ha sido el más ampliamente investigado respecto al metabolismo de las poliaminas. Esto puede atribuirse principalmente al hecho de que las poliaminas presentan marcadas propiedades antisenescentes, que antagonizan directamente varias respuestas que se efectúan por medio de etileno, y a que el etileno y las poliaminas comparten un intermediario común, el SAM. En pétalos de Tradescantia senescente, Suttle (1981) demostró que la adición de poliaminas exógenas reducía la producción de etileno inducida por auxina. Resultados similares se han obtenido en frutos de manzana senescente, en tejidos de hojas de tabaco y judía pinta, y en piel de naranja senescente (Even-Chen y colab. 1982).

1.3.5. Papel de las poliaminas en el crecimiento y desarrollo de las plantas

En las plantas, el crecimiento activo y la división celular están relacionados con una intensa síntesis de macromoléculas y poliaminas. Así se ha demostrado en estudios efectuados con tejidos tumorales de Scorzonera hispanica (Speranza y Bagni 1977) y Nicotiana glauca (Audisio y colab. 1976), y con tejidos de Heliantus tuberosus que han superado el letargo (Bagni y colab. 1980). También se ha observado una biosíntesis incrementada de poliaminas en cultivos en suspensión de células de tabaco que se dividen activamente

(Heimer y colab. 1979), yemas en crecimiento y hojas de Phaseolus (Palavan y Galston 1982), tejidos meristemáticos de yemas de tubérculos de patata que emergen del letargo (Kaur-Sawhney y colab. 1982), ápices de raíz de centeno (Dumortier y colab. 1983) y tomate en desarrollo (Cohen y colab. 1982). En cultivos de tejidos de aliso (Huhtinen y colab. 1982) y protoplastos de trigo (Kaur-Sawhney y colab. 1980), la adición de poliaminas exógenas estimula la mitosis.

El incremento de la biosíntesis de poliaminas durante la fase G_1 del ciclo celular, que precede a la iniciación de la síntesis de ADN en las células en división, parece ser un fenómeno universal en animales (Fuller y colab. 1977) y plantas (Cohen y colab. 1983). En cultivos sincrónicos de Chlorella se produce un incremento de la actividad ODC y de los niveles de poliaminas, que precede a la síntesis de ADN y la división celular (Cohen y colab. 1984). En cultivos sincrónicos de Euglena, se produce un segundo incremento de la síntesis de poliaminas durante las fases S y G_2 que preceden a la división celular (Adlakha y colab. 1980). Sin embargo, la acumulación de poliaminas en estas células no es suficiente para inducir división celular, la cual depende del metabolismo de poliaminas durante las fases S y M, como indica el rápido descenso de sus niveles al iniciarse la división. Estas observaciones sugieren que las poliaminas desempeñan un importante papel a lo largo del ciclo celular.

Mientras la biosíntesis de poliaminas durante la activa división celular parece iniciarse por cambios en la actividad ODC, la biosíntesis de poliaminas en tejidos en activo crecimiento en extensión, generalmente, es el resultado de la actividad ADC (Smith 1981, Bagni y colab. 1983). Además, en un órgano determinado, se ha demostrado que existen gradientes en los niveles de poliaminas específicas y la actividad de los enzimas de su biosíntesis (Dumortier y colab. 1983, Cohen y colab. 1982, Smith y Best 1977); en los teji-

dos, estos gradientes producen cambios aproximadamente paralelos a las proporciones de división y extensión celular.

Los cambios en el metabolismo de las poliaminas están relacionados con diversos procesos del desarrollo vegetal. Por ejemplo, Bagni (1970) observó cambios en los niveles de poliaminas de cotiledones y yemas de plántulas de Phaseolus, paralelos a cambios en la síntesis macromolecular. Resultados similares se observaron durante el crecimiento de ejes embrionarios de plántulas de Lathyrus (Ramakrishna y Adiga 1975), lo que permitía sugerir que las poliaminas intervenían en la morfogénesis de las plántulas.

Además de su papel en la regulación del desarrollo fisiológico de tejidos maduros, los cambios en la síntesis y los niveles de poliaminas influyen también en la diferenciación celular, la cual es un proceso inherente al desarrollo de tejidos vegetales organizados. En callos de tabaco, Malfatti y colab. (1983) han demostrado que la proporción de síntesis de poliaminas es muy baja, mientras que se acumulan arginina y otros aminoácidos. Sin embargo, cuando se produce diferenciación de yemas de tallo y raíces, inducida por auxina, la síntesis de putrescina incrementa marcadamente. Otros autores han propuesto que las poliaminas están implicadas en la formación de raíces adventicias inducida por AIA (Friedman y colab. 1982, Jarvis y colab. 1983). Una demostración experimental más convincente de la diferenciación de tejidos por medio de poliaminas se realizó en el sistema embriogénico de zanahoria. Montague y colab. (1978, 1979) demostraron que la actividad ADC y los niveles de poliaminas son aproximadamente el doble en cultivos embriogénicos que en cultivos no embriogénicos. Recientemente, Feirer y colab. (1984) han observado que la embriogénesis de zanahoria puede ser bloqueada por la inhibición in vivo de ADC con DFMA, y que esta inhibición revierte por aplicación de putrescina exógena. Por el contrario, α -difluorometilornitina (DFMO, un inhibidor

irreversible) no inhibe la embriogénesis, lo que sugiere, de acuerdo con Slocum (1984), que el desarrollo dependiente de poliaminas está regulado por cambios en la actividad ADC más bien que en la de ODC.

1.3.6 Metabolismo de poliaminas en plantas en "stress"

Diversos tipos de condiciones de "stress" producen cambios metabólicos característicos, que ocasionan la acumulación de putrescina en concentraciones elevadas en los tejidos vegetales, mientras que las otras poliaminas permanecen esencialmente estables. Aunque la significación fisiológica de esta respuesta no se conoce, puede ser de fundamental importancia, ya que las plantas que crecen en ambientes naturales deben adaptarse continuamente a condiciones subletales de "stress".

A partir del trabajo original de Richards y Coleman (1952), varios investigadores han aportado datos sobre los elevados incrementos de los niveles de putrescina en diversas plantas deficientes en K^+ (Smith 1970, Klein y colab. 1979, Young y Galston 1984). Murty y colab. (1971) sugirieron que el incremento en los niveles de putrescina compensaba aproximadamente un 30% de la pérdida de K^+ en hojas de grosellero negro, y así podían tener una función en el mantenimiento del balance iónico en estos tejidos.

Los tratamientos que generan un exceso de iones H^+ en los tejidos, como nutrición ácida (Smith y Sinclair 1967, Young y Galston 1983a), exposición a SO_2 (Priebe y colab. 1978), o nutrición con NH_4^+ (Priebe y colab. 1978, Klein y colab. 1979), también producen elevados niveles de putrescina en las plantas. Una respuesta similar se observa en tejidos en "stress" osmótico, como plantas marchitas u hojas situadas en soluciones de elevada molaridad (Flores y Galston 1982,

1984). Esta respuesta, que puede ser un mecanismo para regular las pérdidas de agua producidas por un incremento de la osmolaridad intracelular, es fundamentalmente distinta a la de las bacterias (Munro y colab. 1972) y células de mamífero (Munro y colab. 1975). En estos organismos, un incremento de osmolaridad produce una rápida excreción de putrescina como respuesta a la toma de K^+ , lo que da lugar a una disminución de los niveles intracelulares de putrescina.

La acumulación gradual de putrescina en plantas deficientes en K^+ (Smith 1979), o en plantas mantenidas con NH_4^+ como única fuente de nitrógeno (LeRudulier y Goas 1975), está relacionada con un incremento en la actividad ADC durante un período de varios días o semanas. En hojas de avena deficientes en K^+ los niveles de ADC son aproximadamente 8 veces superiores que aquellos de los controles (Smith 1979, Young y Galston 1984). También los niveles incrementados de putrescina en hojas de avena con "stress" osmótico y "stress- H^+ " están relacionados con una actividad ADC incrementada. En ambos casos, esta respuesta se produce al cabo de 1-2 horas y depende de la síntesis continua de proteínas, esto se observó en estudios con el inhibidor cicloheximida. El incremento en los niveles de putrescina, que puede ser más de 60 veces superior en hojas con "stress" osmótico que en las hojas control después de 6 horas de tratamiento (Flores y Galston 1982), puede ser bloqueado por DFMA, pero no por DFMO. Estos resultados sugieren que la síntesis de putrescina se debe principalmente a un incremento de la actividad ADC, más que a la actividad ODC, en plantas en "stress".

Otros estudios indican, sin embargo, que la descarboxilación de arginina por ADC no constituye siempre el principal camino de síntesis de putrescina en las plantas, y que ADC y ODC son activas y están implicadas en la biosíntesis de putrescina (Yoshida 1969, Schuber y Lambert 1974). Más re-

cientemente se ha observado que en frutos de tomate la actividad ODC incrementaba extremadamente el tercer día después de la polinización, mientras que la actividad ADC era muy baja (Heimer y colab. 1979), y también se observó que los aminoácidos arginina y ornitina eran igualmente descarboxilados en cultivos celulares de tabaco (Berlin 1981). De acuerdo con Altman y colab. (1982), altas actividades de ambas enzimas, ADC y ODC, son detectables en diferentes partes de plántulas de judía mung. Finalmente, en raíces de tabaco, Yang y colab. (1984) han observado que ODC era el principal enzima implicado en la síntesis de putrescina y que la actividad ODC, pero no aquella ADC, incrementaba extremadamente (hasta 8 veces) en las raíces de plantas decapitadas.

Se tienen pocos conocimientos acerca de la significación fisiológica de la acumulación de putrescina, la cual parece producirse como una respuesta universal al "stress" en las plantas (Slocum y colab. 1984). La respuesta puede ser de naturaleza protectora, confiriéndoles una respuesta selectiva a las células en "stress". Ya se han indicado las propiedades antisenescentes de las poliaminas exógenas, pero todavía no se conoce si estas poliaminas penetran en las células senescentes y ejercen sus efectos a nivel intracelular. Aún admitiendo que la putrescina intracelular, producida en respuesta al "stress", ejerza funciones análogas, es conveniente no obstante considerar que las diaminas, tales como putrescina, son generalmente menos efectivas que las poliaminas (espermidina y espermina) en la prevención del incremento de las actividades RNAasa y proteasa, la degradación de la clorofila, y otros procesos que conducen a la senescencia (Kaur-Sawhney y colab. 1982). La putrescina es también menos efectiva que las poliaminas en la estabilización de las membranas contra los cambios en su fluidez (Ben-Arie y colab.

1982) y salida de solutos (Altman 1982) inducidos por "stress". Así, la acumulación de putrescina, que lógicamente implica el bloqueo de la conversión metabólica de la diamina putrescina en espermidina y espermina, podría parecer una desventaja desde el punto de vista antisenescente. La acumulación de putrescina podría ser una causa de las lesiones inducidas por "stress". Se ha observado que la aplicación de elevadas concentraciones de putrescina exógena son tóxicas para diversos tejidos vegetales (Shevyakova 1966), y la elevada acumulación de putrescina endógena puede estar relacionada con la necrosación de tejidos de hojas deficientes en K^+ (Basso y Smith 1974). Obviamente, concentraciones intracelulares elevadas de aminas libres, tales como putrescina, tendrían consecuencias drásticas para la regulación del metabolismo nitrogenado, síntesis de proteínas y mantenimiento del pH celular y la homeostasis iónica.

1.4. Síntesis de nicotina en plantas de tabaco

La nicotina es con mucho el alcaloide más abundante del tabaco Burley 21, promediando el 90% del contenido alcaloídico total, la nornicotina el 9% y la anatabina el 1% restante (Sisson y Saunders 1982). La herencia del contenido alcaloídico total de la planta de tabaco Burley está controlada por dos genes principales independientes (Legg y colab. 1969). También se ha comprobado que factores cuantitativos o genes secundarios influyen sobre el contenido de alcaloides (Matzinger y colab. 1962). Finalmente, un tercer sistema genético asociado con la herencia alcaloídica controla la conversión de nicotina en nornicotina (su producto de desmetilación). La conversión de nicotina en nornicotina está controlada por dos loci genéticos (Mann y colab. 1964). Los genotipos recesivos de ambos loci ($c_1c_1c_2c_2$) son no-convertores y conservan nicotina como alcaloide principal. Los genotipos dominantes de ambos loci ($C_1^-C_2^-$) son convertidores de nicotina. En los actuales cultivos de tabaco sólo el locus C_1 es activo (Mann y colab. 1964). La evolución ha reducido aparentemente la redundancia genética asociada con el origen anfidiplóide estas especies. Por ello, la conversión de nicotina a nornicotina en los actuales cultivos de tabaco depende sólo de la presencia o ausencia del alelo dominante en el locus C_1 , con independencia del genotipo del locus C_2 (Sisson y Saunders 1982). En la planta de tabaco intacta el alelo no-converidor cambia a la forma convertidora de nicotina con una frecuencia del 0,8% por generación, lo que representa una alta frecuencia de mutación (Wernsman y Matzinger 1970). Aunque es posible que esta frecuencia de mutación pueda incrementar en los cultivos de callo de tabaco, debido a que uno de los problemas propios del cultivo in vitro puede ser la inestabilidad genética, no tenemos información de

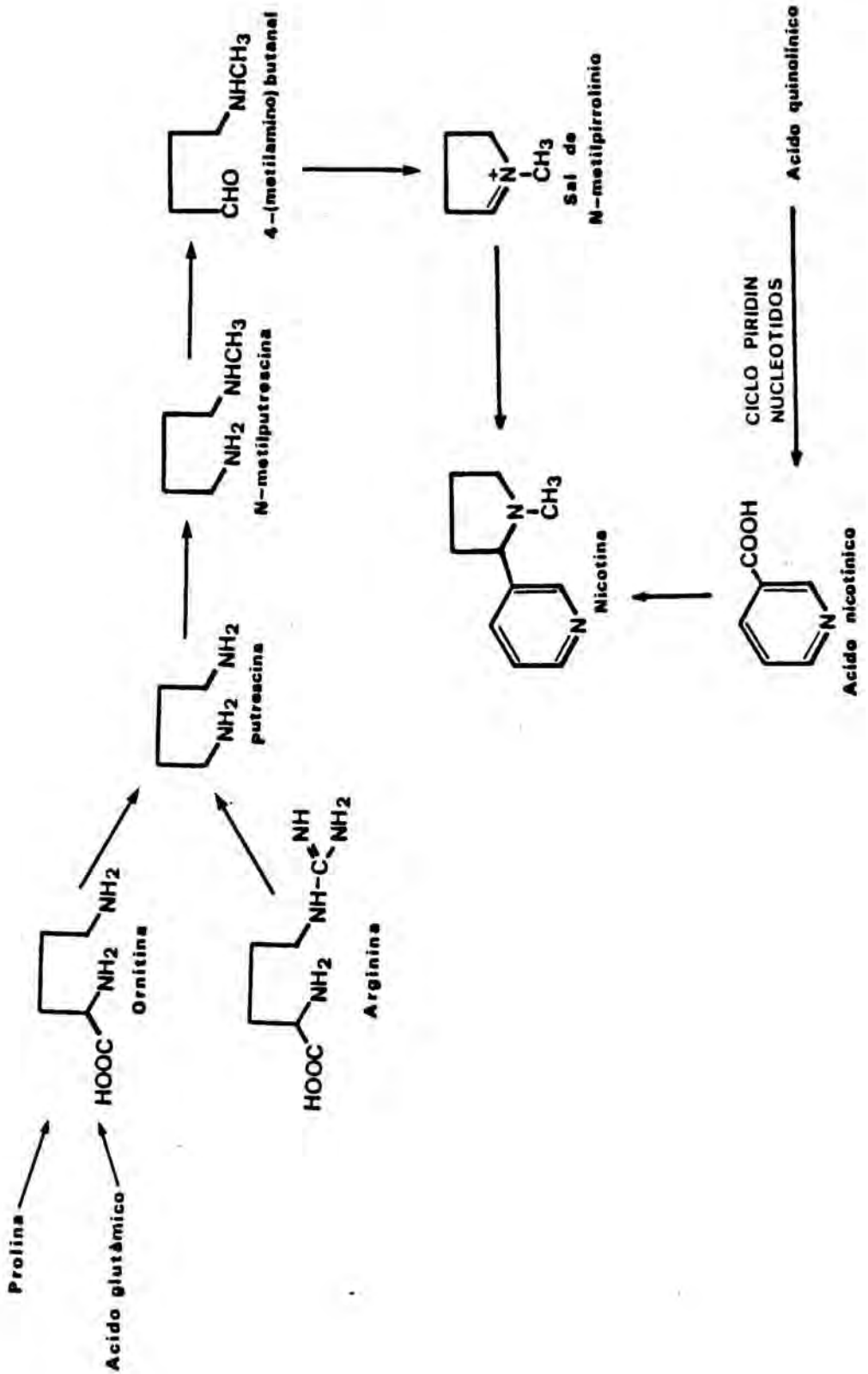
que se hayan realizado estudios sobre el particular.

1.4.1. Biosíntesis de nicotina y su regulación enzimática

El metabolismo de los aminoácidos está íntimamente relacionado con la biogénesis de los alcaloides. Los aminoácidos ornitina, ácido glutámico, prolina y arginina, actúan como precursores más o menos directos del anillo de pirrolidina de nicotina, y el ácido aspártico del anillo de piridina del alcaloide. En experimentos realizados por Klein y Linser (1933), se demostró que las plantas de tabaco puestas en disoluciones al 1% de prolina, ácido glutámico y ornitina, aumentaban considerablemente su contenido de nicotina, y los modernos métodos de marcado los confirmaron como precursores del anillo de pirrolidina del alcaloide. Mediante la aplicación de ornitina- $2C^{14}$ (Mizusaki y colab. 1968), glutamato- C^{14} (Leete 1968, Lamberts y Byerrum 1958), prolina- $2C^{14}$ (Lamberts y Byerrum 1958) y arginina- $2C^{14}$ (Yoshida y Mitake 1966) a plantas en activo crecimiento, se probó la incorporación de estos aminoácidos en el anillo de pirrolidina de nicotina. Experimentos verificados con aminoácidos marcados con C^{14} , aplicados a brotes de plantas de tabaco, han revelado que se incorporan en nicotina en el siguiente orden: ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, prolina, leucina, valina, serina, fenilalanina, alanina, histidina, lisina y treonina. Es como si la biosíntesis de nicotina estuviese vinculada al metabolismo nitrogenado global de la planta de tabaco (Lovkova e Il'in 1962). Es decir, la especificidad de la planta de Nicotiana sería estricta respecto al alcaloide formado, pero no lo sería en el mismo grado respecto con los precursores internos o dados de origen externo.

Puesto que los dos anillos de nicotina, el de piridina y el de pirrolidina, se forman por separado y después se unen, consideraremos su síntesis también por separado.

Figura 2. Biosíntesis de nicotina.



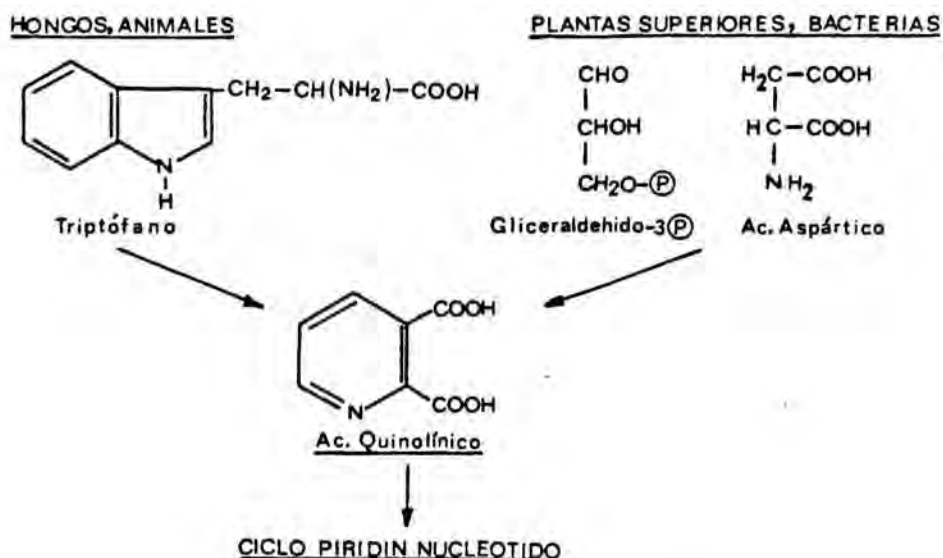
El anillo de N-metilpirrolidina de nicotina deriva directamente de la diamina putrescina, la cual, por ello, ocupa una posición central en el camino biosintético del alcaloide. La putrescina, tal como se considera ampliamente en el apartado correspondiente a "Significación y metabolismo de poliaminas en plantas" (pags. 18-32), se puede formar en las plantas directamente, a través de la descarboxilación de ornitina por la acción de ornitina descarboxilasa, o indirectamente, a través de una serie de intermediarios, que siguen a la descarboxilación de arginina por arginina descarboxilasa. A su vez, ácido glutámico y prolina pueden ser precursores de putrescina vía ornitina (Fig. 2).

El camino biosintético del anillo de N-metilpirrolidina de nicotina implica la sal de N-metilpirrolinio como intermediario (Leete 1967). La N-metilación de putrescina y la subsiguiente desaminación del grupo amino primario de la N-metilputrescina son responsables de la biosíntesis de 4-metilaminobutanal y la sal de N-metilpirrolinio (Fig. 2). El primer enzima estudiado de este proceso fué la metiltransferasa (Mizusaki y colab. 1972). Aunque la N-metilputrescina no se ha identificado en la planta de tabaco, puede servir como precursor de nicotina, y el hecho de la caracterización del enzima que la produce constituye además una prueba evidente de su participación en la síntesis del alcaloide. El enzima se ha extraído de las raíces -el único lugar de la planta donde se encuentra- y es altamente específico para putrescina. La N-metilputrescina oxidasa cataliza la desaminación oxidativa de N-metilputrescina a 4-metilaminobutanal, el cual se cicla espontáneamente a ión o sal de N-metilpirrolinio (Mizusaki y colab. 1972). El enzima se extrajo de raíces de tabaco y tenía un pH óptimo de 8 y una Km para N-metilputrescina de 0,45 mM; también tenía actividad para putrescina y cadaverina, pero no para otras aminas ensayadas.

El uso de inhibidores indicó la presencia en el mismo de las funciones carbonilo y mercapto.

Los enzimas biosintéticos de putrescina, ornitina y arginina descarboxilasas, están ampliamente distribuidos en la planta y se han determinado en varias especies vegetales además de en tabaco (Mizusaki y colab. 1972, Ramakrishna y Adiga 1975, Altman y colab. 1982). Ornitina descarboxilasa se obtuvo parcialmente purificada de raíces de N. tabacum, y se comprobó que requería piridoxal-P como cofactor y que era parcialmente inhibida por δ -N-metil-ornitina, pero no por el isómero α -N-metil-ornitina (Mizusaki y colab. 1972). Arginina descarboxilasa de Lathyrus sativus, se determinó como un enzima sulfhidrilo que también requería piridoxal-P como cofactor. La actividad de este enzima era inhibida competitivamente por varias aminas incluyendo el producto final de la reacción, agmatina, y sustratos análogos tales como homoarginina (Ramakrishna y Adiga 1975).

Según se indicó anteriormente, la nicotina consta además del anillo de pirrolidina, de otro de piridina (Fig. 2). Si se admite que el anillo de piridina procede del ácido nicotínico (Tso y Jeffrey 1959, Dawson y colab. 1956, Dawson y colab. 1960), el problema está en averiguar como se forma el ácido. En animales y hongos se admite que el precursor, el ácido quinolínico (AQ), procede de un anillo de indol, mientras que en las plantas superiores y bacterias, el primer intermediario conocido en la síntesis de novo de los nucleótidos y alcaloides de piridina, sería producido por condensación de una molécula de C₃-gliceraldehido-3-P y otra de C₄-ácido aspártico.

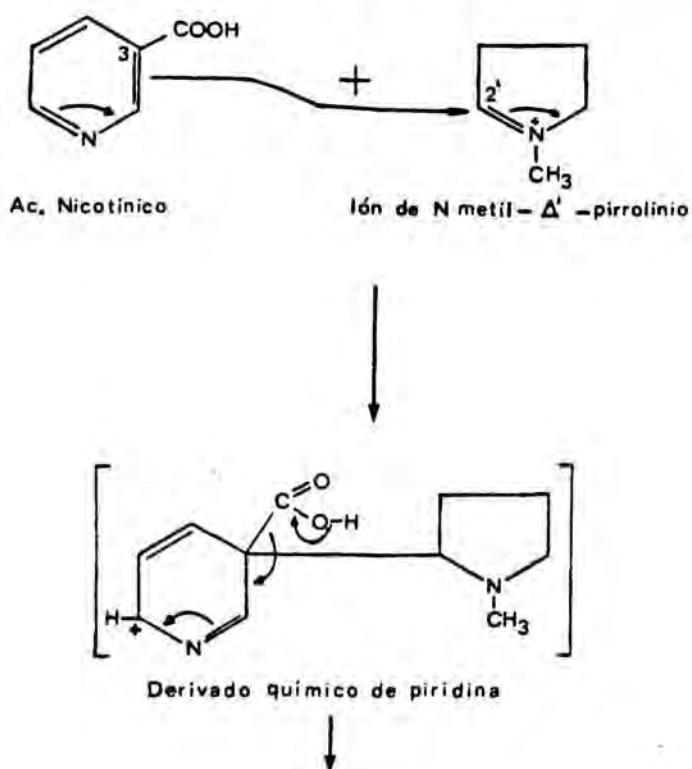


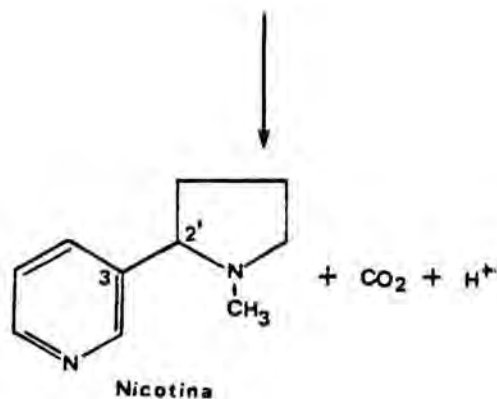
El paso siguiente es la descarboxilación de AQ a ácido nicotínico-mononucleótido (ANMN) catalizada por el enzima AQ-fosforribosiltransferasa (AQPRT). El valor excepcionalmente alto de AQPRT en las raíces de tabaco, donde se forman nicotina y anabasina, comparado con los bajos niveles de todos los otros enzimas (Mann y Eyerrum 1974), sugiere que en la planta de tabaco la síntesis de novo del alcaloide es activada por determinación genética.

El papel de otro enzima encontrado en raíces de N. rustica, el ácido nicotínico-descarboxilasa, es incierto en la biosíntesis del alcaloide nicotina. Se sabe que se incorpora el anillo de piridina del ácido, pero no el átomo de carbono del carboxilo; la posición de este grupo, es decir, la posición 3, es el punto de acoplamiento con el anillo de pirrolidina (Yang y Waller 1965). La descarboxilasa probablemente forma parte de un sistema enzimático que afecta a esta condensación.

Una vez formados los anillos de piridina y pirrolidina,

se reunen para formar el alcaloide. Si se dan a plantas de Nicotiana tabacum cantidades subletales de ácido 5-fluoronicotínico, se formará 5-fluoronicotina (Leete y colab. 1971). Esto demuestra, tal como se ha indicado, que el anillo de pirrolidina se une al de piridina por el carbono 3, es decir, por el mismo carbono que el carboxilo. Según Chandler y Gholson (1972), en las raíces hay un sistema enzimático, que no se halla presente en hojas y tallos, implicado en la biosíntesis de nicotina y que cataliza el desprendimiento de $C^{14}O_2$ correspondiente al carboxilo. Uno de los enzimas del sistema puede descarboxilar el ácido nicotínico (ácido nicotínico descarboxilasa); otro enzima puede estar implicado en la rotura del doble enlace del ión N-metilpirrolinio, y un tercer enzima puede unir el ácido nicotínico descarboxilado y el anillo de pirrolidina modificado por un nuevo enlace entre C-2' y C-3 para formar nicotina (Waller y Derner 1981), como se indica en la siguiente figura.





Según Mizusaki y colab. (1973), el efecto de decapitar plantas de tabaco de 4 semanas de edad se traducía en un incremento de la actividad enzimática y en la acumulación de nicotina en la raíz. Además, la administración de nicotina a las plantas en la concentración de 0,5 mM causaba el 50% de la inhibición de la síntesis de los enzimas implicados en su formación y casi la total inhibición en la concentración 5 mM. Puesto que las plantas intactas contienen suficiente nicotina como para causar el 50% de inhibición, es posible que la acumulación de nicotina en las raíces reprima la síntesis de enzimas inducida por decapitación del tallo.

El ácido β -indolacético (AIA), dado a plántulas en baja concentración al tiempo de la decapitación, estimulaba la producción de enzima, mientras que a mayores concentraciones inhibía tal producción y por último la detenía enteramente (Mizusaki y colab. 1973). El AIA, sin duda, es importante en la regulación de la biosíntesis del alcaloide.

1.4.2. Regulación de la producción de nicotina in vitro

La eficiente producción de compuestos secundarios por los sistemas de cultivos vegetales in vitro, depende en gran par-

te de los factores ambientales y biológicos. Ya que si bien el material genético -DNA- determina las potencialidades para el desarrollo, el medio determina el grado y la clase de potencial genético que realmente se manifiesta. El medio influye sobre el crecimiento, diferenciación y metabolismo celulares debido a que controla, a través de sus efectos sobre la síntesis proteica y la actividad enzimática, la expresión de su dotación genética o genoma.

Seguidamente se examina la información encontrada acerca del efecto de los factores ambientales y biológicos sobre la producción de nicotina en cultivo de callo de tabaco.

A.- Luz

De todos los factores externos que pueden afectar al desarrollo vegetal, los efectos de la radiación, especialmente de la luz visible, son los mejor conocidos. En los organismos fotoautótrofos la radiación se hace efectiva principalmente a través de la fotosíntesis. Pero, además, puede afectar la morfogénesis de los vegetales de manera específica; este fenómeno se conoce como fotomorfogénesis y los efectos respectivos debidos a la radiación como fotomorfósis. Por ello, no es de extrañar que se tenga mayor información de los efectos de la luz sobre la producción de metabolitos secundarios en cultivos de callo y células en suspensión, que la que se tiene de los efectos de otros factores físicos del medio ambiente.

En un número de cultivos de tejidos se ha podido demostrar que, generalmente, la luz estimulaba la formación de compuestos, que incluyen carotenoides, flavonoides, polifenoles y plastoquinona. En contraste con estos efectos estimulantes de la luz, diversos autores han encontrado que la luz blanca o azul inhibía casi completamente la formación

de diversos compuestos secundarios (Tabata 1977).

Weeks y Bush (1974) indicaron que las semillas de tabaco en germinación, que se encontraban en la oscuridad antes de la protusión de la radícula, contenían más alcaloide que aquellas que permanecían en la luz durante este estado -19 horas de luz al día-, pero que el contenido de nicotina en las mismas era mayor cuando las semillas se iluminaban después de la protusión de la radícula. Debido a estas observaciones, los autores sugirieron que los precursores del alcaloide se formaban más rápidamente en la oscuridad, pero que la luz favorecía su conversión en nicotina.

Posteriormente, Ohta y Yatazawa (1978) estudiaron el efecto de la luz sobre la producción de nicotina en cultivos de callo de tabaco. Observaron que la luz inhibía la producción de nicotina, incluso cuando el crecimiento del callo era estimulado ligeramente por la luz, y que el efecto inhibitorio de esta era proporcional a la intensidad de la radiación y al período de iluminación. No encontraron diferencias destacables entre los efectos de la luz roja y azul en la producción de nicotina por los callos ensayados. Sin embargo, el contenido de alcaloide de los callos crecidos en la luz roja o azul era considerablemente más alto que aquel de los callos crecidos en la luz blanca, probablemente debido a la más baja intensidad de las radiaciones monocromáticas. Cuando los callos fueron transferidos de la luz a la oscuridad, su producción de nicotina se incrementó hasta los niveles de los callos crecidos permanentemente en la oscuridad. Lógicamente, el efecto inhibitorio de la luz en la producción de nicotina por los cultivos de callo de tabaco, podía haberse producido o por disminución de la biosíntesis de nicotina, o por el incremento de la degradación del alcaloide. Para separar y evaluar estos dos procesos, se hicieron crecer los callos primero en la oscuridad y después en la luz.

En ambos ensayos se midió el nivel de nicotina, y los resultados no indicaron ni fotooxidación ni fotopromoción de la degradación del compuesto, ya que los niveles de nicotina en los callos no disminuyeron.

Por todo ello, Ohta y Yatazawa (1978) llegaron a la conclusión de que la producción de nicotina está regulada por la luz de igual manera que lo está por los reguladores vegetales del crecimiento. En la planta de tabaco, la nicotina se sintetiza en las células de la raíz, pero debido a la totipotencia celular, es evidente que las células de la hoja y del tallo poseen la información genética para la producción del alcaloide, y estas células podrán manifestar su capacidad cuando crezcan en un medio con un bajo nivel de auxina y en la oscuridad.

B.- Temperatura

Los embriones de N. tabacum y N. rustica sintetizan nicotina desde el mismo momento en que inician la germinación, antes de tomar nutriente nitrogenado alguno.

El contenido en nicotina de las semillas de tabaco que germinan a 27°C es el doble que el de las germinadas a 21°C o 32°C (Weeks y Bush 1974). Este resultado coincide con el obtenido por Ohta y colab. (1978) en tejido de callo de tabaco OMT-53; estos investigadores comprobaron que los valores máximos de crecimiento y producción de nicotina para el tejido de callo incubado a diferentes temperaturas -15°C, 19°C, 25°C, 30°C y 37°C-, se producían a 25°C, y que el contenido de nicotina a esta temperatura era del orden de 1,41% referido a peso seco. Cuando la temperatura de incubación se desviaba de 25°C, la producción de nicotina y el crecimiento disminuían acusadamente.

C.- Reguladores del crecimiento vegetal

Como se ha indicado previamente, los reguladores del crecimiento de las plantas afectan no sólo al crecimiento y diferenciación de los cultivos vegetales in vitro, sino también a su metabolismo secundario. Sus efectos sobre este metabolismo dependen en gran manera del compuesto secundario considerado.

En Nicotiana, la relación entre auxina y citoquinina controla la diferenciación. En un cultivo de callo, la existencia en el medio de cultivo de altos niveles de citoquinina en relación a auxina, puede condicionar la formación de yemas de tallo, las cuales, a su vez, pueden regenerar plantas completas si desarrollan raíces. Con niveles intermedios de auxina y citoquinina en el medio de cultivo, los tejidos de callo, por ejemplo de N. tabacum, crecerán en forma de masas esféricas bastante compactas, muy apropiadas para el marcado radioactivo y otras manipulaciones. Finalmente, si el nivel de auxina es relativamente más alto que el de citoquinina, los callos, en el cultivo, se desarrollaran en forma de masas de células friables, muy apropiadas para los bioensayos de sustancias del crecimiento vegetal. Los niveles de las sustancias de crecimiento requeridos para cada caso y para las distintas especies pueden diferir; así como puede diferir la acción sobre el crecimiento y diferenciación de un tejido de callo determinado, de las sustancias de crecimiento de un mismo grupo.

Según Ohta y colab. (1978), la producción de nicotina en cultivos de callo de tabaco de la raza OMT-53 se incrementaba notablemente cuando el tejido de callo se cultivaba con una baja concentración de ANA -ácido α -naftalenacético- en el medio de cultivo.

Los efectos de las auxinas sobre la síntesis de nicotina

en cultivos de callo de Nicotiana han sido estudiados por varios investigadores, como se ha discutido anteriormente (pags. 1-3). Sólo recordaremos el mecanismo bioquímico del control por las auxinas de la biosíntesis de nicotina, indicado por Mizusaki y colab. (1971). Según estos autores, un alto nivel de auxina inhibe la actividad de la putrescina-N-metil transferasa que cataliza la N-metilación de putrescina, el intermediario clave en el camino de biosíntesis del alcaloide nicotina.

D.- Nutrientes

Una de las principales ventajas de los cultivos de células vegetales sobre los cultivos de células animales, es que las células vegetales pueden crecer en un medio sintético simple. Sin embargo, la composición química de un medio que permita un buen crecimiento celular, no tiene que ser necesariamente el más adecuado para la producción de metabolitos secundarios. Sobre los efectos de los componentes individuales de un medio y sus interacciones en la producción de compuestos secundarios, hasta el momento, se tiene poco conocimiento.

Ohta y colab. (1978) observaron que las concentraciones óptimas de sacarosa y nitrógeno en el medio de cultivo de callo de tabaco OMT-53 eran respectivamente del 3% y de 840 mg de nitrógeno/l. Este resultado coincide con el hecho de que la producción de alcaloides en la planta intacta incrementa 2-10 veces, cuando crece bajo el efecto de un alto nivel de abonos nitrogenados. Se puede observar, frecuentemente, la formación de raíces en tejidos de callo crecidos con altos niveles de nitrógeno (1680-2520 mg N/l).

E.- Variación celular

Por último, deseamos destacar que la variación celular es otro factor que puede regular el metabolismo secundario, y que tiene un uso potencial en la mejora de las capacidades biosintéticas de las líneas de cultivo. Se conoce empíricamente que cultivos de callo producen de forma esporádica subcultivos variantes que muestran diferentes niveles en la concentración de determinados metabolitos secundarios.

En cultivos de células en suspensión de N. rustica, procedentes de tejidos de callo, según Tabata e Hiraoka (1976), ciertas células se desarrollaron como clones individuales y presentaron grandes diferencias en el crecimiento y producción de nicotina. Uno de estos clones desarrolló una línea relativamente estable y sin ninguna organización, capaz de producir nicotina en una elevada proporción -cerca del 0,3% referido a peso seco- en un medio que contenía 2,4-D. Estos investigadores indicaron también que una línea de cultivo derivada de callo de N. tabacum, que mostraba sólo una cantidad traza de nicotina, a lo largo de diez años de subcultivo llegó a formar una gran cantidad de nicotina, aproximadamente el 1% referido a peso seco. Igualmente, Ohta y colab. (1976) informaron de una línea de callo de tabaco con un alto contenido en nicotina, del orden del 1,7% referido a peso seco. Es obvio que la selección basada en la elevada capacidad biosintética puede ser de gran importancia para la mejora de la producción de compuestos útiles mediante cultivos de callo y células en suspensión.

1.5. Formación de metabolitos secundarios en cultivo "in vitro"

La célula vegetal suele contener, en mayor o menor número y variedad, metabolitos secundarios, es decir, compuestos que no le son esenciales para su supervivencia. Los metabolitos secundarios más significativos son los alcaloides, isoprenoides y fenoles con algunas excepciones, antibióticos y varios aminoácidos libres. Compuestos de estos tipos han sido aislados de cultivos de tejidos y células (Butcher 1977, Staba 1980), y su biosíntesis in vitro está bien establecida (Kurz y Constabel 1979). Varios de estos compuestos, debido a su aplicación terapéutica, son de particular interés en Farmacia.

Respecto a la biosíntesis de alcaloides in vitro, cultivos derivados de diversas partes de una planta productora de alcaloides son capaces de sintetizar estas sustancias y producir un espectro idéntico al producido por la planta de origen (Böhm 1980). Algunos cultivos celulares -cultivos de tejidos de callo y de células en suspensión e inmovilizadas- derivados de plantas alcaloídicas pueden carecer total o parcialmente de capacidad para sintetizar estos compuestos. Por el contrario, en otros cultivos in vitro los alcaloides pueden alcanzar niveles muy superiores a aquellos encontrados en la planta intacta, por ejemplo, la apoescopolamina predomina en cultivos de diversas especies de Datura, mientras que en la planta se presenta sólo en cantidades traza (Corduan 1975). Además, ciertos cultivos producen alcaloides nuevos no encontrados in vivo, por ejemplo, la producción de edulinina y aromorina en cultivos celulares de Ruta graveolens y Stephania cepharantia, respectivamente (Böhm 1980). Este metabolismo secundario modificado en cultivos celulares, también observable en otros grupos de metabolitos se-

cundarios producidos por cultivos celulares, ha sido atribuido a diversos factores.

El primero de estos factores, es la falta de diferenciación de tejido en algunos cultivos de callo y de células en suspensión. Por ejemplo, los tejidos de Atropa belladonna que desarrollan raíces son capaces de producir alcaloides de tropano mientras que los cultivos no diferenciados del mismo material vegetal no los producen (Thomas y Street 1970). Similarmente, tejidos diferenciados de Papaver bracteatum y Nicotiana tabacum tienden a producir más tebaína y nicotina, respectivamente, que los correspondientes cultivos de callo no diferenciados (Kamimura y Nishikawa 1976, Pearson 1978). La falta de estructuras celulares especializadas en algunos cultivos puede ser la causa de los reducidos niveles de metabolitos secundarios acumulados (particularmente de aceites volátiles, resinas y látex) (Krikorian y Steward 1969). A pesar de ello, cada vez es mayor la evidencia de que la organogénesis en cultivos de tejidos no es un prerrequisito esencial para la biosíntesis in vitro de metabolitos secundarios (Staba 1980, Fowler 1983). En efecto, el descenso en la producción de metabolitos secundarios ha sido indicado en algunos cultivos como consecuencia de la organogénesis. Por ejemplo, cultivos indiferenciados de Dioscorea deltoidea y Agave wightii producían de 1-2% (referido a peso seco) de sapogeninas esteroídicas, mientras que cuando los cultivos se diferenciaban para producir raíces o yemas de tallo, respectivamente, sólo se producían cantidades traza de sapogeninas (Kaul y Staba 1968, Sharma y Khanna 1980). Cada año incrementa considerablemente el número de trabajos sobre el establecimiento de líneas celulares diferenciadas altamente productivas de metabolitos secundarios, algunos cultivos producen cantidades de estos compuestos 50-60 veces mayores que la planta de origen diferenciada, por

ejemplo, los altos niveles de alcaloides indólicos producidos por cultivos celulares de Rauwolfia serpentina (Stöckigt y colab. 1981).

Un segundo factor puede ser que el potencial biosintético de los cultivos celulares derivados de una parte de la planta difiera de aquel de los cultivos derivados de otra parte de la planta. Hay pocos argumentos que apoyan esta idea, ya que, en general, la procedencia del explante no suele influir sobre la capacidad de producción de metabolitos secundarios de los tejidos y células cultivadas durante periodos prolongados. Esto es una prueba de la totipotencia bioquímica de las células vegetales referida por Zenk (1978), es decir, que todo el potencial genético y fisiológico necesario para la formación de metabolitos secundarios está presente en una célula aislada, y que los cultivos celulares, independientemente de la parte de la planta de la cual derivan, comúnmente producen metabolitos secundarios similares, cuando mantenidos en condiciones de cultivo estables.

Un tercer posible factor pueden ser las nuevas disposiciones estructurales de los genomas de las células cultivadas, debidas a procesos de endoduplicación y/o fragmentación nuclear (hechos inherentes al crecimiento celular in vitro) (D'Amato 1977, Yeoman y Forche 1980) que pueden conducir a cambios significativos en los genotipos de una parte de una población celular, causando con ello un metabolismo secundario modificado en estas células. Puesto que la proporción de células que contienen genotipos cambiados puede incrementar durante periodos de cultivo prolongados (especialmente en los casos en que estos genotipos producen tipos de células que crecen rápidamente), se puede producir un descenso gradual en la producción de metabolitos secundarios. Es significativo, sin embargo, que las capacidades biosintéticas

de los cultivos de células vegetales pueden ser restauradas tras la regeneración de las plantas de cultivos desdiferenciados. Por ejemplo, Kartnig (1977) observó que la productividad y el espectro de cardenólidos de cultivos celulares de Digitalis descendía a niveles no detectables después de 16-18 subcultivos seriados de 5-6 semanas cada uno. Sin embargo, cuando de estos últimos, aparentemente no productivos, fueron regeneradas plantas, se restablecía el espectro de cardenólidos original. Por ello, el genotipo original para el control de la biosíntesis de cardenólidos había sido retenido a través de muchos subcultivos. Situaciones de este tipo inducen a suponer que la expresión de los genes que controlan la biosíntesis de metabolitos secundarios se halla probablemente bajo alguna forma de mecanismo de control de desrepresión/represión. Esta hipótesis está apoyada por los hallazgos de Hirotsani y Furuya (1977), los cuales mostraron que los genes responsables del control de la biosíntesis de metabolitos secundarios (en el caso de la biosíntesis de cardenólidos en Digitalis purpurea) estaban de hecho también presentes en las células de los cultivos no productivos. En la literatura está expresada la tendencia actual a sostener la opinión de que las células vegetales cultivadas, derivadas de plantas que producen niveles detectables de metabolitos secundarios, contienen la información genética necesaria para su biosíntesis.

Además de a las perturbaciones genotípicas, el genotipo de las células vegetales cultivadas puede estar expuesto a alteraciones extranucleares heredables, es decir, a la variabilidad epigenética (Dougall 1980). El fenómeno epigenético puede resultar en la acumulación en los cultivos, de células independientes de auxina o citoquinina, y su presencia puede reducir drásticamente la proporción de células productoras de metabolitos secundarios en los cultivos.

Los reguladores del crecimiento vegetal son desencadenantes efectivos del metabolismo secundario in vivo (Böhm 1980). Similarmente, in vitro, la naturaleza y la cantidad de las auxinas presentes inicialmente en el medio, o administradas durante el curso del desarrollo del cultivo, tienen un marcado efecto sobre el metabolismo primario y secundario (Everett y colab. 1981, Gamborg y colab. 1971). Con la excepción de los cultivos habituados y oncogénicos, los cultivos vegetales requieren la adición al medio de reguladores del crecimiento, es decir, auxinas y citoquininas, para el crecimiento por división celular. El crecimiento por diferenciación o morfogénesis, por otro lado, puede ser inducido usualmente por la reducción de la concentración de auxina o por la adición de sustancias de crecimiento menos activas. Puesto que la producción de metabolitos secundarios en los cultivos de células vegetales es una función del crecimiento celular, los reguladores del crecimiento tienen un papel principal en la determinación del potencial de productividad de un cultivo dado.

Existen evidencias de una relación inversa entre crecimiento y acumulación de metabolitos secundarios. Así mismo, cambios en la proporción de crecimiento afectarían a la actividad de varias enzimas. ¿Qué relaciones existen, entonces, entre crecimiento y metabolismo, y ambos a su vez con la organización y diferenciación celular?. La bibliografía registra por lo menos dos tipos de mecanismos implicados en estas relaciones. De acuerdo con estos mecanismos, el crecimiento regula la producción de producto(s) secundario(s) sólo indirectamente. Un estado de agregación que condiciona el crecimiento lento parece necesario para el rendimiento de metabolitos secundarios (Yeoman y colab. 1982). El segundo mecanismo es de tipo cinético, según el cual, rutas "primarias" y "secundarias" compiten diferencialmente por pre-

cursores en células que crecen rápida y lentamente. Si las condiciones son favorables para el crecimiento rápido, operan los cambios metabólicos necesarios para este modo de crecimiento. Si el crecimiento rápido es bloqueado, algunas rutas "primarias" se hacen inoperantes, y las rutas "secundarias" entran en juego. Ciertos precursores se desvían de una serie de enzimas a otra, formándose un producto distinto (Davies 1972, Lindsey 1982). Probablemente, ambas series de enzimas se hallan presentes en la célula y no son sintetizados de novo (Banthorpe 1979). Aunque no se comprende bien la relación entre el crecimiento y la acumulación de producto, la baja proporción de crecimiento de los cultivos vegetales in vitro conduciría a altos rendimientos de metabolitos secundarios.

1.6. Organogénesis del cultivo de callo

En los callos se puede producir la inducción controlada de un primordio de órgano mediante manipulación de los nutrientes y fitohormonas en el medio de cultivo. Normalmente, el medio contiene componentes orgánicos e inorgánicos y fitohormonas exógenas. Cada tejido tiene sus propias necesidades y, a veces, los coadyuvantes del crecimiento menos definidos juegan un papel en la organogénesis. El proceso depende también de otros factores, como el origen de los explantes, su genotipo y edad, los niveles endógenos de hormonas y diversos factores físicos.

Wetmore y Sorokin (1955) demostraron que el injerto de yemas de tallo en los callos puede producir xilogénesis. En la organización de un nódulo vascular, interviene un azúcar, particularmente un disacárido con un radical α -glucosilo en el extremo no reductor y AIA (Roberts 1969). El tipo de diferenciación vascular dependía de la concentración de sacarosa en el medio. Los efectos xilogenéticos podían ser inducidos por adición de para-benciladenina (PBA) y almidón en cultivos de tejido de tubérculo de Heliantus tuberosus, mientras que ácido giberélico (GA_3) ó ácido abscísico (AAB) inhibían la diferenciación de traqueas (Minocha y Halperin 1974). La diferenciación de una célula aislada en una traquea, elemento de xilema o esclereida, en un medio definido, todavía no se ha conseguido, aunque se ha observado estímulo xilogénico en células que han experimentado división (Halperin 1973).

Las especies que se regeneran fácilmente in vivo pueden hacerlo también, aunque no necesariamente, in vitro. La formación de raíces se produce con mayor frecuencia que otros tipos de regeneración, independientemente del origen del callo, y a veces es demasiado casual para poder definir sus

condiciones. La formación de yemas de tallo seguida de la formación de raíces es característica de cultivos recientes de hipocotilo, tallos y segmentos de hoja, y raramente se produce en callos procedentes de raíces (a excepción de zanahoria), aunque se ha observado formación de yemas en cultivos de raíces aisladas de tomate (Norton y Boll 1954), Convolvulus (Torrey 1958) y Brassica (Bajaj y Nietsch 1957). Según Thomas y Street (1972), en cultivos de raíz de Atropa el callo inducido en su base regeneraba yemas de tallo. Es evidente, que los reguladores endógenos del crecimiento suministrados por el tejido vascular pueden jugar un papel importante en la inducción de formación de yemas de tallo.

En la mayoría de los callos, la formación de yemas de tallo puede disminuir con la edad y el subcultivo, pero la capacidad de formar raíces persiste durante años, como en la caña de azúcar (Barba y Nickell 1969). La iniciación de yemas de tallo puede preceder a la rizogénesis o viceversa, o como sucede en Pergularia (Prabhudesai y Narsyanaswamy 1974), los brotes de tallo inducidos pueden crecer como tallos sin raíces.

Con independencia de las hormonas y metabolitos presentes en el medio de cultivo, los callos pueden permanecer indiferenciados aunque presenten un activo crecimiento. Los callos con un crecimiento exhuberante son menos adecuados para la regeneración, como se observa en tejidos de callo derivados de tallo de Holarrhaena (Heble y colab. 1971) y Citrus (Chaturvedi y colab. 1974). Generalmente la neoformación de órganos sigue al cese de la proliferación activa.

Después de la demostración de Skoog y Miller (1957), de que la relación citoquinina (quinetina)/auxina (AIA) determinaba el tipo de organogénesis en tejido de médula de tabaco, se ha observado que los cambios cuantitativos son decisivos en numerosos sistemas vegetales. Concentraciones ele-

vadas de quinetina causaban la formación de yemas de tallo, mientras que niveles elevados de auxina favorecían la formación de raíces. Zeatina (=2iP) y (\pm)-dehidrozeatina -las dos citoquininas naturales aisladas de Zea mays y Lupinus luteus, respectivamente- eran igualmente efectivas en la inducción de yemas de tallo en tabaco (Yamada y colab. 1972). De acuerdo con Yamada y colab. (1972), el grupo en posición N⁶ de las citoquininas se une a un lugar receptor para aumentar la organogénesis, y en esta reacción las citoquininas levorotatorias inducen la formación de yemas de tallo. Ciertos compuestos fenólicos incrementaban la formación de yemas de tallo en callos de tabaco, debido, probablemente, a la inactivación de auxina y a un consecuente aumento del nivel fisiológicamente efectivo de citoquininas (Lee y Skoog 1965). El mecanismo molecular de acción de las fitohormonas aún no está claro.

El ácido N-1-naftil-tálmico, que es un inhibidor de la auxina, también induce la formación de yemas de tallo (Feng y Linck 1970). En Plumbago, la adición de adenina al medio crea unas condiciones que conducen a la diferenciación de yemas diploides (Nitsch y colab. 1967). En cultivos de tejidos de Daucus carota se ha observado (Newcomb y Wetherell 1970) un incremento del potencial embriogénico inducido por el ácido 2,4,6-triclorofenoxiacético, un antagonista de auxina. Kochar y colab. (1970) observaron que el agente quelante, ácido 1,3-diamino-2-hidroxiopropano-N,N,N',N'-tetracético, inducía la formación de yemas de tallo en cultivos haploides de tabaco. Los mismos autores (1971) indicaron que los hidrocarburos policíclicos, tales como dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)pireno, etc., pueden reemplazar a auxinas y citoquininas en la formación de yemas de tallo y raíces en callos haploides de tabaco.

Peters y colab. (1974) demostraron el papel de nicotina

exógena, como un factor inductor de morfogénesis en cultivo de tejidos de Nicotiana rustica. La concentración óptima de nicotina para la formación de raíces era de 50 mg/ml, aunque la adición de nicotina no era necesaria para inducir diferenciación en otras especies de tabaco. Su presencia en especies vegetales que producen fácilmente morfogénesis, indicaría un papel positivo de los alcaloides en la diferenciación de tejidos.

Puesto que la diferenciación se produce por la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, varios investigadores han intentado relacionar los dos fenómenos. Vaseur (1972) observó que la formación de yemas de tallo en Cichorium intybus, estaba asociada a alteraciones en los patrones de síntesis de ARN y nucleótidos. En tabaco, un incremento en la relación ARN/ADN e histonas/ADN estaba relacionado con la organogénesis, y la embriogénesis con la síntesis de ADN en zanahoria. Thorpe y Meier (1972) observaron que existía una correlación entre la formación de yemas de tallo y la acumulación de almidón y tasa de respiración en los tejidos formadores de yemas.

La organogénesis generalmente depende del tamaño del explante cultivado. De acuerdo con Okazawa y colab. (1967), cuanto más pequeños eran los explantes menor era la capacidad regenerativa, mientras que los mayores presentaban parénquima, tejido vascular y cambium, formando yemas espontáneamente, con independencia de la relación auxina/citoquinina. Sin embargo, pequeños grupos de tejido homogéneo obtenidos de las capas epidérmica y subepidérmica de tabaco, utilizados como sistemas experimentales, podían originar directamente órganos complejos como flores, yemas y raíces (Tran Thanh Van 1973).

La procedencia del explante cultivado es importante para determinar el potencial regenerativo. La edad fisiológica

del explante es otro factor que influye en la formación de órganos. Por ejemplo, explantes de hoja de Echeveria jóvenes formaban sólo raíces, mientras que hojas más viejas regeneraban yemas de tallo, y las hojas de una edad intermedia producían yemas de tallo y raíces (Raju y Mann 1970). La formación de raíces sólo se produce en peciolos jóvenes de Lunaria (Pierik 1967, 1972).

Las variaciones estacionales influían profundamente en la regeneración. Los explantes de Solanum tuberosum obtenidos en diciembre y abril son altamente tuberogénicos, mientras que los obtenidos en febrero-mayo o mayo-diciembre muestran una pobre respuesta (Fellenberg 1963).

El gradiente de oxígeno en un cultivo de tejidos puede desempeñar un papel efectivo en la promoción de organogénesis, esto fué confirmado por Kessel y Carr (1972) en cultivos de zanahoria. Si se reducía el oxígeno disponible se favorecía la formación de yemas de tallo, sin embargo la formación de raíces requería un incremento del gradiente de oxígeno.

Se ha demostrado que la cualidad e intensidad de la luz desempeñan, frecuentemente, un papel clave en el fenómeno de la organogénesis (Weis y Jaffe 1969). La región del azul del espectro promovía la formación de yemas de tallo y la luz roja favorecía la formación de raíces (Letouze y Beauchesne 1969). Por ello, la naturaleza de la diferenciación en un tejido puede ser controlada por exposición a luz de distintas longitudes de onda.

La temperatura, el fotoperíodo, intensidad de la luz, pH, concentración de azúcar y calidad del agar son otros factores que pueden tener un papel determinante en la organogénesis y la embriogénesis, pero se tienen pocos datos sobre ellos. Los lirios y los gladiolos son sensibles a la tempe-

ratura, y también lo son los cultivos de tejidos derivados de ellos. Las bajas temperaturas y el frío de los explantes anteriores al cultivo favorecen su regeneración. Existen evidencias que indican que el efecto de los factores ambientales, tales como la luz y la temperatura (Pierik 1967, Gautheret 1971) se efectúan por medio de cambios en los niveles endógenos de varios reguladores del crecimiento vegetal.

1.6.1. Potencial morfogénético en relación al subcultivo

Diversos tejidos en cultivo presentan un elevado potencial de morfogénesis y embriogénesis cuando se inician por primera vez, pero este disminuye a lo largo de sucesivos subcultivos con pérdida eventual de la respuesta morfogénética. Varios investigadores han observado este fenómeno en callos que han pasado por varios subcultivos (Torrey 1967, Murashige y Nakano 1967) y en cultivos de células libres en suspensión (Syono 1965, Reinert y Backs 1968, Reinert y colab. 1971, Thomas y Street 1970, 1972, Smith y Street 1974).

La pérdida de potencial morfogénético en un tejido puede deberse a cambios genéticos o fisiológicos inducidos por las condiciones de cultivos prolongados. En el caso de un cambio genético, las posibilidades de restauración son muy pocas, sin embargo esto puede conseguirse, por adición o sustitución de fitohormonas y nutrientes, si la alteración es fisiológica.

Los efectos genéticos en un tejido cultivado se reflejan en cambios del número de cromosomas, que conducen de la euploidía a la aneuploidía, o en aberraciones cromosómicas y mutaciones. Los tejidos cultivados pueden tener un número de cromosomas distinto al de la cepa parenteral (Zosimovich y colab. 1972, Wright y Northcote 1973, Ravkin y Popov 1973).

En algunos tejidos se ha observado una correlación entre el cambio en el nivel de ploidía y la pérdida de capacidad regenerativa (Torrey 1967, Murashige y Nakano 1967). De acuerdo con Smith y Street (1974), el subcultivo origina células de escasa o nula totipotencia debido a algunos cambios en la citología nuclear, y estas células están en desventaja selectiva respecto a las células normales. Eventualmente, en las últimas etapas del cultivo, estas células son reemplazadas totalmente por células no totipotentes. Una alteración en el cariotipo no siempre da lugar a incapacidad morfogénica, por ejemplo, se ha observado la regeneración de plantas aneuploides a partir de tejidos tumorales de tabaco de 20 años de edad (Sacristán y Melchers 1969). De acuerdo con Syono y Furuya (1972), las plántulas regeneradas a partir de subcultivos viejos son débiles y anormales y no llegan a desarrollarse en plantas maduras. Noriko (1972) observó que no podía inducirse organogénesis en los primeros estadios de cultivo de callo de tabaco, pero, en la última etapa del mismo subcultivo (fase estacionaria y posterior), el potencial de organogénesis podía aumentar. En estos cultivos, durante las etapas iniciales, las células presentaban núcleos alargados y eran, frecuentemente, multinucleadas; sin embargo, durante la fase estacionaria, el tamaño y forma de los núcleos llegaban a ser más o menos uniformes. Estas células eran capaces de producir embriogénesis.

Según una hipótesis alternativa, el subcultivo conduce, frecuentemente, a la pérdida de muchos factores endógenos presentes en las etapas críticas del crecimiento. Tales factores (morfógenos) están presentes en los cultivos de callo iniciales, pero puede ser que no se sintetizen, o lo hagan en cantidad insuficiente, en las últimas etapas. Por tanto, si estos factores se añaden a los tejidos subcultivados, sería posible recuperar el potencial morfogénico. Wochock y

Wetherell (1972) observaron que la adición de quinina permitía recuperar la respuesta regenerativa perdida en cultivos prolongados de zanahoria, mientras que en las primeras etapas no se observaba un efecto promotor de la citoquinina. Se ha indicado frecuentemente la pérdida gradual del requerimiento de auxinas exógenas (habituaación). Algunas cepas alteradas producen auxinas y citoquininas endógenamente. Basándose en sus estudios sobre la recuperación de embriogénesis en cultivos prolongados de zanahoria, por un cambio en la composición del medio de cultivo, Reinert y colab. (1971) apoyaron la hipótesis fisiológica.

Es probable que ambos procesos estén implicados en el descenso y pérdida de capacidad morfogenética durante cultivos prolongados. Las alteraciones también pueden producirse en la citología nuclear y originar células euploides en los callos. Algunas de estas células pueden ser eliminadas, otras pueden llegar a ser componentes estables de una población mixta, y otras pueden tener una ventaja selectiva sobre las células normales. Si los nutrientes suministrados a una población mixta, que contiene células totipotentes y no totipotentes, son capaces de actuar selectivamente sobre el crecimiento de las células totipotentes, podemos decir que se ha conseguido la recuperación. Por otra parte, si las células deterioradas predominan y se seleccionan para continuar el subcultivo, se obtendrá una población compuesta totalmente por células alteradas, produciéndose células incapaces de inducir morfogénesis incluso por un cambio en las condiciones nutritivas y otras.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Hemos realizado nuestros experimentos con Nicotiana tabacum var. Burley 21, debido a su alto contenido en nicotina. Las semillas nos las proporcionó el Dr. M.J. Kasperbauer (Associate Professor, Department of Agronomy. University of Kentucky and Agricultural Research Service, USDA, Lexington, KY 40506).

2.1. Obtención del cultivo de callo

Para conseguir los cultivos hemos seguido los pasos que se indican a continuación.

2.1.1. Condiciones para el cultivo de N. tabacum

La posibilidad de obtener tejido de callo depende en gran parte del estado nutritivo y fisiológico general de la planta donante, antes de la separación de los explantes de tejido. En nuestro trabajo, las plantas de N. tabacum crecieron en cultivo hidropónico, en una cámara acondicionada a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 60% de humedad y una iluminación de 24 W/m^2 durante 12 horas diarias, procedentes de plafones con tubos fluorescentes Philips TL de 40 W, situados a 80 cm de la superficie de los recipientes de cultivo.

Para el cultivo hidropónico se utilizó como soporte para las raíces una mezcla de perlita y arena silíceas puras, en la

proporción 2:1 (v/v). La arena se trató previamente con ácido clorhídrico, hasta eliminar los carbonatos y otras sales solubles, y seguidamente se lavó con agua destilada hasta que las aguas de lavado no dieron reacción de cloruros con nitrato de plata.

Las semillas, una vez lavadas con abundante agua destilada, para separar posibles sustancias inhibidoras de la cubierta, que pudieran impedir su germinación, se sembraron sobre la mezcla de perlita y arena, contenida en recipientes de arcilla protegidos con una capa de polietileno transparente. Estos recipientes poseían un dispositivo de desagüe en su parte inferior, lo que facilitó la renovación semanal de la solución nutritiva y el lavado del sistema soporte con agua destilada. La indicada operación es necesaria para eliminar los iones concentrados en el medio nutritivo como consecuencia de la absorción selectiva y la concentración de iones H^+ , que acidifican el medio.

De este modo se podía mantener la solución nutritiva a la concentración iónica y el pH adecuados. El pH se mantuvo, hasta conseguir las plantas deseadas, entre 6 y 6,5, es decir dentro de los límites fisiológicos apropiados para el cultivo de Nicotiana.

Hasta que las semillas germinaron, el sustrato inerte -mezcla de arena y perlita- se humedeció con agua destilada. En cuanto aparecieron las primeras hojas verdes de las plántulas, se procedió al total drenaje del agua contenida en los recipientes y se inició el riego con solución nutritiva.

La solución nutritiva utilizada fué la de Ben Zioni y colab. (1971), apropiada para las plantas de tabaco, cuya composición es la siguiente:

$Ca(NO_3)_2$	2,5 mM/l	$MnCl_2$	0,9 mM/l
KNO_3	2,5 mM/l	$ZnCl_2$	0,06 mM/l

MgSO ₄	1,0 mM/1	CuCl ₂	0,024 mM/1
KH ₂ PO ₄	0,5 mM/1	MoO ₃	0,079 mM/1
H ₃ BO ₃	1,5 mM/1	EDTA-Fe	5 ml

El hierro se dió en forma de complejo EDTA-Fe, siendo la concentración de FeSO₄.7H₂O 0,0895 mM/1.

2.1.2. Medio de cultivo

Para la inducción de tejido de callo a partir de los explantes y posterior subcultivo del mismo, se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) (MS), cuya composición figura en la Tabla 1. Para la preparación de este medio se utilizaron sales y otros compuestos de las firmas Merck y Fluka. El Bacto-agar es el más aconsejable, ya que algunas sustancias presentes en otros tipos de agar pueden ser tóxicas para los tejidos.

Una vez preparada la solución utilizada como medio nutritivo, antes de la adición de agar, se llevó a un volumen de 900 ml con agua destilada, en constante agitación, y se ajustó a pH 5,8 ± 0,2 con NaOH 1 N. Después se adicionó el agar, se ajustó el volumen a un litro, y la solución se esterilizó en un autoclave a 120°C durante 20 minutos. El medio debe ser utilizado inmediatamente después de solidificarse.

2.1.3. Separación de los explantes e inducción del tejido de callo

Los explantes utilizados para la inducción de tejido de callo se obtuvieron de la parte basal del nervio medio de hojas procedentes de plantas de 3 meses de edad.

De cada planta -7 en nuestro experimento- se separaron las hojas situadas a 20 ± 2 cm del ápice y, con un escalpelo,

se cortaron fragmentos de 5 cm a partir de la base de las mismas. Estos fragmentos de 5 cm, que comprendían la parte basal del nervio medio, se lavaron con agua destilada, se separaron cuidadosamente las vainas y se procedió a su esterilización; para ello se introdujeron en etanol del 70%, durante 30 segundos, y después en hipoclorito sódico del 19%, durante 10-15 minutos. Debe ponerse especial cuidado en el procedimiento de esterilización para que los tejidos estén expuestos al hipoclorito el tiempo adecuado. Una exposición demasiado prolongada puede causar la muerte de los tejidos, mientras que un tratamiento demasiado corto puede suponer la persistencia de agentes contaminantes en dichos tejidos.

Tras la esterilización, los explantes se lavaron varias veces con agua destilada estéril y se cortaron sobre cápsulas de Petri secas y estériles, en segmentos de 3 a 4 mm, después de prescindir de ambos extremos, que habían estado en contacto con el medio de esterilización. Los segmentos se dividieron por la mitad, en sección longitudinal, y se situaron en número de 6, por la superficie cortada, sobre el medio de cultivo contenido en cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro (Fig. 3). Al medio MS se le adicionó ácido α -naftalenacético (ANA) 11,5 μ M y quinetina 1 μ M, que son las concentraciones adecuadas para la inducción de tejido de callo.

Todas las operaciones efectuadas después de la primera inmersión en etanol se realizaron en una cabina de flujo laminar, para garantizar las condiciones estériles.

Los instrumentos se esterilizaron mediante inmersión en etanol de 95% y flameado. Todo el material fungible necesario se esterilizó previamente en autoclave a 120°C durante 35 minutos.

Para la inducción de tejido de callo, las cápsulas, convenientemente cerradas en la cabina de flujo laminar, se situaron en una estufa de cultivo a 25°C, en la oscuridad. En

nuestro experimento el número de cápsulas preparadas fué de 150. En las técnicas de cultivo de tejidos, es necesario preparar siempre un volumen de material mayor del necesario, debido al riesgo de contaminación del material y a los fallos en la formación de callo.

2.1.4. Subcultivo del callo inicial

En las condiciones de cultivo indicadas, transcurridas de tres a cinco semanas, generalmente se pueden separar de los explantes piezas de callo de 40 a 50 mg -peso fresco-, apropiadas para el subcultivo. El nuevo tejido formado, el callo inicial, creció como una masa densa de color blanquecino, que parecía enteramente una línea de callo después de una serie de subcultivos (Fig. 4). En esta fase se desecharon varios cultivos, particularmente a causa de contaminación.

En nuestro trabajo se procedió, después de cinco semanas de cultivo, al subcultivo del callo inicial; para ello, piezas de callo inicial de 40 ± 4 mg, se transfirieron sobre 30 ml de los dos medios de cultivo, contenidos en cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro:

- Medio alto en auxina. Medio MS, con una concentración 11,5 μ M de ácido α -naftalenacético (ANA) y 1 μ M de quinentina, y solidificado con Bacto-agar en una proporción del 0,8%. Medio análogo al utilizado para la inducción de callo.

- Medio bajo en auxina. Medio MS, con concentraciones de ANA y quinentina, 1 μ M, y solidificado con Bacto-agar en una proporción del 0,8%. La concentración 1 μ M de auxina es, según Ohta y colab. (1978) y nuestros ensayos previos, la óptima para la biosíntesis de nicotina por el tejido de callo.

Tabla 1. Medio de Murashige y Skoog

a) Componentes inorgánicos		b) Componentes orgánicos	
Macronutrientes:			
NH_4NO_3	1650	Sacarosa	30 g/l
KNO_3	1900	Agar	10 "
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	Mio-inositol	100 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	Glicina	2 "
KH_2PO_4	170	Acido nicotínico	0,5 "
Micronutrientes:			
Na_2EDTA	37,30	Piridoxina HCl	0,5 "
$\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	27,80	Tiamina HCl	0,5 "
H_3BO_3	6,20	Auxina	(1)
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,90	Quinetina	(1)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,63		
IK	0,83		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025		
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,025		

(1) Las concentraciones de auxina y citoquinina varían, según se trate del medio "alto" o "bajo" en auxina

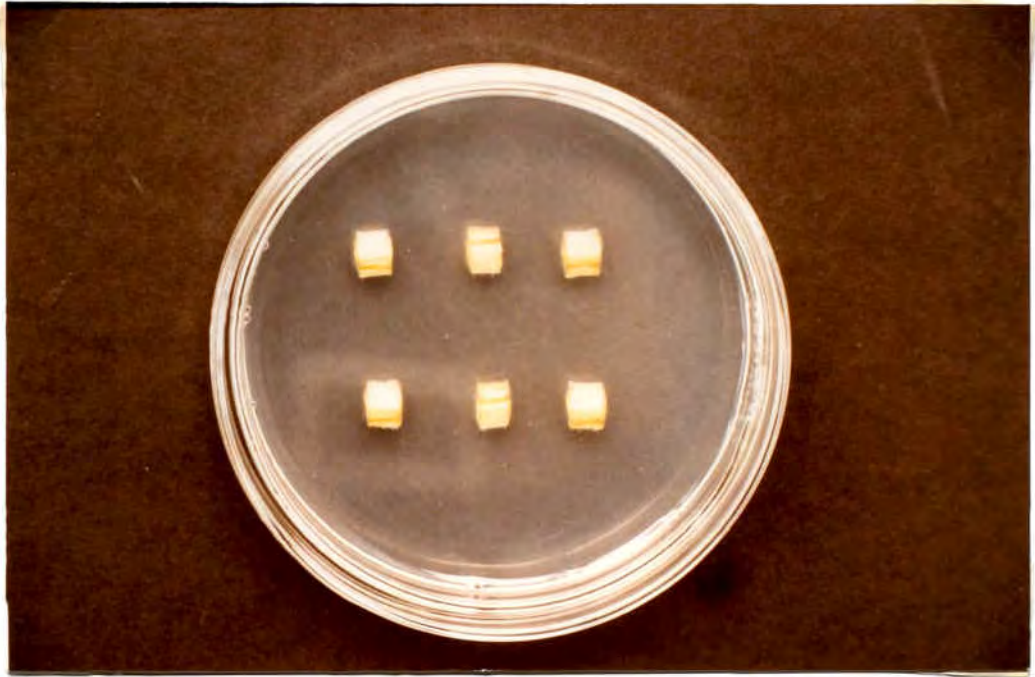


Figura 3. Aspecto de los explantes en el momento de iniciar su cultivo.



Figura 4. Aspecto de los explantes antes de proceder al subcultivo del callo formado.

2.2. Toma de muestra de los cultivos de callo

Experimentos anteriores, realizados en nuestro Departamento (Piñol y colab. 1984), mostraron que la mayor acumulación de nicotina, en el callo crecido en el medio bajo en auxina -óptimo para la síntesis del alcaloide-, se producía a las 6 semanas de iniciado el subcultivo, por lo que la muestra se tomó una vez transcurrido este período de tiempo.

Se separaron los callos crecidos en ambos medios: "alto en auxina" y "bajo en auxina" y, a su vez, los que presentaban organogénesis y los que no la presentaban, obteniéndose así muestras de los 4 tipos de callo:

a) Callo crecido en el medio alto en auxina con organogénesis.

b) Callo crecido en el medio alto en auxina sin organogénesis.

c) Callo crecido en el medio bajo en auxina con organogénesis.

d) Callo crecido en el medio bajo en auxina sin organogénesis.

Esta operación se realizó con las piezas de callo procedentes de cada una de las 7 plantas de Nicotiana utilizadas. Al mismo tiempo se contó el número de piezas correspondientes a cada tipo de callo, de acuerdo con la clasificación anterior, indicando, en el caso de presentarse organogénesis, si se trataba de raíces, yemas o ambos órganos. De esta manera pudimos calcular los índices de: organogénesis (IO), formación de raíces (IFR) y formación de yemas (IFY), según las formulas dadas por Kikuta y Okazawa (1984):

$$IO = \frac{(N^{\circ} \text{ raíces+yemas formadas})(N^{\circ} \text{ callos con raíces o yemas})}{(N^{\circ} \text{ callos cultivados})^2}$$

$$\text{IFR} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ raíces formadas})(\text{N}^{\circ} \text{ callos con raíces})}{(\text{N}^{\circ} \text{ callos cultivados})^2}$$

$$\text{IFY} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ yemas formadas})(\text{N}^{\circ} \text{ callos con yemas})}{(\text{N}^{\circ} \text{ callos cultivados})^2}$$

De los cuatro tipos de callo mencionados anteriormante se determinaron los pesos fresco y seco; y además los contenidos de agua, K^+ y aminoácidos en estado libre, así como los niveles de putrescina (libre y ligada) y nicotina, y las actividades de los enzimas ARG, ADC y ODC. Finalmente, la fracción proteica soluble se separó por electroforésis sobre gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

2.3. Determinación de peso seco y contenido en agua

Los pesos secos se obtuvieron, respectivamente, de las piezas de callo con y sin organogénesis, despuesde eliminar de estas últimas las yemas y/o raíces que presentaban. La desecación se llevó a cabo en estufa a 60°C durante 2 días.

El contenido en agua (pérdida de peso después de 48 horas a 60°C) se midió en todas las piezas de callo utilizadas para la determinación de los pesos fresco y seco del callo crecido en ambos medios de cultivo, con y sin organogénesis, y se expresó en gramos de agua por gramo de peso seco.

Para las determinaciones experimentales descritas en el texto, se analizaron de 6 a 15 muestras de callo, con y sin organogénesis, de cada uno de los dos medios.

2.4. Determinación del contenido en K⁺

El contenido en K⁺ de los tejidos de callo se determinó por fotometría de llama de las muestras sometidas previamente a digestión ácida. Para operar con esta técnica, es necesario disponer de soluciones patrón de ión K⁺ de concentración conocida, a fin de obtener las correspondientes curvas de calibrado. Tanto las muestras preparadas como las soluciones patrón deben estar suplementadas con un catión supresor de la ionización que no interfiera en el análisis. La adición de esta catión es necesaria para evitar las desviaciones, debidas a la ionización del potasio en las curvas de calibrado. En nuestro caso el catión utilizado para este fin fué el Sr²⁺.

Procedimiento. Utilizamos polvo homogéneo de callos secos, obtenido por trituración de estos callos en mortero de vidrio. Pesos conocidos de este polvo (0,5 g), dispuestos en cartuchos de papel Whatman de cenizas conocidas, se sometieron a digestión por calentamiento con H₂SO₄ del 95% y HNO₃ en un digestor Tecator, modelo Digester 1009, a la temperatura de 270°C. Primero, se sometió la muestra a la acción del H₂SO₄ (3 ml) durante 1 hora, y a continuación se añadieron, sucesivamente, 4 fracciones de 2 ml de HNO₃ fumante, dejando actuar cada una de ellas durante 30 minutos. Al final del proceso obtuvimos una solución totalmente transparente, lo cual indica que la digestión ha sido completa. Esta solución, una vez fría, se enrasó a 25 ml con agua destilada, de los cuales se tomaron 10 ml y se llevaron a un volumen final de 50 ml con agua destilada, previa adición de 10 ml de una solución de Cl₂Sr (1500 ppm de Sr²⁺), así teníamos muestras con una concentración de K⁺ adecuada para la lectura al espectrofotómetro, de acuerdo con la curva de calibrado. Los análisis se realizaron en un fotómetro de llama

Zeiss, modelo PF5.

Los patrones utilizados para la obtención de las curvas de calibrado se prepararon a partir de una solución de ClK (Merck) de 100 ppm de K^+ , de la cual se tomaron fracciones de 1, 5, 10, 15 y 20 ml, respectivamente, a las que se añadieron 20 ml de la solución de Cl_2Sr , y se llevaron a un volumen final de 100 ml con agua destilada. De este modo, se obtuvieron patrones con unas concentraciones de K^+ de 1, 5, 10, 15 y 20 ppm respectivamente.

2.5. Extracción y análisis de aminoácidos libres

Los aminoácidos libres se extrajeron de las piezas de caldo inmediatamente después de su recolección. La primera parte del proceso de extracción fue común para estos aminoácidos y la fracción proteica soluble, de la cual trataremos en un apartado posterior (2.11).

Cada muestra de tejido fresco se homogeneizó, en mortero de vidrio, en la proporción de 1 g de tejido fresco/1,25 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M (pH = 8,0), suplementado con sacarosa 0,5 M y ácido ascórbico al 0,1%. Tras 24 horas de maceración, en cámara climatizada entre 0 y 4°C, el homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gasa estéril, recogiendo el extraco en una probeta para comprobar su volumen.

Estos extractos se sometieron a una centrifugación diferencial (Fig. 5). La primera centrifugación se realizó a 1.000 g durante 20 minutos, así obtuvimos el sobrenadante A y un sedimento compuesto por células intactas y restos de células. El sobrenadante A se centrifugó de nuevo a 5.000 g durante 20 minutos, y los sobrenadantes subsiguientes se centrifugaron sucesivamente a 15.000, 30.000 y 46.000 g, durante 15, 30 y 150 minutos respectivamente, obteniéndose al final del proceso el sobrenadante E. Todas las centrifugaciones se realizaron en una ultracentrifuga "Heraeus-Christ" refrigerada, modelo Omikron, con un rotor de titanio de la marca "Christ".

Del último sobrenadante se separaron 2 partes alícuotas, una de las cuales se destinó a la extracción y análisis de aminoácidos libres, y la otra a la purificación y separación la fracción proteica soluble por electroforesis SDS (apartado 2.11).

El proceso de extracción de los aminoácidos libres se pro-

siguió añadiendo al sobrenadante E TCA-acetona (5 g de TCA en una mezcla de 47,5 ml de acetona + 47,5 ml de agua) en la proporción 1:10 (v/v), con el fin de precipitar la proteína soluble, y se dejó 24 horas en reposo, en cámara climatizada a 0-4°C, pasado este tiempo se centrifugó a 3270 g durante 20 minutos. Al sobrenadante se le añadió acetona pura en la proporción 1:1 (v/v), para despigmentar los extractos, y seguidamente se efectuó una segunda centrifugación a 3270 g durante 20 minutos. El sobrenadante se evaporó a sequedad, en rotavapor, y el residuo se disolvió en un volumen conocido (5 ml) de HCl 0,025 N. Esta solución se pasó por una columna (1 x 20 cm) de Dowex 50 w, en forma H⁺ y malla 100-200, preparada para cada muestra. Así los aminoácidos pueden ser adsorbidos, según su diversidad estructural y propiedades, por la resina de intercambio iónico y posteriormente eluidos. La columna se lavó primero con agua (20 ml de agua/0,4-1 ml de solución), desechándose el eluyente resultante, e inmediatamente después se eluyeron los aminoácidos con NH₄OH 2 N. Todas estas operaciones se realizaron en cámara climatizada entre 0 y 4°C para evitar la oxidación de los aminoácidos extraídos.

El eluato obtenido, según se ha indicado, se concentró a sequedad en rotavapor, a presión reducida, y el residuo se disolvió en 3 ml de HCl 0,025 N. Esta solución se filtró a través de Millipore de 0,5 μ de poro, y se guardó en congelador a -20°C hasta el momento de ser utilizada como muestra para el análisis de aminoácidos.

Para la regeneración de las columnas utilizadas en la purificación de los aminoácidos, se procedió como sigue: primero se pasó por la columna un volumen de NaOH 2 N equivalente a 5 veces el lecho de la resina, a continuación se lavó esta última con agua destilada, hasta que el eluyente dió pH neutro; seguidamente se pasó por la columna un volumen de HCl

2 N equivalente también a 5 veces el lecho de la resina, y esta última se lavó con agua destilada hasta que el eluyente dió pH neutro, en este caso, para separar los iones Cl^- . La operación se realizó antes de pasar cada muestra por la columna.

Análisis de los aminoácidos. Se fundamenta en la separación de los distintos aminoácidos mediante el paso (adsorción y elución) de la muestra por una columna de intercambio iónico y su posterior cuantificación. Se ha utilizado un analizador de aminoácidos "Chromaspeck Rank Hilger".

Las muestras problema, preparadas como se ha indicado anteriormente, se introducen en cubetas de 0,2 ml, y son tomadas automáticamente por inyección (0,1183 ml). La muestra pasa por una columna de intercambio iónico (35 x 3 mm) llena de resina Rank Hilger MK2 de poliestireno sulfonado, donde quedan retenidos los diferentes aminoácidos, cada uno de los cuales se eluye mediante un gradiente de pH (1,9-11,5) que se crea con el paso de un sistema de soluciones tampón, cuya composición es la siguiente:

- Tampón ácido 0,15 M Li (pH = 1,9)

Acido cítrico	21,0 g
Cloruro de litio anhidro	12,6 g
Tiodiglicol (25% p/p en H_2O)	2,5 ml
Brij 35 al 10%	3,5 ml
Agua c.s.p.	1000,0 ml

- Tampón básico 0,3 M Li (pH = 11,5)

Acido cítrico	10,5 g
Hidróxido de litio monohidrato	12,6 g
Acido bórico	8,8 g
EDTA (4% p/v en H_2O)	10,0 ml
Brij 35 al 10%	3,5 ml
Agua c.s.p.	1000,0 ml

A la salida de la columna, el eluato se mezcla, de manera fraccionada, por la entrada de gas nitrógeno, con el reactivo de ninhidrina y el agente reductor, cuyas composiciones son las siguientes:

- Reactivo de ninhidrina

Ninhidrina	10,0 g
Acetato sódico. $3H_2O$	216,0 g
2-Metoxietanol	400,0 ml
Acido acético glacial	100,0 ml
Brij 35 al 10%	10,0 ml
Agua c.s.p.	1000,0 ml

- Solución al 1% de agente reductor

Hidróxido sódico 4 M	5,0 ml
CNK 1%	10,0 ml
Brij 35 al 10%	3,5 ml
Agua c.s.p.	1000,0 ml

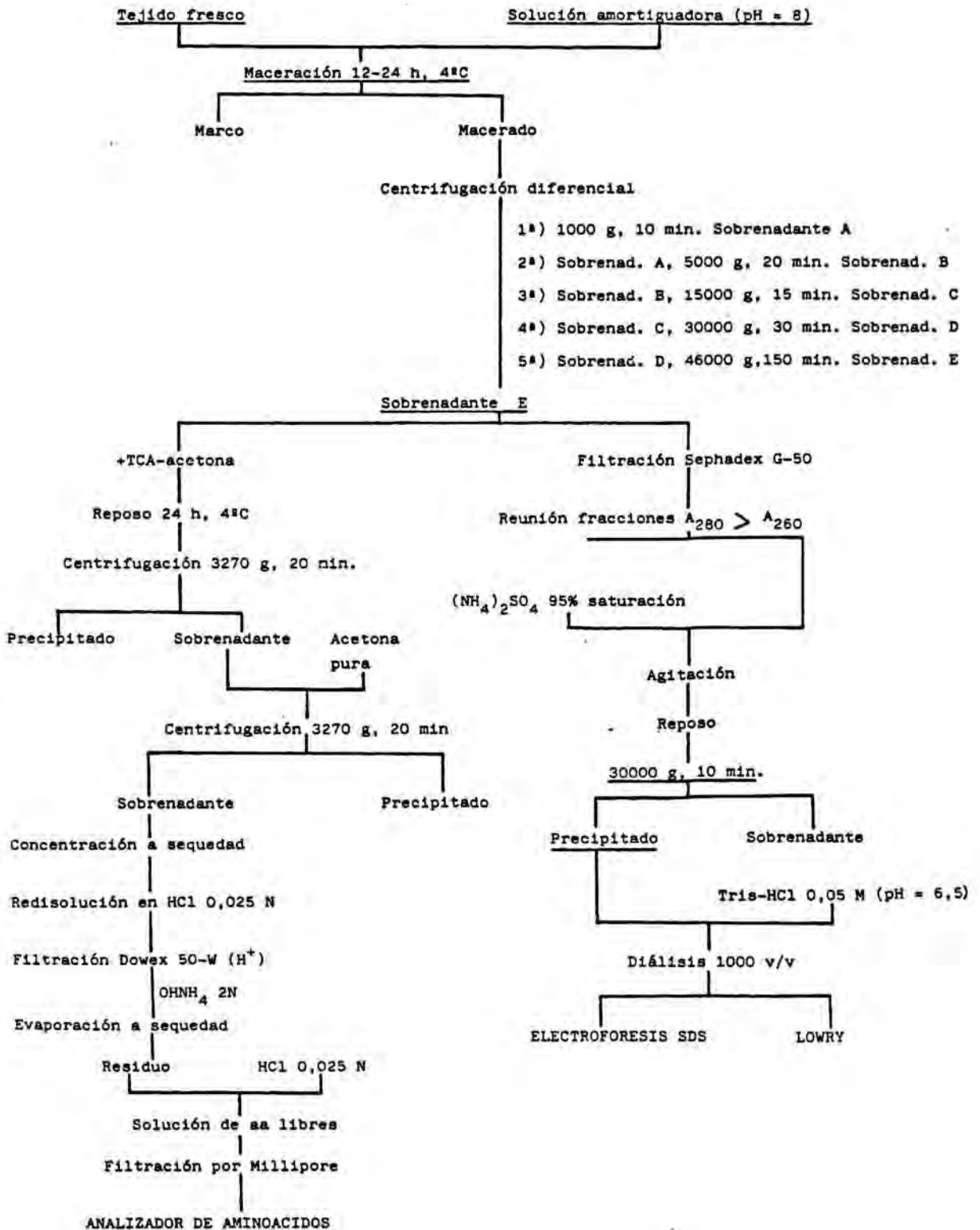
La mezcla obtenida pasa al baño de reacción (90°C), donde se forma el compuesto coloreado cuya intensidad se detecta espectrofotométricamente mediante 2 células fotoeléctricas con máximos de absorción a 440 y 570 nm. Las lecturas se registran en un registrador gráfico "Vitatron", y las áreas de los picos correspondientes a cada aminoácido se calculan mediante un integrador "Variant CDS 111".

Para determinar las cantidades de cada aminoácido, se tomó como referencia una solución patrón que contenía cantidades exactamente medidas de cada uno de los distintos aminoácidos analizados, y cuya composición era la siguiente:

- Patrón Calbiochem AA-5 (Behring) 1,0 ml
- Glutamina (Merck) 2,5 M/ml 1,0 ml
- GABA (Merck) 2,5 M/ ml 1,0 ml

- Triptófano (Merck) 2,5 M/ml 1,0 ml
- Ornitina (Merck) 2,5 M/ml 1,0 ml
- HCl 0,025 M c.s.p. 25,0 ml

Figura 5. Proceso de extracción de aminoácidos y proteínas.



2.6. Extracción y análisis de putrescina

Para la extracción de la diamina putrescina nos basamos en el método propuesto por Flores y Galston (1982) con pequeñas modificaciones.

Las muestras de tejido fresco se extrajeron por homogeneización, en mortero de vidrio, con HClO_4 frío al 5%, en la relación 0,6 g de tejido fresco/ml de HClO_4 . Los homogeneizados se dejaron en maceración durante 1 hora a la temperatura de 2-4°C, con el fin de asegurar la extracción, y posteriormente se centrifugaron a 46000 g durante 50 minutos, en una centrifuga refrigerada "Heraeus-Christ", modelo Cryofuge 6-4.

En el sobrenadante obtenido se determinaron las fracciones de putrescina (libre y ligada) solubles en HClO_4 , y en el sedimento se determinó la fracción de putrescina ligada insoluble en HClO_4 . Para ello, una parte del sobrenadante, que contenía la putrescina libre soluble en HClO_4 , se guardó hasta el momento del análisis en viales de plástico a la temperatura de -20°C, se ha comprobado que en estas condiciones los extractos perclóricos son estables para el análisis de poliaminas por HPLC ó cromatografía en capa fina, durante más de 6 meses.

El sedimento se llevó al volumen original con NaOH 1 M, y seguidamente partes alícuotas (2 ml) de la suspensión resultante y el resto del sobrenadante se hidrolizaron con HCl 12 M en la relación 1:1 (v/v) a la temperatura de 100°C durante 20 horas. Los hidrolizados se evaporaron a sequedad, bajo presión reducida, y los residuos se llevaron al volumen original (2 ml) con HClO_4 al 5%. Las muestras así preparadas, que contenían la putrescina ligada insoluble en HClO_4 y la putrescina ligada soluble en HClO_4 , respectivamente, se guardaron, igual que las anteriores, en viales de plástico a

-20°C para su posterior análisis.

Análisis de putrescina. Se realizó por cromatografía líquida de alta resolución. Para ello, las muestras preparadas como se ha indicado anteriormente, así como el patrón de putrescina (Sigma), se dansilaron según el método descrito por Dai y colab. (1982) con algunas modificaciones.

Partes alícuotas de los extractos perclóricos (0,2 ml) se mezclaron con 0,5 ml de cloruro de dansilo (Sigma: 5 mg/ml de acetona) y se adicionaron 0,2 ml de una solución saturada de CO_3HNa ; esta mezcla se incubó, a 30°C en la oscuridad, durante una noche. Transcurrido este tiempo, la dansilputrescina se extrajo con 0,5 ml de benceno mediante agitación en Vibro-mixer. 0,3 ml del extracto de la capa orgánica se llevaron a sequedad, en rotavapor (presión reducida, $T^{\circ} = 25-30^{\circ}\text{C}$), y el residuo se disolvió en 0,5 ml de metanol (Merck, para HPLC). Esta solución se filtró a través de un microfiltro Millipore Millex-HV (0,45 μ de poro), y los filtrados se inyectaron directamente en el cromatógrafo, siendo el volumen de muestra inyectado de 20 μl .

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Waters programable (Bomba mod. 6000A, Inyector mod. U6K y Detector UV mod. 481). Las muestras se eluyeron a través de una columna de 8 mm de diámetro interno (Altex-octadecilsilano) rellena con Radial-Pack C_{18} (10 μ de tamaño de partícula) y se detectaron a 254 nm. Como fase móvil se utilizó una mezcla de tampón fosfato disódico y metanol (pH = 7) en la proporción 1:9 (v/v), siendo la velocidad de flujo de 2 ml/min. Los resultados se cuantificaron en un integrador Hewlett-Packard 3385A.

El pico correspondiente a putrescina se identificó por comparación con el de putrescina patrón, cuyo tiempo de retención fué de 5,62 minutos. Para comprobar si el pico inte-

grado correspondía al de la amina patrón, se realizó un análisis añadiendo a las muestras solución patrón, y se observó que el pico identificado como putrescina era el único que aumentaba su área, mientras que el resto disminuían por efecto de la dilución. La cuantificación de las muestras se realizó por el método del estándar externo.

2.7. Extracción y análisis de nicotina

El procedimiento de extracción se basó en el seguido por Burns y Collin (1977). Cada muestra de tejido seco se pulverizó y se colocó en cartuchos de celulosa Whatman de 25 x 80 mm para su extracción durante 6 horas, con metanol (Merck), en la relación 2 g de peso seco/100 ml de metanol, en un extractor Soxhlet situado en un baño de parafina a 100°C. Todas las extracciones se realizaron en atmósfera de nitrógeno, para evitar en lo posible la oxidación del alcaloide. Transcurrido el tiempo de extracción, los extractos metanólicos obtenidos se llevaron todos a un volumen final de 50 ml, en las muestras así preparadas se determinó la nicotina por CGL.

Análisis de nicotina. Partimos de 25 ml de los extractos anteriores, a los que se añadió 1 ml de una solución al 0,05 % de quinaldina (2-metilquinolina) en metanol como estándar interno, se utilizó esta sustancia por ser 1 su factor de respuesta frente a nicotina.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases "Sigma SA. Well" con detector de ionización de llama, utilizando una columna de 2 m x 3 mm de diámetro interno rellena con Carbowax 20M al 8% y KOH al 1% sobre Diatomea de 80-100 μ de malla, con nitrógeno libre de oxígeno como gas portador.

La cantidad de muestra inyectada fué de 1 μ l, y la duración de los análisis de 20 minutos. La temperatura del bloque inyector era de 220°C, y el horno se mantuvo isotérmicamente a 180°C.

El pico de nicotina se identificó por comparación con el de nicotina patrón Merck, rectificada por redestilación en vacío, cuyo tiempo de retención fué, aproximadamente, de 3,56 minutos. La pureza de la nicotina patrón se comprobó mediante un espectro IR y un espectro de Masas.

2.8. Extracción y ensayo de ADC y ODC

Para la extracción de estas enzimas utilizamos callo fresco, inmediatamente después de su recolección.

Los callos se homogeneizaron, en mortero de vidrio, en la relación 1 g de tejido fresco/ 1 ml de medio de extracción, a la temperatura de 4°C. El medio de extracción contenía: tampón fosfato 10 mM (pH = 7,2), ditioneitol (DTT) 0,1 mM, piridoxal-5'-fosfato 1 mM y EDTA-Na 20 mM. Los homogeneizados se centrifugaron a 27000 g durante 20 minutos, y el sobrenadante (extracto enzimático) se utilizó inmediatamente para determinar las actividades ODC y ADC, de acuerdo con el método de Altman y colab. (1982) con pequeñas modificaciones.

La reacción enzimática se inició por adición de 150 µl de extracto enzimático a un tubo, especialmente diseñado por nosotros (con un dispositivo para situar un disco de papel Whatman nº 1 de 7 mm de diámetro), que contenía 100 µl de medio de extracción y 20 µl de hidrocloreuro de L-(U-C¹⁴) arginina (Amershan, 50 µCi/ml, 348 mCi/mmol) ó 25 µl de hidrocloreuro de L-(U-C¹⁴) ornitina (New England Nuclear, 20 µCi/ml, 266 mCi/mmol) para el ensayo de ADC u ODC, respectivamente. Después de impregnar con 50 µl de KOH 2 M el disco de papel de filtro, para fijar el C¹⁴O₂ liberado, se taparon los tubos y se introdujeron en un baño de agua a 45°C, en constante agitación. Transcurrida 1 hora, se paró la reacción por adición de 0,2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Después de 30 minutos de agitación adicional, en las condiciones anteriores, los discos de papel de filtro se secaron y se situaron en viales de centelleo con 8 ml de Cocktail-11 Normascint (Scharlau), una solución centelleadora adecuada para determinaciones no acuosas, que contiene PPO, POPOP y tolueno.

La radioactividad liberada se determinó por contaje du-

rante 10 minutos en un contador de centelleo LKB Wallace, mod. 1217 Rack Beta. La eficacia del contaje fué del 80%, y los valores para el blanco se obtuvieron utilizando extracto enzimático hervido.

Las actividades enzimáticas se han expresado en μmol de C^{14}O_2 liberado/h/g de proteína.

La proteína se determinó por el método de Lowry y colab. (1951) (apartado 2.10).

2.9. Extracción y ensayo de ARG

Igual que en el caso de ADC y ODC, para la extracción del enzima arginasa utilizamos callo fresco, inmediatamente después de su recolección.

Los callos se homogeneizaron, en cámara climatizada a 0-4°C, con tampón de extracción (Tris-HCl 0,1 M pH=7, que contenía 0,5% de polivinilpirrolidona) en la proporción de 1 g de tejido fresco/0,5 ml de tampón de extracción. Los homogeneizados se centrifugaron a 15000 g durante 15 minutos, en una centrifuga refrigerada "Heraeus-Christ", y el sobrenadante se utilizó como extracto enzimático.

Ensayo de la actividad ARG. Seguimos el método descrito por Schimke (1970). Este método se basa en determinar la proporción de urea formada a partir de arginina, y la posterior cuantificación de la urea por colorimetría.



Los extractos enzimáticos (0,9 ml) se activaron a 55°C en presencia de Cl_2Mn 0,01 M (0,1 ml de una solución 0,1 M de Cl_2Mn) durante 5 minutos. A continuación, cantidades alícuotas (0,1 ml) de estos extractos enzimáticos activados se incubaron durante 10 minutos a 37°C con 1 ml de mezcla de reacción (0,9 ml de L-arginina 0,250 M, pH=9,7 + 0,1 ml de Cl_2Mn 0,01 M); esta mezcla se tiene que preparar justo antes de utilizarla. Transcurridos 10 minutos, se paró la reacción por adición de 2,5 ml de ácido perclórico 0,5 M. La solución obtenida tras estas operaciones se utilizó para determinar la cantidad de urea. Para ello, a tubos que contenían 1 ml de las soluciones anteriores, se les adicionaron 2,9 ml de mezcla ácida (90 ml SO_4H_2 + 270 ml PO_4H_3 , se llevan a un vo-

lumen final de 1000 ml con agua destilada) y 0,1 ml de solución etanólica de 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxima al 6%. Los tubos, adecuadamente tapados, se introdujeron en un baño de agua a 100°C durante 1 hora. Las soluciones coloreadas obtenidas se dejaron enfriar en la oscuridad, y a continuación se procedió a la lectura espectrofotométrica de las densidades ópticas, en una longitud de onda de 540 nm. Los valores obtenidos se trasladaron a una curva patrón, previamente obtenida, para leer en ella el equivalente a la concentración correspondiente de urea. Como blanco se utilizaron extractos sin L-arginina.

Para la obtención de la curva patrón utilizamos soluciones de urea de concentraciones comprendidas entre 50 y 400 μ M, obtenidas a partir de un patrón combinado de glucosa-urea Cromatest, que contenía 50 mg de urea/100 ml. La ecuación de esta curva fué la siguiente: $y = 0,0012 x - 0,0610$.

La actividad enzimática se ha expresado como: mmol de urea formados/h/mg de proteína. La proteína se determinó por el método de Lowry y colab (1951) (apartado 2.10).

2.10. Determinación de proteína

La proteína se precipitó, en los diferentes extractos, con TCA-acetona. Tras centrifugar a 46000 g durante 20 minutos, el sedimento se redisolvió con NaOH 0,1 M, y en las soluciones obtenidas se determinó la proteína por el método de Lowry y colab. (1951). Para ello, a tubos de ensayo que contenían 0,2 ml de las soluciones anteriores, se les añadió 1 ml de una solución que contenía CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0,1 M y $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5% en tartrato sódico al 1%, en la proporción 50:1 (v/v). Después de 10 minutos se adicionó 0,1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, diluido a la mitad con agua destilada. Transcurridos 30 minutos, se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro "Variant Techtron 653" a una longitud de onda de 750 nm.

La concentración proteica de las muestras analizadas se dedujo de la curva patrón, obtenida a partir de soluciones de ovoalbúmina Merck de concentraciones comprendidas entre 100 y 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siendo la ecuación de dicha curva:

$$y = 0,0009 x - 0,0548$$

2.11. Extracción de proteína soluble y electroforésis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

La extracción de la fracción proteica soluble se fundamentó en el método propuesto por Van Loon y Van Kammen (1968).

Como ya se indicó en el apartado 2.5, la primera parte del proceso de extracción, hasta la obtención del sobrenadante E (Fig. 5, pag. 78), es común para la fracción proteica soluble y los aminoácidos libres.

En el caso de las proteínas, una vez obtenido dicho sobrenadante, una parte alícuota del mismo se pasó a través de una columna de Sephadex G50 (Pharmacia, 40 x 3 cm) equilibrada con tampón Tris-HCl 0,05 M (pH = 7,5), para separar las proteínas de otros compuestos de bajo peso molecular, la proteína se eluyó con el mismo tampón a una velocidad constante de flujo de 14 ml/h. Los eluatos se recogieron en un colector de fracciones LKB, modelo Redi Rac 2112, y se determinaron sus absorciones ópticas en longitudes de onda de 260 y 280 nm.

Las fracciones con contenido proteico, es decir aquellas cuya absorción a 280 nm predominaba sobre la absorción a 260 nm, se reunieron y se llevaron a 95% de saturación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sólido (0,712 g/ml), en constante agitación, para precipitar la proteína. Después de 1 hora de reposo, la mezcla se centrifugó a 30000 g durante 10 minutos. El sedimento, que contenía la fracción proteica soluble, se disolvió en tampón Tris-HCl 0,05 M (pH = 6,5), y se dializó durante 48 horas, en sacos de diálisis de la firma "Dialyzer Tubing 3787-D, Sigma" frente a 1000 volúmenes de la misma solución tampón. Todas las operaciones se realizaron en cámara climatizada entre 2-4°C.

Una parte de la fracción dializada se utilizó para determinar su contenido proteico mediante el método de Lowry y colab. (1951), como se ha descrito en el apartado anterior, y el resto se guardó en congelador a -20°C hasta el momento de realizar el fraccionamiento de las proteínas.

Las proteínas solubles se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS), en estas condiciones la separación de las proteínas depende sólo del peso molecular de sus cadenas polipeptídicas.

Los geles se prepararon en lecho plano, siguiendo el sistema discontinuo propuesto por Laemmli (1970). Utilizamos acrilamida (Bio Rad) al 15% en el gel separador y al 5% en el gel empilador. La composición completa de los geles fué la siguiente:

- Gel separador

Tris-HCl 1,5 M (pH = 8,9)	7,5 ml
Acrilamida 22,2%	20,2 ml
Bis-acrilamida 0,6%	
SDS 10%	0,3 ml
H ₂ O	5,0 ml
Persulfato amónico 5%	1,0 ml
TEMED	20,0 ul

- Gel empilador

Tris-HCl 0,5 M (pH = 6,5)	5,0 ml
Acrilamida 22,2%	2,7 ml
Bis-acrilamida 0,6%	
SDS 10%	0,2 ml
H ₂ O	12,0 ml
Persulfato amónico 5%	1,0 ml
TEMED	20,0 ul

Las muestras (40 μ l), antes de su aplicación, se disolvieron en 15 μ l de tampón muestra A y 13 μ l de tampón muestra B, cuya composición es la siguiente:

- Tampón muestra A

SDS	250,0	mg
Mercaptoetanol	0,25	ml
Tris-HCl 0,5 M (pH = 6,5)	0,4	ml
H ₂ O c.s.p.	5,0	ml

- Tampón muestra B

Bromofenol blue	5,0	mg
Sacarosa	2,0	g
H ₂ O c.s.p.	10,0	ml

Un volumen adecuado (15 μ l) de las muestras así preparadas se aplicó en el soporte electroforético mediante una jeringa Hamilton. Se utilizó un aparato para electroforesis vertical, de lecho plano, conectado a una fuente de alimentación LKB-2197. El sentido de la corriente fué de cátodo (-) a ánodo (+), y la intensidad de la misma de 20 mA, hasta que el colorante marcador (azul de bromofenol) llegó al gel separador, y de 25 mA desde este momento hasta el final del proceso, el cual se dió por terminado cuando el frente llegó a 2 cm del extremo de la placa.

Los geles se tiñeron con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,35 mg) en 300 ml de una mezcla de etanol, ácido acético glacial y agua, en la proporción 25:16:59 (v/v/v), durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se decoloraron con una solución cuya composición es igual a la de la anterior pero sin Coomassie Brilliant Blue.

Una vez decolorados, los geles se fotografiaron, y las transparencias de alta resolución ampliadas (18 x 12 cm) se

utilizaron para leer y registrar, posteriormente, la intensidad de las bandas proteicas, mediante un densitometro "Viatron TLD 100", con un filtro de 660 nm.

Los pesos moleculares de las bandas separadas se determinaron por comparación con proteínas patrón (Bio Rad) de distintos pesos moleculares: fosforilasa B, 92,5 kD; BSA (albúmina de suero bovino), 66,2 kD; ovoalbúmina, 45,0 kD; anhidrasa carbonica, 31,0 kD; inhibidor de tripsina de soja, 21,5 kD; y lisocima, 14,4 kD.

La movilidad relativa se calculó, de acuerdo con Webern y Osborn (1969), a partir del siguiente cociente:

$$Mr = \frac{\text{distancia recorrida por la banda (cm)}}{\text{distancia recorrida por el colorante marcador (cm)}}$$

La distribución de las actividades ADC y ODC sobre los geles se determinó por seccionamiento de geles duplicados sin teñir, después de la electroforesis a 4°C, y por extracción de las secciones del gel (cerca de 4mm), que contenían las bandas proteicas con PM aproximados a los de ADC y ODC, con tampón fosfato 50 mM (pH = 7,6) suplementado con DTT 2 mM y piridoxal-5'-fosfato 50 µM durante una noche a 4°C. En los extractos libres del gel, obtenidos tras centrifugar a 27000 g durante 20 minutos, se determinaron las actividades enzimáticas como se ha indicado en el apartado 2.8.

2.12. Análisis estadístico de los resultados

Como hemos mencionado anteriormente, en este trabajo, además del estudio de la fracción proteica soluble mediante PAGE-SDS, se comparan los efectos de los 2 medios de cultivo -alto y bajo en auxina- sobre el crecimiento de los callos, contenidos en K^+ , aminoácidos libres, putrescina y nicotina, y las actividades ARG, ODC y ADC de las piezas de callo, con y sin organogénesis, crecidas sobre estos medios.

Por este motivo, los datos obtenidos en los análisis correspondientes se sometieron a un tratamiento estadístico mediante la técnica del análisis de la varianza de una vía, a fin de establecer posibles diferencias entre ambos tratamientos ($11,5 \mu\text{M ANA}$ y $1 \mu\text{M ANA}$).

En todos los casos, el nivel de significación se expresa según la siguiente relación de probabilidades:

PROBABILIDAD	EXPRESION	NIVEL DE SIGNIFICACION
$0,01 < P \leq 0,05$	*	Significativo
$0,001 < P \leq 0,01$	**	Muy significativo
$P \leq 0,001$	***	Altamente significativo

Todos los tratamientos estadísticos de los resultados se han realizado mediante un ordenador TEKTRONIX y un programa de la biblioteca del Laboratorio de Cálculo Numérico de la Facultad de Farmacia.

3. RESULTADOS Y SU DISCUSION

3.1. Consideraciones preliminares

Estudios efectuados por varios investigadores han revelado que, en los tejidos vegetales deficientes en K^+ , la acumulación de la diamina putrescina, el compuesto intermedio clave en la biosíntesis de nicotina (Yoshida y Mitake 1966), parece producirse por el camino biosintético vinculado a la L-arginina descarboxilasa (ADC), en lugar de por L-ornitina descarboxilasa (Smith 1963, Flores y Galston 1982). Otros estudios indican que ambas descarboxilasas son activas y están implicadas en la biosíntesis de putrescina (Yoshida 1969, Altman y colab. 1982, Yang y colab. 1984). Aunque arginina y ornitina marcadas pueden ser eficientes precursores de putrescina y nicotina, se conoce poco respecto a su participación en la síntesis de estos últimos compuestos en los tejidos de callo de tabaco.

Según se ha indicado anteriormente (pág. 3), en dos cultivos de callo derivados de la parte basal del nervio medio de hojas de N. tabacum cv. Burley 21, crecidos, respectivamente, sobre un medio alto en auxina (11,5 μ M ANA) y otro bajo en auxina (1 μ M ANA), se ha determinado el contenido de nicotina y aminoácidos libres, y establecido las relaciones entre la producción de alcaloide y los niveles de sus aminoácidos precursores iniciales: ácido glutámico, prolina, ornitina y arginina del anillo de pirrolidina y ácido aspártico del anillo de piridina. También hemos determinado la

actividad arginasa, y el contenido de K^+ y putrescina (libre y ligada), y la actividad de los enzimas biosintéticos de putrescina, arginina y ornitina descarboxilasa, a fin de comprobar nuestra hipótesis, según la cual, en tejido de callo de tabaco, la toma de K^+ , las actividades de las dos descarboxilasas (ADC y ODC), la acumulación de putrescina libre y la síntesis de nicotina son procesos relacionados y dependientes de la concentración de auxina en el medio de cultivo. Finalmente, hemos separado la fracción proteica soluble por PAGE-SDS. El medio fundamental para ambos cultivos fué el de Murashige y Skoog (1962), suplementado con una concentración $1 \mu M$ de quineta y solidificado con Bacto-agar en la proporción de 0,8 %. Los cultivos se dispusieron en una cámara a $25^{\circ}C$, en la oscuridad.

A las seis semanas del subcultivo del callo inicial en ambos medios de experimentación -alto y bajo en auxina-, cuando, según se comprobó en condiciones análogas de cultivo, el crecimiento y la producción de nicotina eran máximos (Piñol y colab. 1984), se examinaron las características y la organogénesis de los cultivos, y se efectuó la toma de muestra de los mismos para la determinación de sus pesos fresco y seco, contenido en agua, estudio de las actividades enzimáticas y separación de la fracción proteica soluble por PAGE-SDS, y para los análisis de K^+ , aminoácidos libres, putrescina y nicotina. El número de determinaciones en cada caso fué de 6 a 15.

Para la discusión de los resultados obtenidos, estos se han agrupado en cinco apartados:

- Caracteres morfológicos, crecimiento y contenido de K^+
- Contenido de alcaloides y putrescina
- Actividades ADC, ODC y ARG
- Análisis por PAGE-SDS
- Contenido de aminoácidos

En las tablas que figuran en cada uno de los apartados indicados, están representados los correspondientes valores de las piezas de callo crecidas, respectivamente, sobre los medios alto y bajo en auxina, utilizados, a su vez, para la composición de las tablas y figuras sobre las que, en cada caso, se basa la discusión de los resultados.

Por último, queremos indicar que sólo se han estimado como valorables aquellos resultados experimentales que se han expresado de modo claro y/o constante, dados los errores que pueden cometerse durante las distintas operaciones realizadas.

3.2. Carácteres morfológicos, crecimiento y contenido de K⁺

Los tejidos de callo en el medio con una concentración 11,5 μ M de ANA (alto en auxina), crecieron activamente en forma de masas algo friables de color amarillo pálido (Figs. 6 y 7), mientras que en el medio con una concentración 1 μ M de ANA (bajo en auxina), crecieron bastante menos y formaron masas más compactas de color amarillo parduzco (Figs. 8 y 9). Por razones desconocidas, sobre ambos medios se desarrollaron callos con y sin organogénesis. En el medio alto en auxina los callos con organogénesis, que representaron aproximadamente el 52% del total de callos recolectados, formaron principalmente raíces, debido posiblemente a la baja relación citoquinina/auxina existente en este medio de cultivo, que habría estimulado el desarrollo de meristemas de raíz (Wareing y Phillips 1981). En el medio bajo en auxina los callos con organogénesis, que representaron aproximadamente el 58% del total de piezas recolectadas, formaron también yemas de tallo de color verde pálido en alta proporción (Tab. 2).

Si nos referimos a los índices de organogénesis (yemas + raíces) (IO), formación de raíces (IFR) y formación de yemas (IFY), calculados para nuestros cultivos de callo tal como se ha indicado previamente (págs. 68-69), podemos resaltar que si bien el IO era similar para los cultivos crecidos con las dos diferentes concentraciones de auxina en el medio, el IFR era superior en los callos crecidos en el medio alto en auxina, y el IFY muy superior en aquellos crecidos en el medio bajo.

En las Tablas 3-8, figuran los resultados del efecto de ambas concentraciones de auxina sobre el crecimiento y el contenido de agua y K⁺ de los tejidos de callo después de

un período de cultivo de 6 semanas. Según se puede observar más claramente en la Tabla 8, los pesos frescos de los callos indican que el crecimiento de éstos era reducido significativamente por la concentración $1 \mu\text{M}$ de ANA en el medio de cultivo. De los resultados que figuran en la indicada Tabla se puede calcular que los pesos frescos de los callos, con y sin organogénesis, crecidos en el medio alto en auxina, eran, respectivamente, 47,6 y 48,6 veces más altos, y aquellos de los callos crecidos en el medio bajo sólo, respectivamente, 19,9 y 17 veces más altos, cuando comparados con los pesos frescos de las piezas de callo inicial ($0,04 \pm 0,004 \text{ g}$) inoculadas sobre ambos medios de cultivo. Los valores de porcentaje de peso seco, referidos a peso fresco, de los callos con y sin organogénesis crecidos sobre el mismo medio de cultivo, eran similares. Sin embargo, se produjo una diferencia significativa entre los valores de porcentaje de peso seco de los tejidos de callo crecidos sobre los dos diferentes medios de cultivo. Los porcentajes de peso seco de los callos con y sin organogénesis eran significativamente más altos (el doble) en los cultivos crecidos con una concentración $1 \mu\text{M}$ de ANA en el medio (Tab. 8, Fig. 12). Estos resultados indican una acusada reducción de la extensión celular (y por ello una baja relación vacuola/citoplasma) en los tejidos de callo crecidos en el medio bajo en auxina y, consecuentemente, podrían responder de las diferencias observadas en la proporción de crecimiento entre los callos crecidos sobre ambos medios de cultivo. Evidencia adicional para esta interpretación de los resultados la aportan los valores del contenido de agua de los callos (Tab. 8, Fig. 13), el cual en las piezas de callo con y sin organogénesis, crecidas en el medio alto en auxina, era más de 2 veces superior, con relación al contenido de las correspondientes piezas crecidas en el medio bajo en auxina.

La concentración de auxina en el medio de cultivo influyó acusadamente sobre el contenido de K^+ de los tejidos de callo (Tab. 8, Fig. 14). Los callos con y sin organogénesis crecidos sobre el medio alto en auxina, poseían concentraciones de K^+ significativamente superiores a aquellas determinadas en los correspondientes callos crecidos en el medio bajo en auxina. Sin embargo, aunque la concentración 11,5 μM de ANA en el medio de cultivo ocasionó un considerable aumento del contenido de K^+ de los callos, nuestros cultivos de callo eran deficientes en K^+ , de acuerdo con los datos citados por Evans y Sorger (1966), según los cuales el contenido de K^+ de las plantas de N. tabacum que presentan síntomas de deficiencia de este elemento oscila entre 27,9 y 37,2 mg por gramo de peso seco. Por otra parte, como indica la correspondiente relación de valores (Tab. 8), el contenido de K^+ era superior en las piezas de callo con organogénesis que en aquellas sin organogénesis crecidas sobre un mismo medio de cultivo, con un incremento, según se puede deducir de los datos que figuran en la indicada Tabla, del 21,07 % en los callos crecidos en el medio alto en auxina -que presentaron un índice de formación de raíces (IFR) igual a 0,86-, y de un 4,70 % en los crecidos en el medio bajo en auxina -los cuales presentaban un IFR igual a 0,63-. Se podría suponer por ello, que cuando los tejidos de callo desarrollan raíces, éstas pueden contribuir a la absorción del K^+ presente en el medio de cultivo.

Los resultados comentados hasta el momento y la opinión generalizada de que en los tejidos jóvenes el K^+ es indispensable para la obtención del turgor celular óptimo, el cual se requiere para la extensión celular (Mengel y Kirkby 1982), sugieren que en los callos crecidos sobre el medio bajo en auxina, la reducción del contenido de agua y la proporción de crecimiento, podrían deberse a una reducción de

la toma de K^+ por las células del tejido de callo, condicionada por la concentración $1 \mu M$ de ANA en el medio de cultivo. Esta interpretación encuentra apoyo en el trabajo de Cocucci y Dalla Rosa (1980), en el que los autores demuestran que el efecto estimulante del AIA sobre la extensión celular, está estrechamente relacionado con la separación de H^+ , la toma de K^+ y la síntesis de proteína.

Tabla 2. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre la organogénesis de tejido de callo de tabaco.

CALLOS								
ANA µM	Recolectados	Con raíces	Con yemas	Con raíces y yemas	% Organo- génesis	IO	IFR	IFY
11,5	894	438	12	16	52,1	0,932	0,859	0,003
1,0	1000	447	64	65	57,6	0,960	0,633	0,055

Tabla 3 . PESO FRESCO (g/callo)

11,5 μ M ANA			1 μ M ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
1,745	2,569		0,805	0,726	
1,330	1,904		0,916	0,639	
1,445	1,892		0,860	0,643	
1,639	2,171		0,560	0,669	
2,065	2,717		0,829	0,947	
1,816	1,525		0,891	0,787	
1,939	1,793		0,815	0,648	
2,730	1,490		0,746	0,574	
2,479	1,604		0,793	0,813	
1,933	1,565		0,720	0,614	
2,372	2,166		0,767	0,650	
1,658	nd		0,745	0,943	
1,813	nd		0,865	0,508	
2,004	nd		0,980	0,580	
1,617	nd		0,689	0,476	
\bar{x}_1 1,906	\bar{x}_2 1,945	0,980	\bar{x}_3 0,799	\bar{x}_4 0,681	1,173

nd = no determinado

Tabla 4 . PESO SECO (g/callo)

11,5 μ M ANA			1 μ M ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
0,070	0,105		0,063	0,056	
0,047	0,066		0,066	0,048	
0,059	0,062		0,068	0,051	
0,066	0,089		0,050	0,055	
0,087	0,104		0,062	0,069	
0,069	0,066		0,071	0,063	
0,068	0,077		0,066	0,054	
0,097	0,065		0,053	0,047	
0,099	0,068		0,064	0,066	
0,067	0,053		0,061	0,046	
0,088	0,078		0,060	0,053	
0,064	nd		0,058	0,075	
0,085	nd		0,064	0,037	
0,099	nd		0,074	0,046	
0,068	nd		0,055	0,038	
\bar{x}_1 0,075	\bar{x}_2 0,076	0,987	\bar{x}_3 0,062	\bar{x}_4 0,054	1,148

nd = no determinado

Tabla 5 . % PS (PF/PS x 100)

11,5 μ M ANA			1 μ M ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
4,02	4,07		7,80	7,78	
3,51	3,47		7,24	7,45	
4,09	3,26		7,96	8,00	
4,04	4,08		8,96	8,16	
4,20	3,82		7,49	7,31	
3,79	4,30		7,98	7,97	
3,50	4,28		8,15	8,38	
3,55	4,37		7,13	8,20	
3,98	4,24		8,03	8,17	
3,49	3,40		8,49	7,57	
3,69	3,62		7,77	8,18	
3,89	nd		7,76	7,94	
4,68	nd		7,37	7,38	
4,94	nd		7,58	7,95	
4,21	nd		8,04	7,90	
\bar{x}_1 3,97	\bar{x}_2 3,90	1,02	\bar{x}_3 7,85	\bar{x}_4 7,89	0,99

nd = no determinado

Tabla 6 . CONTENIDO EN AGUA (g/g PS)

11,5 μ M ANA			1 μ M ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
23,89	23,56		11,82	11,86	
27,48	27,80		12,82	12,43	
23,42	29,67		11,57	11,50	
23,73	23,47		10,15	11,25	
22,79	25,20		12,35	12,68	
25,36	22,25		11,53	11,54	
27,55	22,37		11,26	10,93	
27,14	21,89		13,02	11,19	
24,09	22,55		11,45	11,23	
27,64	28,36		10,77	12,21	
26,07	26,59		11,86	11,23	
24,70	nd		11,89	11,60	
20,35	nd		12,56	12,55	
19,22	nd		12,19	11,58	
22,74	nd		11,44	11,66	
\bar{x}_1 24,41	\bar{x}_2 24,88	0,98	\bar{x}_3 11,78	\bar{x}_4 11,69	1,01

nd = no determinado

Tabla 7 . K^+ (mg/g PS)

11,5 μ M ANA			1 μ M ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
37,59	33,51		24,00	23,85	
37,82	32,36		24,85	24,50	
37,24	30,93		26,17	25,18	
40,07	32,39		25,16	23,46	
39,55	30,55		25,72	25,38	
38,73	31,07		26,42	23,12	
\bar{x}_1 38,50	\bar{x}_2 31,80	1,21	\bar{x}_3 25,39	\bar{x}_4 24,25	1,05

Tabla 8. Crecimiento y contenido de K^+ en cultivo de callo de tabaco. Los valores son la media de 6-15 determinaciones \pm ES. *** $P \leq 0,001$ < ** $P \leq 0,01$.

Parámetro	ANA		Organos
	11,5 μM	1 μM	
PF,	1,906 \pm 0,100	0,799 \pm 0,026	*** Presentes
g/callo	1,945 \pm 0,126	0,681 \pm 0,036	*** Ausentes
PS	0,075 \pm 0,004	0,062 \pm 0,002	** Presentes
g/callo	0,076 \pm 0,005	0,054 \pm 0,003	*** Ausentes
PS/PF x 100	3,97 \pm 0,11	7,85 \pm 0,12	*** Presentes
	3,90 \pm 0,12	7,89 \pm 0,08	*** Ausentes
Cont. H_2O ,	24,41 \pm 0,66	11,78 \pm 0,19	*** Presentes
g/g PS	24,88 \pm 0,84	11,69 \pm 0,13	*** Ausentes
K^+ ,	38,50 \pm 0,46	25,39 \pm 0,36	*** Presentes
mg/g PS	31,80 \pm 0,46	24,25 \pm 0,37	*** Ausentes



Figura 6. Aspecto de un callo sin organogénesis, crecido en el medio alto en auxina.



Figura 7. Aspecto de un callo con organogénesis crecido en el medio alto en auxina.

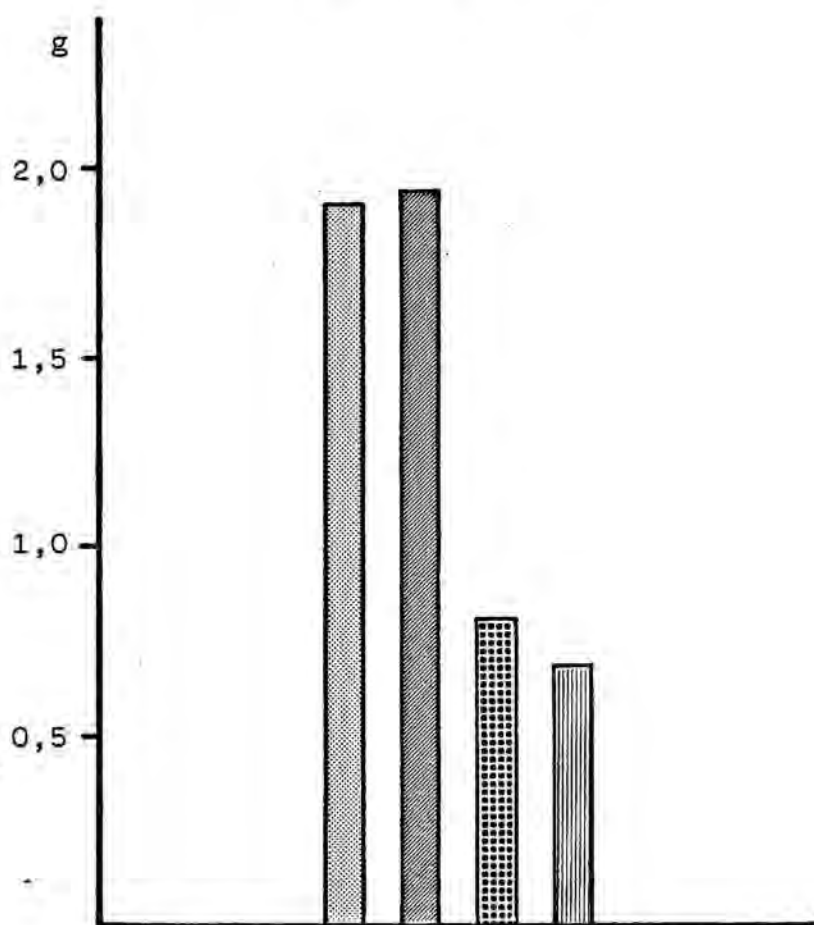


Figura 8. Aspecto de un callo sin organogénesis, crecido en el medio bajo en auxina.



Figura 9. Aspecto de un callo con organogénesis, crecido en el medio bajo en auxina.

Figura 10. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el crecimiento (expresado como aumento de peso fresco) de cultivo de callo de tabaco.



■ Callos con organogénesis (11,5 μM ANA)

■ Callos sin organogénesis (11,5 μM ANA)

■ Callos con organogénesis (1 μM ANA)

■ Callos sin organogénesis (1 μM ANA)

Figura 11. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el crecimiento (expresado como aumento de peso seco) de cultivo de callo de tabaco.

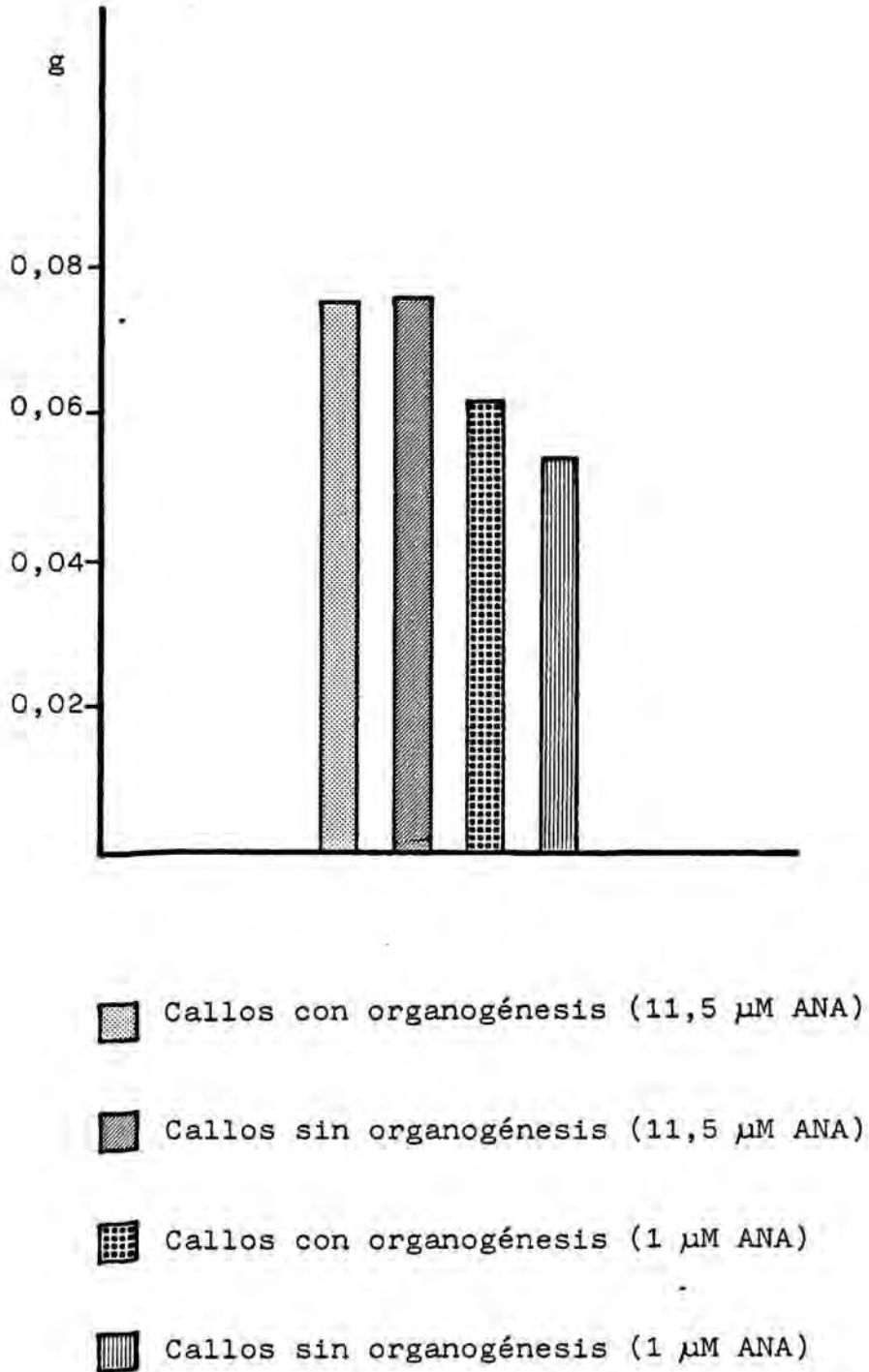
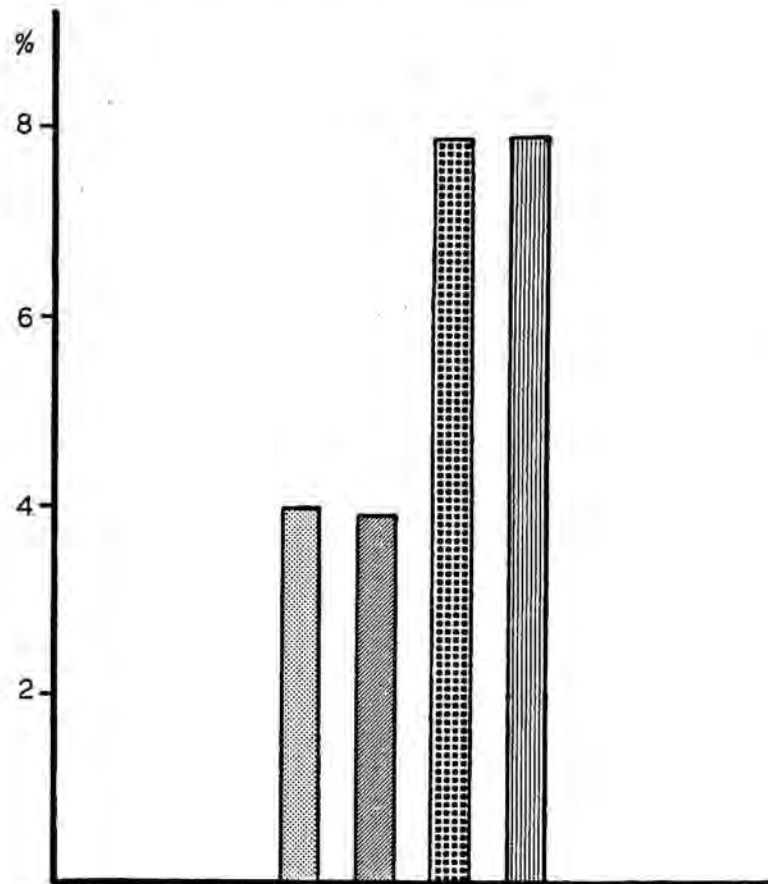


Figura 12. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el porcentaje de peso seco, referido a peso fresco, de cultivo de callo de tabaco.







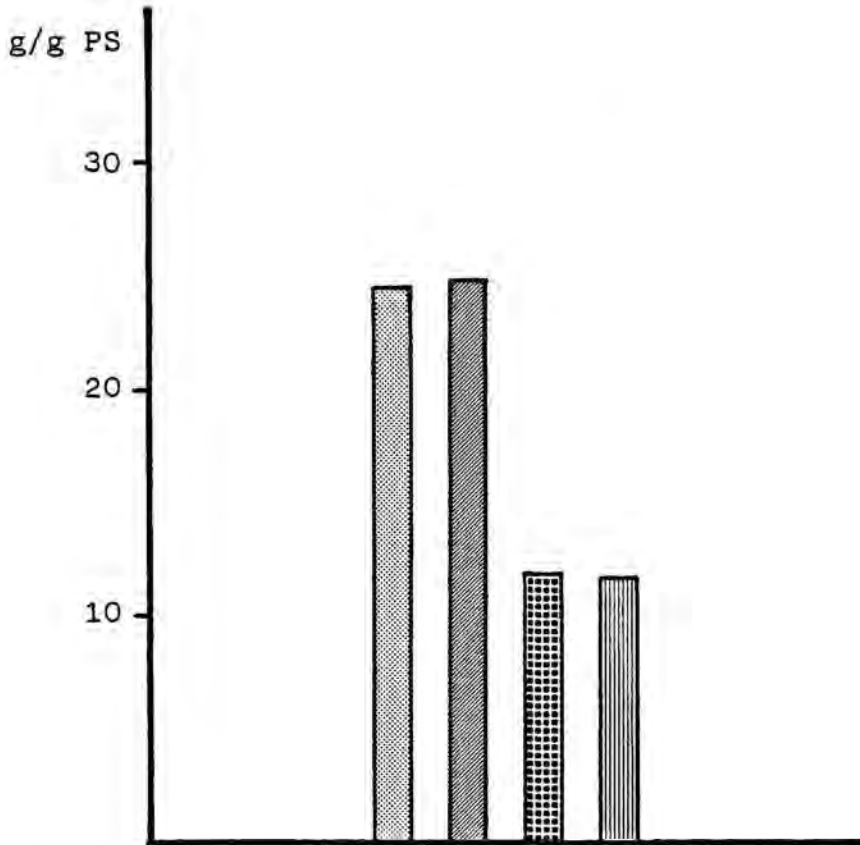
-  Callos con organogénesis (11,5 μM ANA)
-  Callos sin organogénesis (11,5 μM ANA)
-  Callos con organogénesis (1 μM ANA)
-  Callos sin organogénesis (1 μM ANA)

Figura 13. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el contenido de agua de cultivo de callo de tabaco.



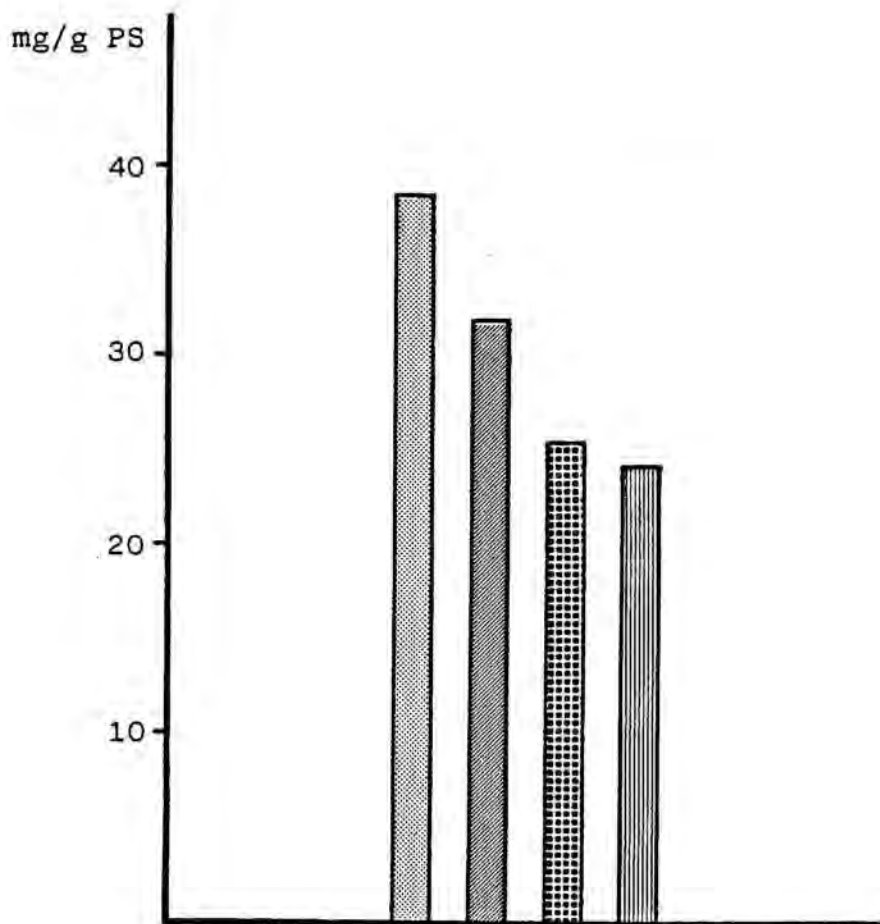
■ Callos con organogénesis (11,5 μ M ANA)

■ Callos sin organogénesis (11,5 μ M ANA)

■ Callos con organogénesis (1 μ M ANA)

■ Callos sin organogénesis (1 μ M ANA)

Figura 14. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el contenido de K^+ de cultivo de callo de tabaco.



■ Callos con organogénesis (11,5 μ M ANA)

■ Callos sin organogénesis (11,5 μ M ANA)

■ Callos con organogénesis (1 μ M ANA)

■ Callos sin organogénesis (1 μ M ANA)

3.3. Contenido de alcaloides y putrescina

En las Tablas 9-13 están representados los valores de nicotina y putrescina de los callos crecidos, respectivamente, en el medio alto en auxina -supra-óptimo para la síntesis de nicotina- y el medio bajo en auxina -óptimo para la síntesis del alcaloide-, después de un período de cultivo de 6 semanas, momento en que, en las condiciones de este experimento, la síntesis de nicotina por el tejido de callo era máxima (Piñol y colab. 1984).

Los análisis de los extractos alcaloídicos por CGL, en las condiciones indicadas en la correspondiente Parte Experimental, han probado que los callos con y sin organogénesis crecidos sobre ambos medios de cultivo, así como las raíces y yemas de tallo desarrolladas por los mismos, presentaban un modelo alcaloídico similar, con nicotina (tiempo de retención = 3,6 min.) como único alcaloide (Figs. 15-17). La Tabla 13, en la que están representados además de los valores medios de K^+ aquellos de nicotina y putrescina, muestra que la síntesis de nicotina en los callos con y sin organogénesis crecidos en el medio bajo en auxina, donde promediaba 1,87 mg por gramo de peso seco de tejido de callo, era significativamente superior cuando se comparaba con aquella de los correspondientes callos crecidos en el medio alto en auxina, donde promediaba sólo 0,40 mg por gramo de peso seco de tejido de callo. Además, el contenido de nicotina era siempre más alto en las piezas de callo con organogénesis que en aquellas sin organogénesis crecidas sobre ambos medios de cultivo, con un incremento del 22,22 % en las correspondientes al medio alto en auxina (donde los callos con organogénesis formaron principalmente raíces, Tabla 2) y de un 11,30 % en las que crecieron en el medio bajo en auxina (donde los callos con organogénesis formaron, además de raíz-

ces; yemas de tallo en alta proporción, Tabla 2). Estos datos indican que el desarrollo de órganos por el tejido de callo estimuló la producción de alcaloide en nuestros cultivos, y demuestran, de acuerdo con Luckner (1971) y Böhm (1977), la importancia de la diferenciación morfológica para la diferenciación bioquímica, requerida en la biosíntesis de compuestos secundarios. Nuestros resultados sugieren que determinados genes, que normalmente no afectan a un camino metabólico -en este caso, la biosíntesis de nicotina- en las células de una planta, sí pueden afectar este camino cuando sus células crecen in vitro. Consecuentemente, un camino metabólico puede estar influenciado por diferentes genes in vivo e in vitro. Las diferencias genéticas a que aludimos, probablemente no afectaron directamente al camino de biosíntesis de nicotina. Sugerimos que, en nuestro experimento, las diferencias en la producción de nicotina por los callos con y sin organogénesis, crecidos en un mismo medio de cultivo, estén relacionadas con las diferencias en la capacidad genética de los callos para formar órganos. Todo ello queda reflejado claramente en la Figura 18.

El contenido de nicotina de las yemas de tallo y raíces desarrolladas por los callos crecidos en el medio con una concentración 1 μ M de ANA (óptima para la síntesis del alcaloide), era extremadamente alto (3,22 mg por gramo de peso seco en las yemas de tallo y 8,04 mg por gramo de peso seco en las raíces), casi 2 veces y más de 4 veces más alto, respectivamente, que en las correspondientes piezas de callo (Tab. 13). Estos resultados reflejan claramente la significación de la raíz para la síntesis de nicotina, ya que el alcaloide es sintetizado en la raíz de la planta de tabaco. Por otra parte, debido a que una vez formada la nicotina es transportada desde las raíces a las hojas, donde se acumula durante el estado vegetativo de la planta, se po-

dría suponer que en nuestro experimento, cuando los tejidos de callo desarrollaron yemas de tallo, éstas últimas asumieron la función acumulativa de las hojas en la planta intacta.

En la mayoría de las investigaciones sobre el contenido de putrescina, en respuesta a diversos estímulos de crecimiento y condiciones fisiológicas, se determina sólo la diamina en estado libre. Sin embargo, puesto que entre las funciones de este compuesto figuran la estabilización de macromoléculas y la participación en los mecanismos homeostáticos para el control del pH celular (Slocum y colab. 1984), la putrescina se encuentra en forma libre y ligada. Por este motivo, en nuestros cultivos de callo, hemos investigado la presencia de las tres fracciones: 1) putrescina libre soluble en ácido perclorico (S), 2) putrescina ligada soluble en HClO_4 (LS), y 3) putrescina ligada insoluble en HClO_4 (LI).

La comparación de los contenidos de putrescina de los callos crecidos sobre ambos medios (Tab. 13, Fig. 19) muestra que la putrescina libre (S) se acumuló significativamente en los callos con y sin organogénesis crecidos en el medio bajo en auxina, donde representó, respectivamente, el 57,6 y el 50,6 % del total de putrescina, en relación con los correspondientes callos crecidos en el medio alto en auxina, donde sólo representó, respectivamente, el 20,5 y el 15,1 % del total de la diamina. Por el contrario, los niveles de putrescina ligada soluble (LS) eran significativamente más altos en los callos con y sin organogénesis crecidos en el medio alto en auxina, donde, a su vez, alcanzó, respectivamente, el 51,1 y el 58,0 % del total de putrescina, en relación con los correspondientes callos crecidos en el medio bajo en auxina, donde sólo alcanzó, respectivamente, el 18,4 y el 27,4 % del total de putrescina. Finalmente, los valores de putrescina ligada insoluble (LI) y de putrescina total,

eran muy parecidos, lo mismo en los callos con organogénesis que en aquellos sin organogénesis crecidos sobre ambos medios de cultivo. De lo expuesto se puede deducir que, independientemente de la síntesis de novo de putrescina y de su posterior transformación o degradación, el contenido total de putrescina en nuestros cultivos de callo -con diferentes grados de deficiencia de K^+ - permanece constante dentro de ciertos límites, lo que coincide con lo observado previamente por Klein y colab. (1979) en plantas de guisante deficientes en K^+ cuando comparadas con las plantas control. Se puede suponer, por ello, que la mayor acumulación de putrescina libre (S) en los callos crecidos en el medio bajo en auxina, en relación con aquellos crecidos en el medio alto, resulta principalmente de una mayor proporción de cambio de la diamina ligada soluble (LS) a la forma libre (S), probablemente en respuesta a una deficiencia de K^+ más severa inducida en los primeros callos por la concentración $1 \mu M$ de ANA en el medio de cultivo (Tab. 13). Esto estaría de acuerdo con la opinión generalizada de que la acumulación de putrescina en plantas deficientes en K^+ se debe a su función como catión divalente (Hackett y colab. 1965, Murty y colab. 1971, Klein y colab. 1979).

Así, en este trabajo se revela, en los tejidos de callo crecidos sobre ambos medios de cultivo, la existencia de una correlación positiva entre los niveles de putrescina libre (S) y de nicotina, a la vez que una correlación negativa entre aquellos de putrescina ligada soluble (LS) y del alcaloide, y además se prueba que la putrescina soluble depende más que la putrescina total del contenido de K^+ de los callos.

Los cambios en los contenidos de putrescina soluble y nicotina, apoyan nuestra hipótesis de que en tejidos de callo de tabaco la toma de K^+ , la acumulación de putrescina libre

y la síntesis de nicotina son procesos relacionados y dependientes de la concentración de auxina en el medio de cultivo. La putrescina libre acumulada en los callos deficientes en K^+ causa probablemente un incremento de la síntesis de nicotina por un efecto de acción de masa. Todo parece sugerir que la concentración de auxina en el medio de cultivo, en mayor grado aquella $1 \mu M$ de ANA, asegura un elevado abastecimiento de precursor en el lugar de la síntesis de nicotina.

Tabla 9. NICOTINA (mg/g PS)

11,5 μ M ANA			1 μ M ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
0,49	0,41		2,01	1,81	
0,53	0,47		2,16	1,98	
0,40	0,33		1,81	1,51	
0,42	0,28		1,91	1,91	
0,43	0,35		2,07	1,75	
0,37	0,33		1,87	1,68	
\bar{x}_1 0,44	\bar{x}_2 0,36	1,22	\bar{x}_3 1,97	\bar{x}_4 1,77	1,11

Tabla 10. PUTRESCINA LIBRE SOLUBLE en HClO_4 (mg/g PS)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
1,84	1,47		5,65	4,75	
1,85	1,49		5,66	4,76	
1,80	1,42		5,61	4,71	
1,89	1,54		5,69	4,81	
1,80	1,39		5,60	4,70	
1,90	1,57		5,71	4,82	
\bar{x}_1 1,85	\bar{x}_2 1,48	1,25	\bar{x}_3 5,65	\bar{x}_4 4,76	1,19

Tabla 11. PUTRESCINA LIGADA SOLUBLE en HClO_4 (mg/g PS)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
4,61	5,66		1,81	2,58	
4,63	5,67		1,82	2,58	
4,59	5,60		1,80	2,51	
4,54	5,73		1,83	2,65	
4,65	5,59		1,74	2,49	
4,69	5,75		1,88	2,67	
\bar{x}_1 4,62	\bar{x}_2 5,67	0,81	\bar{x}_3 1,81	\bar{x}_4 2,58	0,70

Tabla 12. PUTRESCINA LIGADA INSOLUBLE en HClO_4 (mg/g PS)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
2,55	2,61		2,34	2,06	
2,56	2,62		2,35	2,08	
2,50	2,60		2,33	2,04	
2,61	2,63		2,36	2,10	
2,30	2,31		2,20	1,99	
2,82	2,93		2,49	2,15	
\bar{x}_1 2,56	\bar{x}_2 2,62	0,98	\bar{x}_3 2,35	\bar{x}_4 2,07	1,13

Tabla 13. Contenidos de K^+ , nicotina y putrescina en cultivo de callo de tabaco. Los valores son la media de 6 análisis \pm ES. *** $P \leq 0,001$; NS = diferencias no significativas.

Parametro	ANA		Organos			
	11,5 μ M	1 μ M				
K^+ , mg/g PS	38,50 \pm 0,46 31,80 \pm 0,46	r=1,21 r=1,21	25,39 \pm 0,36 24,25 \pm 0,37	r=1,05 r=1,05	*** ***	Presentes Ausentes
Nicotina mg/g PS	0,44 \pm 0,02 0,36 \pm 0,02	r=1,22 r=1,22	1,97 \pm 0,13 1,77 \pm 0,17	r=1,11 r=1,11	*** ***	Presentes Ausentes
Put. S. mg/g PS	1,85 \pm 0,02 1,48 \pm 0,03	r=1,25 r=1,25	5,65 \pm 0,02 4,76 \pm 0,02	r=1,19 r=1,19	*** ***	Presentes Ausentes
Put. LS mg/g PS	4,62 \pm 0,02 5,67 \pm 0,03	r=0,81 r=0,81	1,81 \pm 0,02 2,58 \pm 0,03	r=0,70 r=0,70	*** ***	Presentes Ausentes
Put. LI mg/g PS	2,56 \pm 0,07 2,62 \pm 0,08	r=0,98 r=0,98	2,35 \pm 0,04 2,07 \pm 0,02	r=1,13 r=1,13	NS NS	Presentes Ausentes
Put. total mg/g PS	9,03 \pm 0,22 9,77 \pm 0,32	r=0,92 r=0,92	9,81 \pm 0,18 9,41 \pm 0,17	r=1,04 r=1,04	NS NS	Presentes Ausentes
Nicotina mg/g PS			3,22 \pm 0,50 8,04 \pm 0,97			Yemas de tallo Raíces

Figura 15. Cromatogramas de extractos alcaloídicos de tejido de callo de tabaco con (A) y sin (B) organogénesis crecido en el medio alto en auxina ($11,5 \mu\text{M ANA}$).

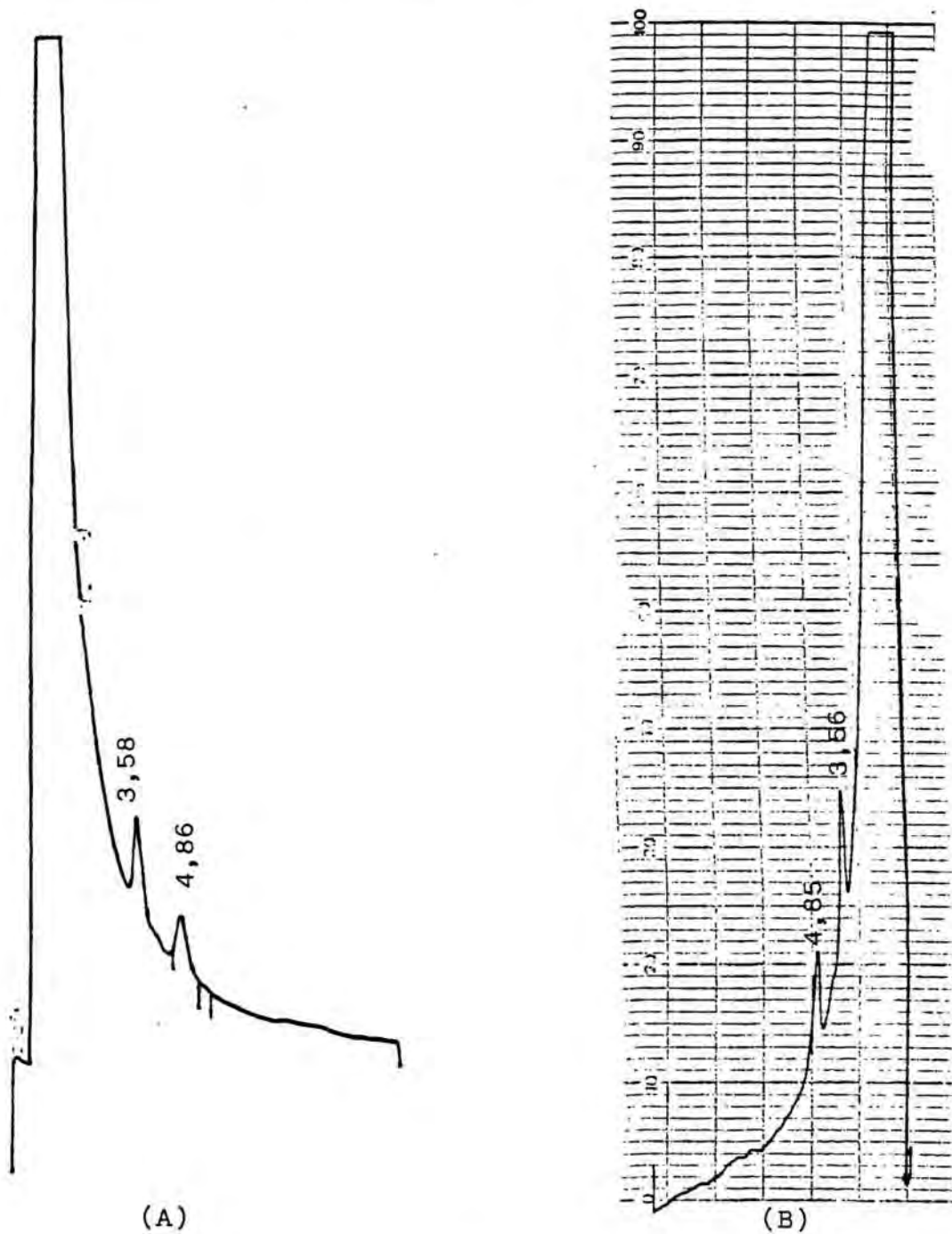


Figura 16. Cromatogramas de extractos alcaloídicos de tejido de callo de tabaco con (A) y sin (B) organogénesis crecido en el medio bajo en auxina ($1 \mu\text{M}$ ANA).

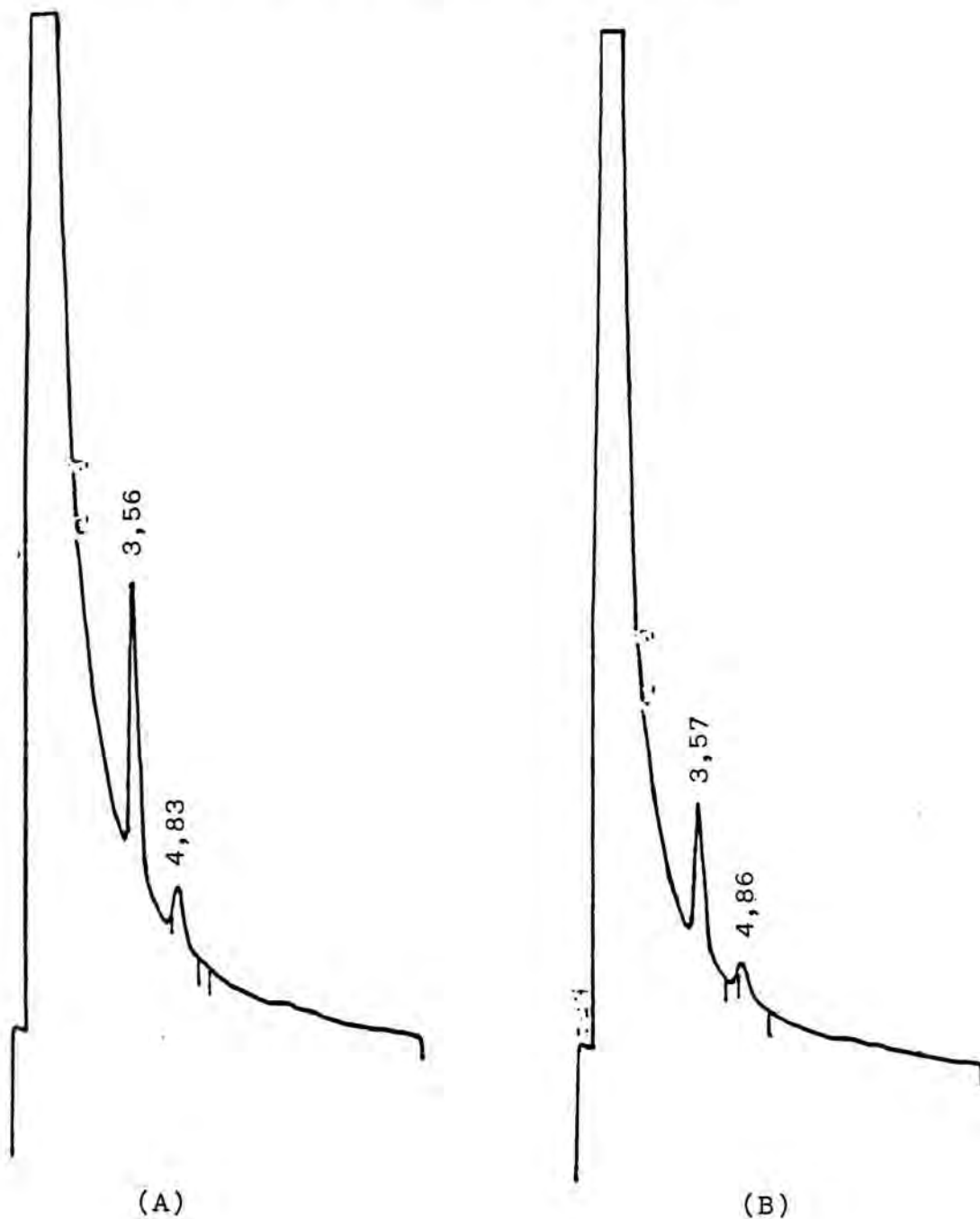
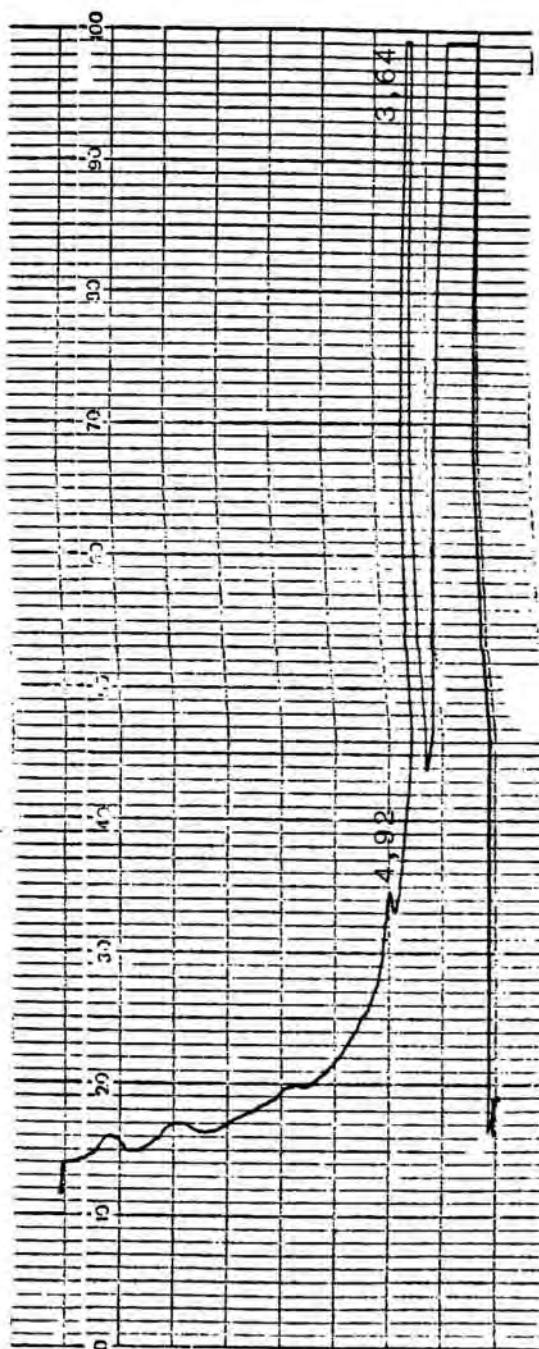


Figura 17. Cromatogramas de extractos alcaloídicos de yemas de tallo (A) y raíces (B) obtenidas de tejido de callo de tabaco crecido en el medio bajo en auxina ($1 \mu\text{M}$ ANA)

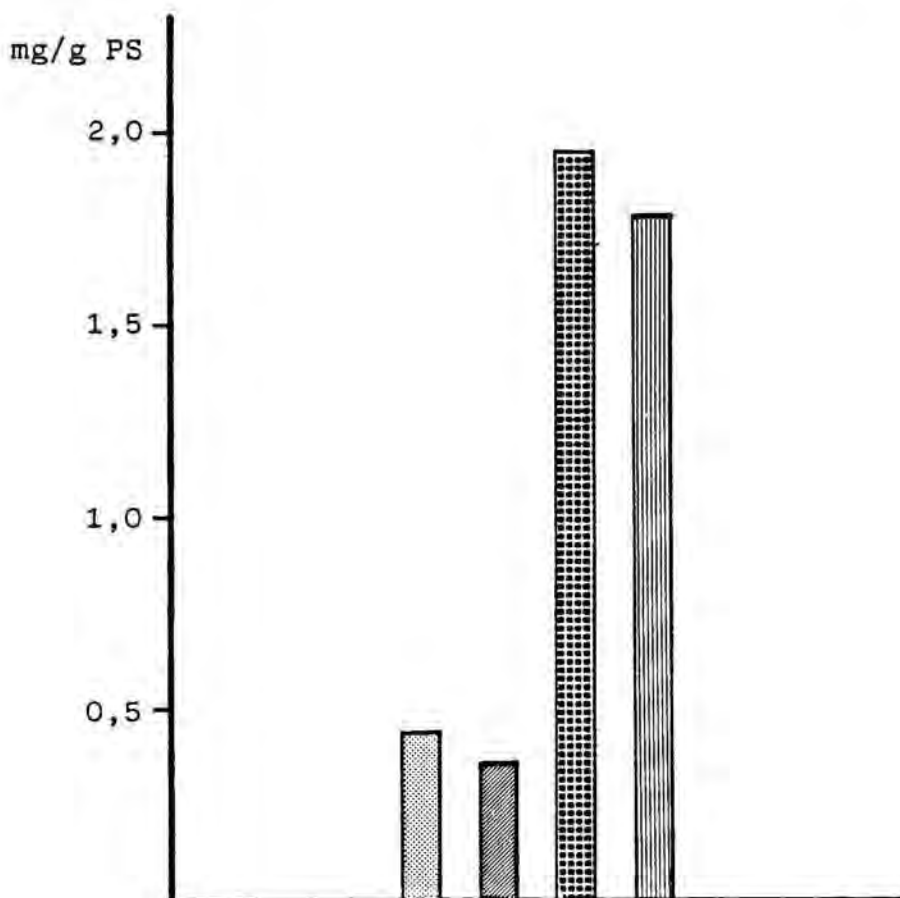


(A)



(B)

Figura 18. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el contenido de nicotina de cultivo de callo de tabaco.



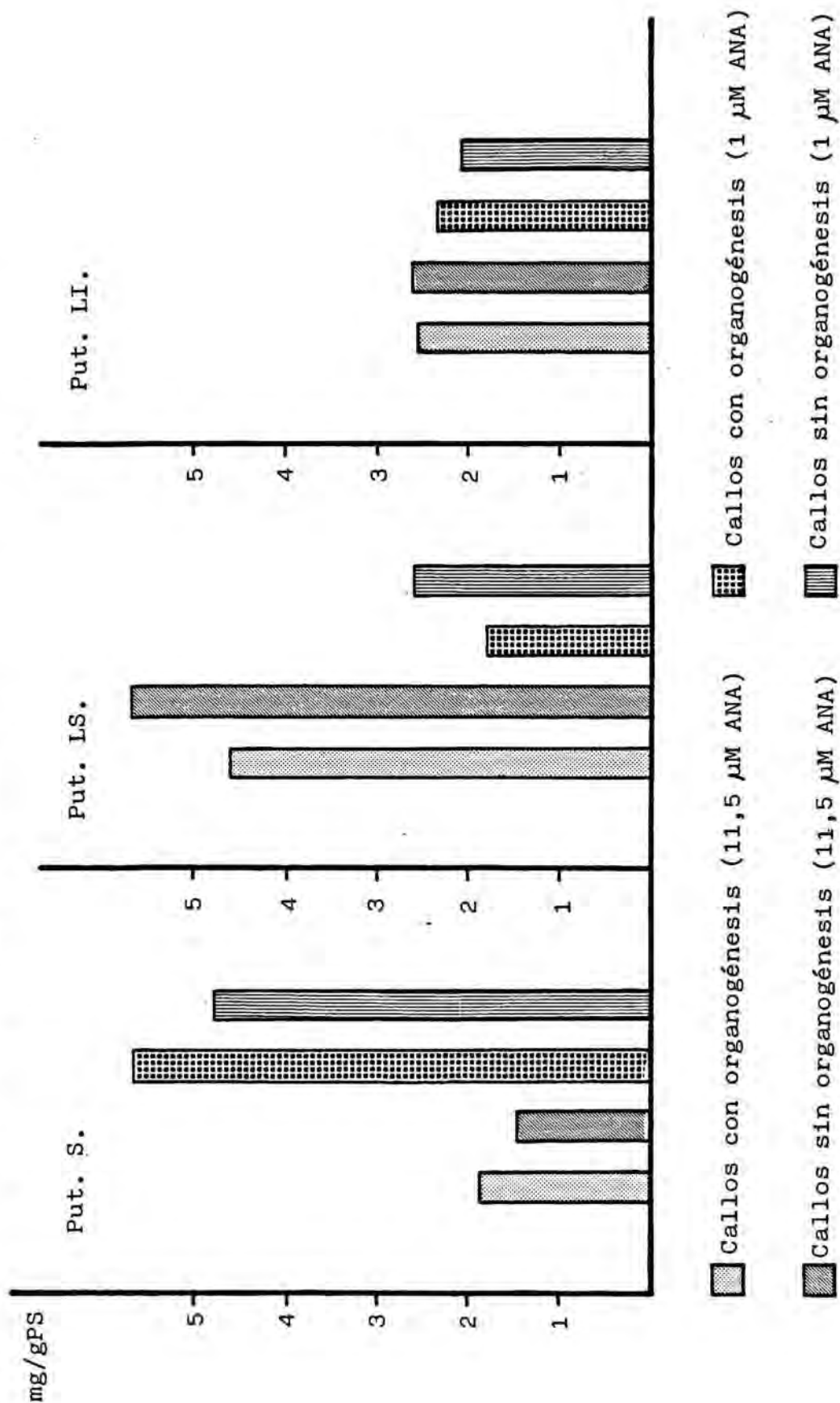
■ Callos con organogénesis (11,5 μ M ANA)

■ Callos sin organogénesis (11,5 μ M ANA)

■ Callos con organogénesis (1 μ M ANA)

■ Callos sin organogénesis (1 μ M ANA)

Figura 19. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el contenido de putrescina en cultivo de callo de tabaco.



3.4. Actividades ADC, ODC y ARG

Hemos comparado también las actividades de arginina y ornitina descarboxilasa en los tejidos de los callos crecidos sobre ambos medios de cultivo (Tabs. 14, 15 y 17), con el objeto de estudiar la significación de estas enzimas en la síntesis de los alcaloides de pirrolidina, vía putrescina, en nuestros cultivos de callo. Los resultados indican que, en las condiciones de este experimento, las actividades de ADC y ODC se manifiestan en el momento de máxima producción de nicotina (6ª semana) por el tejido de callo, lo que concuerda con el hecho de que la putrescina, y consecuentemente la nicotina, pueden derivar de arginina y ornitina en tabaco (Yoshida 1969, Mizusaki y colab. 1973, Yang y colab. 1984). Sin embargo, según se puede deducir también de la relación ODC/ADC (Tab. 17), la actividad ornitina descarboxilasa en nuestros cultivos de callo era más alta que aquella de arginina descarboxilasa -significativamente en el caso de los callos con organogénesis crecidos sobre el medio alto en auxina y en aquellos con y sin organogénesis crecidos sobre el medio bajo-. Por ello, a pesar de haberse sostenido que la descarboxilación de arginina constituye el principal camino para la biosíntesis de putrescina en las plantas (Smith 1978), nuestros resultados indican que ODC es el principal enzima implicado en la biosíntesis de putrescina y nicotina en tejidos de callo de tabaco, lo cual está de acuerdo con los experimentos realizados en plantas de tabaco por Mizusaki y colab. (1973) y Yang y colab. (1984). Los hechos precedentes sugieren que ambas enzimas, ADC y ODC, son activos en tejidos vegetales, y que su contribución relativa a la biosíntesis de putrescina depende del tipo de tejido y de los procesos de crecimiento condicionados por el medio.

La síntesis de putrescina en las plantas superiores puede implicar también al enzima arginasa (Fig. 1, pág. 21); este enzima convierte directamente la L-arginina en L-ornitina y urea. Este último aminoácido puede ser utilizado en la síntesis de putrescina por la acción de ODC, o convertido otra vez a arginina a través del ciclo de la ornitina. El hecho de que en nuestros cultivos de callo la actividad ODC fuera significativamente mayor que aquella de ADC, y de que, con independencia de la concentración de auxina en el medio de cultivo, no pudieramos, sorprendentemente, encontrar arginina en estado libre (Tab. 36, pág. 156), nos indujo a determinar la actividad arginasa en los callos crecidos sobre ambos medios de cultivo. Los datos que figuran en las Tablas 16 y 17, muestran, que la actividad arginasa también era manifiesta en los callos crecidos en el medio óptimo (1 μ M ANA) y supra-óptimo (11,5 μ M ANA) para la biosíntesis de nicotina, aunque significativamente superior (más de 2 veces) en aquellos con y sin organogénesis crecidos en el medio alto en auxina, lo cual indica un incremento significativo de la conversión de arginina en ornitina en los callos crecidos con una concentración 11,5 μ M de ANA en el medio de cultivo.

De lo expuesto se puede suponer que en las condiciones de nuestro experimento, arginasa participó activamente en los callos crecidos sobre el medio bajo en auxina y muy activamente en aquellos crecidos sobre el medio alto, en la reducción del "pool" de arginina libre al convertir esta en ornitina, la cual era descarboxilada después en elevada proporción a putrescina por la acción de ODC. Si bien ornitina, por medio del ciclo que lleva su nombre puede ser metabolizada de nuevo a arginina, en nuestro trabajo todo induce a suponer la inhibición de este camino metabólico, debido probablemente a la presencia de NH_3 en el medio, como se discu-

te ampliamente en el apartado correspondiente a "Aminoácidos libres" (pág. 139)

Tabla 14. Actividad ADC ($\mu\text{mol CO}_2/\text{h/g}$ proteina)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
4,02	1,23		17,10	6,01	
4,90	2,11		17,02	6,93	
3,95	1,04		16,84	5,89	
4,97	2,30		18,28	7,05	
3,78	2,22		18,69	7,25	
5,14	1,12		16,43	5,69	
\bar{x}_1 4,46	\bar{x}_2 1,67	2,67	\bar{x}_3 17,39	\bar{x}_4 6,47	2,69

Tabla 15. Actividad ODC ($\mu\text{mol CO}_2/\text{h/g}$ proteina)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
5,90	2,02		32,01	15,61	
6,14	2,26		32,25	16,05	
5,78	1,79		31,84	15,10	
6,26	2,49		31,21	14,91	
6,94	1,48		32,42	16,56	
5,10	2,80		33,05	16,75	
\bar{x}_1 6,02	\bar{x}_2 2,14	2,81	\bar{x}_3 32,13	\bar{x}_4 15,83	2,03

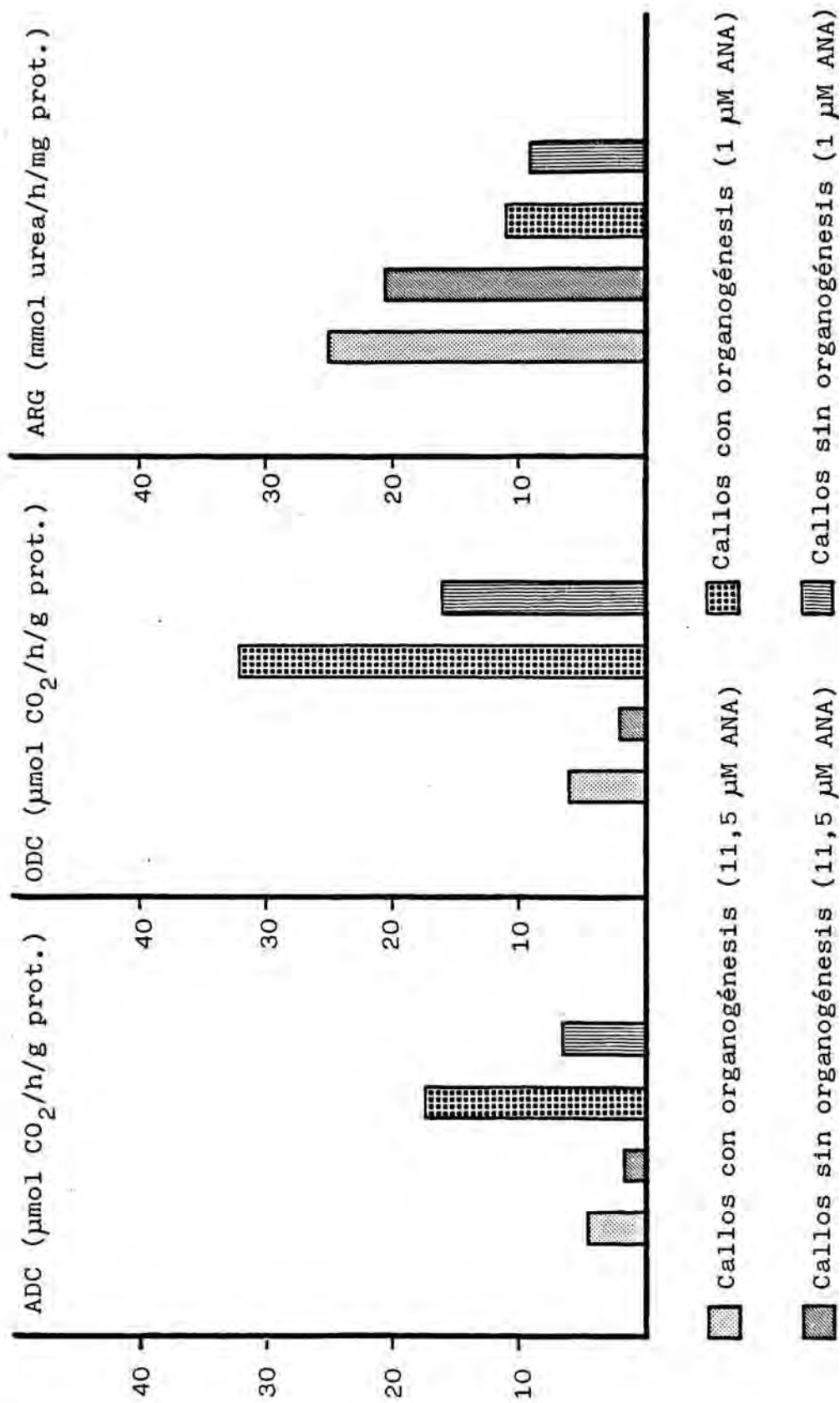
Tabla 16. Actividad ARG (mmol urea/h/mg proteina)

11,5 μ M ANA			1 μ M ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
24,39	21,90		10,01	7,78	
24,39	23,00		10,38	7,78	
23,90	22,27		9,64	8,34	
23,66	19,69		8,90	9,86	
26,81	19,00		12,20	10,81	
24,67	19,91		11,61	10,05	
26,43	19,67		11,40	7,78	
25,84	20,12		13,06	10,05	
\bar{x}_1 25,01	\bar{x}_2 20,69	1,21	\bar{x}_3 10,90	\bar{x}_4 9,06	1,20

Tabla 17. Actividad ADC, ODC y ARG en cultivo de callo de tabaco. Los valores son la media de 6-8 análisis \pm ES. ***P \leq 0,001; NS = diferencias no significativas.

ANA μ M	ODC	ADC	ODC/ADC	ARG	Organos
	μ mol CO ₂ /h/ g proteina	μ mol CO ₂ /h/ g proteina		mmol urea/h/ mg proteina	
11,5	6,02 \pm 0,24	4,46 \pm 0,25	1,34	25,01 \pm 0,42	Presentes
	2,14 \pm 0,81	1,67 \pm 0,24	1,28	20,69 \pm 0,52	Ausentes
1,0	32,13 \pm 0,25	17,39 \pm 0,36	1,83	10,90 \pm 0,49	Presentes
	15,83 \pm 0,31	6,47 \pm 0,28	2,45	9,06 \pm 0,44	Ausentes

Figura 20. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre las actividades ADC, ODC y ARG en cultivo de callo de tabaco.



3.5. Análisis por PAGE-SDS

La fracción proteica soluble, parcialmente purificada, de los tejidos de callo crecidos sobre ambos medios de cultivo, se fraccionó por electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) (Fig. 21). El objetivo principal de este análisis era encontrar diferencias en las proteínas solubles de los callos que pudieran relacionarse con su capacidad de síntesis de putrescina y nicotina. Cada carril del gel se cargó con igual volumen de extracto proteico. La intensidad de las bandas proteicas teñidas con el mismo azul de Coomassie, por ello, proporciona una medida relativa de su contenido en los tejidos de callo en el momento de máxima producción del alcaloide por estos tejidos (6ª semana).

En los electroforegramas (Fig. 21), se observa claramente que las bandas A y B en los callos crecidos en el medio bajo en auxina (1 μM ANA) eran bastante más intensas que en los callos crecidos en el medio alto en auxina (11,5 μM ANA) y, a la vez, más intensas en los callos con organogénesis (+) que en aquellos sin organogénesis (-) crecidos sobre ambos medios de cultivo. El peso molecular aproximado de las bandas A y B era respectivamente de 38.900 D y 35.500 D (Fig. 22). Las bandas C y D, con pesos moleculares aproximados de 13.800 D y 12.600 D respectivamente, eran también más intensas en los callos crecidos en el medio bajo en auxina que en aquellos crecidos en el medio alto. Las otras bandas proteicas no presentaban cambios tan claros.

Los análisis para la actividad enzimática ADC y ODC de los geles duplicados sin teñir, permitió establecer que la banda proteica de peso molecular aproximado 38.900 D(A) presentaba actividad ADC, y aquella de peso molecular aproxi-

mado de 35.500 D (B) actividad ODC. Así, estos resultados aportan evidencia adicional al hecho de que en nuestros cultivos de callo la actividad ODC era superior a aquella ADC (Tab. 17, pág. 132), y además indican una clara correlación positiva entre la intensidad de las bandas y la síntesis de nicotina por el tejido de callo de tabaco (Figs. 21 y 18).

Las lecturas densitométricas de los geles (Fig. 23), indicaron que la proteína de 35.500 D que presentaba actividad ODC comprendía aproximadamente el 34 y el 31 %, respectivamente, del total de proteína soluble en los callos con y sin organogénesis crecidos en el medio bajo en auxina, mientras que la proteína de 38.900 D que presentaba actividad ADC comprendía aproximadamente sólo el 19 y el 14 %, del total de esta fracción en los respectivos callos crecidos en este medio. En los cultivos de callo crecidos en el medio alto en auxina, la cantidad de proteína que presentaba actividad ODC (35.500 D) también era superior que la cantidad de aquella que presentaba actividad ADC (38.900 D), la primera comprendió aproximadamente en los callos con y sin organogénesis crecidos en este medio, respectivamente, el 22 y el 19 % del total de proteína soluble, y la segunda aproximadamente el 12 % del total de esta fracción en ambos tipos de callo.

Recientemente, Yang y colab. (1984) han purificado parcialmente y caracterizado ADC y ODC de Nicotiana tabacum var. Ky-14, y han establecido para ADC un peso molecular de 120.000 D y para ODC de 70.000 D. De acuerdo con nuestros resultados, por ello, podríamos suponer, provisionalmente, que en tabaco Burley 21, ADC estuviese constituida de 3 subunidades idénticas y ODC de dos; este es un problema que requiere un estudio más detallado.

Figura 21. Separación de las proteínas solubles de callo de tabaco Burley 21 por PAGE-SDS. Los números de la izquierda indican la $M_r \times 10^{-3}$ de las proteínas patrón. + = callos con organogénesis; - = callos sin organogénesis.

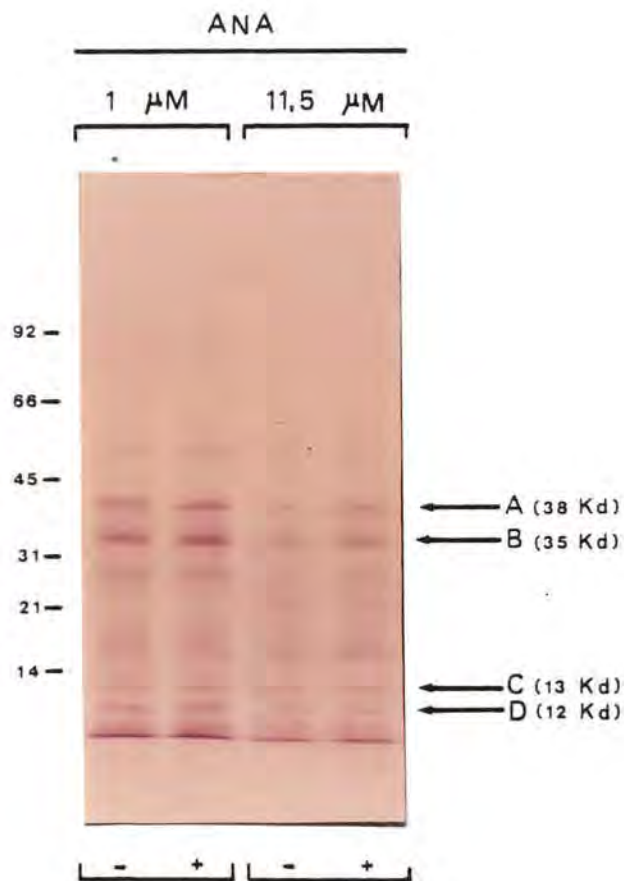


Figura 22. Determinación del peso molecular de las proteínas solubles de callo de tabaco Burley 21 mediante PAGE-SDS. Las proteínas patrón eran: I, Lisocima; II, Inhibidor de tripsina de soja; III, Anhidrasa carbonica; IV, Ovoalbumina; V, Albumina de suero bovino (BSA); VI, Fosforilasa B.

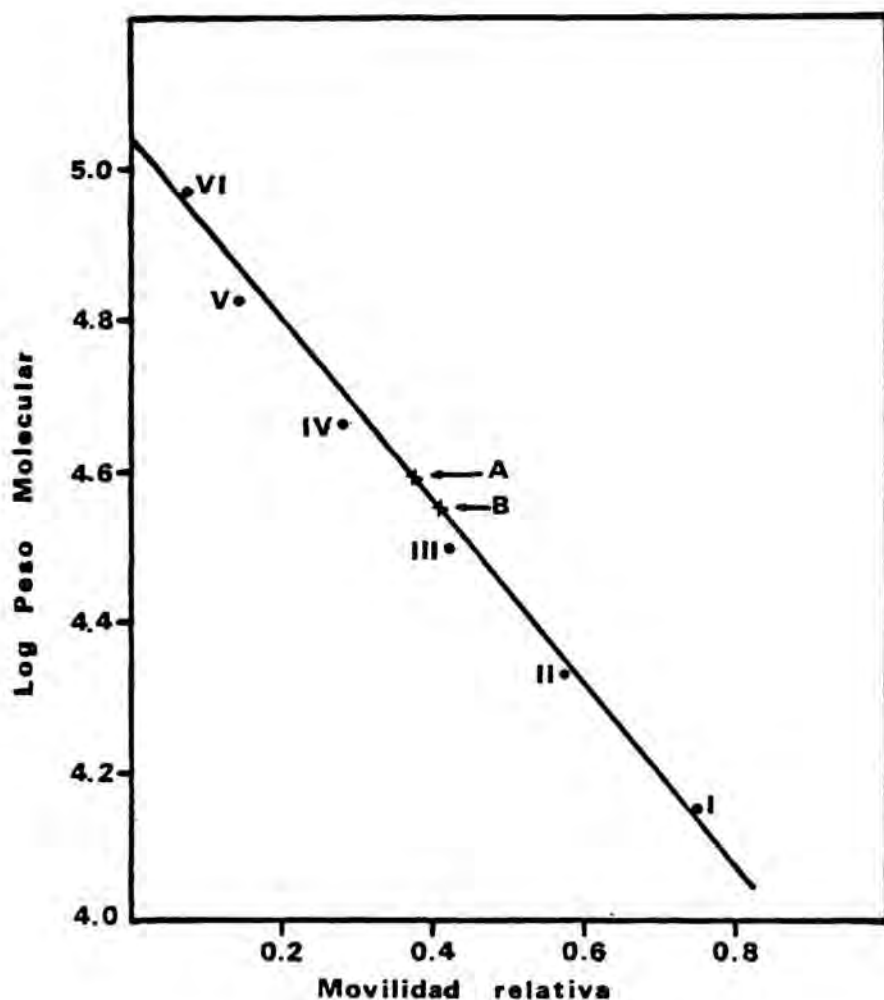
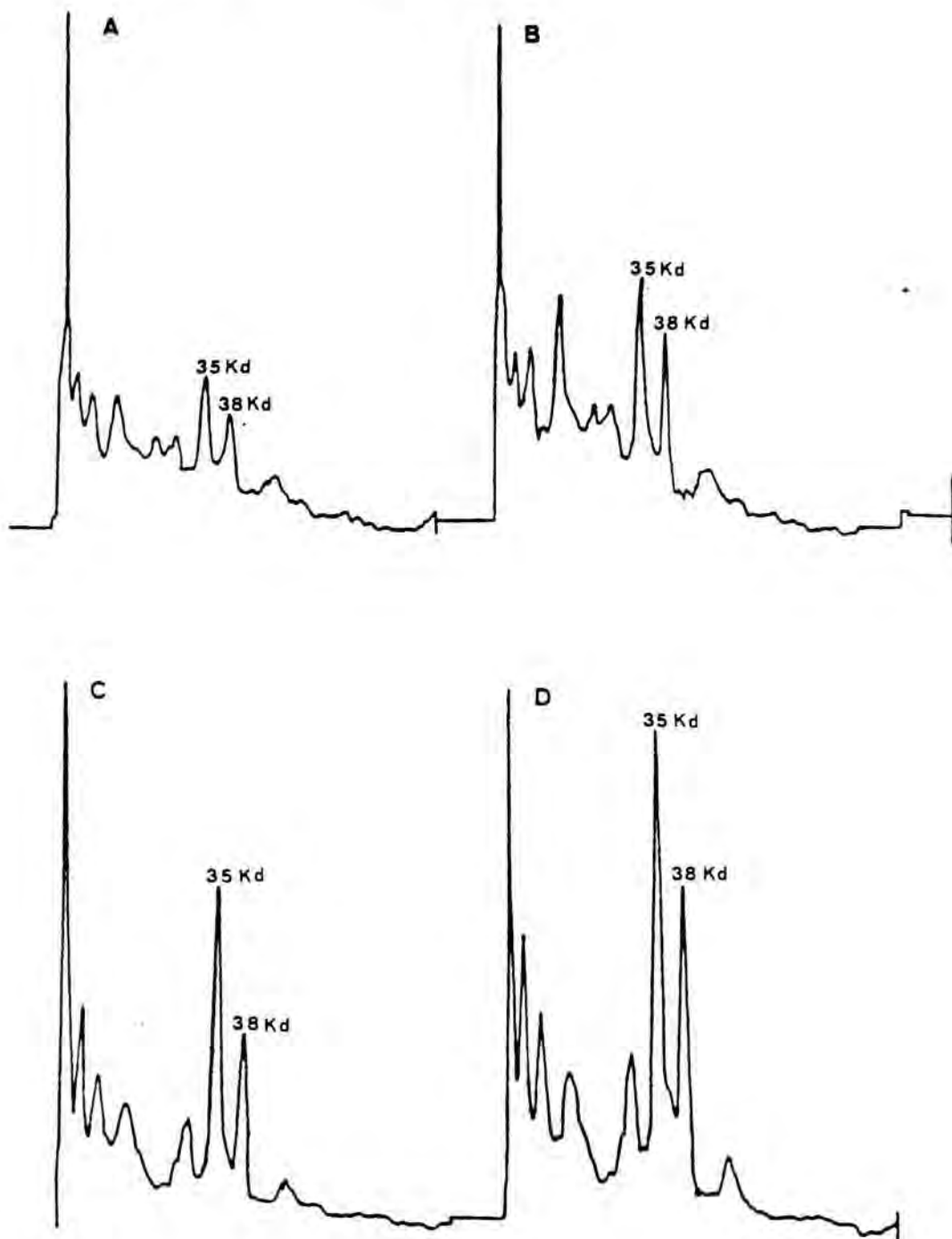


Figura 23. Lecturas densitométricas de las bandas de proteína soluble separadas por PAGE-SDS de los callos crecidos en el medio bajo en auxina -sin (A) y con (B) organogénesis- y de los callos crecidos en el medio alto en auxina -sin (C) y con (D) organogénesis-.



3.6. Aminoácidos libres

(Tablas 18-37, Figuras 24-28)

En la Tabla 36 están representados los contenidos medios \pm el error standard de los 18 α -aminoácidos libres: 16 proteicos y 2 no-proteicos (ácido γ -aminobutírico y ornitina), encontrados en los tejidos de callo crecidos en ambos medios de cultivo, alto y bajo en auxina (11,5 y 1 μ M ANA, respectivamente) después de 6 semanas de cultivo. El aminoácido más abundante era glutamina, seguido, en menor proporción de ácido glutámico y ácido γ -aminobutírico. Sin embargo, arginina, un aminoácido que abunda en estado libre en la planta de tabaco, y un conocido precursor del anillo de pirrolidina de nicotina (Yoshida y Mitake 1966), no se pudo determinar en nuestros cultivos de callo, independientemente de la concentración de auxina en el medio de cultivo.

Entre los aminoácidos libres determinados en nuestros cultivos: ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glutamina, glicina, valina, ácido γ -aminobutírico, histidina, ornitina y prolina, en los callos con y sin organogénesis, y alanina y lisina sólo en aquellos con organogénesis, eran significativamente más altos en los cultivos de callo crecidos sobre el medio bajo en auxina (1 μ M ANA) que en los correspondientes cultivos crecidos sobre el medio alto en auxina (11,5 μ M ANA). Las concentraciones de alanina y lisina, aunque más altas en los callos sin organogénesis crecidos sobre el medio bajo en auxina, no eran afectadas significativamente por la diferente concentración de auxina en el medio de cultivo. Por el contrario, las concentraciones de isoleucina y leucina, eran más altas en las piezas de callo crecidas en el medio alto en auxina -significativamente más altas aquellas de isoleucina en las piezas con y sin or-

ganogénesis, y sólo significativamente más altas las de leucina en las piezas sin organogénesis-. Finalmente, las sumas de los α -aminoácidos libres en los callos con y sin organogénesis crecidos en el medio bajo en auxina, eran significativamente más altas que en los correspondientes callos crecidos en el medio alto en auxina (Tab. 36, Fig. 24).

Como puede apreciarse también en la Tabla 36, las concentraciones de glutamina eran extremadamente altas en nuestros cultivos, constituyendo el 35,41 y el 38,29 % del total de $N-\alpha NH_2$, respectivamente, en los callos con y sin organogénesis crecidos en el medio alto en auxina, y el 45,31 y 37,37 % del total de esta fracción, respectivamente, en aquellos con y sin organogénesis crecidos en el medio bajo en auxina. Las concentraciones de esta amida en nuestros cultivos de callo eran mucho más altas que las observadas en las plantas. Altas concentraciones de glutamina en cultivos in vitro de tabaco fueron ya indicadas por varios investigadores (Stedman 1968, Bergman y colab. 1976, Lawyer y colab. 1980, Lawyer y colab. 1981). Bergman y colab. (1976) atribuyen estas elevadas concentraciones de glutamina a la presencia de NH_3 en el medio, y distinguen un "pool" de reserva de este aminoácido dentro de las vacuolas de las células de tabaco, y un "pool" rápidamente metabolizable en el citoplasma, el cual está vinculado a la síntesis de proteínas.

En los cultivos crecidos en el medio alto en auxina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, alanina, ácido γ -aminobutírico y prolina, representaban en los callos con organogénesis el 4,49, 17,38, 5,11, 6,73, 17,03 y 3,68 %, y en los callos sin organogénesis el 3,38, 17,05, 4,47, 5,70, 15,89 y 4,06 %, respectivamente, de la correspondiente suma de los α -aminoácidos libres (Tab. 36). Es decir, estos seis aminoácidos representaban en la indicada suma: el 54,42 % en las piezas de callo con organogénesis y el 51 % en aque-

llas sin organogénesis crecidas sobre este medio de cultivo. En la Tabla 36 se puede observar también que los α -aminoácidos libres en mayor concentración después de la glutamina, igualmente en los cultivos crecidos en el medio bajo en auxina, eran: ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, alanina, ácido γ -aminobutírico y prolina -representando el 5,13, 13,43, 4,07, 5,11, 15,78 y 3,44 % en los callos con organogénesis, y el 5,25, 16,57, 4,75, 4,53, 17,25 y 4,73 % en los callos sin organogénesis, respectivamente, de la suma-. En este caso, los indicados aminoácidos, constituían en los callos con y sin organogénesis, crecidos con una concentración $1 \mu\text{M}$ de ANA en el medio de cultivo, respectivamente el 4,96 y el 53,08 % de la correspondiente suma del total de α -aminoácidos libres. Respecto a las concentraciones de los restantes aminoácidos en los tejidos de callo con y sin organogénesis crecidos sobre ambos medios de cultivo, representaban, en cada caso, menos del 2 % de la respectiva suma del total de α -aminoácidos libres (Tab. 36).

Por otra parte, en nuestro experimento, las concentraciones de los α -aminoácidos libres determinadas en los tejidos de callo con organogénesis, crecidos sobre ambos medios de cultivo, eran comúnmente superiores a las correspondientes concentraciones de estos metabolitos encontradas para los tejidos de callo sin organogénesis, como puede deducirse de las relaciones de valores que figuran en la Tabla 36. Las relaciones más altas, indican obviamente la presencia de "pools" de α -aminoácidos libres proporcionalmente superiores en los callos con organogénesis que en aquellos sin organogénesis crecidos sobre ambos medios de cultivo. El hecho de que para los tejidos de callo crecidos en las diferentes concentraciones de auxina en el medio de cultivo ($11,5$ y $1 \mu\text{M}$ de ANA), la suma de los valores de los α -aminoácidos determinados fuera superior en los tejidos con orga-

nogénesis que en aquellos sin organogénesis (Tab. 36, Fig. 23) apoya lo expuesto. Es evidente, que con independencia de la concentración de auxina en el medio de cultivo, la capacidad de los callos para formar órganos, afectó a varios sistemas enzimáticos implicados en la síntesis y/o acumulación de los indicados α -aminoácidos.

Como hemos indicado anteriormente, los α -aminoácidos libres más abundantes en nuestros cultivos después de glutamina, eran ácido glutámico y ácido γ -aminobutírico. Los altos niveles de ácido glutámico podrían ser consecuencia, a su vez, de los altos niveles de la amida de este aminoácido; es bien conocido, que en los tejidos vegetales la glutamina puede metabolizarse a ácido glutámico (Givan 1979). Esta interpretación viene apoyada por el hecho de que, en las condiciones de este experimento, existe una clara correlación positiva entre los valores de glutamina y ácido glutámico en los tejidos de callo con y sin organogénesis crecidos sobre ambos medios de cultivo -alto y bajo en auxina- (Tab. 36, Fig. 25).

Aunque, de acuerdo con Noguchi y Tamaki (1962), el ácido γ -aminobutírico (GABA), es el aminoácido libre más abundante en las hojas de plantas de tabaco, las concentraciones de este aminoácido eran también, en nuestros cultivos de callo, mucho más altas que en la planta intacta, especialmente en aquellos crecidos sobre el medio bajo en auxina (Fig. 26).

Según se puede deducir de los datos que figuran en la Tabla 36, el valor medio de GABA en los callos crecidos en el medio bajo en auxina era 1,5 veces superior que en aquellos crecidos sobre el medio alto en auxina. GABA, como nicotina, es otro metabolito potencial de putrescina en las plantas superiores (Wielgat y Kleczkowski 1971, Slocum y colab. 1984),

y de manera similar a lo que sucede con el alcaloide, los valores de GABA en nuestros cultivos de callo presentaban una correlación positiva con las cantidades de putrescina soluble (S), y negativa con aquellas de putrescina ligada soluble (LS) (Tabs. 13 y 36). Parece por ello que, en las condiciones de este trabajo, la concentración $1 \mu\text{M}$ de ANA en el medio de cultivo ocasionaba también un incremento de la síntesis de GABA, vía putrescina, en los callos crecidos en este medio, y en mayor proporción en aquellos con organogénesis.

En las plantas en condiciones de moderado a severo "stress", uno de los cambios más espectaculares en el "pool" de nitrógeno soluble se debe al marcado incremento (10-100 veces) del aminoácido prolina, primeramente observado por Kemble y MacPherson (1954), y considerado actualmente como un fenómeno general (Hanson y Hitz 1982). En nuestros cultivos, el contenido de prolina era importante e incrementó, según se puede deducir también de los valores que figuran en la Tabla 36, más de 1,5 veces por término medio, en los tejidos de callo crecidos en el medio bajo en auxina en relación con aquellos crecidos en el medio alto, en respuesta, probablemente, al mayor grado en la deficiencia de K^+ inducido en los primeros por la concentración $1 \mu\text{M}$ de ANA en el medio de cultivo (Fig. 27). En la planta, las condiciones ácidas que acompañan a la deficiencia de K^+ , inducen la síntesis de prolina (Göring y Bui Huy Thien 1979). Por otra parte, el hecho de que las piezas de callo crecidas sobre ambos medios de cultivo, tuvieran niveles de prolina más altos en las piezas con organogénesis que en aquellas sin organogénesis (1,18 y 1,03 veces más altos, respectivamente, en los medios alto y bajo en auxina), podría deberse a una respuesta al "stress" adicional causado en estos callos por la mayor acumulación de metabolitos, como es el caso de ni-

cotina (Tabs. 13 y 36).

Si nos referimos únicamente a los aminoácidos precursores iniciales de nicotina: ácido glutámico, prolina, ornitina y arginina del anillo de pirrolidina, y ácido aspártico del anillo de piridina (Lamberts y Byerrum 1958, Lamberts y colab. 1959, Wu y colab. 1962, Yoshida y Mitake 1966), sorprendentemente, como se ha indicado anteriormente, no se encontró arginina libre en nuestros cultivos de callo, mientras que las concentraciones de ácido glutámico, prolina, ornitina y ácido aspártico, según se puede observar en la Tabla 36, eran considerables en los callos crecidos sobre ambos medios de cultivo. Estos últimos aminoácidos constituyeron el 26,31 y el 25,91 % de la suma de α -aminoácidos libres determinados, respectivamente, en los callos con y sin organogénesis crecidos en el medio alto en auxina, y el 22,63 y 27,39 % del total de esta fracción, respectivamente, en aquellos con y sin organogénesis crecidos en el medio bajo en auxina. Por otra parte, no sólo la suma de las concentraciones de estos últimos cuatro aminoácidos en los callos con y sin organogénesis, crecidos en el medio bajo en auxina, sino también sus concentraciones individuales, eran significativamente más altas que aquellas encontradas en los respectivos cultivos crecidos en el medio alto en auxina (Tab. 37, Fig. 28). Estos resultados, parecen sugerir que ambas concentraciones de auxina en el medio de cultivo, 11,5 μM y 1 μM de ANA, respectivamente, supra-óptima y óptima para la síntesis de nicotina, si bien determinaron una severa reducción del "pool" de arginina libre en los cultivos de callo crecidos sobre ambos medios, no afectaron de igual manera a los "pools" de los otros aminoácidos precursores de nicotina. Por el contrario, la concentración de auxina, en el medio de cultivo, óptima para la síntesis de nicotina (1 μM ANA), ocasionó un incremento significativo de los "pools"

de ácido glutámico, prolina, ornitina y ácido aspártico, en los cultivos de callo crecidos sobre este medio, cuando comparados con aquellos de los respectivos cultivos crecidos con la concentración supra-óptima de auxina en el medio (Tab. 37).

La presencia de NH_3 en el medio, indicada por la acumulación de glutamina (Bergmann y colab. 1976), y por ello tan evidente en nuestros cultivos de callo (Tab. 36), podría haber contribuido al modelo de aminoácidos que hemos descrito para los mismos y, a la vez, a su elevada actividad ODC. La posible reducción del nivel de ATP en las mitocondrias, debida a la inhibición de la oxidación del $\text{NADH}+\text{H}^+$, vía la cadena de transporte de electrones, por el NH_3 presente en el medio (Vines y Wedding 1960), podría haber afectado negativamente la síntesis de carbamil-fosfato en estos orgánulos (Glasgow y Peterchase 1977) y, consecuentemente, a la de citrulina y arginina a través del ciclo de la ornitina (Fig. 1, pág. 21). Esto se traduciría obviamente en una reducción del "pool" de arginina, una acumulación de ornitina y un incremento de la actividad ODC de los tejidos vegetales. Por otra parte, la indicada inhibición de la oxidación del $\text{NADH}+\text{H}^+$, vía la cadena de transporte de electrones, en las condiciones de este experimento, podría resultar en un incremento de piridin nucleótido para la síntesis del anillo de piridina de nicotina (Fig. 2, pág. 35). En nuestros resultados, también se puede observar una clara correlación positiva entre los niveles de ácido aspártico (el aminoácido precursor del anillo de piridina de nicotina) y nicotina, en los callos con y sin organogénesis, crecidos sobre ambos medios de cultivo (Tabs. 13 y 36). Finalmente, como se ha indicado anteriormente, en los tejidos vegetales la glutamina puede metabolizarse a ácido glutámico (Givan 1979), uno de los precursores de nicotina vía ornitina. Puesto que existe

una clara correlación positiva entre los valores de glutamina, ácido glutámico y nicotina en los callos con y sin organogénesis crecidos sobre ambos medios (Tabs. 13 y 36), es lógico suponer una alta producción de ornitina, producida de ácido glutámico, que podría, en nuestros cultivos, contribuir a la elevada actividad ODC de los mismos y a la incrementada síntesis de putrescina y nicotina (Tabs. 13 y 17).

Tabla 18. ASPARTICO ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
50,45	38,57		93,24	56,96	
57,07	30,21		91,89	73,77	
50,68	34,70		95,97	60,69	
53,83	33,48		97,01	78,47	
54,78	30,98		92,82	69,62	
49,62	38,98		92,31	67,85	
\bar{x}_1 52,74	\bar{x}_2 34,49	1,53	\bar{x}_3 93,87	\bar{x}_4 67,89	1,38

Tabla 19. TREONINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
14,94	6,29		18,57	14,41	
14,16	5,38		16,45	12,57	
15,20	5,60		15,96	13,76	
14,56	6,39		15,60	11,00	
14,22	6,81		14,65	12,37	
15,24	5,88		16,28	12,79	
\bar{x}_1 14,72	\bar{x}_2 6,06	2,43	\bar{x}_3 16,25	\bar{x}_4 12,82	1,27

Tabla 20. SERINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
25,11	10,97		34,69	19,49	
26,91	12,99		32,80	20,07	
26,81	8,20		37,54	16,09	
27,01	13,07		34,21	16,21	
26,92	10,70		35,07	15,52	
28,87	8,39		36,01	20,45	
\bar{x}_1 26,94	\bar{x}_2 10,72	2,51	\bar{x}_3 35,05	\bar{x}_4 17,97	1,95

Tabla 21. GLUTAMICO ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
200,80	143,41		231,97	210,17	
203,38	153,04		241,16	218,35	
209,00	164,71		263,21	214,39	
200,87	145,49		247,77	218,44	
202,26	151,58		256,37	211,17	
210,04	164,09		235,69	213,28	
\bar{x}_1 204,39	\bar{x}_2 153,72	1,33	\bar{x}_3 246,03	\bar{x}_4 214,30	1,15

Tabla 22. GLUTAMINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
436,47	391,38		659,51	441,57	
303,36	286,59		957,62	419,81	
785,92	357,28		871,91	588,80	
303,67	319,87		795,45	453,26	
349,56	336,06		726,17	466,18	
588,75	379,36		967,42	530,72	
\bar{x}_1 461,29	\bar{x}_2 345,09	1,34	\bar{x}_3 829,68	\bar{x}_4 483,39	1,72

Tabla 23. GLICINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
56,72	42,43		76,71	57,95	
59,24	44,22		74,47	63,33	
61,82	34,32		73,62	63,04	
62,34	43,70		73,51	57,77	
57,41	30,55		73,24	63,59	
62,65	46,76		75,93	62,96	
\bar{x}_1 60,03	\bar{x}_2 40,33	1,49	\bar{x}_3 74,58	\bar{x}_4 61,44	1,25

Tabla 24. ALANINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
71,97	48,70		95,43	52,87	
81,45	48,31		92,06	59,40	
85,12	57,10		90,83	61,21	
74,87	47,32		95,68	61,93	
83,39	58,63		91,41	55,31	
77,92	48,16		95,83	61,02	
\bar{x}_1 79,12	\bar{x}_2 51,37	1,54	\bar{x}_3 93,54	\bar{x}_4 58,62	1,59

Tabla 25. VALINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
15,07	14,70		16,29	13,56	
13,46	11,03		14,86	14,18	
14,22	9,75		15,42	14,35	
14,72	10,54		18,85	15,09	
15,55	9,89		16,67	13,07	
14,45	14,98		17,33	15,49	
\bar{x}_1 14,58	\bar{x}_2 11,80	1,23	\bar{x}_3 16,57	\bar{x}_4 14,29	1,16

Tabla 26. METIONINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 $\mu\text{M ANA}$			1 $\mu\text{M ANA}$		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
1,95	2,91		-	-	
1,91	5,09		-	-	
2,08	-		-	-	
-	-		-	-	
-	-		-	-	
-	-		-	-	
\bar{x}_1 1,98	\bar{x}_2 4,00	0,49	-	-	-

Tabla 27. ISOLEUCINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 $\mu\text{M ANA}$			1 $\mu\text{M ANA}$		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
9,15	7,68		6,26	10,30	
9,75	9,26		6,10	8,73	
8,63	8,06		6,16	11,00	
9,86	7,30		6,78	10,97	
8,92	7,05		5,89	12,26	
9,79	9,13		6,74	10,40	
\bar{x}_1 9,38	\bar{x}_2 8,08	1.16	\bar{x}_3 6,32	\bar{x}_4 10,61	0,59

Tabla 28. LEUCINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
11,12	19,94		13,55	16,01	
14,90	19,93		11,91	16,59	
14,90	19,35		12,26	18,40	
14,79	18,70		13,71	18,21	
15,55	18,99		13,99	19,64	
12,32	19,97		11,74	15,93	
\bar{x}_1 13,93	\bar{x}_2 19,48	0,71	\bar{x}_3 12,86	\bar{x}_4 17,46	0,74

Tabla 29. FENILALANINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
5,41	5,19		7,66	5,39	
5,51	4,72		5,98	5,99	
3,41	4,59		6,90	6,48	
3,90	6,98		8,28	6,21	
5,79	6,86		8,64	6,35	
3,34	5,61		5,76	6,66	
\bar{x}_1 4,56	\bar{x}_2 5,66	0,80	\bar{x}_3 7,20	\bar{x}_4 6,18	1,16

Tabla 30. ACIDO γ -AMINOBUTIRICO ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
210,81	110,21		265,98	233,90	
196,26	138,83		289,91	224,14	
185,48	175,02		273,98	211,40	
208,22	148,77		305,94	220,72	
211,60	111,54		310,10	216,14	
188,78	174,89		287,97	232,60	
\bar{x}_1 200,19	\bar{x}_2 143,21	1,40	\bar{x}_3 288,98	\bar{x}_4 223,15	1,29

Tabla 31. HISTIDINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
11,02	8,26		14,83	14,40	
11,59	8,37		15,04	12,39	
11,37	5,48		18,48	15,67	
10,83	7,04		16,02	18,98	
11,06	8,61		17,82	12,81	
12,11	5,98		14,36	17,91	
\bar{x}_1 11,33	\bar{x}_2 7,29	1,55	\bar{x}_3 16,09	\bar{x}_4 15,36	1,05

Tabla 32. ORNITINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
9,38	11,81		12,46	11,09	
9,90	8,73		10,23	10,38	
6,48	7,62		13,80	12,11	
6,92	6,44		12,27	9,14	
10,50	10,32		10,21	10,85	
10,31	7,77		10,75	11,85	
\bar{x}_1 8,91	\bar{x}_2 8,78	1,01	\bar{x}_3 11,62	\bar{x}_4 10,90	1,07

Tabla 33. LISINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
14,35	12,50		18,58	15,25	
11,38	14,23		13,67	17,12	
8,99	16,80		17,32	14,11	
8,41	12,30		17,47	15,59	
9,21	16,13		16,23	16,27	
13,21	15,38		15,55	15,20	
\bar{x}_1 10,92	\bar{x}_2 14,56	0,75	\bar{x}_3 16,47	\bar{x}_4 15,59	1,06

Tabla 34. PROLINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
45,81	39,29		62,45	60,29	
40,23	38,94		63,66	66,52	
43,75	35,83		58,86	56,77	
42,66	33,00		62,37	55,39	
40,95	37,14		69,83	58,87	
46,15	35,39		60,60	69,37	
\bar{x}_1 43,26	\bar{x}_2 36,60	1,18	\bar{x}_3 62,96	\bar{x}_4 61,20	1,03

Tabla 35. TIROSINA ($\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$)

11,5 μM ANA			1 μM ANA		
Con org.	Sin org.	\bar{x}_1/\bar{x}_2	Con org.	Sin org.	\bar{x}_3/\bar{x}_4
2,37	-		4,35	1,50	
-	-		1,82	2,99	
-	-		-	-	
-	-		-	-	
-	-		-	-	
-	-		-	-	
\bar{x}_1 2,37	\bar{x}_2 -	-	\bar{x}_3 3,08	\bar{x}_4 2,25	1,37

Tabla 36. Contenido de aminoácidos libres en cultivo de callo de tabaco. Los valores son la media de 6 análisis \pm ES. ***P \leq 0,001 \angle **P \leq 0,01 \angle *P \leq 0,05; NS = diferencias no significativas.

Amino- ácidos	Organos	$\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$				% aminoácidos	
		11,5 μM		1 μM		11,5 μM	1 μM
		ANA		ANA		ANA	ANA
Asp	Presentes	52,74 \pm 1,20	r=1,53	93,87 \pm 0,86	r=1,38	4,49	5,13
	Ausentes	34,49 \pm 1,51		67,89 \pm 3,27		3,83	5,25
Tre	Presentes	14,72 \pm 0,19	r=2,43	16,25 \pm 0,53	r=1,27	1,25	0,89
	Ausentes	6,06 \pm 0,21		12,82 \pm 0,48		0,67	0,99
Ser	Presentes	26,94 \pm 0,49	r=2,51	35,05 \pm 0,66	r=1,95	2,29	1,91
	Ausentes	10,72 \pm 0,87		17,97 \pm 0,92		1,19	1,39
Glu	Presentes	204,39 \pm 1,67	r=1,33	246,03 \pm 4,94	r=1,15	17,38	13,43
	Ausentes	153,72 \pm 3,68		214,30 \pm 1,43		17,05	16,57
Gln	Presentes	416,29 \pm 78,42	r=1,34	829,68 \pm 50,98	r=1,72	35,41	45,31
	Ausentes	345,09 \pm 15,92		483,39 \pm 26,04		38,29	37,37
Gly	Presentes	60,03 \pm 1,06	r=1,49	74,58 \pm 0,58	r=1,25	5,11	4,07
	Ausentes	40,33 \pm 2,61		61,44 \pm 1,13		4,47	4,75

Ala	Presentes	79,12 ± 2,08	r=1,54	93,54 ± 0,96	r=1,59	***	6,73	5,11
	Ausentes	51,37 ± 2,07		58,62 ± 1,51		NS	5,70	4,53
Val	Presentes	14,58 ± 0,29	r=1,23	16,57 ± 0,58	r=1,16	*	1,24	0,90
	Ausentes	11,80 ± 0,98		14,29 ± 0,37		*	1,31	1,10
Met	Presentes	1,98 ± 0,09	r=0,49	-			0,17	-
	Ausentes	4,00 ± 1,54		-			0,44	-
Ile	Presentes	9,38 ± 0,23	r=1,16	6,32 ± 0,15	r=0,59	***	0,80	0,34
	Ausentes	8,08 ± 0,38		10,61 ± 0,47		***	0,90	0,82
Leu	Presentes	13,93 ± 0,72	r=0,71	12,86 ± 0,41	r=0,74	NS	1,18	0,70
	Ausentes	19,48 ± 0,22		17,46 ± 0,62		***	2,16	1,35
Fen	Presentes	4,56 ± 0,46	r=0,80	7,20 ± 0,48	r=1,16	***	0,39	0,39
	Ausentes	5,66 ± 0,42		6,18 ± 0,18		NS	0,63	0,48
GABA	Presentes	200,19 ± 4,72	r=1,40	288,98 ± 7,05	r=1,29	***	17,03	15,78
	Ausentes	143,21 ± 11,77		223,15 ± 3,65		***	15,89	17,25
His	Presentes	11,33 ± 0,19	r=1,55	16,09 ± 0,69	r=1,05	***	0,96	0,88
	Ausentes	7,29 ± 0,54		15,36 ± 1,09		**	0,81	1,19
Orn	Presentes	8,91 ± 0,72	r=1,01	11,62 ± 0,59	r=1,07	**	0,76	0,63
	Ausentes	8,78 ± 0,80		10,90 ± 0,44		*	0,97	0,90
Lis	Presentes	10,92 ± 1,00	r=0,75	16,47 ± 0,70	r=1,06	***	0,93	0,90
	Ausentes	14,56 ± 0,77		15,59 ± 0,42		NS	1,61	1,20

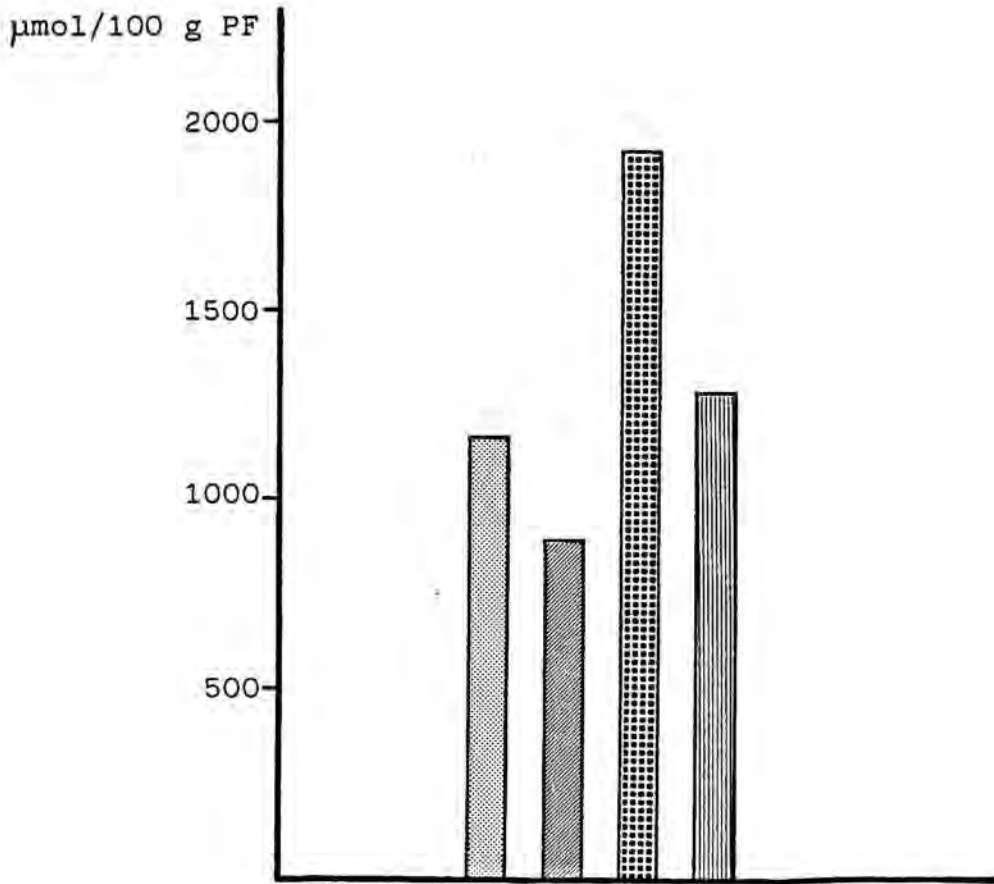
Pro	Presentes	43,26 ± 1,00	r=1,18	62,96 ± 1,53	r=1,03	***	3,68	3,44
	Ausentes	36,60 ± 0,97	-	61,20 ± 2,27	-	***	4,06	4,73
Tir	Presentes	2,37	-	3,08 ± 1,79	r=1,37	NS	0,20	0,17
	Ausentes	-	-	2,25 ± 1,05	-	-	-	0,17
SUMA	Presentes	1175,64 ± 188,05	r=1,30	1831,15 ± 120,31	r=1,41	***	100	100
	Ausentes	901,24 ± 49,91	-	1293,39 ± 62,68	-	***	100	100
Suma PIN	Presentes	309,30 ± 4,06	r=1,32	414,18 ± 14,39	r=1,17	***	26,31	22,63
	Ausentes	233,55 ± 9,96	-	354,29 ± 11,86	-	***	25,91	27,39

PIN = Precursores iniciales de nicotina.

Tabla 37. Contenido de aminoácidos precursores iniciales de nicotina en cultivo de callo de tabaco. Los valores son la media de 6 análisis \pm ES. ***P \leq 0,001 \angle **P \leq 0,01 \angle *P \leq 0,05.

Amino- ácidos	Organos	$\mu\text{mol}/100 \text{ g PF}$				% aminoácidos	
		11,5 μM		1 μM		11,5 μM	1 μM
		ANA		ANA		ANA	ANA
Asp	Presentes	52,74 \pm 1,20	r=1,53	93,87 \pm 0,86	r=1,38	*** 4,49	5,13
	Ausentes	34,49 \pm 1,51		67,89 \pm 3,27		*** 3,83	5,25
Glu	Presentes	204,39 \pm 1,67	r=1,33	246,03 \pm 4,94	r=1,15	*** 17,38	13,43
	Ausentes	153,72 \pm 3,68		214,30 \pm 1,43		17,05	16,57
Orn	Presentes	8,91 \pm 0,72	r=1,01	11,62 \pm 0,59	r=1,07	** 0,76	0,63
	Ausentes	8,78 \pm 0,80		10,90 \pm 0,44		* 0,97	0,90
Pro	Presentes	43,26 \pm 1,00	r=1,18	62,96 \pm 1,53	r=1,03	*** 3,68	3,44
	Ausentes	36,60 \pm 0,97		61,20 \pm 2,27		*** 4,06	4,73
SUMA	Presentes	309,30 \pm 4,06	r=1,32	414,18 \pm 14,39	r=1,17	*** 26,31	22,63
	Ausentes	233,55 \pm 9,96		354,29 \pm 11,86		*** 25,91	27,39

Figura 24. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el contenido total de aminoácidos libres de cultivo de callo de tabaco.



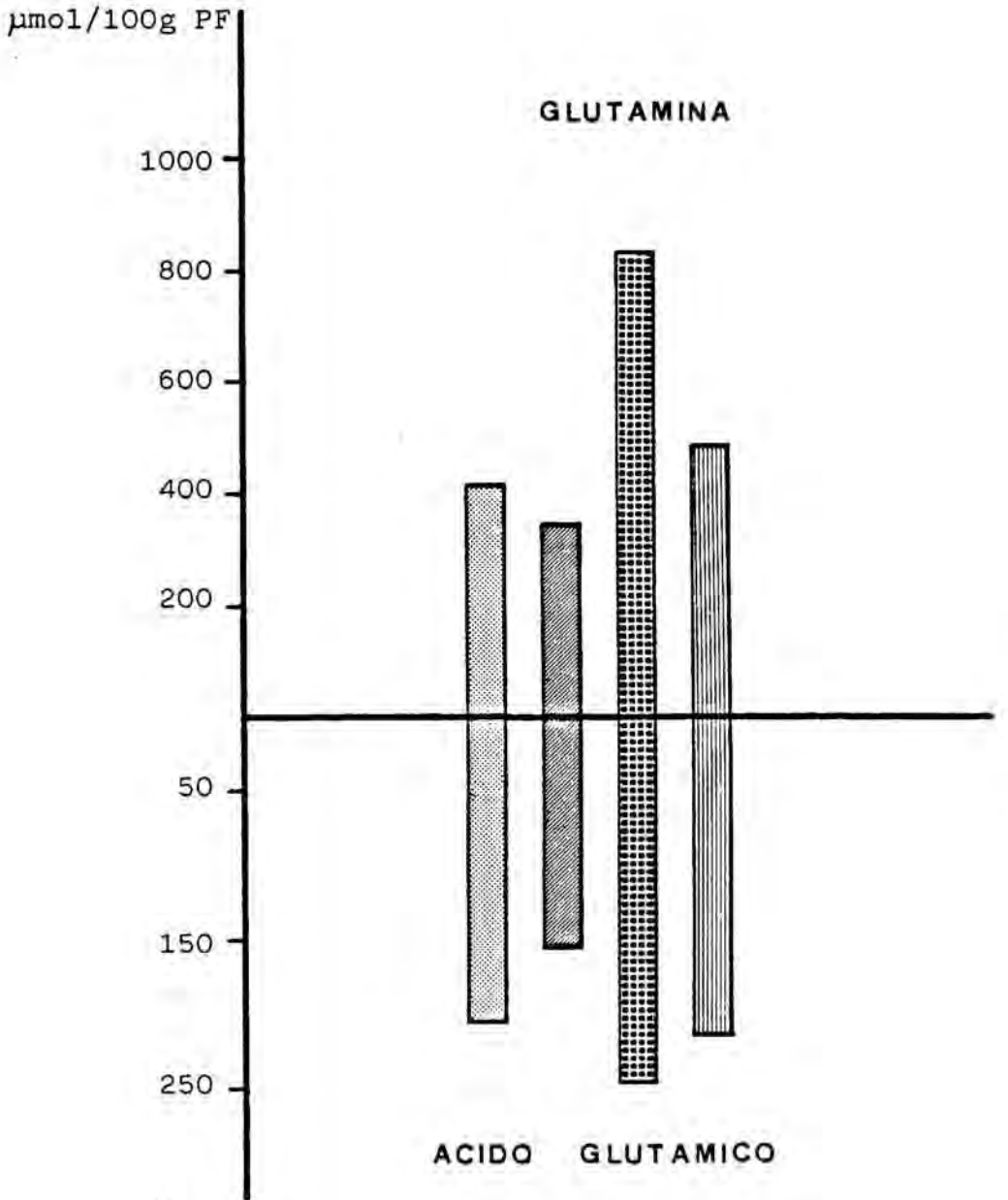
■ Callos con organogénesis (11,5 µM ANA)

■ Callos sin organogénesis (11,5 µM ANA)

■ Callos con organogénesis (1 µM ANA)

■ Callos sin organogénesis (1 µM ANA)

Figura 25. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre los contenidos de ácido glutámico y glutamina en cultivo de callo de tabaco.



- Callos con organogénesis (11,5 μM ANA)
- ▣ Callos sin organogénesis (11,5 μM ANA)
- ▤ Callos con organogénesis (1 μM ANA)
- ▥ Callos sin organogénesis (1 μM ANA)

Figura 26. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el contenido de ácido γ -aminobutírico en cultivo de callo de tabaco.

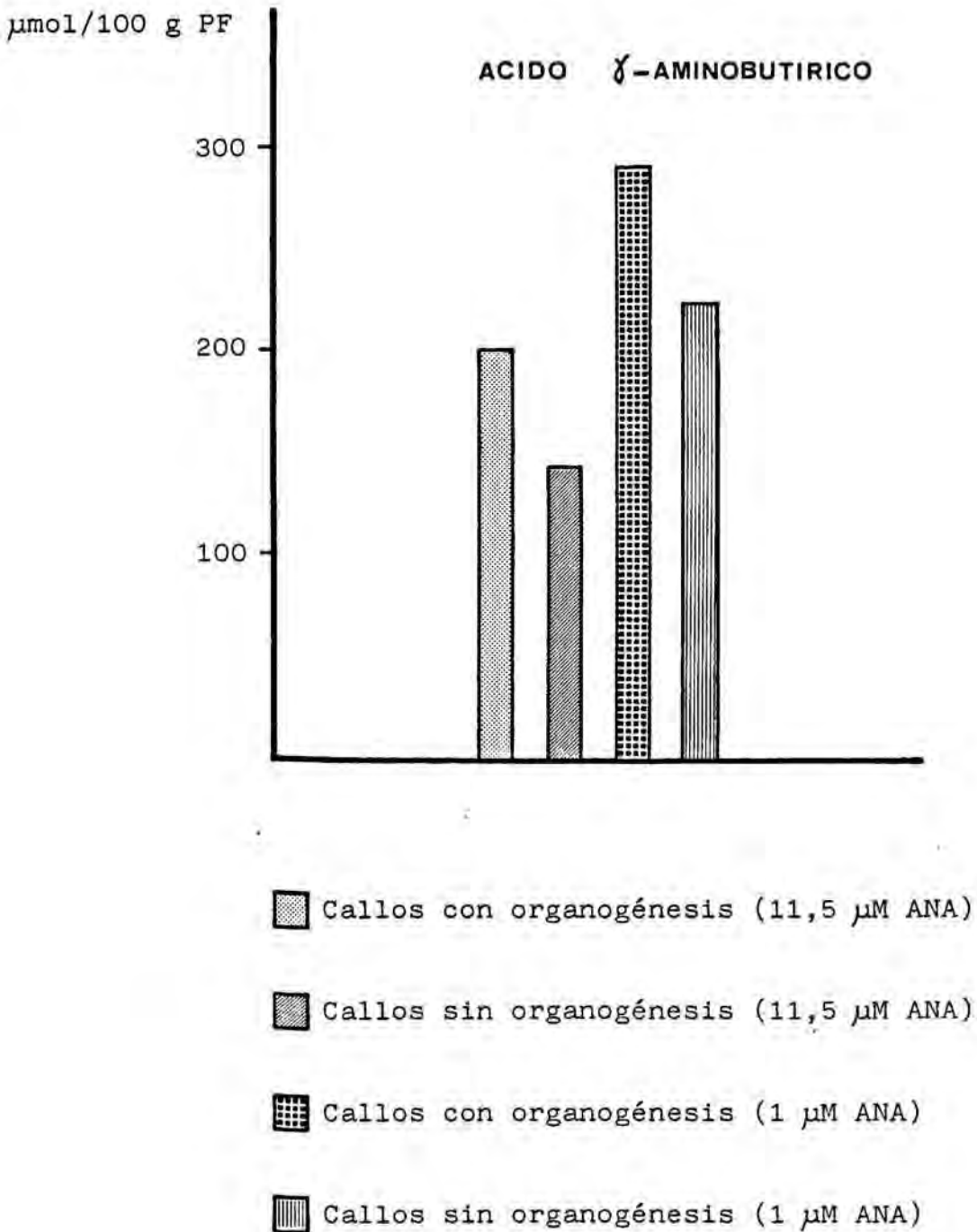
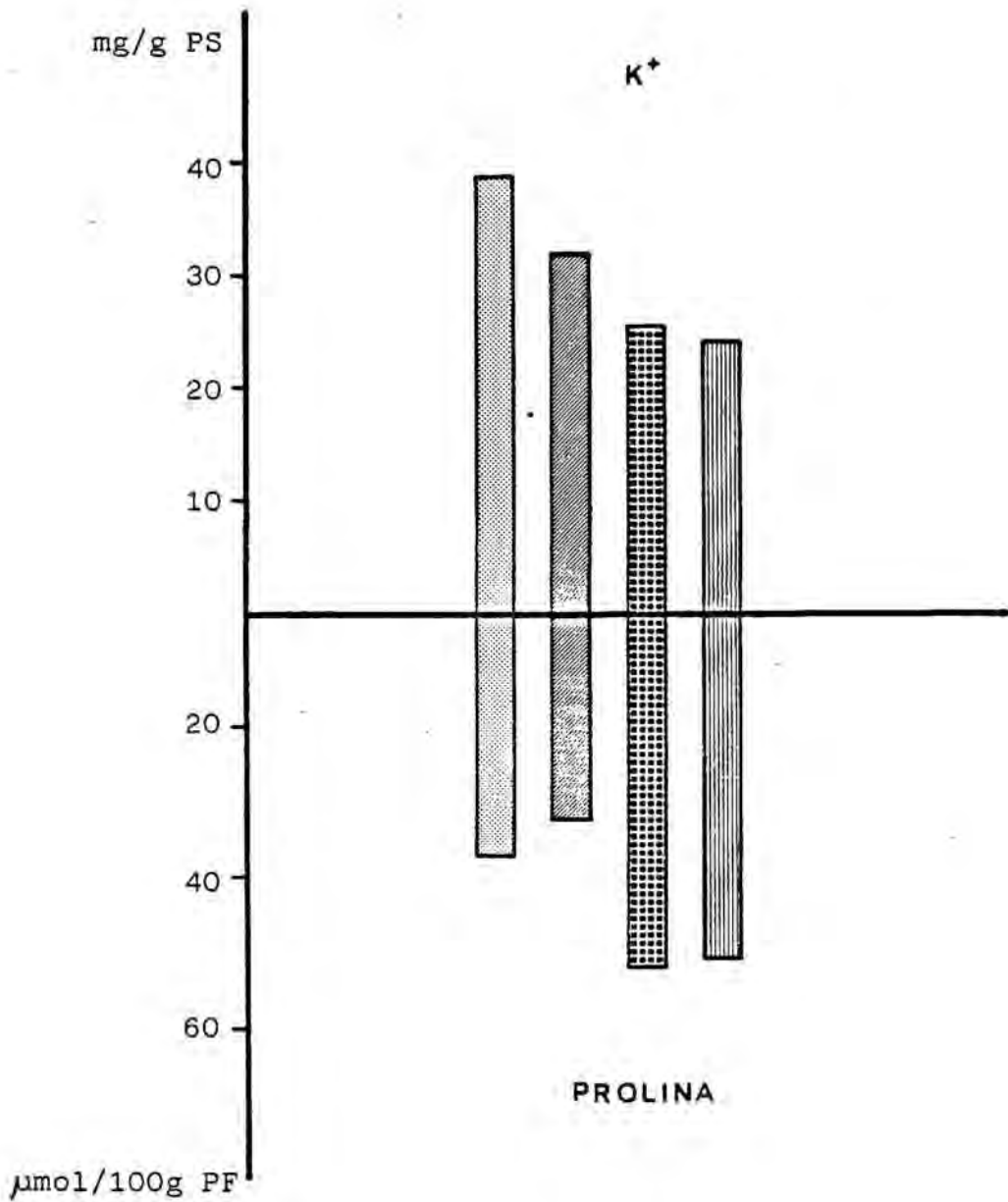
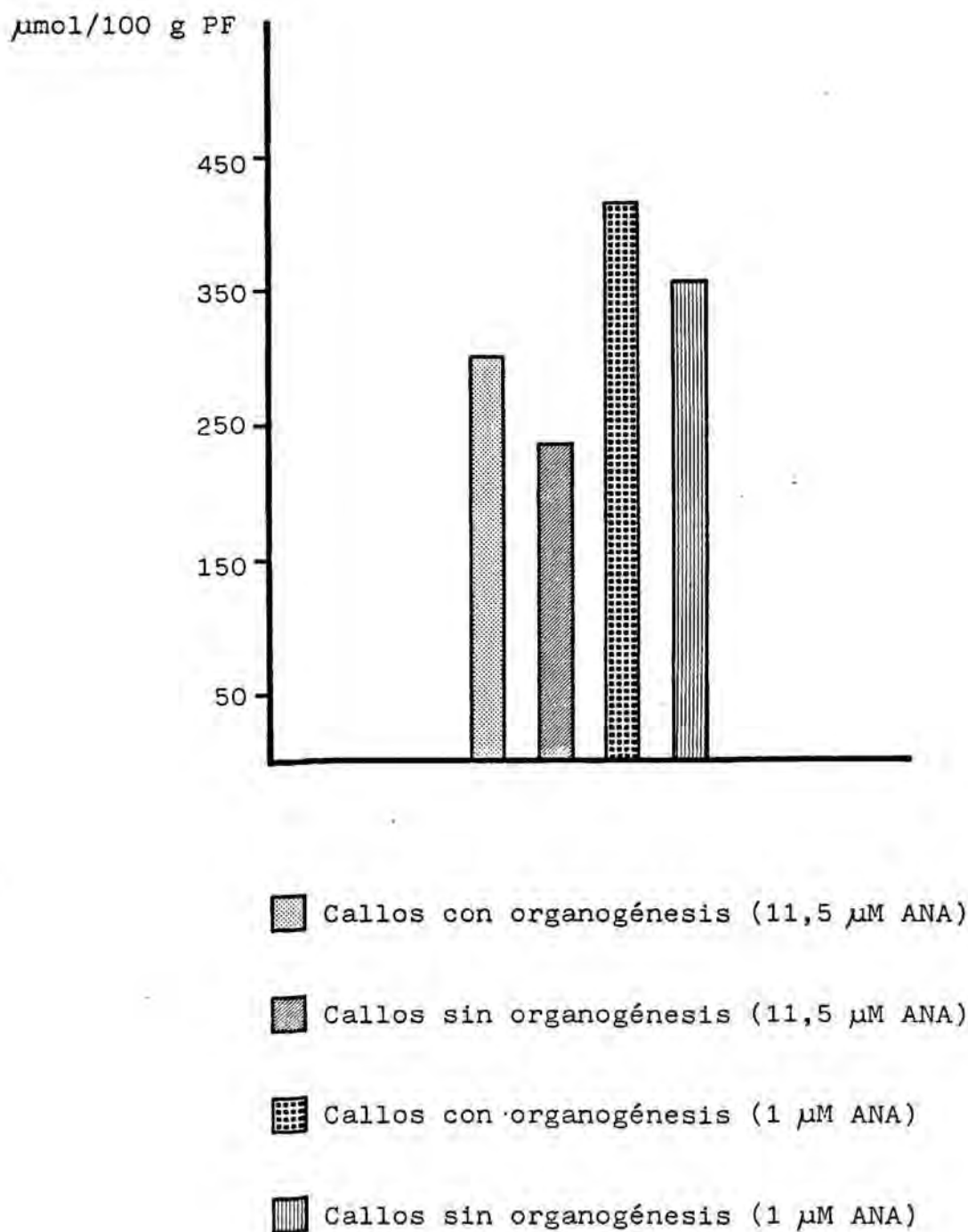


Figura 27. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre los contenidos de K^+ y prolina en cultivo de callo de tabaco



- Callos con organogénesis (11,5 μM ANA)
- Callos sin organogénesis (11,5 μM ANA)
- ▣ Callos con organogénesis (1 μM ANA)
- ▣ Callos sin organogénesis (1 μM ANA)

Figura 28. Efecto de la concentración de auxina en el medio de cultivo sobre el contenido de aminoácidos precursores iniciales de nicotina en cultivo de callo de tabaco.



4. CONCLUSIONES

1.- La concentración de auxina en el medio de cultivo ha influido muy considerablemente sobre el crecimiento y la organogénesis de los tejidos de callo. En el medio con una concentración 11,5 μM de ANA (alto en auxina), los callos han crecido activamente, y aquellos con organogénesis han formado principalmente raíces; por el contrario, en el medio con una concentración 1 μM de ANA (bajo en auxina), los callos han crecido mucho menos y en su organogénesis han formado también yemas de tallo en alta proporción.

2.- La existencia en nuestros cultivos de callo de una correlación positiva entre la concentración de auxina en el medio de cultivo y los valores de peso fresco y peso seco, a la vez que una correlación negativa entre la indicada concentración de auxina y los valores de porcentaje de peso seco referidos a peso fresco, indican una baja relación vacuola/citoplasma en los callos crecidos en el medio con una concentración 1 μM de ANA, lo cual, consecuentemente, respondería de las diferencias observadas en la proporción de crecimiento entre los callos crecidos sobre ambos medios de cultivo. Evidencia adicional para esta interpretación, la aporta el hecho de que el contenido de agua en los callos crecidos en el medio alto en auxina, era significativamente superior que en aquellos crecidos en el medio bajo en auxina.

3.- La concentración 1 μM de ANA en el medio de cultivo ha reducido significativamente el contenido de K^+ de los tejidos de callo crecidos sobre este medio de cultivo. Sin em-

bargo, aunque sólo los tejidos de callo crecidos sobre el medio bajo en auxina muestran claros síntomas de deficiencia de K^+ , los tejidos de callo crecidos en el medio alto en auxina también deben ser considerados deficientes en K^+ de acuerdo con los datos citados por Evans y Sorger (1966).

4.- Lo indicado anteriormente y la opinión generalizada de que en los tejidos jóvenes, el K^+ es indispensable para la obtención del turgor celular óptimo, el cual se requiere para la extensión celular, sugieren que en los callos crecidos sobre el medio bajo en auxina, la reducción del contenido de agua y la proporción de crecimiento pueden deberse, a su vez, a la reducción de la toma de K^+ por las células de estos tejidos, condicionada por la concentración $1 \mu M$ de ANA en el medio de cultivo.

5.- Los niveles de los α -aminoácidos libres, salvo aquellos de leucina e isoleucina, han incrementado considerablemente en los callos crecidos en el medio bajo en auxina, probablemente en respuesta a la deficiencia de K^+ más severa ocasionada por la concentración $1 \mu M$ de ANA en el medio de cultivo.

6.- Los niveles extremadamente altos de glutamina encontrados en nuestros cultivos, muy superiores a aquellos de la planta intacta, serían debidos de acuerdo con Bergman y colab. (1976) a la presencia de NH_3 en el medio. Nosotros sugerimos que la indicada presencia de amonio en el medio, ha contribuido además al modelo de α -aminoácidos observado en nuestros cultivos, al inhibir la oxidación del $NADH+H^+$ vía la cadena de transporte de electrones vinculada a la respiración aerobia.

7.- Respecto a los aminoácidos precursores iniciales de nicotina, sorprendentemente, no se ha encontrado arginina libre en nuestros cultivos, mientras que las concentraciones de ácido glutámico, prolina, ornitina y ácido aspártico es-

tán en proporción considerable en los callos crecidos sobre ambos medios, y significativamente superiores en aquellos crecidos sobre el medio bajo en auxina. Estos resultados sugieren que ambas concentraciones de auxina en el medio de cultivo, 1 μM y 11,5 μM de ANA, si bien han determinado una severa reducción del "pool" de arginina libre, no han afectado de igual manera a los "pools" de los otros aminoácidos precursores. Por el contrario, la concentración 1 μM de ANA, óptima para la síntesis del alcaloide, ha estimulado significativamente el indicado "pool" de aminoácidos.

8.- Contrariamente a lo expuesto para el K^+ , la concentración 1 μM de ANA en el medio de cultivo, óptima para la síntesis de nicotina, ha incrementado significativamente (más de 4 veces) la síntesis del alcaloide en los callos crecidos sobre este medio de cultivo, en relación a aquellos crecidos con una concentración 11,5 μM de ANA en el medio (supra-óptima). Además, el contenido de alcaloide es muy alto en las yemas de tallo desarrolladas por los callos crecidos en el medio bajo en auxina y extremadamente alto en las raíces desarrolladas por estos callos, lo cual es indicativo, respectivamente, de que las yemas de tallo pueden ejercer el papel de las hojas en la planta intacta, y de que en la misma, la síntesis de nicotina está restringida a la raíz.

9.- Aunque es evidente que la síntesis de nicotina ha sido incrementada considerablemente por la concentración 1 μM de ANA en el medio de cultivo, los resultados indican, a la vez, una alta correlación entre el desarrollo de órganos y el contenido de alcaloide en los tejidos de callo, lo que demuestra la importancia de la diferenciación morfológica para la diferenciación bioquímica requerida para la expresión del metabolismo secundario. Nosotros sugerimos, que las diferencias en la producción de nicotina por los tejidos de callo con y sin organogénesis crecidos sobre un mismo medio de cultivo, están relacionadas con las diferencias en la ca-

pacidad genética de los callos para formar órganos.

10.-La putrescina libre soluble (S) se ha acumulado significativamente en los callos crecidos en el medio bajo en auxina, en relación con los callos crecidos sobre el medio alto. Por el contrario, los callos crecidos sobre el medio bajo tienen niveles significativamente más bajos de putrescina ligada soluble (LS) que aquellos de los callos crecidos sobre el medio alto en auxina. Finalmente, los valores de putrescina ligada insoluble (LI) y putrescina total, son similares en los callos crecidos sobre ambos medios de cultivo.

11.- De lo expuesto se puede concluir que, independientemente de la síntesis de novo de putrescina y de su posterior transformación o degradación, el contenido total de putrescina de nuestros cultivos -con diferentes grados de deficiencia de K^+ - permanece constante dentro de ciertos límites. Se puede suponer, por ello, que la mayor acumulación de putrescina libre (S) en los callos crecidos en el medio bajo en auxina, en relación con aquellos crecidos en el medio alto, resulta principalmente de una mayor proporción de cambio de la diamina ligada soluble (LS) a la forma libre (S), probablemente en respuesta a una deficiencia de K^+ más severa inducida en los primeros callos por la concentración $1 \mu M$ de ANA en el medio de cultivo. Esto estaría de acuerdo con la opinión generalizada de que la acumulación de putrescina en plantas deficientes en K^+ se debe a su función como catión divalente.

12.- Así, en este trabajo se revela en los tejidos de callo crecidos sobre ambos medios de cultivo, la existencia de una correlación positiva entre los niveles de putrescina libre (S) y de nicotina, a la vez que una correlación negativa entre aquellos de putrescina ligada soluble (LS) y del alcaloide, y además se prueba que la putrescina soluble de-

pende más que la putrescina total del contenido de K^+ de los callos.

13.- Los cambios en los contenido de K^+ , putrescina soluble y nicotina, sugieren claramente que, en tejidos de callo de tabaco, la toma de K^+ , la acumulación de putrescina libre soluble (S) y la síntesis de nicotina, son procesos relacionados y dependientes de la concentración de auxina en el medio de cultivo. La putrescina libre soluble (LS) acumulada en los callos deficientes en K^+ , es probablemente la causa del incremento de la síntesis de nicotina por un efecto de acción de masa.

14.- A pesar de haberse sostenido que la descarboxilación de arginina constituye el principal camino para la biosíntesis de putrescina en las plantas, los cambios en las actividades ADC y ODC, sugieren que, en las condiciones de este experimento, ODC es el principal enzima implicado en la biosíntesis de putrescina y nicotina en tejido de callo de tabaco. Sin embargo, el hecho de que las actividades de ambas descarboxilasas se manifestaran en nuestros cultivos de callo, indica que la síntesis de putrescina puede implicar ambos enzimas. Nosotros sugerimos, por ello, que en los tejidos vegetales la contribución relativa de ADC y ODC a la biosíntesis de putrescina, y consecuentemente de nicotina, depende del tipo de tejido y de los procesos de crecimiento condicionados por el medio.

15.- El análisis por PAGE-SDS de la proteína soluble de los callos crecidos sobre ambos medios de cultivo y la determinación de las actividades enzimáticas en los geles duplicados sin teñir, han aportado evidencia adicional al hecho de que, en nuestros cultivos, independientemente de la concentración de auxina en el medio, la actividad de ODC fuera superior a aquella de ADC, e indican una clara correlación positiva entre la intensidad de las bandas con la ac-

tividad ODC y ADC y la capacidad de los callos para la acumulación de putrescina libre y nicotina.

16.- De acuerdo con nuestros resultados que indican, para ADC y ODC, respectivamente, unos pesos moleculares aproximados de 38,9 kD y 35,5 kD, y aquellos de Yang y colab. (1984), que establecen para ADC un peso molecular de 120 kD y para ODC de 70 kD, en tabaco Ky-14, se podría deducir, provisionalmente, que en tabaco Burley 21, ADC está constituida de 3 subunidades idénticas y ODC de 2.

17.- En las condiciones de nuestro experimento, el enzima arginasa ha participado activamente en los callos crecidos sobre el medio bajo en auxina, y muy activamente en aquellos crecidos sobre el medio alto, en la reducción del "pool" de arginina libre, al convertir esta en ornitina, la cual sería descarboxilada después, en elevada proporción, a putrescina por la acción de ODC. Si bien, ornitina, por medio del ciclo que lleva su nombre, puede ser metabolizada de nuevo a arginina, en nuestro trabajo todo induce a suponer la inhibición de este camino metabólico, debido probablemente a la presencia de NH_3 en el medio.

18.- Los resultados experimentales de este trabajo parecen probar que, en tejido de callo de tabaco, la concentración de auxina en el medio de cultivo controla la producción de nicotina por medio de sus efectos sobre la toma de K^+ por las células del tejido. Una concentración de ANA 1 μM (óptima para la síntesis de nicotina) en el medio de cultivo, inhibe en mayor proporción la toma de K^+ que aquella de ANA 11,5 μM (concentración supra-óptima), y consecuentemente conduce a una deficiencia de K^+ más severa, a un incremento de los niveles de putrescina soluble y a unos niveles más altos de alcaloide. Todo parece sugerir que la concentración de auxina en el medio de cultivo, en mayor proporción aquella 1 μM de ANA, asegura una elevada provisión de precursor en el lugar de síntesis de nicotina.

5. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, D.O. y YANG, S.F. (1979). Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as a intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 170-174.
- ADLAKHA, R.C., VILLANUEVA, V., CALVAYRAC, R. y EDMUNDS, L. N. Jr. (1980). Arrest of cell division blocks the utilization of polyamines in synchronized cultures of photoautotrophically grown Euglena gracilis. Arch. Biochem. Biophys. 201: 660-668.
- ALTMAN, A. (1982). Retardation of radish leaf senescence by polyamines. Physiol. Plant. 54: 189-193.
- ALTMAN, A.; FRIEDMAN, R. y LEVIN, N. (1982). Arginine and ornithine decarboxylases, the polyamine biosynthetic enzymes of mung bean seedlings. Plant Physiol. 69: 876-879.
- ANSARI, A.Q. y BOWLING, D.J.F. (1972). Measurement of the transroot electrical potential of plants grown in soil. New Phytol. 71: 111-117.
- ARNEKE, W.W. (1980). The effect of potassium on the components of the water potential and on the growth rate of Phaseolus vulgaris. Ph. D. Thesis, FB 19 Nutrition Sci. Justus Liebig University, Giessen 1980.
- AUDISIO, S., BAGNI, S. y SERAFINI-FRACASSINI, D. (1976). Polyamines during the growth in vitro of Nicotiana glauca

- R. Grah habituated tissue. *Z. Pflanzenphysiol.* 77: 146-151.
- BACHRACH, U., KAYE, A. y CHAYEN, R. (1983). *Adv. Polyamine Res.* 4. En: Slocum, R.D., Kaur-Sawhney, R. y Galston, A.W. *The physiology and biochemistry of polyamines in plants.* *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 283-303.
 - BAGNI, N. (1970). Metabolic changes of polyamines during the germination of Phaseolus vulgaris. *New Phytol.* 69: 159-164.
 - BAGNI, N., BARBIERI, P. y TORRIGIANI, P. (1983). Polyamine titer and biosynthetic enzymes during tuber formation of Helianthus tuberosus. *J. Plant Growth Reg.* 2: 177-184.
 - BAGNI, N., CALZONI, G.L. y SPERANZA, A. (1978). Polyamines as sole nitrogen sources for Helianthus tuberosus explants in vitro. *New Phytol.* 80: 317-323.
 - BAGNI, N., MALUCELLI, B. y TORRIGIANI, P. (1980). Polyamines, storage substances and abscisic acid-like inhibitors during dormancy and very early activation of Helianthus tuberosus tuber tissues. *Physiol. Plant.* 49: 341-345.
 - BAJAJ, Y.P.S. y NIETSCH, P. (1975). In vitro propagation of red cabbage (Brassica oleracea L. var. capitata). *J. Exp. Bot.* 26: 883-890.
 - BANTHORPE, D.V. (1979). En: Yeoman, M.M., Lindsey, K., Miedzybrodzka, M.B. y McLauchan, W.R. Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant cell and tissue cultures. En: Differentiation in vitro. British Society for Cell Biology Symposium 4. M.M. Yeoman y D.E.S. Truman (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge. Págs. 65-82. (1982).
 - BARBA, R. y NICKELL, L.G. (1969). Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugar-cane, a monocotyledon. *Planta* 89: 299-302.
 - BASSO, L.C. y SMITH, T.A. (1974). Effect of mineral defi-

- ciency on amine formation in higher plants. *Phytochemistry* 13: 875-883.
- BAXTER, C. y COSCIA, C.J. (1973). In vitro synthesis of spermidine in the higher plant, Vinca rosea. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 54: 147-154.
 - BEN-ARIE, R., LURIE, S. y MATTOO, A.K. (1982). Temperature-dependent inhibitory effects of calcium and spermine on ethylene biosynthesis in apple discs correlative with changes in microsomal membrane microviscosity. *Plant Sci. Lett.* 24: 239-247.
 - BEN ZIONI, A., VAADIA, Y. y HERMAN LIPS, S. (1971). Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiol. Plant.* 24: 288-290.
 - BERGMAN, L., GROSSE, W. y KOTH, P. (1976). Influences of ammonium and nitrate on N-metabolism, malate accumulation and malic enzyme activity in suspension cultures of Nicotiana tabacum var. "Samsun". *Z. Pflanzenphysiol.* 80: 60-70.
 - BERLIN, J. (1981). Formation of putrescine and cinnamoyl putrescines in tobacco cell cultures. *Phytochemistry* 20: 53-55.
 - BERNAL-LUGO, I. (1983). Relationship of putrescine amines endogenous content and GA₃ effect in barley aleurona layers. *Plant Physiol* 72: S-473.
 - BIDWELL, R.G.S., BARR, R.A. y STEWARD, F.C. (1964). Protein synthesis and turn-over in cultured plant tissue: source of carbon for synthesis and the fate of the protein breakdown products. *Nature* 203: 367-373.
 - BOHM, H. (1977). Secondary metabolism and cell differentiation. M. Luckner, L. Nover y H. Böhm (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. Págs. 153-171.
 - BOHM, H. (1980). The formation of secondary metabolites in

- plant tissue and cell cultures. Intern. Rev. Cytol. Suppl. 11B: 183-208.
- BORTNER, C.E. y HAMILTON, J.L. (1966). Effects of fertilization on the amino acid concentration in Burley tobacco. Ky. Agr. Exp. Sta. 78th. Ann. Report.
 - BURDE; R., POINDEXTER, E.H. Jr. y BELL, J.P. (1963). Relationship between tobacco and free amino acid content. 17th. Tob. Chem. Res. Conf., Montreal, Canada.
 - BURNS, D. y COLLIN, E.J. (1977). Rapid determination of certain alkaloids, other than nicotine, in tobacco. J. Chromatogr. 133: 378-381.
 - BUTCHER, D.N. (1977). Secondary products in tissue cultures. En: Plant Cell, Tissue and Organ Culture. J. Reinert y Y.P.S. Bajaj (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. Págs. 668-693.
 - CABANNE, F., DALEBROUX, M.A., MARIN-TANGUY, J. y MARTIN, C. (1981). Hydroxycinnamic acid amides and ripening to flower on Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. Physiol. Plant. 53: 399-404.
 - CABANNE, F., MARTIN-TANGUY, J. y MARTIN, C. (1977). Phenolamines associées a l'induction florale et a l'état reproducteur du Nicotiana tabacum var. Xanthi c. Physiol. Vég. 15: 429-443.
 - COCUCCI, M.C. y DALLA ROSA, S. (1980). Effects of canavanine on IAA-and fusicoocin-stimulated cell enlargement, proton extrusion and potassium uptake in maize coleoptiles. Physiol. Plant. 48: 239-242.
 - COHEN, E., ARAD, S.M., HEIMER, Y.H. y MIZRAHI, Y. (1984). Polyamine biosynthetic enzymes in the cell cycle of Chlorella. Correlation between ornithine decarboxylase and DNA synthesis at different light intensities. Plant Physiol. 74: 385-388.

- COHEN, E., HEIMER, Y.M. y MIZRAHI, Y. (1982). Ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase activities in meristematic tissues of tomato and potato plants. *Plant Physiol.* 70: 544-546.
- COHEN, E., HEIMER, Y.M., ARAD, M.S. y MIZRAHI, Y. (1983). *Adv. Polyamine Res.* 4: 443-444. En: Slocum, R.D., Kaur-Sawhney, R. y Galston, A.W. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 283-303.
- COHEN, S.S., BALINT, R. y SINDHU, R.K. (1981). The synthesis of polyamines from methionine in intact and disrupted leaf protoplast of virus-infected chinese cabbage. *Plant Physiol.* 68: 1150-1155.
- CORDUAN, G. (1975). Produktion von tropanalkaloiden in gewebekulturen. *Planta Medica supplement*: 22.
- CHANDLER, J.L.R. y GHOLSON, R.K. (1972). Nicotinic acid decarboxilation in tobacco roots. *Phytochemistry* 11: 239-242.
- CHATURVEDI, H.C., CHOWDHURY, A.R. y MITRA, G.C. (1974). Morphogenesis in stem-callus tissue of Citrus grandis in long-term cultures -a biochemical analysis-. *Current Sci.* 43: 139-142.
- CHAUDHURI, M.M. y GHOSH, B. (1984). Purification and characterization of diamine oxidase from rice embryon. *Phytochemistry* 23: 241-243.
- CHEESMAN, J.M. y HANSON, J.B. (1979). Energy-linked potassium influx as related to cell potential in corn roots. *Plant Physiol.* 64: 842-845.
- CHO, S.C. (1983 a). Effects of cytokinin and several inorganic cations on the polyamine content of lettuce cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 24: 27-32.
- CHO, S.C. (1983 b). Enhancement by putrescine of gibberellin-induced elongation in hypocotyls of lettuce seedlings.

- Plant Cell Physiol. 24: 305-308.
- DAI, Y-R., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1982). Promotion by gibberellic acid of polyamine biosynthesis in internodes of light-grown dwarf peas. *Plant Physiol.* 69: 103-105.
 - D'AMATO, F. (1977). Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. J. Reinert y Y.P.S. Bajaj (Eds.). Springer-Verlag. Berlin. Págs. 343-357.
 - DAVIES, M.E. (1971). Multisample enzyme extraction from cultured plant cell suspensions. *Plant Physiol.* 47: 38-42.
 - DAVIES, M.E. (1972). Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. *Planta* 104: 50-65.
 - DAWSON, R.F., CHRISTMAN, D.R. y ANDERSON, R.C. (1956). Biosynthesis of the pyridine ring of nicotine. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 2645.
 - DAWSON, R.F., CHRISTMAN, D.R., D'ADAMO, A., SOLT, M.L. y WOLF, A.D. (1960). The biosynthesis of nicotine from isotopically labeled nicotinic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 82: 2628-2633.
 - DE BONIS, E. (1951). Nitrogenous matter and carbohydrates in tobacco leaves in relation to the time of picking. *Tobacco* II 55: 64-72.
 - DOUGALL, D.K. (1970). Threonine deaminase from Paul's Scarlet Rose tissue cultures. *Phytochemistry* 9: 959-964.
 - DOUGALL, D.K. (1980). Nutrition and metabolism. En: *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*. E.J. Staba (Ed.). CRC Press. Florida. Págs. 21-58.
 - DUMORTIER, F.M., FLORES, H.E., SHEKHAWAT, N.S. y GALSTON, A. W. (1983). Gradients of polyamines and their biosynthetic enzymes in coleoptiles and roots of corn. *Plant Physiol.* 72: 915-918.

- DUNLOP, J. y BOWLING, D.J.F. (1971). The movement of ions to the xylem exudate of maize roots. II. A comparison of the electrical potential and electrochemical potentials of ions in the exudate and in the root cells. *J. Exp. Bot.* 22: 445-452.
- ELZMAN, O.E. y HODGES, T.K. (1967). Calcium inhibition of potassium absorption in corn roots. *Plant Physiol.* 42: 1483-1488.
- EVANS, H.J. y SORGER, G.J. (1966). Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17: 47-77.
- EVEN-CHEN, Z., MATTOO, A.K. y GOREN, R. (1982). Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxy-vinylglycine and by polyamines shuuts label from 3,4-(¹⁴C) methionine spermidine in aged orange peel discs. *Plant Physiol.* 69: 385-388.
- EVERETT, N.P., WANG, T.L., GOULD, A.R. y STREET, H.E. (1981). Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. 2. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Protoplasma* 106: 15-22.
- FEIRER, R.P., MIGNON, G.J. y LITVAJ, J.D. (1984). Arginine decarboxylase and polyamines are required for wild carrot embryogenesis. *Science* 223: 1433-1435.
- FELLEBERG, G. (1963). Uber die organbildung an in vitro kultivierten knollengewebe von Solanum tuberosum. *Z. Botan.* 51: 113-141.
- FENG, K.A. y LINCK, A.J. (1970). Effects of N-1-naphthylphthalamic acid on the growth and bud formation of tobacco callus grown in vitro. *Plant Cell Physiol.* 11: 589-598.
- FLETCHER, J.S. y BEEVERS, H. (1971). Influence of cycloheximide on the synthesis and utilization of amino acids in suspension cultures. *Plant Physiol.* 48: 261-264.

- FLORES, H.E. (1983). Studies on the physiology and biochemistry of polyamines in higher plants. Ph. D. Dissertation. Yale University.
- FLORES, H.E. y FILNER, P. (1984). Putrescine metabolism in tobacco cell suspensions: effect of nitrogen source. *Plant Physiol. Suppl.* 75: 19.
- FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 69: 701-706.
- FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1984). Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol.* 75: 102-109.
- FLORIS, G., GIARTOSIO, A. y RINALDI, A. (1983). Diamine oxidase from Lens esculenta seedlings: purification and properties. *Phytochemistry* 22: 1871-1874.
- FOWLER, M.W. (1983). Commercial applications and economic aspects of mass plant cell cultures. En: *Plant Biotechnology*. S.H. Mantell y H. Smith (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge. Págs. 3-39.
- FRIEDMAN, R., ALTMAN, A. y BACHRACH, U. (1982). Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings. I. Effects of exogenous compounds and changes in endogenous polyamine content. *Plant Physiol.* 70: 844-848.
- FULLER, D.J.M., GERNER, E. y RUSELL, D.H. (1977). Polyamine biosynthesis and accumulation during the G₁ to S phase transition. *J. Cell Physiol.* 93: 81-88.
- FURUYA, T., KOJIMA, H. y SYONO, K. (1971). Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissues. *Phytochemistry* 10: 1529-1532.
- GALSTON, A.W. (1983). Polyamines as modulators of plant development. *BioScience* 33: 382-388.

- GAMBORG, O.L., CONSTABEL, F., LA RUE, T.A.G., MILLER, R.A. y STECK, W. (1971). The influence of hormones on secondary metabolite formation in plant cell cultures. En: Les Cultures de Tissus de Plantes. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. Págs. 335-344.
- GAUTHERET, R.J. (1971). Action de variations de temperature sur la rhizogenèse des tissus de Topinambour cultivés in vitro. En: Les Cultures des Tissus de Plantes. Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci., Paris 193: 187-199.
- GIVAN, C.V. (1979). Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. Phytochemistry 18: 375-382.
- GLASGOW, A.W. y PETERCHASE, H. (1977). Effect of salicylate on ureagenesis in rat liver. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155: 48-50.
- GORING, H. y BUI HUY THIEN (1979). Influence of nutrient deficiency on proline accumulation in the cytoplasm of Zea mays L. seedlings. Biochem. Physiol. Pflanzen. 174: 9-16.
- GRIMME, H., VON BRUNSCHWEIG, L.C. y NEMETH, K. (1974). Potassium, calcium and magnesium interactions as related to cation uptake and yield. Landw. Forsch. 30: 93-100.
- HACKETT, C., SINCLAIR, C. y RICHARDS, F.J. (1965). Balance between potassium and phosphorus in the nutrition of barley. Ibid. 29: 331-334.
- HALPERIN, W. (1973). The use of cultured tissue in studying developmental problems. Can. J. Bot. 51: 1801-1806.
- HANSON, A.D. y HITZ, W.D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to water deficits. Ann. Rev. Plant Physiol. 33: 163-203.
- HEBLE, M.R., NARAYANASWAMY, S. y CHADHA, M.S. (1971). 2,4-Methylenecholesterol in tissue cultures of Holarrhena antidysenterica. Z. Naturf. 26b: 1382.

- HEBY, O. (1981). Role of polyamines in the control of cell-proliferation and differentiation. *Differentiation* 19: 1-20.
- HEIMER, Y.H., MIZRAHI, Y. y BACHRACH, U. (1979). Ornithine decarboxylase activity in rapidly proliferating plant cells. *FEBS Lett.* 104: 146-148.
- HIRASAWA, E. y SUZUKI, Y. (1983). Biosynthesis of spermidine in maize seedlings. *Phytochemistry* 22: 103-106.
- HIROTANI, M. y FURUYA, T. (1977). Restoration of cardenolic synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry* 16: 610-611.
- HUHTINEN, O., HONKANEN, Y. y SIMOLA, L.K. (1982). Ornithine -and putrescine- supported divisions and cell colony formation in leaf protoplasts of alders (*Alnus glutinosa* and *A. Iucana*). *Plant Sci. Lett.* 28: 3-9.
- JACOBY, B., ABAS, S. y STEINITZ, B. (1973). Rubidium and potassium absorption by bean-leaf slices compared to sodium absorption. *Physiol. Plant.* 28: 209-214.
- JARVIS, B.C., SHANNON, P.R.M. y YASMIN, S. (1983). Involvement of polyamines with adventitious root development in stem cuttings of mung bean. *Plant Cell Physiol.* 24: 677-683.
- KAMIMURA, S. y NISHIKAWA, M. (1976). Growth and alkaloid production of the cultured cells of *Papaver bracteatum*. *Agric. Biol. Chem.* 40: 907-911.
- KARTING, T. (1977). Cardiac glycosides in cell cultures of *Digitalis*. En: *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*. W. Barz, E. Reinhard y M.H. Zenk (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. Págs. 44-51.
- KAUL, B. y STABA, E.J. (1968). *Dioscorea* tissue cultures. I. Biosynthesis and isolation of diosgenin from *Dioscorea deltoidea* callus and suspension cells. *Lloydia* 31: 171-179.
- KAUR-SAWHNEY, R., FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1980). Poly-

- amine-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 65: 368-371.
- KAUR-SAWHNEY, R., SHIN, L-M. y GALSTON, A.W. (1982). Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. *Plant Physiol.* 69: 411-415.
 - KEMBLE, A.R., MacPHERSON (1954). Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochem. J.* 58: 46-49.
 - KESSELL, R.H.J. y CARR, A.H. (1972). The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot tissue. *J. Exp. Bot.* 23: 996-1007.
 - KIKUTA, Y. y OKAZAWA, Y. (1984). Control of root and shoot-bud formation from potato tuber tissue cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 61: 8-12.
 - KINNERSLEY, A.M. y DOUGALL, D.K. (1982). Variation in nicotine content of tobacco callus cultures. *Planta* 154: 447-453.
 - KLEIN, G. y LINSER, H. (1933). *Planta* 20: 470. En: Dawson, R. F., Christman, D.R. y Anderson, R.C. (1956). Biosynthesis of the pyridine ring of nicotine. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 2645.
 - KLEIN, H., PRIEBE, A. y JAGER, H.J. (1979). Putrescine and spermidine in peas: effects of nitrogen source and potassium supply. *Physiol. Plant.* 45: 497-499.
 - KOCHHAR, T.S., BHALLA, P.R. y SABHARWALL, P.S. (1970). Formation de bourgeons vegetatifs par des cals de tabac sous l'influence d'un agent de chelation - L'acide 1-3-diamino-2-hydroxy-propane-N,N,N',N'-tetracetique (DHPTA). *Compt. Rend.* 271: 1619-1632.
 - KOCHHAR, T.S., BHALLA, P.R. y SABHARWALL, P.S. (1971). Effect of tobacco smoke components on organogenesis in plant tissues. *Plant Cell Physiol.* 12: 603-608.
 - KRIKORIAN, A.D. y STEWARD, F.C. (1969). Biochemical differentiation: the biosynthetic potentialities of growing and quies-

- cent tissue. En: Plant Physiology, vol. VB. F.C. Steward (Ed.) Academic Press, New York. Págs. 227-326.
- KURZ, W.E.W. y CONSTABEL, F. (1979). Plant cell cultures, a potential source of pharmaceuticals. Advances in Applied Microbiology 25: 209-240.
 - KYRIAKIDIS, D.A. (1983). Effect of plant growth hormones and polyamines on ornithine decarboxylase activity during the germination of barley seeds. Physiol. Plant. 57: 499-504.
 - LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature. 277: 680-685.
 - LAMBERTS, B.L. y BYERRUM, R.V. (1958). Glutamate as a precursor for the pyrrolidine ring of nicotine. J. Biol. Chem. 233: 933-939.
 - LAMBERTS, B.L., DEWEY, L.J. y BYERRUM, R.V. (1959). Ornithine as a precursor for the pyrrolidine ring of nicotine. Biochem. Biophys. Acta 33:22-26.
 - LAWYER, A.L., BERLIN, M.B. y ELITCH, Z. (1980). Isolation and characterization of glycine hidroxamate-resistant cell lines of Nicotiana tabacum. Plant Physiol. 66: 334-341.
 - LAWYER, A.L., GRADY, K.L. y BASSHAM, J.A. (1981). Intracellular concentrations and metabolism of carbon compounds in tobacco callus cultures: effects of light and auxin. Plant Physiol. 68: 857-864.
 - LEE, T.T. y SKOOG, F. (1965). Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 386-402.
 - LEETE, E. (1967). Alkaloid biogenesis. En: Biogenesis of Natural Compounds. Bernfeld, P. (Ed.). Pergamon Press, Oxford. Págs. 953-1023.
 - LEETE, E. (1968). The metabolism of nicotine-2'-¹⁴C in Nico-

tiana glauca. Tetrahedron Lett. 42: 4433-4436.

- LEETE, E., BODEM, G.B. y MANUEL, M.F. (1971). Formation of 5-fluoronicotine from 5-fluoronicotinic acid in Nicotiana tabacum. Phytochemistry 10: 2687-2692.
- LEGG, P.D., CHAPLIN, J.F. y COLLINS, G.B. (1969). Inheritance of percent total alkaloids in Nicotiana tabacum L. J. Hered. 60: 213-217.
- LeRUDULIER, D. y GOAS, G. (1975). Etude de l'activité de l'arginine décarboxylase dans les jeunes plantes de Glycine max privées de leurs cotyledons. Physiol. Veg. 13: 125-136.
- LeRUDULIER, D. y GOAS, G. (1977). Devenir de la putrescine-1,4-¹⁴C chez Glicine max. Physiol. Plant. 40: 87-90.
- LETOUZE, R. y BEAUCHESNE, G. (1969). Action d'eclairement monochromatiques sur rhizogenese de tissus de Topinambour. Compt. Rend. 269: 1528-1531.
- LIEBERMAN, M. (1979). Biosynthesis and action of ethylene. Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 533-591.
- LIN, P.C. (1984). Polyamine metabolism and its relation to response of the aleurona layers of barley seeds to gibberellic acid. Plant Physiol. 74: 975-983.
- LINDSEY, K. (1982). Studies on the growth and metabolism of plant cells cultured on fixed-bed reactors. PhD. Thesis University of Edinburgh.
- LOVKOVA, M.Y. y IL'IN, G.S. (1962). Participation of labeled amino acids in biosynthesis of nicotine. Biochemistry 27: 612-614.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- LUCKNER, M. (1971). Pharmazie 26: 717-724. En: Wierman, R.

- Secondary plant products and cell and tissue differentiation. En: The Biochemistry of Plants. P.K. Stumpf y E.E. Conn (Eds.), New York. Págs. 85-116. (1981).
- MALFATTI, H., VALLEE, J.C., PERDRIZET, E., CARRE, M. y MARTIN, C. (1983). Acides aminés et amines libres d'ex-plants foliaires de Nicotiana tabacum cultivés in vitro sur des milieux induisant la rhizogenèse on la caulogenèse. *Physiol. Plant.* 57: 492-498.
 - MANN, D.F. y BYERRUM, R.U. (1974). Activation of the novo pathway for pyridine nucleotide biosynthesis to ricinine biosynthesis in Castor beans. *Plant Physiol.* 53: 603-609.
 - MANN, T.J., WEYBREW, J.A., MATZINGER, D.F. y HALL, J.L. (1964). Inheritance of the conversion of nicotine to nor-nicotine in varieties of Nicotiana tabacum L. and related amphidiploids. *Crop. Sci.* 4: 349-353.
 - MARTIN-TANGUY, J., CABANNE, F., PEDRIZET, E. y MARTIN, C. (1978). The distribution of hidroxycinnamic and amides in flowering plants. *Phytochemistry* 17: 1927-1928.
 - MARTIN-TANGUY, J., MARTIN, C., GALLET, M. y VERNON, R. (1976). Sur de puissants inhibiteurs de multiplication du virus de la mosaïque du tabac. *C.R. Acad. Sci.* 282: 2231-2234.
 - MATZINGER, D.F., MANN, T.H. y COCKERHAM, C.C. (1962). Diallel crosses in Nicotiana tabacum. *Crop. Sci.* 2: 383-386.
 - MENGEL, K. y KIRKBY, E.A. (1982). Potassium in physiology. En: *Principles of Plant Nutrition*, 3rd. Edition. International Potash Inst., Bern. Págs. 417-428.
 - MICHL, H. y KUHN, H. (1954). Amino acids in tobacco. *Fachliche Mitt. Osterr. Tabak* 1: 10-13.
 - MIFLIN, B.J. y LEA, P.J. (1977). Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 299-329.

- MINOCHA, S.C. y HALPERIN, W. (1974). Hormones and metabolites which control tracheid differentiation, with or without concomitant effects on growth in cultured tuber tissue of Helianthus tuberosus L. *Planta* 116: 319-331.
- MIZUSAKI, S., KISAKI, T. y TAMAKI, E. (1968). Phytochemical studies on the tobacco alkaloids. XII. Identification of γ -methylaminobutyraldehyde and its precursor role in nicotine biosynthesis. *Plant Physiol.* 43: 93-98.
- MIZUSAKI, S., NOGUCHI, M. y TAMAKI, E. (1964). Studies on nitrogen metabolism in tobacco plants. VI. Metabolism of glutamic acid, gamma-aminobutyric acid and proline in tobacco leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 105: 599-605.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., NOGUCHI, M. y TAMAKI, E. (1971). p-Coumaroylputrescine, caffeoylputrescine, and feruloylputrescine from callus tissue culture of Nicotiana tabacum. *Phytochemistry* 10: 1347-1350.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., NOGUCHI, M. y TAMAKI, E. (1972). N-methylputrescine oxidase from tobacco roots. *Phytochemistry* 11: 2757-2772.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., NOGUCHI, M. y TAMAKI, E. (1973). Changes in the activities of ornithine decarboxylase, putrescine N-methyltransferase and N-methylputrescine oxidase in tobacco roots in relation to nicotine biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 14: 103-110.
- MONTAGUE, M.J., ARMSTRONG, T.A. y JAWORSKI, E.G. (1979). Polyamine metabolism in embryogenic cells of Daucus carota. II. Changes in arginine decarboxylase activity. *Plant Physiol.* 63: 341-345.
- MONTAGUE, M.J., KOPPENBRINK, J.W. y JAWORSKI, E.G. (1978). Polyamine metabolism in embryogenic cells of Daucus carota. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol.* 62: 430-433.

- MUNRO, G.F., HERCULES, K., MORGAN, J. y SAUERBIER, W. (1972). Dependence of the putrescine content of Escherichia coli on the osmotic strength of the medium. J. Biol. Chem. 247: 1272-1280.
- MUNRO, G.F., MILLER, R.A., BELL, C.A. y VERDEBER, E.L. (1975). Effects of external osmolarity on polyamine metabolism in Hela cells. Biochim. Biophys. Acta 411: 263-281.
- MURASHIGE, T. y NAKANO, R. (1967). Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. Am. J. Bot. 54: 963-970.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- MURTY, K.S., SMITH, T.A. y BOULD, C. (1971). The relation between the putrescine content and potassium status of blank currant leaves. Ann. Bot. 35: 687-695.
- NEWCOMB, W. y WETHERELL, D.F. (1970). The effects of 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid on embryogenesis in wild carrot tissue cultures. Botan. Gaz. 131: 242-245.
- NITSCH, J.P., NITSCH, C., ROSSINI, L.M.E. y HA, B.D. (1967). The role of adenine in bud differentiation. Phytomorphology 17: 446-453.
- NOGUCHI, M. y TAMAKI, E. (1962). Studies on nitrogen metabolism in tobacco plants. A. Part II. Diurnal variation in the amino acid composition of tobacco leaves. Arch. Biochem. Biophys. 98: 197-205.
- NOGUCHI, M., YAMAMOTO, K. y TAMAKI, E. (1961). Studies on the nitrogen metabolism in tobacco plants. I. Nitrogenous compounds in the tobacco sap. Agr. Biol. Chem. 25: 626-631.
- NOGUCHI, M., YAMAMOTO, K., KAIWAI, A., YODA, H. y TAMAKI, E. (1967). Studies on nitrogen metabolism in tobacco plants. VIII. Effects of nitrogen sources and topping on the free

- amino acid composition of leaves and roots. Rep. Jap. Monopoly Central Res. Inst. 109: 7-8.
- NORIKO, S. (1972). Progressive change in organ-forming capacity of tobacco callus during single subculture period. Japan. J. Genet. 43: 53-60.
 - NORTON, S.P. y BOLL, W.G. (1954). Callus and shoot formation from tomato roots in vitro. Science 119: 220-221.
 - OHTA, S., MATSUI, O. y YATAZAWA, M. (1976). Effect of environmental factors on nicotine production in Nicotiana tabacum callus tissues. Abst. 5th. Symp. Plant Tissue Culture. Sendai, No. 22.
 - OHTA, S., MATSUI, O. y YATAZAWA, M. (1978). Culture conditions for nicotine production in tobacco tissue culture. Agric. Biol. Chem. 42: 1245-1251.
 - OHTA, S. y YATAZAWA, M. (1978). Effect of light on nicotine production in tobacco tissue cultures. Agric. Biol. Chem. 42: 873-877.
 - OKAZAWA, Y., KATSURA, N. y TAGAWA, T. (1967). Effect of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured in vitro. Physiol. Plant. 20: 862-869.
 - PALAVAN, N. y GALSTON, A.W. (1982). Polyamine biosynthesis and titer during various developmental stages of Phaseolus vulgaris. Physiol. Plant. 55: 438-444.
 - PALAVAN, N., GOREN, R. y GALSTON, A. W. (1984). Effects of some growth regulators on polyamine biosynthetic enzymes in etiolated pea seedlings. Plant Cell Physiol. 25: 541-546.
 - PEARSON, D.W. (1978). Nicotine production by tobacco tissue cultures. PhD. Tesis, Nottingham University.
 - PEGG, A.E. y McCANN, P.P. (1982). Polyamine metabolism and function. Am. J. Physiol. 243: C212-C221.

- PEOPLES, T.R. y KOCH, D.W. (1979). Role of potassium in carbon dioxide assimilation in Mendicago sativa L. *Physiol. Plant.* 63: 878-881.
- PERELLA, F.W., TAKIGAWA, M. y BOUTWELL, R.K. (1983). *Int. J. Biochem.* 15: 885-889. En: Slocum, R.D., Kaur-Sawhney, R. y Galston, A.W. (1984). The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 283-303.
- PETERS, J.E., WU, P.H.L., SHARP, W.R. y PADDOCK, E.F. (1974). Rooting and the metabolism of nicotine in tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.* 31: 97-100.
- PFLUGER, R. y WIEDEMANN, R. (1977). Effect of monovalent cations on the nitrate reduction in Spinacia oleracea L. *Pflanzenphysiol.* 85: 125-133.
- PIERCE, W.S. y HIGINBOTHAM, N. (1970). Compartments and fluxes of K^+ , Na^+ , and Cl^- in avena coleoptile cells. *Plant. Physiol.* 46: 666-672.
- PIERIK, R.L.M. (1967). Regeneration, vernalization and flowering in Lunaria annua L. in vivo and in vitro. *Mededel. Landbouwhogeschool Wageningen* 67: 1-17.
- PIERIK, R.L.M. (1972). Adventitious root formation in isolated petiole fragments of Lunaria annua L. *Z. Pflanzenphysiol.* 60: 343-351.
- PIÑOL, M.T., PALAZON, J. y SERRANO, M. (1984). Growth and nicotine content of tobacco callus cultures without organogenesis. *Plant Sci. Lett.* 36: 219-223.
- PRABHUDESAI, V.R. y NARAYANASWAMY, S. (1974). Organogenesis in tissue cultures of certain Asclepiads. *Z. Pflanzenphysiol.* 71: 181-185.
- PRIEBE, A., KLEIN, H. y JAGER, H.J. (1978). Role of polyamines in SO_2 -polluted pea plants. *J. Exp. Bot.* 29: 1045-1050.

- RAJU, M.V.S. y MANN, H.E. (1970). Regeneration studies on the detached leaves of Echeveria elegans. Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. Can. J. Bot. 48: 1887-1891.
- RAMAKRISHNA, S. y ADIGA, P.R. (1975). Amine levels in Lathyrus sativus seedlings during development. Phytochemistry 14: 63-68.
- RAVKIN, A.S. y POPOV, Y.G. (1973). Mitotic activity and genome and chromosome changes in the cells of apple tissue culture. Tritol. Genet. 7: 32-36.
- REINERT, J. y BACKS, D. (1968). Control of totipotency in plant cells growing in vitro. Nature 220: 1340-1341.
- REINERT, J., BACKS-HUSEMANN, D. y ZERBAN, H. (1971). Determination of embryo and root formation in tissue cultures from Daucus carota. En: Les Cultures des Tissus de Plants. Paris: Centre Natl. Rech. Sci. 193: 261-268.
- RICHARDS, F.J. y COLEMAN, R.G. (1952). Occurrence of putrescine in potassium-deficient barley. Nature 170: 460.
- ROBERTS, L.W. (1969). The initiation of xylem differentiation. Botan. Rev. 35: 201-250.
- ROBERTS, D. R., WALKER, M.A., THOMPSON, J.E. y DUMBROFF, E.B. (1984). The effect of inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnation flowers. Plant Cell Physiol. 25: 315-322.
- SACRISTAN, M.D. y MELCHERS, G. (1969). The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. Mol. Gen. Genetics 105: 317-333.
- SCHIMKE, R.T. (1970). Arginase (Rat liver). Methods in Enzymology 17: 313-317.
- SCHOOF, G., TEICHMANN, S., HARTMANN, T. y WINK, M. (1983).

- Lysine decarboxylase in plants and its integration in quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 22: 65-69.
- SCHUBER, F. y LAMBERT, C. (1974). Metabolism of ornithine and arginine in Jerusalem artichoke tuber tissue. Relationship with the biosynthesis of polyamines. *Physiol. Vég.* 12: 571-584.
 - SEELY, J.E. y PEGG, A.E. (1983). Effect of 1,3-diaminopropane on ornithine decarboxylase enzyme protein in thioacetamide-treated rat liver. *Biochem.J.* 216: 701-708.
 - SEELY, J.E., POSO, H. y PEGG, A.E. (1982). Effect of androgens on turnover ornithine decarboxylase in mouse kidney: Studies using labeling of the enzyme by reaction with carbon-14-labelled α -difluoromethylornithine. *J. Biol. Chem.* 257: 7549-7553.
 - SHARMA, O.P. y KHANNA, P. (1980). Studies on steroidal saponin from tissue cultures of Agave wightii. *Lloydia* 43: 459-462.
 - SHEVYAKOVA, N.I. (1966). Stimulating and toxic effect of diamines on plants. *Fiziol. Rast.* 13: 522-524.
 - SINDHU, R.K. y COHEN, S.S. (1984). Propylamine transferases in chinese cabbage leaves. *Plant Physiol.* 74: 645-649.
 - SINDHU, R.K. y DESAI, H.V. (1979). Purification and properties of agmatine iminohydrolase from groundnut cotyledons. *Phytochemistry* 18: 1937-1938.
 - SISSON, V.A. y SAUNDERS, J.A. (1982). Alkaloid composition of the USDA tobacco (Nicotiana tabacum L.). *Tob. Sci.* 30: 117-120.
 - SKOOG, F. y MILLER, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro. En: *Biological Action of Growth Substances*. 11th. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131.

- SLOCUM, R.D., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1984). The physiology and biochemistry of polyamines in plants. Arch. Biochem. Biophys. 235: 283-303.
- SMITH, S.M. y STREET, H.E. (1974). The decline of embryogenic potential as callus suspension cultures of carrot (Daucus carota L.) are serially subcultured. Ann. Bot. 38: 223-241.
- SMITH, T.A. (1963). L-Arginine carboxylase in higher plants and its relation to potassium nutrition. Phytochemistry 2: 241-252.
- SMITH, T.A. (1970). Putrescine, spermidine and spermine in higher plants. Phytochemistry 9: 1479-1486.
- SMITH, T.A. (1979). Arginine decarboxylase of oat seedlings. Phytochemistry 18: 1447-1452.
- SMITH, T.A. (1981). Amines. En: P.K. Stumpf y E.E. Conn (Eds.). The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise, Secondary Plant Products. Vol. 7. Academic Press, New York. Págs. 249-268.
- SMITH, T.A. y BEST, G.R. (1977). Polyamines in barley seedlings. Phytochemistry 16: 841-843.
- SMITH, T.A., NEGREL, J. y BIRD, C.R. (1983). The cinamic acid amides of the di- and polyamines. Adv. Polyamine Res. 4: 347-370.
- SMITH, T.A. y SINCLAIR, C. (1967). The effect of acid feeding on amine formation in barley. Ann. Bot. 31: 103-111.
- SPANSWICK, R.M. y WILLIAMS, E.J. (1964). Electrical potentials and Na^+ , K^+ and Cl^- concentrations in the vacuole and cytoplasm of Nitella translucens. J. Exp. Bot. 15: 193-200.
- SPERANZA, A. y BAGNI, N. (1977). Putrescine biosynthesis in Agrobacterium tumefaciens and in normal and crown gall

- tissues of Scorzonera hispanica. Z. Pflanzenphysiol. 81: 226-233.
- SRIVENUGOPAL, K.S. y ADIGA, P.R. (1981). Enzymatic conversion of agmatine to putrescine in Lathyrus sativus seedlings: purification and properties of multifunctional enzyme (putrescine synthetase). J. Biol. Chem. 256: 9532-9541.
 - STABA, E.J. (1980). Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. E.J. Staba (Ed.). CRC. Press, Florida.
 - STEDMAN, R.L. (1968). The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. Chem. Rev. 68: 153-207.
 - STEINBERG, R.A., BOWLING, J.D. y McMURTREY, J.E.Jr. (1950). Accumulation of free amino acids as a chemical basis for morphological symptoms in tobacco manifestating freuching and mineral deficiency symptoms. Plant Physiol. 25: 279-288.
 - STOCKIGT, J., PFITZNER, A. y FIRL, J. (1981). Indole alkaloids from suspension cultures of Rauwolfia serpentina. Benth. Plant Cell Report 1: 36-39.
 - SUELTER, C.H. (1970). Enzymes activated by monovalent cations. Science 168: 789-795.
 - SURESH, M.R. y ADIGA, P.R. (1977). Putrescine-sensitive (artifactual) and insesitive (biosynthetic) S-adenosylmethionine decarboxylase activities of Lathyrus sativus seedlings. Eur. J. Biochem. 79: 511-518.
 - SURESH, M.R., RAMAKRISHNA, S. y ADIGA, P.R. (1978). Regulation of arginine decarboxylase and putrescine levels in Cucumis sativus cotyledons. Phytochemistry 17: 57-63.
 - SUTTLE, J.C. (1981). Effect of polyamines on ethylene production. Phytochemistry 20: 1477-1480.
 - SUZUKI, Y. y HIRASAWA, E. (1980). S-Adenosylmethionine decarboxylase of corn seedlings. Plant Physiol. 66: 1091-1094.
 - SYONO, K. (1965). Changes in organ forming capacity of ca-

- rrot calluses during subculture. *Plant Cell Physiol.* 6: 403-419.
- SYONO, K. y FURUYA, T. (1972). Abnormal flower formation of tobacco plants regenerated from callus cultures. *Botan. Mag., Tokyo* 85: 273-284.
 - TABATA, M. (1977). Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. En: *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*. W. Barz, E. Reinhard y M.H. Zenk (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. Págs. 3-16.
 - TABATA, M. e HIRAOKA, N. (1976). Variation of alkaloid production in Nicotiana rustica callus cultures. *Physiol. Plant.* 38: 19-23.
 - TABATA, M., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, N., MARUMOTO, Y. y KONOSHIMA, M. (1971). Regulation of nicotine production in tobacco tissue culture by plant growth regulators. *Phytochemistry* 10: 723-729.
 - TABOR, C.W., TABOR, H., TYAGI, A.K. y COHN, M.S. (1982). The biochemistry, genetics, and regulation of polyamine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Fed. Proc.* 41: 3084-3088.
 - TABOR, H. y TABOR, C.W. (1983). *Adv. Polyamine Res.* 4: 455-465. En: Slocum, R.D., Kaur-Sawhney, R. y Galston, A.W. (1984). *The Physiology and biochemistry of polyamines in plants*. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 283-303.
 - TERANO, S. y SUZUKI, Y. (1978). Formation of β -alanine from spermine and spermidine in maize shoots. *Phytochemistry* 17: 148-149.
 - THOMAS, E. y STREET, H.E. (1970). Organogenesis in cell suspension cultures of Atropa belladonna L. and Atropa belladonna cultivar lutea *Döhl. Ann. Bot.* 34: 657-669.

- THOMAS, E. y STREET, H.E. (1972). Factors influencing morphogenesis in excised roots and suspension cultures of Atropa belladonna. Ann. Bot. 36: 239-247.
- THORPE, T.A. y MEIER, D.D. (1972). Starch metabolism respiration and shoot formation in tobacco callus cultures. Physiol. Plant. 27: 365-369.
- TORGET, R., LAPI, L. y COHEN, S.S. (1979). Synthesis and accumulation of polyamines and S-adenosylmethionine in chinese cabbage infected by turnip yellow mosaic virus. Biochem. Biophys. Res. Comm. 87: 1132-1139.
- TORREY, J.G. (1958). Differential mitotic response of diploid and polyploid nuclei to auxin and kinetin treatment. Science 128: 1148.
- TORREY, J.G. (1967). Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. Physiol. Plant. 20: 265-275.
- TRAN THAN VAN, M. (1973). Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of Nicotiana tabacum L. Planta 115: 87-92.
- TSO, T.C. y BURK, L.G. (1962). Effects of certain anti-tumor chemicals on a tumorous Nicotiana hybrid. Nature 193: 1204-1205.
- TSO, T.C., BURK, L.G., SOROKIN, T.P. y ENGELHAUPT, M.E. (1962). Genetic tumors of Nicotiana. I. Chemical composition of N. glauca, N. langsdorffii, and their F₁ hybrid. Plant Physiol. 37: 257-260.
- TSO, T.C. y JEFFREY, R. N. (1959). Biochemical studies on tobacco alkaloid. I. The fate of labeled tobacco alkaloid supplied to Nicotiana plants. Arch. Biochem. Biophys. 80: 46-56.
- TSO, T.C. y McMURTREY, J.E.Jr. (1960). Mineral deficiency

- Plant. 22: 171-176.
- WERSMAN, E.A. y MATZINGER, D.F. (1970). Relative stability of alleles at the nicotine conversion locus of tobacco. Tob. Sci. 14: 34-36.
 - WETMORE, R.H. y SOROKIN, S. (1955). On the differentiation of xylem. J. Arnold Arboretum 36: 305-317.
 - WEYBREW, J.A. y MATZINGER, D.F. (1969). The free and protein-bound amino acids of certain Nicotiana species and hybrids. Tob. Sci. 13: 71-78.
 - WIDHOLM, J.M. (1971). Control of tryptophan biosynthesis in plant tissue cultures: Lack of repression of anthranilate and tryptophan synthetases by triptophan. Physiol. Plant. 25: 75-79.
 - WIELGAT, B. y KLECZOWSKI, I. (1971). Putrescine metabolism in pea seedlings. Acta Soc. Bot. Pol. 40: 197-207.
 - WOCHOK, Z.S. y WETHERELL, D. F. (1972). Restoration of declining morphogenetic capacity in long-term cultures of Daucus carota by kinetin. Experientia 28: 104-105.
 - WRIGHT, K. y NORTHCOTE, D.H. (1973). Differences in ploidy and degree of intracellular contact in differentiating and non-differentiating sycamore calluses. J. Cell. Sci. 12: 37-53.
 - WU, P.L., GRIFFITH, T. y BYERRUM, R.U. (1962). Studies of pyrrolidine ring of nicotine from several C¹⁴-labeled metabolites by Nictiana rustica. J. Biol. Chem. 237: 887-890.
 - YAMADA, T., SEKIYA, I. y KOSHIMIZU, K. (1972). Cytokinin-induced shoot formation. Phytochemistry 11: 1019-1021.
 - YANAGISAWA, H., HIRASAWA, E. y SUZUKI, Y. (1981). Purification and properties of diamine oxidase from pea epicotils. Phytochemistry 20: 2105-2108.
 - YANAGISAWA, H. y SUZUKI, Y. (1982). Purification and pro-

- properties of N-carbamyl-putrescine amidohydrolase from maize shoots. *Phytochemistry* 21: 2201-2203.
- YANG, K.S. y WALLER, R.G. (1965). Biosynthesis of the pyridine ring of ricinine from quinolinic acid glycerol and aspartic acid. *Phytochemistry* 4: 881-889.
 - YANG, Y-P., LIN, P.P-C. y BUSH, L.P. (1984). Induction of putrescine biosynthetic enzymes and its relation to polyamine and nicotine synthesis in roots of tobacco. *Plant Physiol.* 75: S-118.
 - YEOMAN, M.M. y FORCHE, E. (1980). Cell proliferation and growth in callus cultures. *Intern. Rev. Cytol. Suppl.* 11A: 1-24.
 - YEOMAN, M.M., LINDSEY, K., MIEDZYBRODZKA, M.B. y McLAUCHLAN, W.R. (1982). Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant cell and tissue cultures. En: *Differentiation In Vitro*. M.M. Yeoman y D.E.S. Trumman (Eds.). British Society for Cell Biology, Symposium 4. Cambridge University Press, Cambridge. Págs. 65-82.
 - YOSHIDA, D. (1969). Formation of putrescine from ornithine and arginine in tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 10: 393-397.
 - YOSHIDA, D. y MITAKE, T. (1966). Agmatine and N-carbamyl-putrescine as intermediates in the formation of nicotine by tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* 7: 301-305.
 - YOUNG, N.D. y GALSTON, A.W. (1983a). Putrescine and acid stress. Induction of arginine decarboxylase activity and putrescine accumulation by low pH. *Plant Physiol.* 71: 767-771.
 - YOUNG, N.D. y GALSTON, A.W. (1983b). Are polyamines transported in etiolated peas?. *Plant Physiol.* 73: 912-914.
 - YOUNG, N.D. y GALSTON, A.W. (1984). Physiological control

of arginine decarboxylase activity in K-deficient oat shoots. *Plant Physiol.* 76: 331-335.

- ZENK, M.H. (1978). The impact of plant cell culture on industry. En: *Frontiers of Plant Tissue Culture*. T.A. Thorpe (Ed.), Calagary: University of Calagary. Págs. 1-13.
- ZIMMERMANN, U. (1978). Physics of turgor and osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 121-148.
- ZIMMERMANN, U. y BECKERS, F. (1978). Generation of action potentials in Chara corallina by turgor pressure changes. *Planta* 138: 173-180.
- ZOSIMOVICH, V.P., LEVENKO, B.A., YURKOVA, G.N. y LEGEIDA, V.S. (1972). Isolation of Crepis capilaris strains of different ploidy in tissue culture. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR Ser. Biol.* 203: 1188-1189.