

En determinadas circunstancias, la producción de metabolitos secundarios, particularmente de uso farmacéutico, que se observa en células cultivadas *in vitro* es una alternativa promisorio para la producción de los mismos en las plantas (véase Capítulo 9). Generalmente, el espectro de los metabolitos secundarios producidos por las suspensiones celulares es comparable con el producido por las plantas, aunque frecuentemente la proporción cuantitativa es diferente; es decir, en algunos casos las suspensiones celulares producen cantidades relativamente mayores de un compuesto y menores de otro.

Ocasionalmente se puede detectar, en las suspensiones celulares, la síntesis de compuestos desconocidos en la planta; sin embargo, lo que ocurre con mayor frecuencia en esas suspensiones es la pérdida de la capacidad para sintetizar algún compuesto que se halla presente en la planta (Bohm, 1980; Constabel et al., 1982). La variedad de las suspensiones celulares puede modificar el espectro de los metabolitos secundarios producidos; la variación no necesariamente es de naturaleza genética.

Los factores que afectan el ritmo de crecimiento y la organización de las células cultivadas influyen también en el contenido de metabolitos secundarios, y un medio de cultivo adecuado para el crecimiento no siempre es adecuado para la producción de determinados compuestos. Entre otros factores se deben tener en cuenta la composición (mineral y orgánica) de los medios de cultivo y el pH (Zenk et al., 1977; Hagimori et al., 1982b; Bohm, 1980; Knobloch et al., 1981).

Un ejemplo de lo anterior es el caso del 2,4-D, cuyo contenido en el medio afecta la friabilidad de los agregados celulares; un aumento de 2,4-D lleva a una caída en la producción de alcaloides de diferentes suspensiones celulares, mientras que niveles relativamente bajos han tenido generalmente un efecto contrario (Tabata et al., 1976; Roustan et al., 1982; Hagimori et al., 1982a; Lindsey et al., 1983a). La adición de diferentes precursores al medio de cultivo y la utilización de inhibidores metabólicos pueden modificar la formación de productos secundarios (Bohm, 1980).

Factores ambientales como la luz, los niveles de oxígeno, y el dióxido de carbono también afectan la producción de metabolitos secundarios en las suspensiones celulares; la luz tiene mucha importancia en la síntesis de determinados compuestos (Bohm, 1980, Lindsey et al., 1983a).

Por lo general, las suspensiones celulares que crecen en los bioreactores son más productivas. Los bioreactores se basan en los principios del sistema de cultivo continuo y abierto; en ellos las suspensiones se pueden controlar con relativa facilidad y las condiciones ambientales se pueden

manipular. Como la biosíntesis de metabolitos secundarios ocurre principalmente durante la fase estacionaria, los bioreactores deben ser adecuados para contener grandes cantidades de suspensiones celulares en esta fase.

En los últimos años, la inmovilización de células vegetales ha recibido mucha atención, ya sea para la producción o para la biotransformación de productos vegetales. En este sistema las células se inmovilizan por medio de materias inertes y se cultivan en un medio líquido; el método de 'atrapar' las células, por ejemplo en alginatos, se usa ampliamente (Morris et al., 1981; 1983). En los cultivos de células 'atrapadas', la producción de metabolitos secundarios puede aumentar con respecto al cultivo de las clásicas suspensiones celulares (Lindsey et al., 1983b y 1983c; Brodelius et al., 1979).

### **Aislamiento de mutantes**

Las suspensiones celulares constituyen sistemas adecuados para el aislamiento y la selección de mutantes. Con métodos similares a los utilizados en microbiología se puede tratar, manipular, plaquear y seleccionar un gran número de células.

Una gran diferencia entre la suspensión celular y el cultivo de bacterias radica en el hecho de que la suspensión presenta agregación celular, mientras que en los cultivos de bacterias cada célula está libre en el medio. La presencia de los agregados en las suspensiones celulares modifica la distribución de los mutantes esperados, pero no descarta la posibilidad de aplicar los criterios de la genética microbiana en los experimentos de aislamiento de mutantes (Murphy, 1982).

Los cultivos de células en suspensión, por sí solos, generan variabilidad genética (Meins, 1983; véase también el Capítulo 13); sin embargo, es posible inducir una variabilidad adicional exponiendo las células, generalmente en la fase de retraso o en la exponencial, a agentes mutagénicos. Los agentes mutagénicos pueden ser de naturaleza física como la luz UV, los rayos  $\gamma$  y los rayos X, o de naturaleza química como el sulfonato de etilmetano (EMS) o el N-etil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG). Después del tratamiento, las células se cultivan en medios frescos para permitir su recuperación, y luego se plaquean en medios selectivos.

La selección se puede llevar a cabo con inhibición metabólica usando análogos de aminoácidos, herbicidas, toxinas de agentes fitopatógenos, o alta concentración de sales. Las colonias que crecen bajo la presión selectiva se pueden separar y caracterizar.

La utilidad de las suspensiones celulares para el aislamiento de mutantes se ha demostrado en varios experimentos exitosos que brindaron mutantes estables. Sung (1976a) aisló líneas celulares mutantes de zanahoria resistentes al 5-fluorouracil y a la cicloheximida, inhibidora ésta de la síntesis de proteínas. Reish et al. (1981) aislaron líneas de alfalfa resistentes a la etionina luego de un tratamiento con EMS.

Varias de las líneas resistentes a los análogos de aminoácidos contienen mayores cantidades de metionina y cisteína. Shimamoto et al. (1981) seleccionaron, luego de tratamientos mutagénicos, líneas celulares de maíz resistentes a la aminopterina. Erdei et al. (1982) han aislado diferentes tipos de mutantes; por ejemplo, aislaron una línea celular estable de trigo resistente al DMSO que tiene alterada la composición lipídica de la membrana celular.

Murphy et al. (1981), trabajando con suspensiones celulares de *Rosa damascena*, aislaron líneas resistentes a los cloratos; en algunas de estas líneas, la actividad de la nitrato reductasa es nula, por lo que no pueden crecer en medios que contengan únicamente nitratos. De suspensiones celulares formadas por células predominantemente haploides se pueden aislar mutantes auxotróficos. Aunque la mayoría de estos mutantes se ha producido con propósitos genéticos o bioquímicos, algunas de sus características importantes se han expresado también a nivel de la suspensión celular, como en el caso de la tolerancia a sales (Warren et al., 1982). Asimismo, Ojima et al. (1983) aislaron líneas celulares tolerantes al aluminio y al manganeso. Por otra parte, las líneas resistentes a los análogos de los aminoácidos producen mayores cantidades del correspondiente aminoácido natural que las líneas celulares normales (Reish et al., 1981).

Las tolerancias a metales pesados, toxinas de fitopatógenos, herbicidas, o condiciones extremas del pH del suelo constituyen temas que se pueden estudiar mediante la utilización de suspensiones celulares (Chaleff, 1983). En la Figura 8.7 se observa, como ejemplo, el efecto del extracto de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre el cultivo de células en suspensión de *Stylosanthes guianensis*.

## Embriogénesis somática

Las suspensiones celulares constituyen sistemas de gran utilidad para el estudio de los procesos de diferenciación y desarrollo de los embriones resultantes de la embriogénesis somática (véanse Capítulos 5, 7, y 13).

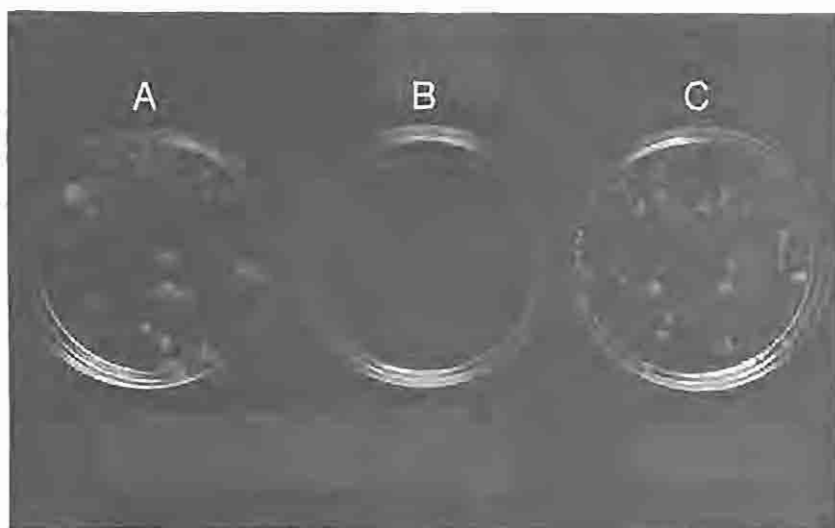


Figura 8.7. Plaqueo de suspensiones celulares de *Stylosanthes guianensis* en MS + ANA (0.5 mg/l) + BAP (0.5 mg). A) testigo; B) con extracto de *Colletotrichum gloeosporioides*; C) en el medio de Czapek (medio de crecimiento del hongo).

El crecimiento de las suspensiones celulares de zanahoria (*Daucus carota* L.) no es organizado cuando se usan medios que contienen 2,4-D; pero cuando las soluciones se cultivan en el mismo medio desprovisto de la auxina, hay desarrollo de embriones (McWilliam et al., 1974). El potencial embriogénico varía de cultivo a cultivo y declina con la edad de las suspensiones.

Se han descrito algunos sistemas, especialmente de zanahoria, en que la diferenciación de embriones se lleva a cabo de manera altamente sincronizada (más del 80%) a partir de pequeños agregados celulares. Estos sistemas son muy útiles para la realización de estudios bioquímicos relacionados con la embriogénesis somática (Jones, 1974; Fujimura et al., 1981). Se ha publicado acerca de la síntesis de proteínas, de ADN y de ARN (Verma et al., 1978; Fujimura et al., 1980, 1981) y sobre los efectos tanto de diferentes reguladores del crecimiento (Jones, 1974; Sung et al., 1979) como del carbón activado (Drew, 1979).

El establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas ha sido difícil en especies de gramíneas (King et al., 1978). Sin embargo se han establecido cultivos de este tipo en algunas especies como *Pennisetum*

*americanum* (Vasil et al., 1980, 1982), *Panicum maximum* (Lu et al., 1981), caña de azúcar (Ho et al., 1983; Larkin, 1982) y maíz (Lu, 1982; Vasil, 1983; Vasil et al., 1984).

También se han descrito suspensiones embriogénicas para otras especies de plantas, entre ellas *Carica* spp. (Litz et al., 1983), tréboles (Gresshoff, 1980) y *Dioscorea* spp. (Ammirato, 1984).

## Referencias

- Ammirato, P. V. 1984. Induction, maintenance, and manipulation of development in embryogenic cell suspension cultures. En: Vasil, I. K. (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, Orlando, E.U. v. 1, p. 139-151.
- Bayliss, M. W. 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. En: Vasil, I. K. (ed.). Perspectives in plant cell and tissue culture. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A:113-144.
- y Gourld, A. R. 1974. Studies on the growth in culture of plant cells. 18: Nuclear cytology of *Acer pseudoplatanus* suspension cultures. J. Exp. Bot. 25:772-983.
- Berry, S. L.; Harrington, H. M.; Bernstein, R. L. y Henke, R. R. 1981. Amino acid transport into cultured tobacco cells; 3: Arginine transport. Planta 153: 511-518.
- Bevan, M. y Northcote, D. H. 1981. Subculture-induced protein synthesis in tissue cultures of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Planta 152:24-31.
- Bohm, H. 1980. The formation of secondary metabolites in plant tissue and cell cultures. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11B:183-208.
- . 1982. The inability of plant cell cultures to produce secondary substances. En: Plant tissue culture: Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue & Cell Culture. p. 325-328.
- Brodellius P.; Deus, B.; Mosbach, K. y Zenk, M. H. 1979. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. FEBS Lett. 103:93-97.
- Chaleff, R. S. 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. Science 219:676-682.
- Cheong, L.; Rich, A. M. y Eidinoff, M. L. 1960. Mechanism of growth inhibition of H. Ep.l. cells by 5-fluorodeoxycytidine and 5-fluorodeoxyuridine. Cancer Res. 20:1602-1607.

- Chu, Y. y Lark, K. G. 1976. Cell cycle parameters of soybean (*Glycine max*) cells growing in suspension culture: Suitability of the system for genetic studies. *Planta* 132:259-268.
- Constabel, F.; Kurz, W. G. W.; Chatson, B. y Gamborg, O. L. 1974. Induction of partial synchrony in soybean cell cultures. *Exp. Cell Res.* 85:105-110.
- ; ———; ——— y Kirkpatrick, J. W. 1977. Partial synchrony in soybean cell suspension cultures induced by ethylene. *Exp. Cell. Res.* 105:263-268.
- ; ——— y Kutney, J. P. 1982. Variation in cell cultures of periwinkle, *Catharanthus roseus*. En: *Plant tissue culture: Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue & Cell Culture*. p. 301-304.
- Cress, D. E.; Jackson, P. J.; Kadouri, A.; Chu, Y. E. y Lark, K. G. 1978. DNA replication in soybean protoplasts and suspension cultured cells: Comparison of exponential and fluorodeoxyuridine synchronized cultures. *Planta* 143:241-253.
- Davies, M. E. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. *Planta* 104:50-65.
- Drew, R. L. K. 1979. Effect of activated charcoal on embryogenesis and regeneration of plantlets from suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Ann. Bot.* 44:387-389.
- . 1980. A cheap, simple apparatus for growing large batches of plant tissue in submerged liquid culture. *Plant Sci. Lett.* 17:227-236.
- Dudits, D.; Lázár, G. y Bajszár, G. 1979. Reversible inhibition of somatic embryo differentiation by bromodeoxyuridine in cultured cells of *Daucus carota* L. *Cell Differentiation* 8:135-144.
- Erdei, L.; Vigh, L. y Dudits, D. 1982. Isolation of wheat cell line with altered membrane properties. *Plant Physiol.* 69:572-574.
- Eriksson, T. 1966. Partial synchronization of cell divisions in suspension cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plant.* 19:900-910.
- Evans, D. A. y Gamborg, O. L. 1982. Chromosome stability of cell suspension culture of *Nicotiana* spp. *Plant Cell Reports* 1:104-107.
- Evans, H. J.; Neary, G. J. y Tonkinson, S. M. 1957. The use of colchicine as an indicator of mitotic rate in broad bean root meristems. *J. Genetics* 55:487-502.
- Everett, N. P.; Wang, T. L.; Gould, A. R. y Street, H. E. 1981. Studies on the control of the cell cycle in culture plant cells; 2: Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Protoplasma* 106:15-22.

- ; —— y Street, H. E. 1978. Hormone regulation of cell growth and development in vitro. En: Thorpe, T. A. *Frontiers of plant tissue culture*. International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá. p. 307-316.
- 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.
- Fosket, D. E. 1977. Regulations of the plant cell cycle by cytokinin. En: Rost, T. L. y Gifford, E. M. (eds.). *Mechanism and control of cell division*. Dowden, Nueva York. p. 66-91.
- Franke, J.; Bohm, H. 1982. Accumulation and secretion of alkaloids by *Macleaya microcarpa* cell cultures; 2: Experiments in liquid medium. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 177:501-507.
- Fujimura, T.; Komamine, A. y Matsumoto, H. 1980. Aspects of DNA, RNA and protein synthesis during somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Physiol. Plant.* 49:255-260.
- ; —— y ———. 1981. Changes in chromosomal proteins during early stages of synchronized embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 102:293-298.
- y ———. 1984. Fractionation of cultured cells. En: Vasil, I. K. (ed). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. v. 1, p. 159-166.
- Furner, I. J. y Sung, Z. R. 1982. Regulation of sulfate uptake in carrot cells: Properties of a hypercontrolled variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 79:1149-1153.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research.* 50:151-158.
- Gaver, M.; Sansonetti, A. y Mazliak, P. 1983. Lipid composition of tobacco cells cultivated at various temperatures. *Phytochemistry* 22:855-859.
- Giménez-Martín, G.; González-Fernández, A. y López-Sáenz, J. F. 1965. A new method of labelling cells. *J. Cell Biol.* 26:305-309.
- ; de la Torre, C. y López-Sáenz, J. F. 1977. Cell division in higher plants. En: Rost, T. L. y Gifford, E. M. (eds.). *Mechanism and control of cell division*. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, Pennsylvania, E.U. p. 261-307.
- González-Fernández, A.; López-Sáenz, J. F. y Giménez-Martín, G. 1966. Duration of division cycle in binucleate and mononucleate cell. *Expl. Cell. Res.* 43:255-267.
- Gould, A. R.; Bayliss, M. W. y Street, H. E. 1974. Studies on the growth in culture of plant cells; 17: Analysis of the cell cycle of asynchronously dividing *Acer pseudoplatanus* L. cells in suspension culture. *J. Exp. Bot.* 25:468-478.

- ; Everett, N. P.; Wang, T. L. y Street, H. E. 1981. Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells; 1: Effects of nutrient limitation and nutrient starvation. *Protoplasma* 106:1-13.
- y Street, H. E. 1975. Kinetic aspects of synchrony in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *J. Cell Sci.* 17:337-348.
- Gresshoff, P. M. 1980. In vitro culture of white clover: Callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. *Bot. Gaz.* 141:157-164.
- Grobner, P. y Loidl, P. 1982. Action of 5-fluorodeoxyuridine on synchronous nuclear division and thymidylate synthetase activity of *Physarum polycephalum*. *FEBS Letters* 140:41-44.
- Hadlaczy, Gy; Bisztray, Gy; Praznovszky, T. y Dudits, D. 1983. Mass isolation of plant chromosomes and nuclei. *Planta* 157:278-285.
- Hagimori, M.; Matsumoto, T. y Obi, Y. 1982a. Studies on the production of *Digitalis cardenolides* by plant tissue culture; 2: Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiol.* 69:653-656.
- ; ——— y ———. 1982b. Studies on the production *Digitalis cardenolides* by plant tissue culture; 3: Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant and Cell Physiol.* 23:1205-1211.
- ; ——— y ———. 1983. Effects of mineral salts, initial pH and precursors on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Agric. Biol. Chem.* 47:565-571.
- Halbrock, K. 1974. Correlation between nitrate uptake, growth and changes in metabolic activities of cultured plant cells. En: Street, H. E. (ed.). *Tissue culture and plant science*. Academic Press, Londres. p. 363-378.
- Harrington, H. M. y Henke, R. R. 1981a. Amino acid transport into cultured tobacco cells; 1: Lysine transport. *Plant Physiol.* 67:373-378.
- ; Berry, S. L. y Jenke, R. R. 1981b. Amino acid transport into cultured tobacco cells; 2: Effect of calcium. *Plant Physiol.* 67:379-384.
- Hauptmann, R. M. y Withelm, J. M. 1982. Cryostorage of cloned amino acid resistant carrot and tobacco suspension cultures. *Plant Physiol.* 70:30-34.
- Ho, W. y Vasil, I. K. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Bot.* 51:719-726.
- Hochhauser, S. J.; Stein, J. L. y Stein, G. S. 1981. Gene expression and cell cycle regulation. *Internat. Review of Cytology* 71:95-243.



- Horn, M. E. y Mertz, D. 1982. Cyanid resistant respiration in suspension cultured cells of *Nicotiana glutinosa* L. *Plant Physiol.* 69:1439-1443.
- Jackson, P. J. y Lack, K. G. 1982. Ribosomal RNA synthesis in soybean suspension cultures growing in different media. *Plant Physiol.* 69:234-239.
- Jones, L. H. 1974. Factors influencing embryogenesis in carrot cultures (*Daucus carota* L.). *Ann. Bot.* 38:177-188.
- Jones, R. W.; Abbot, A. J.; Hewitt, E. J.; James, D. M. y Best, G. R. 1976. Nitrate reductase activity and growth in Paul's Scarlet rose suspension cultures in relation to nitrogen source and molybdenum. *Planta* 133:27-34.
- Jouanneau, J. P. 1971. Controle par les cytokinines de la synchronization des mitoses dans les cellules de tabac. *Exp. Cell. Res.* 67:329-337.
- Kartha, K. K. 1982. Cryopreservation of plant meristems and cells. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). *Plant tissue culture methods*. National Research Council of Canada. p. 25-33.
- ; Leung, N. L.; Gaudet-La Prairie, P. y Constabel, F. 1982. Cryopreservation of periwinkle (*Catharanthus roseus*) cells cultured in vitro. *Plant Cell Reports* 1:135-138.
- King, P. J. 1980. Cell proliferation and growth in suspension cultures. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11A:25-53.
- . 1984. Induction and maintenance of cell suspension cultures. En: Vasil, I. K. (ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press, Orlando, E.U. v. 1, p. 130-138.
- ; Cox, B. J.; Flower, M. W. y Street, H. E. 1974. Metabolic events in synchronized cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *Planta* 117:109-122.
- ; Mansfield, K. J. y Street, H. E. 1973. Control of growth and cell division in plant cell suspension cultures. *Can. J. Bot.* 51:1807-1823.
- ; Potrykus, I. y Thomas, E. 1979. In vitro genetics of cereals: Problems and perspectives. *Physiol. Veg.* 16:381-399.
- Klerk-Kiebert de, Y. M.; Kneppers, T. J. A.; Matthijs, H. C. P. y Verleur, J. D. 1983. Sugar uptake in soybean (*Glycine max*) cells in suspension culture. *Physiol. Plant.* 57:217-221.
- Knobloch, K. H.; Beutnagel, G. y Berlin, J. 1981. Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium induced cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 153:582-585.
- Komamine, A.; Morigaki, T. M. y Fujimura, T. 1982. Metabolism in synchronous growth and differentiation in plant tissue and cell cultures. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Frontiers of plant tissue culture 1978*. Calgary, Canadá. p. 159-168.

- Komor, E.; Thom, M. y Marezky, A. 1981. The mechanism of sugar uptake by sugarcane suspension cells. *Planta* 153:181-192.
- Kurz, W. G. W. 1982. A bioreactor system for the continuous culture of plant cells. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). *Plant tissue culture methods*. P. R. L. National Research Council, Saskatoon, Canadá. p. 117-121.
- Kutney, J. P.; Choi, L. S. L.; Kółodziejczyk, P.; Sleigh, S. K.; Stuart, K. L.; Worth, B. R.; Kurz, W. G. W.; Chatson, K. B. y Constabel, F. 1980. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures; 3: Catharanthine and other alkaloids from the 200 GW cell line. *Heterocycles* 14:765-768.
- Larkin, P. J. 1982. Sugarcane tissue and protoplast culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1:149-164.
- Leguay, J.-J. y Guern, J. 1975. Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiol.* 56:356-359.
- y ———. 1977. Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells; 2: Influence of 2,4-D metabolism and intracellular pH on the control of cell division by intracellular 2,4-D concentration. *Plant Physiol.* 60:265-270.
- Lindsey, K. y Yeoman, M. M. 1983a. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.* 34:1055-1065.
- y ———. 1983b. Novel experimental systems for studying the production secondary metabolites by plant tissue cultures. En: Mantel, S. H. y Smith, H. (eds.). *Plant biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 39-66.
- ; ———; Black, G. M. y Mavituna, F. 1983c. A novel method for the immobilization and culture of plant cells. *FEBS Letters* 155:143-149.
- Litz, R. E. y Conover, R. A. 1983. High frequency somatic embryogenesis from *Carica* suspension cultures. *Ann. Bot.* 51:683-686.
- Lu, C. y Vasil, I. K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* in vitro. *Ann. Bot.* 47:543-548.
- y ———. 1982. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* 62:109-112.
- Maddox, A. D.; Gonsalves, F. y Shields, R. 1982/83. Successful preservation suspension cultures of three *Nicotiana* species at the temperature of liquid nitrogen. *Plant Sci. Lett.* 28:157-162.
- Mak, S. 1965. Mammalian cell cycle analysis using microspectrophotometry combined with autoradiography. *Exp. Cell Res.* 39:286-308.

- Malmberg, R. L. y Griesbach, R. J. 1980. The isolation of mitotic and meiotic chromosomes from plant protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 17:141-147.
- Maretzky, A. y Thom, M. 1972. The existence of two membrane transport systems for glucose in suspension of sugar cane cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:44-50.
- y ———. 1978. Transports of organic and inorganic substances by plant cells in culture. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Frontiers of plant tissue culture. International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá.* p. 463-473.
- McDaniel, C. N.; Hölterman, R. K.; Bone, R. F. y Wozniak, P. M. 1982. Amino acid transport in suspension cultured plant cells; 3: Common carrier system for the uptake of L-arginine, L-aspartic acid, L-histidine, L-leucine and L-phenylalanine. *Plant Physiol.* 69:246-249.
- McWilliam, A. A.; Smith, S. M. y Street, H. E. 1974. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot. *Ann. Bot.* 38:243-250; 463-473.
- Meadows, M. G. 1982/83. Characterization of cells and protoplasts of the B73 maize cell line. *Plant Science Letters* 28:337-348.
- Meins, F. Jr. 1983. Heritable variation in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34:327-346.
- Moloney, M. M. y Elliot, M. C. 1982. Tryptophan and indole-3-acetic acid accumulation in *Acer* cell cultures and its relationship with cell autolysis. *Planta* 156:326-331.
- ; Hall, J. F.; Robinson, G. M. y Elliot, M. C. 1983. Auxin requirements of sycamore cells in suspension culture. *Plant Phys.* 71:927-931.
- Morris, P. y Fowler, M. W. 1981. A new method for the production of fine plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 1:15-24.
- ; Smart, N. J. y Fowler, M. W. 1983. A fluidised bed vessel for the culture of immobilized plant cells for the continuous production of fine cell suspension. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 2:207-216.
- Murashige, T. y Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murata, M. y Orton, T. J. 1983. Chromosome structural changes in cultured celery cells. *In vitro* 19:83-89.
- Murphy, T. M. 1982. Analysis of distribution of mutants in clones and plant cell aggregates. *Theor. Appl. Genet.* 61:367-372.
- e Imbrie, C. W. 1981. Induction and characterization of chlorate-resistant strains of *Rosa damascena* cultured cells. *Plant Physiol.* 67:910-916.

- Nash, D. T. y Davies, M. E. 1972. Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet rose cell suspensions. *J. Exp. Bot.* 23:75-91.
- Navarrette, M. H.; de la Torre, C. y Schwartzman, J. B. 1978. Compartmentalizing the S period. *Cell Biology Internal. Reports* 2:607-613.
- Nishi, A.; Kato, K.; Takahashi, M. y Yoshida, R. 1977. Partial synchronization of carrot cell culture by auxin deprivation. *Physiol. Plant.* 39:9-12.
- Nover, L.; Kranz, E. y Scharf, K. D. 1982. Growth cycle of suspension cultures of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 177:483-499.
- Ogino, T.; Hiraoka, N. y Tabata, M. 1978. Selection of high nicotine producing cell lines of tobacco callus by single-cell cloning. *Phytochemistry* 17:1907-1910.
- Ojima, K. y Ohira, K. 1983. Characterization of aluminium and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell cultures. *Plant and Cell Physiol.* 24:789-797.
- Owens, T. y Poole, R. J. 1979. Regulation of cytoplasmic and vacuolar volumes by plant cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 64:900-904.
- Prensky, W. y Smith, H. H. 1965. The mechanism of 5-aminouracil-induced synchrony of cell division in *Vicia faba* root meristems. *J. Cell. Biol.* 24:401-414.
- Reider, M. L.; Smith, B. A. y Fletcher, J. S. 1982. Protein content and subculturing properties of senescing plant suspension cultures. *In vitro* 18:1004-1008.
- Reish, B.; Duke, S. H. y Bingham, E. T. 1981. Selection and characterization of ethionine-resistant alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines. *Theor. Appl. Genet.* 59:89-94.
- Rembur, J. 1973. Cycle cellulaire et teneurs en ADN de cellules en suspension de l'*Acer pseudoplatanus* en phase exponentielle de croissance: Hétérogénéité de la culture. *Can. J. Bot.* 52:1535-1543.
- Rost, T. 1982. Regulation of cell division in pea root tips after wounding: A possible role for ethylene. *Protoplasma* 111:1-9.
- Roustan, J. P.; Ambid, C. y Fallot, J. 1982. Influence de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique sur l'accumulation de certains alcaloïdes indoliques dans les cellules quiescentes de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro*. *Physiol. Vég.* 20:523-532.
- Schaefer, A.; Ohyama, K. y Gamborg, P. L. 1981. Detection by agarose gel electrophoresis of nucleases associated with cells and protoplasts from plant suspension cultures using *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Agric. Biol. Chem.* 45:1441-1445.

- Scharf, K. D. y Nover, L. 1982. Heat-shock-induced alteration of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* 30:427-437.
- Scheuermann, W. y Klaffke-Lobsien, G. 1973. On the influence of 5-aminouracil on the cell cycle of root tip meristems. *Exp. Cell Res.* 76:428-436.
- Shimamoto, K. y Nelson, O. E. 1981. Isolation and characterization of aminopterin-resistant cell lines in maize. *Planta* 153:436-442.
- Slabas, A. R.; MacDonald, G. y Lloyd, C. W. 1980. Thymidine metabolism and the measurement of the rate of DNA synthesis in carrot suspension cultures. *Plant Physiol.* 65:1194-1198.
- Smith, J. A. y Martin, L. 1973. The cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:1263-1267.
- Smith, T. A.; Best, G. R.; Abbot, A. J. y Clements, E. D. 1978. Polyamines in Paul's Scarlet rose suspension cultures. *Planta* 144:63-68.
- Stafford, A. y Fowler, M. W. 1983. Effect of carbon and nitrogen growth limitations upon nutrient uptake and metabolism in batch cultures of *Catharanthus roseus* L. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 2:239-251.
- Street, H. E. 1977. Cell (suspension) culture-techniques. En: Street, H. E. (ed.). *Plant tissue and cell culture.* University of California Press, Los Angeles, E.U. p. 61-102.
- Sung, Z. R. 1976a. Mutagenesis of cultured plant cells. *Genetics* 84:51-57.
- . 1976b. Turbidimetric measurement of plant cell culture growth. *Plant Physiol.* 57:460-462.
- ; Smith, R. y Horowitz, J. 1979. Quantitative studies of embryogenesis in normal and 5-methyltryptophan-resistant cell lines of wild carrot; the effects of growth regulators. *Planta* 147:236-240.
- Szabados, L. y Gaggero, C. 1985. Callus formation from protoplasts of a sugarbeet cell suspension culture. *Plant Cell Reports* 4(4):195-198.
- ; Hadlaczky, Gy. y Dudits, D. 1981. Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplasts. *Planta* 151:141-145.
- Tabata, M. y Hiraoka, N. 1976. Variation of alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures. *Physiologia Plantarum* 38:19-23.
- Thom, M.; Maretzky, A.; Komor, E. y Sakai, W. S. 1981. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 1:3-14.
- Timson, J. 1975. Hydroxyurea. *Mutation Res.* 32:115-132.

- Torrey, J. G. y Reinert, J. 1961. Suspension cultures of higher plant cells in synthetic media. *Plant Physiol.* 36:483-491.
- Urlaub, H. y Jankowski, G. 1982. Sulfate reduction in *Catharanthus roseus* L. Identification and subcellular localization of a particulate adenosine 5'-phosphosulfate-reducing activity in cells from cell suspension cultures. *Planta* 155:154-161.
- Van't Hof, J. y Kovacs, C. J. 1972. Mitotic cycle regulation in the meristem of cultured roots: The principal control point hypothesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 18:15-30.
- Vasil, I. K. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. En: Lurquin, P. F. y Kleinhofs, A. (eds.). *Genetic engineering in eukaryotes*. Plenum Publishing Corporation. p. 233-252.
- Vasil, V. y Vasil, I. K. 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts; 2: Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theor. Appl. Genet.* 56:97-99.
- y ———. 1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescens of *Pennisetum americanum* (Pearl millet, *Gramineae*). *Amer. J. Bot.* 69:1441-1449.
- y ———. 1984. Isolation and maintenance of embryogenic cell suspension cultures of *Gramineae*. En: Vasil, I. K. (ed.). *Cell culture and somatic cell genetic of plants*. Academic Press, Orlando, E.U. v. 1, p. 152-158.
- Verma, D. C. y Dougall, D. K. 1978. DNA, RNA and protein content of tissue during growth and embryogenesis in wild-carrot suspension cultures. *In vitro* 14:183-191.
- Verma, D. P. S. y Marcus, A. 1974. Activation of protein synthesis upon dilution of an *Arachis* cell culture from the stationary phase. *Plant Physiol.* 53:83-87.
- Wang, T. L.; Everett, N. P.; Gould, A. R. y Street, H. E. 1981. Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells; 3: The effects of cytokinin. *Protoplasma* 106:23-35.
- Warren, R. S. y Gould, A. R. 1982. Salt tolerance expressed as a cellular trait in suspension cultures developed from the halophytic grass *Distichlis spicata*. *Z. Pflanzphysiol.* 107:347-356.
- Watanabe, K. y Yamada, Y. 1983. Selection of variants with high levels of biotin from cultured green *Lavandula vera* cells irradiated with gamma rays. *Plant and Cell Physiol.* 23:1453-1456.
- Werry, P. A. Th. J. y Stoffelsen, K. M. 1981. Radiation stimulated increase of plating efficiency of free plant cells. *Theor. Appl. Genet.* 59:391-393.

- Wilson, S. B.; King, P. J. y Street, H. E. 1971. Studies on the growth in culture of plant cells; 7: A versatile system for the large scale batch or continuous culture of plant cell suspensions. *J. Exp. Bot.* 24:1172-1185.
- Wilson, H. M. y Street, H. E. 1975. The growth anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of *Hevea brassiliensis*. *Ann. Bot.* 39:671-682.
- Withers, L. A. 1980. Preservation of germplasm. En: Vasil, I. K. (ed.). *International Review of Cytology*. Academic Press. Suppl. 11B:101-136.
- y King P. J. 1979. Proline, a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 64:675-678.
- Yeoman, M. M.; Lindsay, K.; Miedzybrodzka, M. B. y McLauchland, W. R. 1982. Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant cell and tissue culture. En: Yeoman, M. M. y Truman, D. E. S. (eds.). *Differentiation in vitro*. British Society for Cell Biology Symposium. Cambridge University Press. v. 4, p. 65-82.
- Zeleneva, I. V. y Khavkin, E. E. 1980. Rearrangements of enzyme patterns in maize callus and suspension cultures: Is it relevant to the changes in the growing cells of the intact plant? *Planta* 148:108-115.
- Zenk, M. H.; El-Shagi, H.; Arens, H.; Stockigt, J.; Weiler, E. W. y Deus, B. 1977. Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). *Plant tissue culture and its biotechnological application*. Springer-Verlag, Berlin. p. 27-43.
- Zink, M. W. y Veliky, I. A. 1982. Separation and some properties of two acid phosphatases from suspension cultures of *Ipomoea* sp. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 1:265-273.