



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Estudio de las Respuestas de Defensa Inducidas
por Elicitores en Cultivos de Células Vegetales**

Dña. Ana Belén Sabater Jara

2013

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Dpto. de Biología Vegetal (U.D. Fisiología Vegetal) de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia con la ayuda de una beca del Plan de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Ciencia e Innovación (AP2008-03892). Este trabajo de investigación ha sido financiado por el MICINN-FEDER (BIO2008-02941 y BIO2011-29856-C02-02), por la Consejería de Educación, Ciencia e Investigación de la Región de Murcia (BIO-BVA 07/01-0003) y como resultado del proyecto de investigación de la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia en el marco de II PCTRM 2007-10 (08799/PI/08).

Los resultados de la presente Memoria han sido incluidos en los siguientes trabajos de investigación:

Producción científica derivada de la Tesis

*Ambos autores contribuyen por igual a este trabajo

Sabater-Jara AB*, Almagro L*, Belchí-Navarro S, Ferrer MA, Ros Barceló A, Pedreño MA (2010) Induction of sesquiterpenes, phytoosterols and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited cell cultures of *Capsicum annuum*. *Journal of Plant Physiology* 167: 1273-1281

Sabater-Jara AB, Tudela LR, López-Pérez AJ (2010) *In vitro* culture of *Taxus sp.*: strategies to increase cell growth and taxoid production. *Phytochemistry Reviews* 9:343-356

Sabater-Jara AB*, Almagro L*, Belchí-Navarro S, Ros Barceló A, Pedreño MA (2011) Methyl jasmonate induces extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Capsicum chinense*. *Plant Signaling & Behavior* 6: 3

Briceño Z, Almagro L, Sabater-Jara AB, Calderón AA, Pedreño MA, Ferrer MA (2012) Enhancement of phytosterols, taraxasterol and induction of extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology* 169:1050– 1058

Sabater-Jara AB, Pedreño MA (2013) Use of β -cyclodextrins to enhance phytosterol production in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. DOI 10.1007/s11240-013-0320-4

Sabater-Jara AB, Pedreño MA (2013) Effects of cyclodextrins and methyl jasmonate on secretome of suspension-cultured cells of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology* (en revisión)

Almagro L*, Sabater-Jara AB*, Belchí-Navarro S*, Fernández-Perez F, Bru R and Pedreño MA (2011) Effect of UV light on secondary metabolite biosynthesis in plant cell cultures elicited with cyclodextrins and methyljasmonate. *Abiotic Stress*. ISBN: 978-953-308-121-2.

Sabater-Jara AB, Almagro L, Belchí-Navarro S, Martínez-Esteso MJ, Youssef SM, Casado-Vela J, Vera-Urbina JC, Selles S, Bru R, Pedreño MA (2013) Plant cell cultures as a tool to analyze the extracellular proteome. *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 2nd edition. (Ed.) Springer protocols (en edición)

Ana Belén Sabater Jara, Lorena Almagro Romero, Antonio José López Pérez, M^a Ángeles Pedreño García (2010) Uso de ciclodextrinas para la producción y extracción de fitoesteroles en cultivos celulares. WO/2010/049563

Producción científica relacionada con la Tesis

Sabater-Jara AB, Souliman-Youssef S, Novo-Uzal E, Almagro L, Belchí-Navarro S, Pedreño MA (2013) Biotechnological approaches to enhance the biosynthesis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry Reviews* 12:191–205

***Belchí-Navarro S, *Almagro L, *Sabater-Jara AB, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA** (2013) Early signaling events in grapevine cells elicited with methyl jasmonate and cyclodextrins. *Plant Physiology and Biochemistry* 62:107-110

Belchí-Navarro S, Almagro L, Sabater-Jara AB, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA (2012) Induction of *trans*-resveratrol and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited suspension cultured cells of *Vitis vinifera* cv Monastrell. *Journal of Plant Physiology* 170:258–264

Capítulos de libro

Almagro L, Belchí-Navarro S, Fernández-Pérez F, Sabater-Jara AB, Bru R and Pedreño MA (2011) Implication of early signalling events in the production of *trans*-resveratrol in grapevine cells. *BioVeg* 2011. ISBN: 978-959-16-1286-1

Almagro L, Belchí-Navarro S, Sabater-Jara AB, Vera-Urbina JC, Selles S, Bru R, Pedreño MA (2013) Bioproduction of *trans*-resveratrol from grapevine cell cultures. *Handbook of Natural Products*. (Ed). Springer-Verlag Doi: 10.1007/978-3-642-22144-6_54

Patentes

Lorena Almagro Romero, Ana Belén Sabater Jara, Antonio José López Pérez, M^a Ángeles Pedreño García (2008) Uso combinado de ciclodextrinas y jasmonato de metilo para incrementar la producción de alcaloides indólicos. P200802437

Comunicaciones a congresos

Lax V, Sabater-Jara AB, Almagro L, López-Pérez AJ, Pedreño MA (2008) Production of secondary metabolites in *Lactuca sativa* celular cultures under elicitation conditions Ponencia invitada Biospain Biotec. Granada

Sabater-Jara AB, Briceño Z, Belchí-Navarro S, Almagro L, Ferrer MA, Pedreño MA, Calderón AA (2008) Production of secondary metabolites and extracellular proteins in *Lycopersicon sculentum* elicited cell lines (Póster) FESPB. Tampere (Finlandia)

Almagro L, Sabater-Jara AB, Belchí-Navarro S, López-Pérez AJ, Sottomayor M y Pedreño MA (2008) Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures elicited with cyclodextrins and methyljasmonate (Póster) FESPB 2008. Tampere (Finlandia)

Belchí-Navarro S, Almagro L, Gómez-Ros LV, Sabater-Jara AB, Ros-Barceló A, Pedreño MA (2008) Analysis of apoplastic proteins and peroxidases of elicited *Capsicum* cell cultures (Póster) 8th International Peroxidase Symposium 2008. Tampere (Finlandia)

Almagro L, Sabater-Jara AB, Belchí-Navarro S, Sellés S, Bru R, Pedreño MA (2008) Extracellular proteome analysis of *Daucus carota* cell cultures after elicitation with cyclodextrins and methyljasmonate (Póster) 8th International Peroxidase Symposium 2008. Tampere (Finlandia)

Belchí-Navarro S, Almagro L, Sabater-Jara AB, Gómez Ros LV, Bru R, Pedreño MA (2009) Efecto de moléculas señal sobre la producción de resveratrol y análisis de proteínas extracelulares en cultivos elicitados de vid (Ponencia invitada) XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Zaragoza

Almagro L, Sabater-Jara A.B, Fernández-Pérez F, Calderón AA, Pedreño MA (2009) Utilización de cultivos celulares como biofactorías para la producción de fitosteroles (Póster) VIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales. Murcia

Sabater-Jara AB, Almagro L, Ferrer MA, Pedreño MA (2009) Análisis del proteoma extracelular de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* elicidadas con jasmonato de metilo (Póster) VIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales. Murcia

Sabater-Jara AB, Almagro L, Belchí-Navarro S, Pedreño MA (2010) A new strategy to enhance the production of phytosterols in *Daucus carota* cell cultures (Póster) FESPB 2010. Valencia

Sabater-Jara AB, Pedreño MA, Palazón J, Cusidó RM (2011) Taxane production in *Taxus x media* cell cultures elicited with cyclodextrins and methyljasmonate (Ponencia invitada) XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Castellón

Hernández-Ruiz J, Sánchez-Godinez A, Youssef SM, Sabater-Jara AB, Cruz-Ruiz RM, Novo-Uzal E, Pedreño MA (2011) New method for the identification of flavonoids, ginkgolides and bilobalide in Ginkgo biloba extracts by HPLC-ESI-MS-TOF. 1st International Meeting FA1006-COST Action: PlantEngine I: Current state and vision for the future. Murcia

Almagro L, Belchí-Navarro S, Fernández-Pérez F, Sabater-Jara AB, Bru R and Pedreño MA (2011) Implication of early signalling events in the production of *trans*-resveratrol in grapevine cells (Ponencia) 8th International Congress on Plant Biotechnology. Cuba

Almagro L, Belchí-Navarro S, Sabater-Jara AB, Lijaveztky D, Bru R, Pedreño MA (2012) Different strategies to unravel mechanisms involved in resveratrol production in elicited grapevine cell cultures (Ponencia invitada) Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV). Mar de Plata (Argentina)

Sabater-Jara AB, Onrubia M, Palazón J, Cusidó RM, Pedreño MA (2013) Analysis of transcript profile and its relationship with taxane production in *Taxus media* elicited suspension cultured-cells (Póster) XIII Congresso Luso Espanhol de Fisiología Vegetal. Lisboa (Portugal)

Sabater-Jara AB, Miras-Moreno B, Cruz-Ruiz RM, Pedreño MA (2013) Early signaling events in carrot suspension cultured-cells elicited with cyclodextrins (Póster) XIII Congresso Luso Espanhol de Fisiología Vegetal. Lisboa (Portugal)

Premios

I Edición del premio a la investigación aplicada en la empresa 2009. “Producción de fitoalexinas y compuestos bioactivos de interés agronómico y farmacológico mediante la estimulación de cultivos celulares vegetales”. Concedido por el “Centro Europeo de Empresas e Innovación de Murcia” (CEEIM)

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que de algún modo han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra M^a Ángeles Pedreño, directora de este trabajo, la confianza que un buen día depositó en mi, por su apoyo y orientación, sin los cuales habría sido imposible realizar este trabajo. Gracias por enseñarnos a “no tirar la toalla” y seguir luchando cada día por nosotros y nuestro futuro.

Agradecer a la Dra Rosa M^a Cusidó, directora de esta memoria, por acogerme en su laboratorio y por la ayuda prestada durante todo este tiempo a pesar de la distancia. Gracias por brindarme la oportunidad de conocer a gente maravillosa con la que he pasado buenos ratos tanto dentro como fuera del laboratorio.

Agradecer también a los Dres Palazón, Bonfill y Moyano de la Universidad de Barcelona, por recibirme en su laboratorio con la mayor simpatía y agrado y estar siempre dispuestos a resolver cualquier “problemilla” y cómo no, por esas maravillosas comidas de Navidad tan “internacionales” y llenas de sorpresas.

A mis compañeros del laboratorio, porque con todos y cada uno he aprendido algo:

A Lorena, por haberme introducido en este “mundillo” de la investigación, con quien compartí mis primeras experiencias con el cultivo *in vitro*. Gracias por todos estos años de amistad y aventuras no sólo profesionales sino también personales, buenas y no tan buenas, pero en definitiva los buenos amigos siempre están ahí.

A Sarai, porque aunque al principio de iniciar esta andadura éramos simplemente compañeras, te has convertido en una gran amiga con la que he pasado buenísimos momentos. Muchas gracias por tu ayuda en la preparación de los experimentos y por mantener el laboratorio “a raya”, siempre con la bayeta en la mano y por tu disponibilidad a la hora de realizar cualquier tarea.

A Francisco, ese pequeño rui señor que tenemos revoloteando por el laboratorio y que nos hace tanto reír con sus interminables chistes, pero sobre todo por su valentía a la hora de afrontar nuevos retos en investigación y por ser un trabajador nato, además de ser el “hombre de la casa” y un gran compañero y amigo.

A ese terremoto llamado Rosa, por los años de amistad. Quién nos iba a decir cuando estábamos en el Instituto que íbamos a acabar trabajando juntas!!! Gracias por cuidar como nadie de mis zanahorias y por tu incansable afán de aprender. Por cierto, que no se te olvide hacerte el traje para el Nobel que esta vez nos lo llevamos.

A Esther, por esas largas jornadas de trabajo (y también de ocio aunque sea en el laboratorio) y por sus incansables serenatas a cualquier hora del día y en cualquier idioma y sobretodo, por ser una enciclopedia andante. Muchas gracias por estar siempre dispuesta a echarme una mano.

A Laura, gran investigadora donde las haya aunque ahora dedicada a una tarea más difícil con sus dos pequeños. Muchas gracias por haber compartido grandes momentos de risas. Espero que vuelvas pronto.

A “la Pepi”, por esas semanas mortales e interminables de preparación de prácticas y por estar siempre ahí para solucionarnos cualquier problemilla de última hora. Por estar siempre dispuesta a echarnos una mano por mucho trabajo que tenga y por sus cabreos cuando le quitamos el material de laboratorio. No te enfades Pepi que lo hacemos siempre desde el cariño!

Como olvidar a mis compañeros y amigos de Barcelona Karla, Rafa y Ana con los que he pasado momentos inolvidables y aunque los tengo un poco abandonados, espero que sepan que aquí tienen una amiga para lo que necesiten. Venga que ya os queda poco también a vosotros! Y qué puedo decir de Miriam, esa gran investigadora y amiga, muchas gracias por haber aguantado mis continuas e insistentes dudas y preguntas sobre real-time en esos duros momentos de escribir la Tesis, tú sí que vales! Agradecer también al resto de compañeros de Barcelona por esas comidas tan amenas y por haberme acogido como una más.

A las nuevas generaciones, Marina, Tamara y Elena y en especial a Bego, quién te iba a decir a ti que en lugar de estar en el campo serías un ratón de laboratorio, zanahoria pa´riba, zanahoria pa´bajo. Muchas gracias a todas por ayudarnos y ale! que ya os queda poco para acabar con el máster.

A Pepe Rodríguez Matínez (más conocido como “Pepe Grissom”) y a Isabel Buendía por enseñarme el maravilloso mundo del gases-masas y estar siempre dispuestos a ayudarme.

Y por último pero no menos importante, agradecerle a mi familia (padres, hermanas, tíos y primos) su comprensión durante todos estos años sin saber muy bien a qué me dedicaba, después de mucho trabajo y esfuerzo pues aquí está. Dedicar especialmente esta memoria a mis tres soles Romeo, Paula y a la pequeña Laurita, ¡por fin he terminado los deberes! y espero a partir de ahora, poder disfrutar mucho más de vosotros y no perderme más bailes ni fiestas de fin de curso. Gracias una vez más por confiar en mí.

*Un recuerdo muy especial en memoria del
Profesor Alfonso Ros Barceló*

Índice

Abreviaturas.....	i
Introducción.....	1
I. Estudio de las respuestas de defensa en plantas: Elicitación.....	3
I.1. Elicitación con oligosacáridos cíclicos: ciclodextrinas.....	4
I.2. Elicitación con jasmonatos: jasmonato de metilo.....	6
II. Elicitación como estrategia para incrementar la producción de metabolitos secundarios.....	8
II.1. Metabolismo secundario en plantas.....	8
II.2. Producción de metabolitos secundarios mediante cultivo de células vegetales.....	12
II. 3. Metabolitos secundarios de interés: compuestos isoprenoides.....	14
II.3.1. Biosíntesis de compuestos de naturaleza isoprenoide.....	15
<i>Ruta del ácido mevalónico (MVA)</i>	16
<i>Ruta del metileritritol 4-fosfato (MEP)</i>	18
II.4. Cultivos celulares de pimiento (<i>Capsicum</i> sp) como modelo para la biosíntesis de compuestos de naturaleza isoprenoide.....	19
II.5. Cultivos celulares de zanahoria (<i>Daucus carota</i> L.) como fuente de esteroides vegetales.....	22
II.5.1. Esteroides vegetales o fitosteroides.....	23
II.5.2. Biosíntesis de los fitosteroides.....	24
II.5.3. Funciones de los fitosteroides en plantas.....	26
II.5.4. Actividad biológica de los fitosteroides.....	28
II.6. Cultivos celulares de tejo (<i>Taxus x media</i>) como fuente de taxanos.....	29
II.6.1. Taxol y taxanos relacionados.....	31
II.6.2. Producción biotecnológica del taxol.....	33
II.6.3. Biosíntesis del taxol.....	35
III. Rutas de transducción de la señal mediadas por elicitores que conducen a la producción de metabolitos secundarios.....	43
III.1. Implicación del calcio en la señalización intracelular inducida por la elicitación.....	45
III.2. Implicación de las especies reactivas de oxígeno y del óxido nítrico en la señalización intracelular dirigida por elicitores.....	47

III.2.1. Especies reactivas de oxígeno.....	47
III.2.2. Óxido nítrico.....	48
III.3. Elicitación como herramienta para el estudio del proteoma extracelular.....	50
III.3.1. Tipos de proteínas funcionales de la pared celular.....	52
III.3.2. Proteínas relacionadas con la patogénesis.....	55
III.3.2.1. Peroxidasas.....	58
III.3.2.2. Quitinasas.....	59
III.3.2.2. Glucanasas.....	60
Objetivos.....	61
Material y Métodos.....	65
I. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	67
I.1. Inducción y mantenimiento de callos.....	67
I.2. Iniciación y mantenimiento de suspensiones celulares.....	70
II. Medida del crecimiento celular.....	70
II.1. Caracterización del crecimiento celular.....	70
II.2. Determinación de la viabilidad celular.....	71
III. Tratamientos de elicitación.....	72
III.1. Experimentos de elicitación en cultivos celulares de <i>Capsicum</i> sp.....	72
III.2. Experimentos de elicitación en cultivos celulares de <i>D. carota</i>	72
III.3. Experimentos de elicitación en cultivos celulares de <i>T. × media</i>	78
IV. Extracción de metabolitos.....	79
IV.1. Extracción de compuestos sesquiterpénicos en cultivos celulares de <i>C. annum</i>	79
IV.2. Extracción de fitosteroles en cultivos celulares de <i>D. carota</i>	80
IV.3. Extracción de taxanos en cultivos celulares de <i>T. × media</i>	80
V. Identificación y cuantificación de metabolitos.....	81
VI. Metodología empleada para los estudios proteómicos.....	82
VI.1. Precipitación y cuantificación de proteínas presentes en el medio extracelular.....	82
VI.2. Determinación del patrón de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	82

VI.3. Técnicas proteómicas y bioinformáticas.....	84
VI.3.1. Digestión de proteínas.....	84
VI.3.2. Adquisición de los espectros de MS y MS/MS.....	85
<i>Espectrometría MALDI-TOF/TOF</i>	85
<i>Espectrometría ESI MS/MS</i>	86
VI.3.3. Secuenciación <i>de novo</i>	86
VI.3.4. Técnicas bioinformáticas.....	88
VII. Análisis del perfil génico de cultivos celulares elicitados de <i>T. × media</i> ...	88
VII.1. Recogida de muestras.....	88
VII.2. Aislamiento y purificación de ARN.....	89
VII.3. Cuantificación del ARN total.....	89
VII.4. Síntesis de ADNc.....	89
VII.5. PCR cuantitativa a tiempo real.....	90
Resultados y Discusión	93
<i>Análisis metabolómico y proteómico de cultivos celulares de <i>Capsicum sp</i> elicitados con ciclodextrinas y jasmonato de metilo</i>	95
I. Antecedentes y objetivos.....	97
II. Caracterización de la curva de crecimiento de <i>Capsicum annuum</i>	99
II.1. Cinética de crecimiento de las suspensiones celulares.....	100
III. Identificación y cuantificación de compuestos de naturaleza sesquiterpénica en cultivos celulares de <i>C. annuum</i> elicitados con ciclodextrinas y jasmonato de metilo.....	101
IV. Análisis del proteoma extracelular de cultivos celulares de <i>C. annuum</i> elicitados con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo.....	103
V. Análisis del proteoma extracelular de cultivos celulares de <i>C. chinense</i> elicitados con jasmonato de metilo.....	114
<i>Análisis metabolómico y proteómico de cultivos celulares elicitados de <i>Daucus carota</i></i>	119
I. Antecedentes y objetivos.....	121
II. Caracterización de la curva de crecimiento de <i>Daucus carota</i>	125
II.2.1. Cinética de crecimiento de las suspensiones celulares.....	126
II.2.2. Identificación y cuantificación de fitosteroles en cultivos celulares	

de <i>D. carota</i> elicitados con ciclodextrinas.....	127
III. Caracterización de la producción extracelular de fitosteroles en suspensiones celulares de <i>D. carota</i>	129
III.1. Estudio temporal y comparativo del efecto de la adición de distintos tipos de ciclodextrinas sobre la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de <i>D. carota</i>	129
III.2. Efecto de la edad celular sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de <i>D. carota</i>	131
III.3. Efecto de la densidad celular y de diferentes concentraciones de M- β -CD sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de <i>D. carota</i> ...	132
III.4. Caracterización de la producción intracelular de fitosteroles en cultivos celulares de <i>D. carota</i> elicitados con M- β -CD.....	134
III.5. Efecto de la adición de jasmonato de metilo en presencia de M- β -CD sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de <i>D. carota</i>	135
III.6. Efecto de la luz UV-A y UV-C sobre la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de <i>D. carota</i> elicitadas con M- β -CD y MJ.....	139
IV. Ruta de señalización dirigida por los elicitores en la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de <i>D. carota</i>	143
IV.1. Implicación del calcio en la producción de fitosteroles desencadenada por ciclodextrinas metiladas al azar.....	143
IV.2. Implicación de eventos de fosforilación/desfosforilación en la producción de fitosteroles desencadenada por ciclodextrinas metiladas al azar.....	149
IV.3. Implicación H ₂ O ₂ y NO en la producción de fitosteroles dirigida por las ciclodextrinas metiladas al azar.....	150
V. Análisis del proteoma extracelular en cultivos celulares de zanahoria elicitados con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo.....	152
<i>Análisis metabolómico y genómico en cultivos celulares de <i>Taxus x media</i> elicitados con ciclodextrinas y jasmonato de metilo</i>	165
I. Antecedentes y objetivos.....	167
II. Caracterización del crecimiento en suspensiones celulares de <i>T. x media</i>	169
II.1. Caracterización del crecimiento en suspensiones celulares de <i>T. x</i>	

<i>media</i> elicidadas con jasmonato de metilo y ciclodextrinas.....	171
III. Identificación y cuantificación de taxanos en cultivos celulares de <i>T. x media</i> elicitados con jasmonato de metilo y ciclodextrinas.....	175
IV. Caracterización de la producción de taxanos en suspensiones celulares de <i>T. x media</i>	176
IV.1. Estudio temporal y comparativo del efecto de la adición de distintos tipos de ciclodextrinas solas o en combinación con jasmonato de metilo sobre la producción de taxanos en suspensiones celulares de tejo.....	176
V. Análisis de los niveles de expresión de los genes que codifican enzimas clave de la ruta de biosíntesis de taxanos utilizando cultivos celulares de <i>T. x media</i> elicitados con jasmonato de metilo y ciclodextrinas separadamente o en combinación.....	183
Conclusiones	201
Bibliografía	207

Abreviaturas

[Ca²⁺]_{cit}: concentración de calcio citosólico libre

ADPRc: adenosín difosfato ribosa cíclica

Ap: apigenina

APS: persulfato amónico

BAPT: bacatina III: 3-amino-13-fenilpropanoiltransferasa

Can: cantaridina

CAS: cicloartenol sintasa

CD: ciclodextrina(s)

CoA: coenzima A

c-PTIO: carboxi-2-fenil-4,4,5,5,-tetrametilimidazolelino-1-oxyl-3-óxido

DAB III: 10-deacetilbacatina III

DAF: diacetato de fluoresceína

DAT: 10-deacetiltaxol

DBAT: 10-deacetilbacatina III-10-*O*-acetiltransferasa

DBTNBT: debenzoiltaxol *N*-benzoiltransferasa

DE: desviación estándar

DEPC: dietilpirocarbonato

DMAPP: dimetilalilpirofosfato

DPI: ioduro de difenilo

DTT: ditioneitol

DXP: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato

DXR: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa

DXS: 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa

EAH: 5-epi-aristoloqueno hidroxilasa

EAS: 5-epi-aristoloqueno sintasa

EDTA-Na: etilendiaminotetraacetato de sodio

EEC: espacio extracelular

EGTA: ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N, N, N', N'-tetraacético

ESI: ionización por electrospray

Est: estaurosporina

FDA: Food and Drug Administration (USA)

FPP: farnesilpirofosfato
GA₃: ácido giberélico
GB5: Gamborg B₅
GC/MS: cromatografía de gases/ masas
Gen: genisteína
GGPP: geranylgeranylpirofosfato
GLP: proteína(s) tipo germina
GPP: geranyl pirofosfato
h: hora(s)
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
HDR: hidroximetilbutenil pirofosfato reductasa
HDR: hidroximetilbutenil pirofosfato reductasa.
HDS: hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa
HDS: hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa
HMBPP: hidroximetilbutenil pirofosfato
HMG CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMG: 3-hidroxi-3-metilglutaril
HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa
HMGS: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa
HPLC-DAD: cromatografía líquida de alta presión acoplado a un fotodiodo array
HP-β-CD: beta-ciclodextrina(s) hidroxipropilada(s)
IP: ioduro de propidio
IP₃: inosítidos fosfato
IPP: isopentenilpirofosfato
JA: ácido jasmónico
La³⁺: cloruro de lantano
L-NNA: Nω-Nitro-L-Arginina
LRR: proteína(s) conrepeticiones ricas en leucina
MALDI-TOF-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a tiempo de vuelo
MAPK: proteín quinasas activadas por mitógeno
MEP: metileritritol fosfato

- min:** minuto(s)
- MJ:** metil jasmonato
- MS:** Murashige y Skoog
- MVA:** ácido mevalónico o mevalonato
- MVD:** mevalonato pirofosfato descarboxilasa
- MVK:** mevalonato quinasa
- M- β -CD:** beta-ciclodextrina(s) metilada(s) al azar
- Neo:** neomicina
- NO:** óxido nítrico
- NOS:** óxido nítrico sintasa
- NPS:** nitroprusiato sódico
- NR:** nitrato reductasa
- O₂⁻:** anión superóxido
- OFA:** óxido de fenilarsina
- P450:** citocromo P450
- PAL:** fenilalanina amonioliasa
- PAM:** fenilalanina aminomutasa
- PF:** peso fresco
- PMK:** fosfomevalonato quinasa
- PP:** proteín fosfatasas
- PQ:** proteín quinasas
- Proteínas PR:** proteínas relacionadas con la patogénesis
- PS:** peso seco
- RE:** retículo endoplasmático
- ROS:** especies reactivas de oxígeno
- RR:** rojo rutenio
- SA:** ácido salicílico
- SAM:** S-adenosil-L-metionin-esterol-C-metiltransferasa
- SDS:** dodecilsulfato sódico
- SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- Ser-Thr PQ:** serina/treonina proteín quinasa
- SO:** escualeno epoxidasa

SS: escualeno sintasa

t₀: tiempo cero

T10βOH: taxano 10β-hidroxilasa

T13αOH: taxano 13α-hidroxilasa

T14βOH: taxano 14β-hidroxilasa

T1βOH: taxano 1β-hidroxilasa

T2'αOH: taxano 2'α-hidroxilasa

T2αOH: taxano 2α-hidroxilasa

T5αOH: taxano 5α-hidroxilasa

T7βOH: taxano 7β-hidroxilasa

T9αOH: taxano 9α-hidroxilasa

T_a: tiempo de agotamiento de los nutrientes

T_c: tasa de crecimiento

TAT: taxadieno-5α-ol-*O*-acetil transferasa

TBT: taxano-2α-*O*-benzoil transferasa

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

TLP: proteína(s) tipo taumatina

tr: tiempo de retención

TXS: taxadieno sintasa

Tyr-PQ: tirosin proteín quinasa(s)

UV: ultravioleta

VEC: volumen de empaquetamiento celular

VEC_{máx}: volumen de empaquetamiento celular máximo

V_{exp}: velocidad de crecimiento celular en la fase exponencial

α-CD: alfa ciclodextrina(s)

β-CD: beta ciclodextrina(s)

γ-CD: gamma ciclodextrina(s)

Introducción

I. Estudio de las respuestas de defensa en plantas: Elicitación

Las plantas responden al ataque de patógenos, insectos y herbívoros y a otros estreses bióticos y abióticos mediante la activación de un conjunto de mecanismos de defensa que incluyen la biosíntesis de metabolitos, respuesta hipersensible y barreras de defensa estructurales tales como la deposición de lignina sobre la pared celular (Vasconsuelo y Boland, 2007). Los estudios sobre las vías de transducción de señales con elicitores definidos como, *cualquier factor biótico o abiótico que, introducido en pequeñas concentraciones en un sistema celular vivo, es capaz de perturbar el metabolismo a través de una regulación transcripcional de genes relacionados con las respuestas de defensa*, han revelado claras similitudes entre las moléculas usadas por plantas y animales para percibir y transmitir señales asociadas con organismos invasores, que ponen de manifiesto la conservación en diferentes reinos de un sistema de señalización relacionado con la defensa (Nürnberger y cols., 2004). Así, el proceso de *elicitación* se define como “la inducción o aumento de la biosíntesis de metabolitos debido a la adición de pequeñas cantidades de elicitores”. Existen gran cantidad de elicitores que según su origen, pueden ser clasificados en bióticos entre los que se incluyen i) enzimas, fragmentos de la pared celular de hongos patógenos, polisacáridos derivados de microorganismos (quitina o glucanos) y glicoproteínas; ii) fitoquímicos producidos por las plantas en respuesta a daños físicos, ataques fúngicos o bacterianos, polisacáridos derivados de la pared celular (pectina o celulosa), fragmentos de pectina (formados por la acción de microorganismos sobre la pared celular); iii) quitosan, glucanos, jasmonato de metilo (MJ), ácido salicílico (SA) y etileno entre otros. Los elicitores abióticos son sustancias de origen no biológico que pueden ser de origen químico tales como sales inorgánicas, metales pesados y compuestos que perturban la integridad de la membrana plasmática o factores físicos como heridas mecánicas, radiación ultravioleta, temperaturas extremas y altas presiones cuya función principal es inducir las respuestas de defensa que tienen lugar en las plantas (Cai y cols., 2012).

Tras la percepción del elicitador por parte de proteínas receptoras de membrana tienen lugar los eventos tempranos como la fosforilación/desfosforilación de proteínas o la activación de proteínas de membrana plasmática, que conducen a la movilización o a la generación de diversas moléculas señal, como calcio libre (Ca^{2+}), óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS). Mediante la descodificación de estas señales por proteínas sensibles a ellas, se producen las respuestas tardías a través de cambios

transcripcionales, proteómicos y metabólicos. En última instancia, las vías de transducción de señales inducidas por elicitores promueven i) el refuerzo de paredes celulares con la deposición de calosa o lignina; ii) la producción de metabolitos secundarios y la biosíntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) y enzimas antioxidantes (García-Brugger y cols., 2006).

I.1. Elicitación con oligosacáridos cíclicos: ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos formados por 6, 7 u 8 unidades de α -D-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos α (1 \rightarrow 4) (Saenger, 1980), denominándose α -, β - y γ -CD, respectivamente. Estos compuestos naturales se producen a partir de la degradación enzimática del almidón por acción de la enzima ciclodextrín-glicosil-transferasa (Szejtli, 1997), que es secretada por distintos microorganismos del género *Bacillus* (Jeang y cols., 2005; Qi y cols., 2007). El proceso de obtención de las CD se basa en cuatro fases fundamentalmente: i) cultivo del microorganismo que produce la enzima ciclodextrín-glicosil-transferasa; ii) separación, concentración y purificación de la enzima a partir del medio de fermentación; iii) conversión enzimática del almidón pre-hidrolizado en una mezcla de dextrinas cíclicas y acíclicas; y iv) separación de las CD de la mezcla, purificación y cristalización de las mismas (Astray y cols., 2009).

Las CD tienen forma de cilindro cónico, que es frecuentemente caracterizado como un anillo o corona con forma de cono truncado, con los grupos $-\text{OH}$ del C2 y C3 de los residuos de glucosa hacia el interior del anillo y con el grupo $-\text{OH}$ del C6 hacia el exterior. A su vez, los $-\text{OH}$ del C6 de las CD se encuentran situados en la cara ancha del tronco cónico mientras que los $-\text{OH}$ de los C2 y C3 lo hacen en la cara estrecha de dicho cono (Figura 1).

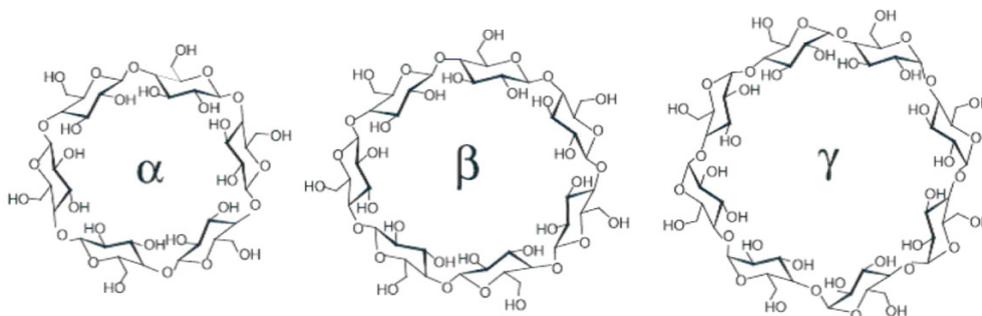


Figura 1. Esquema de las α -, β - y γ -ciclodextrinas.

Esta disposición química le confiere un interior altamente apolar (grupos $-CH$) y una superficie exterior hidrofílica debido a los grupos hidroxilo (Griffit y Bender, 1973) (Figura 2). Por esta razón, la principal característica de las CD es la formación de complejos de inclusión, nombre que reciben las estructuras formadas por la unión de la CD con una molécula (orgánica, inorgánica o ión) en su cavidad hidrofóbica (López-Nicolás y cols., 1995).

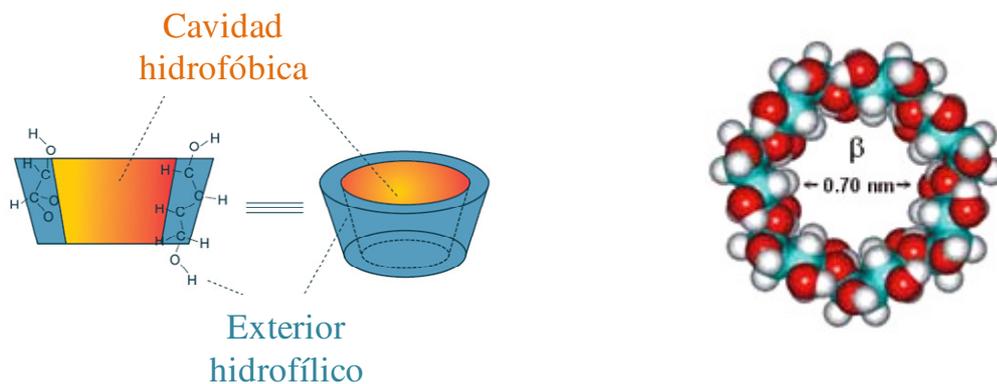


Figura 2. Estructura tridimensional (izquierda) y esquema de una β -ciclodextrina típica (derecha).

Son numerosas las aplicaciones de las CD en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Szejtli, 1997). Así, por ejemplo, en la industria farmacéutica se emplean como agentes solubilizadores para mejorar las propiedades físico-químicas de los fármacos o para incrementar la biodisponibilidad de compuestos poco solubles en agua. Asimismo, en la industria cosmética y alimentaria, las CD han sido ampliamente utilizadas como estabilizante de aromas y fragancias, para la eliminación de sabores desagradables y otros compuestos no deseados (Frömmig y Szejtli, 1994; Martín del Valle, 2004).

En los últimos años, se ha prestado gran atención al uso de las CD como agentes capaces de inducir respuestas de defensa en cultivos celulares vegetales actuando por tanto, como verdaderos elicitores (Zamboni y cols., 2009). En este sentido, estudios realizados en cultivos celulares de *Vitis vinifera* ponen de manifiesto que la incubación de estas células con β -CD, a una concentración que resulta inocua para las células (50 mM) es capaz de inducir respuestas de defensa en dichas células tales como la biosíntesis de *trans*-resveratrol (fitoalexina del género *Vitis*), así como cambios en el nivel de expresión de los genes que codifican para enzimas clave de la ruta de biosíntesis de los estilbenos (Bru y cols., 2006; Lijavetzky y cols., 2008). Estos autores

describieron las CD como elicitores de la síntesis de fitoalexinas del siguiente modo: i) la fracción de las pectinas de las paredes celulares contiene éteres y ésteres, derivados de azúcares tales como metilgalacturonato, 3-acetil galacturonato, 2-O-metilxilosa y 2-O-metil-4-acetil fucosa; ii) el tratamiento de una suspensión celular con enzimas pectolíticas libera oligosacáridos de pectina, los cuales actúan como elicitores de la síntesis de fitoalexinas (Negrel y Javelle, 1995). En este sentido, las CD modificadas se asemejan a los oligosacáridos pécticos alquil-derivados liberados de forma natural de las paredes celulares durante un ataque fúngico y además participan en la inducción de una cascada de eventos celulares que dan lugar al aumento de la síntesis de fitoalexinas.

Recientemente, Zamboni y cols., (2009) estudiaron los perfiles génicos en cultivos celulares de vid elicitados con CD después de 2 y 6 h de tratamiento y observaron que las CD inducen respuestas de defensa temprana como la activación de proteínas quinasas (PQ) ó proteínas fosfatasa (PP). Además, las CD desencadenan una cascada de transducción de señales que activan diferentes familias de factores de transcripción regulando la expresión de genes relacionados con la ruta de biosíntesis del *trans*-resveratrol como la estilbeno sintasa o la fenilalanina amonio liasa y la expresión de proteínas PR como las quitinasas ó proteínas con actividad ribonucleasa (PR-10) entre otras. Asimismo, Belchí-Navarro y cols., (2011) demostraron que las CD estimulaban la biosíntesis de silimarinas, una mezcla isomérica de flavolignanos farmacológicamente activos, formadas por el acoplamiento oxidativo de taxifolina y alcohol coniferílico, favoreciendo su acumulación en el medio extracelular de cultivos celulares de *Sylibum marianum*. Por lo tanto, la elicitación con CD no sólo incrementa la producción de metabolitos secundarios, principalmente aquellos relacionados con la defensa, mediante la inducción de la expresión de los genes responsables de su biosíntesis sino que además, permiten su acumulación en el medio extracelular e inhiben el feedback negativo y por lo tanto evitan la muerte de las células causada por la acumulación excesiva del metabolito.

I.2. Elicitación con jasmonatos: jasmonato de metilo

El ácido jasmónico (AJ) y jasmonato de metilo (MJ), junto con sus compuestos intermedios, producidos por la ruta de biosíntesis de los octadecanoides, son importantes moléculas de señalización conocidas de manera general como jasmonatos.

Derivan del ácido linolénico liberado de los fosfolípidos de membrana por la acción de lipasas. El ácido linolénico, a través de una serie de etapas que incluyen lipoxidación, ciclación y oxidación (Schaller y Stintzi, 2009) se transforma en AJ y éste puede ser metabolizado fácilmente a MJ por acción de la ácido jasmónico metiltransferasa (Gfeller y cols., 2010) (Figura 3). Estos compuestos están implicados en procesos cruciales relacionados con el desarrollo y la supervivencia de la planta, incluyendo las respuestas de defensa, el metabolismo secundario, el proceso reproductivo y la senescencia de los frutos (Avanci y cols., 2010).

El MJ fue aislado por primera vez en 1962 a partir del aceite esencial extraído de pétalos de jazmín (*Jasminum grandiflorum*) y por su volatilidad, despertó gran interés comercial en la industria del perfume (Demole y cols., 1962). Además, debido a su naturaleza volátil y a su capacidad de difundir a través de membranas, MJ ha sido considerado como una importante molécula señal mediando en las comunicaciones internas de la planta, en la modulación de las respuestas de defensa (Demole y cols., 1962; Creelman y Mullet, 1997; Seo y cols., 2001; Wasternack, 2007) y en la regulación de los procesos reproductivos (von Malek y cols., 2002).

Así, numerosos estudios demuestran que el AJ y el MJ regulan muchos procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento, el desarrollo floral, la embriogénesis y la senescencia foliar (Wasternack, 2007; Reinbothe y cols., 2009) y están implicados en la señalización local y sistémica del estrés biótico y abiótico así como en la regulación de la expresión de genes relacionados con la defensa (Pauwels y cols., 2008; Frenkel y cols., 2009; Clarke y cols., 2009). En ese sentido, en cultivos celulares de vid y tomate, la adición de MJ induce la expresión de genes que codifican proteínas PR como quitinasas, β -1,3-glucosidasas y peroxidasas (Belchí-Navarro y cols., 2013; Briceño y cols., 2012). Asimismo, el MJ es capaz de inducir la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos celulares como ajmalicina (Almagro y cols., 2011), taxanos (Onrubia y cols., 2010a) y astaxantina (Lu y cols., 2010) entre otros.

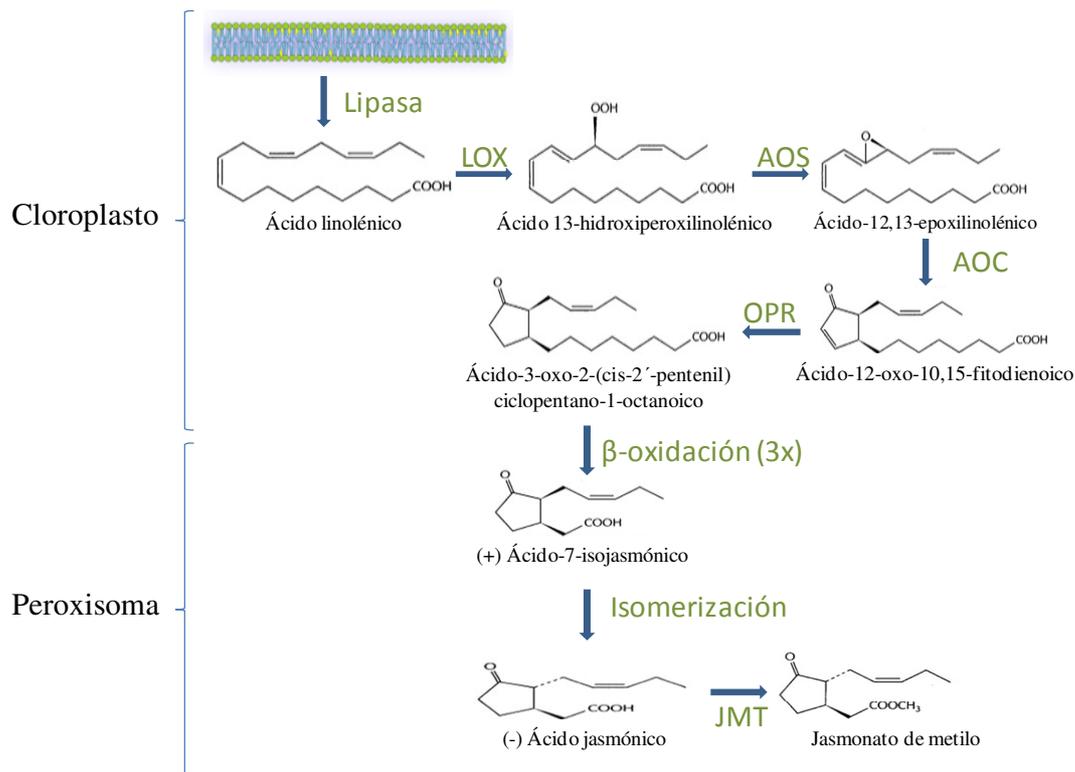


Figura 3. Ruta de biosíntesis de los jasmonatos. LOX, lipooxigenasa; AOS, aleno óxido sintasa; AOC, aleno óxido ciclasa; OPR, cis(+)-12-oxofitodienoico reductasa; JMT, ácido jasmónico carboxil metiltransferasa.

II. Elicitación como estrategia para incrementar la producción de metabolitos secundarios

II.1. Metabolismo secundario en plantas

La totalidad de las reacciones químicas que tienen lugar en las células de un ser vivo constituyen lo que se denomina *metabolismo*. Mediante estas reacciones se producen un gran número de compuestos orgánicos, incluyendo monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y sus polímeros derivados: polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc... Estos procesos son esenciales y comunes a todos los organismos y se conocen como metabolismo primario y los compuestos que se producen se denominan *metabolitos primarios*. Además de estos procesos, en las

plantas se desarrollan otras rutas que conducen a la formación de compuestos característicos de ciertos grupos taxonómicos. Estas rutas constituyen el metabolismo secundario y sus productos se denominan *metabolitos secundarios*. La biosíntesis de estos metabolitos secundarios suele encontrarse restringida a fases específicas del desarrollo vegetal y a períodos de estrés causados por factores ecológicos y ambientales.

La función de estos metabolitos secundarios podría parecer irrelevante, pero lo cierto es que la planta dedica una gran cantidad de energía a su síntesis y se han mantenido en el reino vegetal hasta nuestros días. Esto es debido a que tienen un papel primordial en la supervivencia de las plantas, ya que muchos de ellos poseen una función fisiológica determinada como los esteroides (constituyentes de las biomembranas) o las ligninas (responsables de la rigidez e impermeabilidad de los tallos) o proporcionan un mecanismo de defensa frente a virus, bacterias y hongos, análogo al sistema inmunitario de los animales. Además, actúan como señales moleculares dentro de la planta o entre la planta y los microorganismos; en defensa frente a herbívoros o como atrayentes de insectos polinizadores que dispersan semillas (Kessler y Baldwin, 2002). Asimismo, los metabolitos secundarios sirven como arsenal químico para defenderse de predadores o entrar en competición con otras plantas (sustancias alelopáticas) siendo algunos de estos compuestos constitutivos y otros inducidos en respuesta a una infección (fitoalexinas) (Sánchez-Sampedro, 2006).

La división entre metabolismo primario y secundario es confusa debido a que muchos intermediarios del metabolismo primario también lo son del metabolismo secundario. Este solapamiento funcional asegura la interconexión entre los dos metabolismos debido a que muchas moléculas generadas durante el metabolismo primario son esenciales para las rutas principales del metabolismo secundario. Las principales clases de metabolitos secundarios producidos por las plantas se pueden dividir en tres grupos principales: compuestos fenólicos, terpenoides/isoprenoides y compuestos que contienen nitrógeno o azufre tales como los alcaloides y glucosinolatos, respectivamente. Estas tres clases principales de metabolitos secundarios proceden de las rutas básicas del metabolismo primario (Figura 4). Los compuestos fenólicos (derivados de la ruta fenilpropanoide, flavonoides, estilbenos y ligninas) se sintetizan a partir de los aminoácidos aromáticos producidos en la ruta del ácido siquímico y a partir de la ruta del ácido malónico (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Los terpenos se

sintetizan a partir de acetil coenzima A (acetil CoA), por la ruta del ácido mevalónico y la ruta del metileritritol fosfato (MEP) los compuestos nitrogenados se sintetizan a partir de aminoácidos aromáticos producidos en la ruta del ácido siquímico y a partir de aminoácidos alifáticos producidos en la ruta de los ácidos tricarbóxicos (Cheng y cols., 2007).

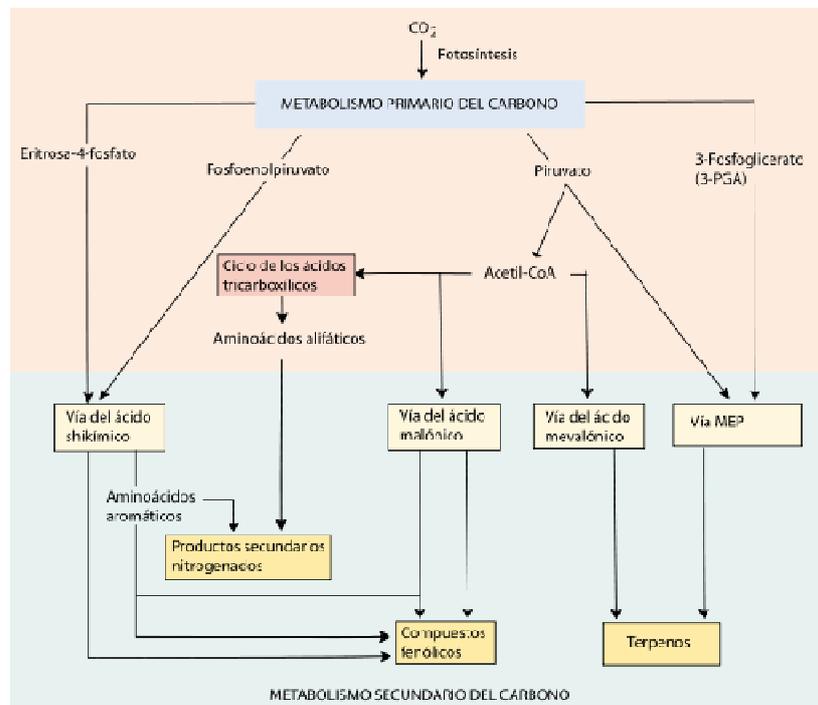


Figura 4. Esquema simplificado de las principales rutas de síntesis de los metabolitos secundarios en plantas. Tomado de Taiz y Zeiger, 2006.

Son muy numerosas las aplicaciones que tienen los metabolitos secundarios en la vida cotidiana, a nivel de la industria química, cosmética, agroalimentaria y farmacéutica, además de su importancia en la fisiología de las plantas como mecanismo de adaptación al estrés. Sin embargo, la producción de estos compuestos es a menudo baja (< 1% de peso seco (PS)) y depende fundamentalmente del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Actualmente, la mayoría de estos metabolitos secundarios se obtienen directa o indirectamente de plantas mediante técnicas extractivas o de síntesis química.

Aunque los procedimientos extractivos son la base de una actividad económica importante a nivel mundial, existen inconvenientes difícilmente salvables:

- La disponibilidad del material vegetal depende de la estacionalidad de las plantas y de las condiciones climáticas y geográficas.
- La materia prima no siempre se produce en el mismo lugar donde se realiza la extracción de los metabolitos secundarios.
- Las especies pueden ser cultivadas o silvestres. En el caso de las especies cultivadas existe una gran diversidad de variedades y cultivares por lo que, la materia prima en sí es heterogénea trasladando esta heterogeneidad a los extractos que se obtienen de las mismas. Por otra parte, la producción de biomasa en las especies silvestres no está sujeta a un control empresarial por lo que la disponibilidad de estas especies se ve rápidamente mermada por la sobreexplotación de estos recursos llegando en última instancia, al peligro de extinción como en el caso de *Taxus* sp, productora de paclitaxel (Taxol[®]) considerado como uno de los agentes anticancerígenos más utilizado en la quimioterapia frente a diversos tipos de cáncer (Expósito y cols., 2009a) y de *Ginkgo biloba* para la obtención de la ginkgólidos y bilobálidos que inhiben la agregación β -amiloide y se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Luo y cols., 2002).
- Los extractos vegetales se obtienen en estado impuro por lo que para su utilización en sectores que requieren gran pureza (farmacéuticos, cosméticos o químicos) se encarece exponencialmente su coste debido a las técnicas de purificación.

En algunos casos se ha conseguido sustituir los métodos extractivos por los de síntesis química, aunque estos presentan una serie de dificultades:

- Disponibilidad de los precursores a partir de los cuales se pretende iniciar la síntesis.
- Estereoespecificidad e inestabilidad de los compuestos.
- Dificultad intrínseca de algunas reacciones químicas y condiciones de producción severas (pH, temperatura, presión elevada, etc...).
- Elevados costes del proceso de producción.

No obstante, la obtención de metabolitos secundarios a partir de extractos de materia prima vegetal constituye la base de una actividad económica muy importante a nivel mundial, pero debido a la sobreexplotación de materiales silvestres, algunos de ellos en peligro de extinción, cada vez existen más inconvenientes para la continuidad de estos procedimientos que hoy por hoy no tienen una solución técnicamente viable.

Existen alternativas de producción de carácter biotecnológico que se basan en la utilización de los cultivos *in vitro* (órganos, tejidos y células). La obtención de metabolitos secundarios mediante la utilización del cultivo de células constituye un área emergente y de gran potencial de crecimiento ya que representa una alternativa a los procesos extractivos a partir de la materia prima vegetal y de síntesis química convencional. En este sentido, el cultivo *in vitro* de células vegetales ha abierto nuevos caminos como fuente renovable de compuestos bioactivos de gran valor añadido (DiCosmo y Misawa, 1995), debido a las ventajas que presenta su utilización ya que estos cultivos son independientes de factores geográficos, estacionales y ambientales. Estos cultivos constituyen sistemas de producción estables ya que aseguran la obtención continua de compuestos con calidad y productividad uniformes y los requerimientos de espacio para el desarrollo de la producción son reducidos. Además, el proceso de purificación del compuesto de interés es más fácil y se optimiza cuando éste se libera al medio de cultivo (Cai y cols., 2012) y se puede realizar a gran escala. También existe la posibilidad de obtener productos nuevos que no son sintetizados por las plantas de forma natural (Ramachandra y Ravishankar, 2002).

II.2. Producción de metabolitos secundarios mediante cultivo de células vegetales

Los cultivos de células se inician la formación de un callo. Un callo se define como una “*masa indiferenciada de células en crecimiento activo que, de forma natural, se origina a partir de tumores, heridas o por interacción del tejido con patógenos invasores*”. Los callos originados en cultivo *in vitro* se forman al depositar un fragmento de tejido vegetal (*explanto*) en un medio de cultivo adecuado, de manera que sus células proliferan y comienzan a perder la estructura y organización tisular que mantenían en el tejido original mediante el proceso conocido como desdiferenciación (Thorpe, 1980; Wagley y cols., 1987). Los callos obtenidos mediante este procedimiento se pueden subcultivar para su mantenimiento y propagación, inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis) y/o embriones (embriogénesis) o transferirse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión y mantenidas en agitación, para garantizar un aporte equitativo de los nutrientes y del oxígeno a todas las células que se mantienen en medio líquido. Además, tanto el cultivo de callos como de células en suspensión se emplean para la regeneración de plantas por organogénesis o embriogénesis somática y también se utilizan para la

obtención de protoplastos así como para la obtención de productos del metabolismo secundario.

Una de las condiciones más importantes a la hora de iniciar un cultivo *in vitro*, es la elección del explanto del cual derivará el cultivo. Así, callos procedentes de un mismo explanto pueden presentar diferencias en cuanto a su morfología y características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos. Por ello, lo más apropiado es seleccionar aquél que combine una buena tasa de síntesis y acumulación de los productos de interés siendo imprescindible que retenga la capacidad para expresar la ruta de síntesis del compuesto de interés, en cultivo. Por ello, la optimización de la producción de metabolitos incluye el establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo y el ajuste óptimo de los parámetros de crecimiento celular. Cuando además se quiere comercializar el producto a nivel industrial, es necesario realizar un escalado en sistemas que garanticen la producción elevada del metabolito de interés (utilizando biorreactores) para alcanzar niveles económicamente rentables.

Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas que ofrecen los cultivos de células vegetales, la producción de metabolitos secundarios mediante el uso de esta tecnología presenta aún numerosas limitaciones, siendo los principales obstáculos, la inestabilidad de las líneas celulares, el bajo rendimiento en la obtención del producto, lenta velocidad de crecimiento y problemas de escalado, siendo la productividad obtenida poco competitiva para su aplicación industrial. No obstante, y a pesar de esas limitaciones, actualmente se están comercializando varios metabolitos secundarios obtenidos mediante cultivo de células vegetales tales como la siconina, los ginsenósidos y el taxol obtenidos a partir de cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon*, *Panax ginseng* y *Taxus* sp, respectivamente (Kolewe y cols., 2008).

Por ello, en las últimas décadas, el esfuerzo en la investigación se ha centrado en el desarrollo de estrategias que incrementen la producción de metabolitos secundarios por cultivo *in vitro* para que resulte económicamente rentable por la vía biotecnológica. Estas estrategias están dirigidas fundamentalmente a:

- i. La manipulación de los cultivos celulares para mejorar la productividad de los compuestos diana, a través de la selección del material vegetal y la optimización de

las condiciones de cultivo, el cultivo de células diferenciadas, la inmovilización de las células vegetales y el empleo de elicitores, estreses abióticos y otras aproximaciones independientemente de su mecanismo.

- ii. El estudio de las vías de transducción de la señal que conducen a la biosíntesis de metabolitos secundarios.
- iii. El estudio de los factores de transcripción y su mecanismo de regulación, incluyendo la manipulación de genes reguladores para mejorar la producción de metabolitos secundarios.
- iv. La clonación de los genes que codifican para enzimas clave en la ruta de biosíntesis de los metabolitos secundarios de interés, y la modificación de los genes que dirigen el flujo metabólico hacia los compuestos diana.
- v. El estudio del flujo metabólico y del perfil metabólico de los intermediarios de la ruta de biosíntesis para conocer las rutas completas y la regulación de la acumulación de los compuestos diana.
- vi. El estudio de la transcripción génica del metabolismo secundario mediante el estudio y análisis del perfil de expresión génica en diferentes condiciones, con el fin de comprender la regulación del metabolismo secundario en todo su conjunto.

Entre los diferentes tipos de cultivos, los de células en agitación ofrecen una alternativa de naturaleza biotecnológica como sistema de producción de compuestos bioactivos ya que las células se utilizan como verdaderas biofactorías capaces de dirigir su metabolismo hacia la síntesis de determinados compuestos en respuesta a la estimulación o elicitación. Así, mientras que la planta responde a la presencia del estimulador (elicitador) sintetizando estos metabolitos de forma localizada allá donde se produce la interacción, el cultivo celular responde globalmente, ya que el elicitador entra en contacto con toda la biomasa celular. Por tanto, la cantidad total de compuesto sintetizado es mucho mayor que en la planta y está en función de la biomasa de células elicitada (Bru y cols., 2006). De esta forma se ha conseguido producir cantidades de metabolitos mayores que las extraíbles de tejidos vegetales recolectados.

II. 3. Metabolitos secundarios de interés: compuestos isoprenoides

Los terpenoides o isoprenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios ya que existen más de 50000 miembros individuales y el número de nuevos compuestos va aumentando cada año. Como clase única de compuestos son esenciales

para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas y como productos farmacéuticos, colorantes y saborizantes son de gran importancia para los seres humanos. Además, muchos de ellos, están implicados en respuestas a estreses bióticos y abióticos en plantas contra microorganismos y herbívoros y/o actúan como moléculas para atraer a insectos polinizadores, animales que dispersan semillas y depredadores que actúan sobre insectos herbívoros, por lo que son clasificados como metabolitos secundarios. Debido a ello, la mayoría de los compuestos terpenoides presentan actividad biológica y son por tanto, de interés para la medicina y la biotecnología (Ashour y cols., 2010).

II.3.1. Biosíntesis de compuestos de naturaleza isoprenoide

Los terpenoides no sólo son muy numerosos, sino que además, presentan una gran variabilidad en cuanto a estructura, ya que existen cientos de esqueletos carbonados diferentes con una amplia variedad de grupos funcionales. A pesar de su diversidad, el precursor común de todos los terpenoides es la molécula de 5 átomos de carbono (C_5) isopentenilpirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalipirofosfato (DMAPP), también denominadas unidades de isopreno. Así, la clasificación de estos compuestos se realiza en base al número de unidades de isopreno presentes en su estructura (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los terpenos basada en el número de unidades de isopreno C_5 en su estructura.

Unidades de isopreno	Átomos de carbono n	Nombre	Ejemplo
1	5	Hemiterpenos	Isopreno
2	10	Monoterpenos	Geraniol
3	15	Sesquiterpenos	Capsidiol
4	20	Diterpenos	Taxol
6	30	Triterpenos	Escualeno
8	40	Tetraterpenos	β -caroteno
9-30000	>40	Politerpenos	Caucho

La ruta biosintética de los terpenoides en plantas ha sido ampliamente estudiada (Rodríguez-Concepción, 2006; Hemmerlin y cols., 2012; Vranová y cols., 2013) y tiene lugar a partir de dos rutas diferentes, la ruta clásica o ruta del ácido mevalónico (ruta MVA) que tiene lugar en el citosol, y es mayoritariamente responsable de la generación de los sesquiterpenos y esteroides, y la recientemente descubierta ruta del metileritritol 4-

fosfato (ruta MEP) localizada en los plastidios y que da lugar a los monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos, a partir de las unidades de isopreno, IPP y DMAPP generadas por ambas rutas. Así, en los siguientes pasos de la ruta, IPP y DMAPP se condensan para generar geranilpirofosfato (GPP, C₁₀), farnesilpirofosfato (FPP, C₁₅) y geranilgeranilpirofosfato (GGPP, C₂₀). A continuación, los compuestos C₁₀-C₂₀ tras una serie de reacciones de ciclación y reordenamiento generan los esqueletos carbonados que darán lugar a cada clase de terpenos. De esta manera, GPP, FPP y GGPP son convertidos en mono- sesqui- y diterpenos, respectivamente y a su vez, FPP y GGPP pueden dimerizar para dar lugar a los precursores C₃₀ y C₄₀, respectivamente. Finalmente, tienen lugar una serie de reacciones de oxidación, isomerización, conjugación y otras transformaciones mediante las cuales, cada clase de terpenos será convertida en cientos de metabolitos terpenoides diferentes.

Ruta del ácido mevalónico (MVA)

Para construir la unidad de isopreno, IPP a través de la ruta MVA en el citosol, inicialmente dos unidades de acetil-coenzima A (acetil CoA) se condensan formando acetoacetil-CoA por acción de la enzima acetil-CoA C-acetiltransferasa o acetoacetil-CoA tiolasa. La siguiente enzima, 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) CoA sintasa (HMGS), cataliza la condensación aldólica de acetoacetil CoA con acetil CoA para dar lugar a (S)-HMG CoA, que es convertido en MVA a través de dos pasos de reducción que requieren NADPH, por acción de la enzima HMG CoA reductasa (HMGR), la cual representa un paso crítico y limitante en la ruta de biosíntesis de los compuestos terpenoides, y cuya actividad se encuentra altamente regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional en plantas (Enjuto y cols., 1995; Leivar y cols., 2005). Las etapas siguientes que conducen a la formación de IPP comprenden dos reacciones de fosforilación para convertir el MVA a MVA 5-pirofosfato, reacción catalizada por las enzimas mevalonato quinasa (MVK) y fosfomevalonato quinasa (PMK), seguido finalmente de la descarboxilación dependiente de ATP, para dar lugar a la formación de IPP, por la enzima MVA pirofosfato descarboxilasa (MVD) (Figura 5). Este IPP por acción de la enzima IPP isomerasa será convertido en DMAPP y a partir de ellos tendrá lugar la formación de compuestos de naturaleza terpenoide.

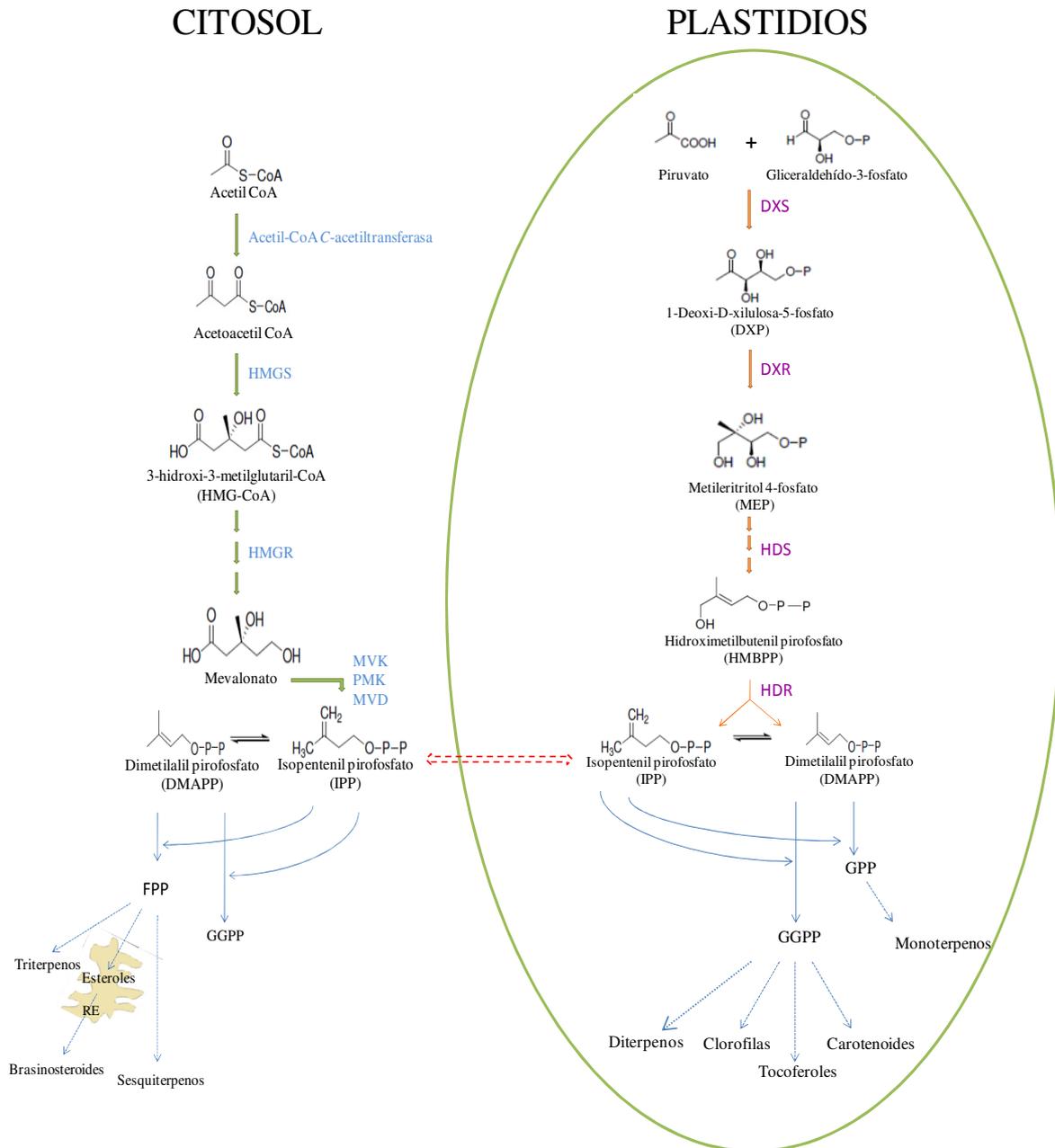


Figura 5. Rutas biosintéticas de los compuestos isoprenoides en las células vegetales. Las enzimas de la ruta del MVA se muestran en azul y las enzimas de la ruta del MEP en violeta. HMGS, 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa; HMGR, HMG CoA reductasa; MVK, mevalonato quinasa; PMK, fosfomevalonato quinasa; MVD MVA pirofosfato descarboxilasa; DXS, 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa; DXR, DXP reductoisomererasa; HDS, hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa; HDR hidroximetilbutenil pirofosfato reductasa.

Los pasos metabólicos que van desde las 3 unidades de acetato activo hasta el IPP han sido ampliamente estudiados (Banthorpe y Wirz-Justice, 1972) y se conocen los sistemas enzimáticos que participan así como la localización subcelular de los mismos (Bach, 1995). Así, la principal enzima limitante de la ruta, HMGR se encuentra anclada al retículo endoplasmático con el dominio catalítico expuesto hacia el citosol, mientras que otras enzimas de la ruta se encuentran localizadas también en el peroxisoma (Sapir-Mir y cols., 2008; Simkin y cols., 2011).

Ruta del metileritritol 4-fosfato (MEP)

A diferencia de lo que ocurre en la ruta del MVA, en la ruta alternativa o ruta de MEP, se produce la formación de IPP y DMAPP en los plastidios, para dar lugar a los mono-, di- y tetraterpenos naturales. La ruta del MEP comienza con la condensación del piruvato y del gliceraldehído-3-fosfato por acción de la enzima 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) sintasa (DXS), obteniéndose el primer producto de la ruta, DXP. En un segundo paso, el reordenamiento intramolecular y la reducción de DXP por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) produce el metileritritol 4-fosfato (MEP), considerado actualmente como el primer precursor limitante de los compuestos isoprenoides originados en los plastidios (Schwender y cols., 1999). A continuación, tiene lugar la transformación de MEP en hidroximetilbutenil pirofosfato (HMBPP), mediante una reducción catalizada por la enzima hidroximetilbutenil pirofosfato (HMBPP) sintasa (HDS), el cual finalmente convertido en una mezcla de IPP y DMAPP por acción de la enzima HMBPP reductasa (HDR) (Figura 5).

El IPP producido por la ruta del MVA es usado para la síntesis de los compuestos isoprenoides en el citosol y en la mitocondria, mientras que IPP y DMAPP producidos por la ruta del MEP sirven para la síntesis de isoprenoides en los plastidios. La conversión de IPP a DMAPP (ruta del MVA) y el equilibrio entre IPP y DMAPP (ruta del MEP) son controlados por la enzima IPP isomerasa en una reacción reversible. Tanto la ruta del MVA como la del MEP funcionan simultáneamente en las células vegetales, y a pesar de su localización en diferentes compartimentos subcelulares, existen numerosas evidencias de intercambio entre ellas, a través de la regulación coordinada de la biosíntesis de IPP y DMAPP. Así, los sesquiterpenos son normalmente sintetizados a partir de las unidades de isopreno derivadas de la ruta del MVA pero en

algunos casos, son sintetizados en los plastidios por la ruta del MEP y transportados posteriormente al citosol (Dudareva y cols., 2005).

II.4. Cultivos celulares de pimiento (*Capsicum* sp) como modelo para la biosíntesis de compuestos de naturaleza isoprenoide

El pimiento es una planta angiosperma perteneciente al género *Capsicum*, de la familia de las Solanáceas, en la que se incluyen otras muchas especies cultivadas de gran importancia para el hombre, como la patata, el tomate o el tabaco. La taxonomía del género *Capsicum* es muy compleja y actualmente, este género comprende 30 especies, entre las cuales existen cinco especies cultivadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens* (Barboza y cols., 2005). El grupo más numeroso es el de *C. annuum*, de flores blancas, que está asociado con hábitats húmedos, en lugares con poca altitud. Este grupo es también, el de mayor importancia económica e incluye desde frutos grandes y dulces que se utilizan como hortalizas hasta pimientos de pequeño tamaño, picantes o dulces, que se emplean para fabricar pimentón. El fruto del *C. annuum* es una baya semicartilaginosa de color verde, en estado de inmadurez y roja, en senescencia, colgante, con talla y forma variable dependiendo del grado de desarrollo y de las condiciones del cultivo (Figura 6). Actualmente se cultivan en el mundo varios cientos de variedades de esta especie que pueden clasificarse atendiendo a la forma del fruto, al tamaño, al color, al sabor, a la presencia o ausencia de picante, así como a su utilización (Bosland, 1996).



Figura 6. Planta de *C. annuum* en la que se muestran las flores blancas características y los frutos en crecimiento (pimientos).

Los frutos del pimiento son una excelente fuente de compuestos bioactivos de gran valor nutricional ya que contienen ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides (provitamina A), tocoferoles (vitamina E) (Howard y cols., 2000; Antoniali y cols., 2007; Sakaldas y Kaynas, 2010), flavonoides, y capsicinoides (Hasler, 1998; Howard y cols., 2000) por lo que presentan propiedades antioxidantes, digestivas y analgésicas. Así, la cantidad y composición de estos metabolitos puede variar entre los diferentes genotipos debido principalmente a las condiciones de maduración del fruto, sistemas de cultivo y métodos de procesado. Además, la presencia de algunos de estos metabolitos en los frutos del pimiento proporciona un mecanismo de defensa frente a diferentes estreses bióticos y abióticos (Aloni y cols., 2008; Schulze y Spiteller, 2009).

Así, por ejemplo, los capsicinoides, son metabolitos secundarios exclusivos del género *Capsicum*, responsables del sabor fuerte y picante de los frutos, también conocido como pungencia. Los capsicinoides son sintetizados en la placenta de los frutos a partir de la condensación enzimática de vanillilamina con ácidos grasos de cadena corta (Curry y cols., 1999; Mazourek y cols., 2009). La vanillilamina es originada por la ruta fenilpropanoide mientras que la cadena de ácido graso procede del metabolismo de aminoácidos y es la responsable del fuerte aroma de los frutos de pimiento (Wahyuni y cols., 2013a). Dentro de la familia de los capsicinoides podemos destacar la capsicina que actúa como metabolito de defensa de las plantas de pimiento contra hongos del género *Fusarium* (Wahyuni y cols., 2013b) y entre otras aplicaciones se está utilizando como rubefaciente debido a que activa la circulación de la sangre y calma el dolor cutáneo, por lo que se utiliza en enfermedades reumáticas o en lumbalgias.

Por otro lado, el capsidiol es un sesquiterpeno bicíclico dihidroxilado (tipo eremofilano) (Figura 7) que se acumula en el apoplasto de la planta, y ha sido aislado a partir de muchas especies de Solanáceas como el tabaco y el pimiento en donde es sintetizado en respuesta a varios estímulos tales como la radiación ultravioleta (UV), elicitores bióticos (celulosa, extracto de levadura, extractos fúngicos) y elicitores abióticos (CuSO_4 , MnCl_2) (Vögeli y Chappell, 1990; Zhao y cols., 2004). Como todos los sesquiterpenos naturales, el capsidiol es sintetizado a partir del FPP en un proceso que comprende dos pasos catalizados por las enzimas 5-epi-aristoloqueno sintasa (EAS) (Facchini y Chappell, 1992) y 5-epi-aristoloqueno hidroxilasa (EAH) (Ralston y cols.,

2001) para formar finalmente el capsidiol (Whitehead y cols., 1989). Sus numerosas aplicaciones se deben a su actividad antifúngica y antimicrobiana (De Marino y cols., 2006).

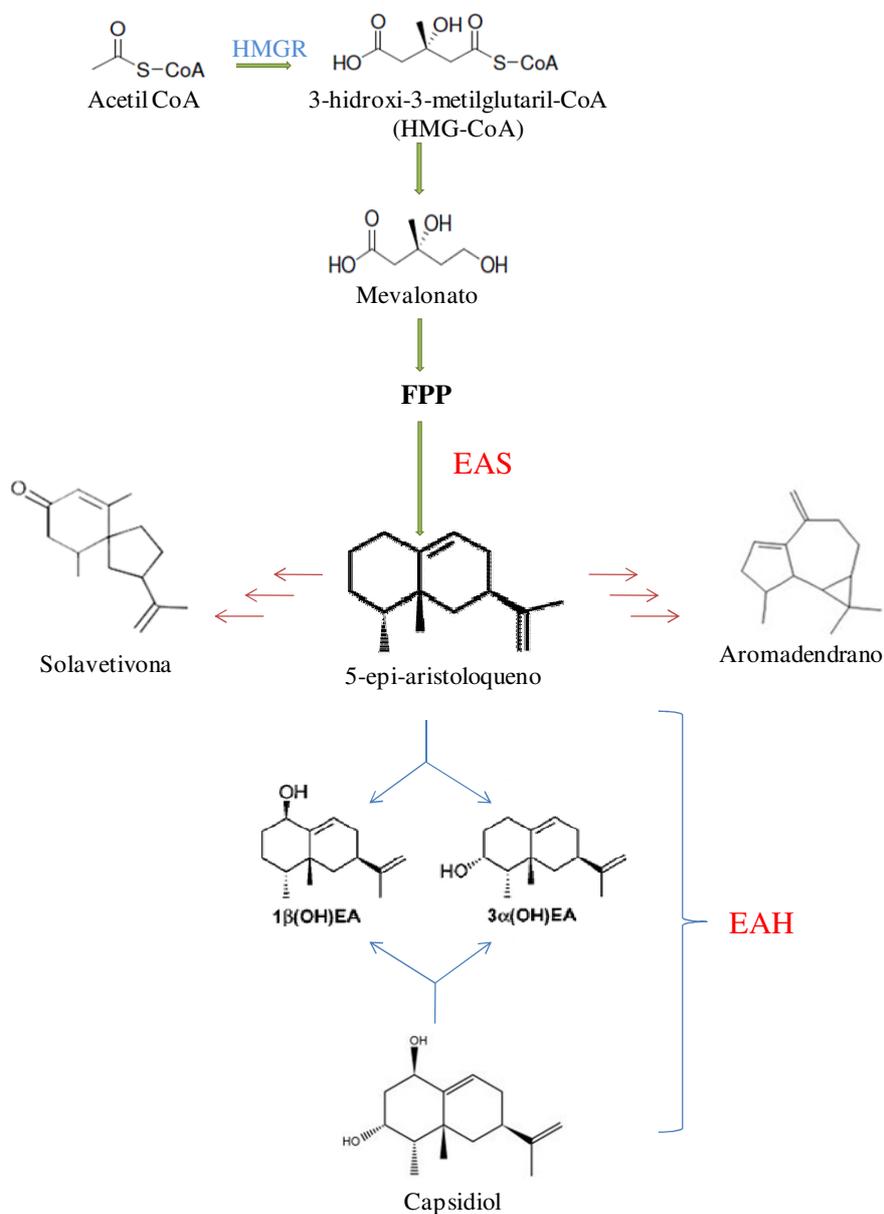


Figura 7. Ruta de biosíntesis del capsidiol a partir del FPP obtenido por la ruta del mevalonato (MVA). Las enzimas de la ruta específica que conducen a la síntesis del capsidiol se muestran en rojo. EAS, 5-epi-aristoloueno sintasa; EAH, 5-epi-aristoloueno hidroxilasa.

II.5. Cultivos celulares de zanahoria (*Daucus carota* L.) como fuente de esteroides vegetales

La zanahoria (*Daucus carota* L.) es una planta angiosperma originaria del centro asiático y del mediterráneo, perteneciente a la familia de las Umbelíferas o Apiáceas, que cuenta con cerca de 250 géneros y más de 2500 especies, entre las que se incluyen otras muchas especies cultivadas de gran importancia para el hombre como el apio, el hinojo o el perejil. Esta familia se caracteriza por presentar las flores agrupadas en inflorescencias llamadas “umbelas”. En el caso de *D. carota*, las flores son de color blanco, con largas brácteas en su base. El sistema radicular consiste en una raíz primaria engrosada que, incluyendo parte del hipocótilo, constituye el órgano de consumo de la especie. Además, está rodeado por numerosas raíces secundarias ramificadas y finas que sirven como órganos de absorción. El fruto, desarrollado después de la polinización cruzada entomófila es un esquizocarpo, formado por dos mericarpos (diaquenio) espinosos que hacia la madurez se dividen ventralmente, conteniendo una semilla cada uno (Figura 8).



Figura 8. Detalles de la planta de *Daucus carota*: inflorescencia con brácteas en la base (A); hojas (B); raíz (C); semilla (D).

Esta planta ha sido cultivada y consumida desde la antigüedad y utilizada en la medicina tradicional china para el tratamiento de diferentes enfermedades (Pant y Manandhar, 2007) ya que presenta una amplia gama de efectos beneficiosos, entre los

se incluyen su actividad antibacteriana (Rossi y cols., 2007), antifúngica y antihelmíntica (Tavares y cols., 2008), hepatoprotectora (Bishayee y cols., 1995) y actividad antitumoral (Yang y cols., 2008; Fu y cols., 2009). El término castellano “zanahoria” tiene su origen en la palabra árabe “isfannariya” ya que fueron verdaderamente los árabes los que introdujeron este cultivo desde el norte de África en España y, desde aquí, hasta Holanda y el resto del continente.

Su apreciación como producto de gran valor nutricional se debe al alto contenido en carotenoides, destacando el β -caroteno o provitamina A que se degrada en retinol o vitamina A en el organismo humano. Esta apreciación positiva se ha visto aumentada ya que diversos estudios demuestran que los alimentos ricos en pigmentos como antocianinas, carotenoides y flavonoides, debido a sus propiedades antioxidantes, tienen la capacidad de prevenir ciertas enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y el envejecimiento celular (Sun y cols., 2009). En el caso de la zanahoria, el contenido de carotenoides es de 10 hasta 1000 veces más elevado que en la mayoría de las hortalizas y este hecho aún puede ser superado con las líneas genéticas de mayor contenido que se han incorporado recientemente en el mercado. La raíz también se utiliza en la industria alimentaria como materia prima vegetal para congelados, encurtidos, jugos y enlatados.

Numerosos estudios han demostrado que los cultivos celulares de zanahoria sometidos a diferentes condiciones de estrés (infección fúngica, metales pesados o luz UV) son capaces de producir diferentes compuestos tales como antocianinas (Hirner y cols., 2001), cumarinas como 6-metoximeleína (Guo y cols., 1993) y compuestos derivados del ácido benzoico como el ácido *p*-hidroxibenzoico (Schnitzler y cols., 1992) cuya biosíntesis se incrementa bajo condiciones de estrés y por lo tanto, están involucrados en las respuestas de defensa de la zanahoria (Mercier y cols., 2000).

II.5.1. Esteroles vegetales o fitosteroles

Los esteroides vegetales o fitosteroides son componentes esenciales de las membranas de todos los organismos eucariotas ya que son responsables de su permeabilidad y la fluidez (Piironen y cols., 2000; Posé y cols., 2009). En las plantas, se han identificado más de 200 tipos diferentes de fitosteroides, siendo el más abundante el β -sitosterol, seguido del campesterol y estigmasterol, que constituyen el 95-98% de

todos los esteroides de plantas (Lagarda y cols., 2006). Así, los fitosteroides están presentes en las plantas en cantidades que varían desde 0.01 al 0.1 % de peso fresco, (PF) que se corresponde con 100-1000 mg de esteroides totales/ kgPF (Neelakandan y cols., 2012). Están presentes en todas las frutas y verduras, y por lo tanto están incluidos regularmente en la dieta humana. En general, los aceites vegetales y los productos derivados de aceite se consideran las fuentes más ricas de esteroides, seguido de los cereales, productos a base de cereales y frutos secos (Piironen y cols., 2000).

II.5.2. Biosíntesis de los fitosteroides

Los fitosteroides son compuestos isoprenoides sintetizados a partir de IPP que procede exclusivamente de la ruta biosintética del MVA que tiene lugar en el citosol. La conversión del IPP a DMAPP por la enzima IPP isomerasa y la siguiente condensación de éstos, da lugar a la formación de GPP. A continuación, se produce la formación de FPP, el cual sirve de punto de ramificación para la síntesis de sesquiterpenos y triterpenos (esteroides) mediante la adición de una segunda molécula de IPP a GPP, reacción catalizada por la enzima FPP sintasa. Tras la formación de FPP, la enzima escualeno sintasa (SS) produce la condensación de dos moléculas de FPP formándose el escualeno, precursor de esteroides y otros triterpenos en plantas (Abe y cols., 1993) (Figura 9), por lo que SS desempeña un papel regulador importante en la ruta de biosíntesis de estos compuestos (Devarenne y cols., 2002).

La ciclación de escualeno a 2,3-oxidoescualeno es catalizada por la enzima escualeno epoxidasa (SO). A continuación, 2,3-oxidoescualeno se cicla para formar cicloartenol mediante la actuación de la enzima cicloartenol sintasa (CAS), que representa el primer paso comprometido de la biosíntesis de fitosteroides. El cicloartenol, es el esteroide cíclico precursor de todos los productos finales de la ruta. A partir de él, la síntesis de los fitosteroides tiene lugar en tres rutas paralelas que conducen a la formación de los esteroides C8 (colesterol), C9 (campesterol) y C10 (fucosterol, sitosterol y estigmasterol). En un paso inicial, S-adenosil-L-metionin-esteroide-C-metiltransferasa (SAM) añade grupos metilo en la posición C24 dando lugar a 24-metilcicloartenol, el cual se modifica mediante una serie de reacciones de metilación/demetilación, oxidación/reducción en diferentes posiciones dando lugar al intermedio 24-metilenlofenol. En esta fase de la ruta, los compuestos intermediarios producidos a

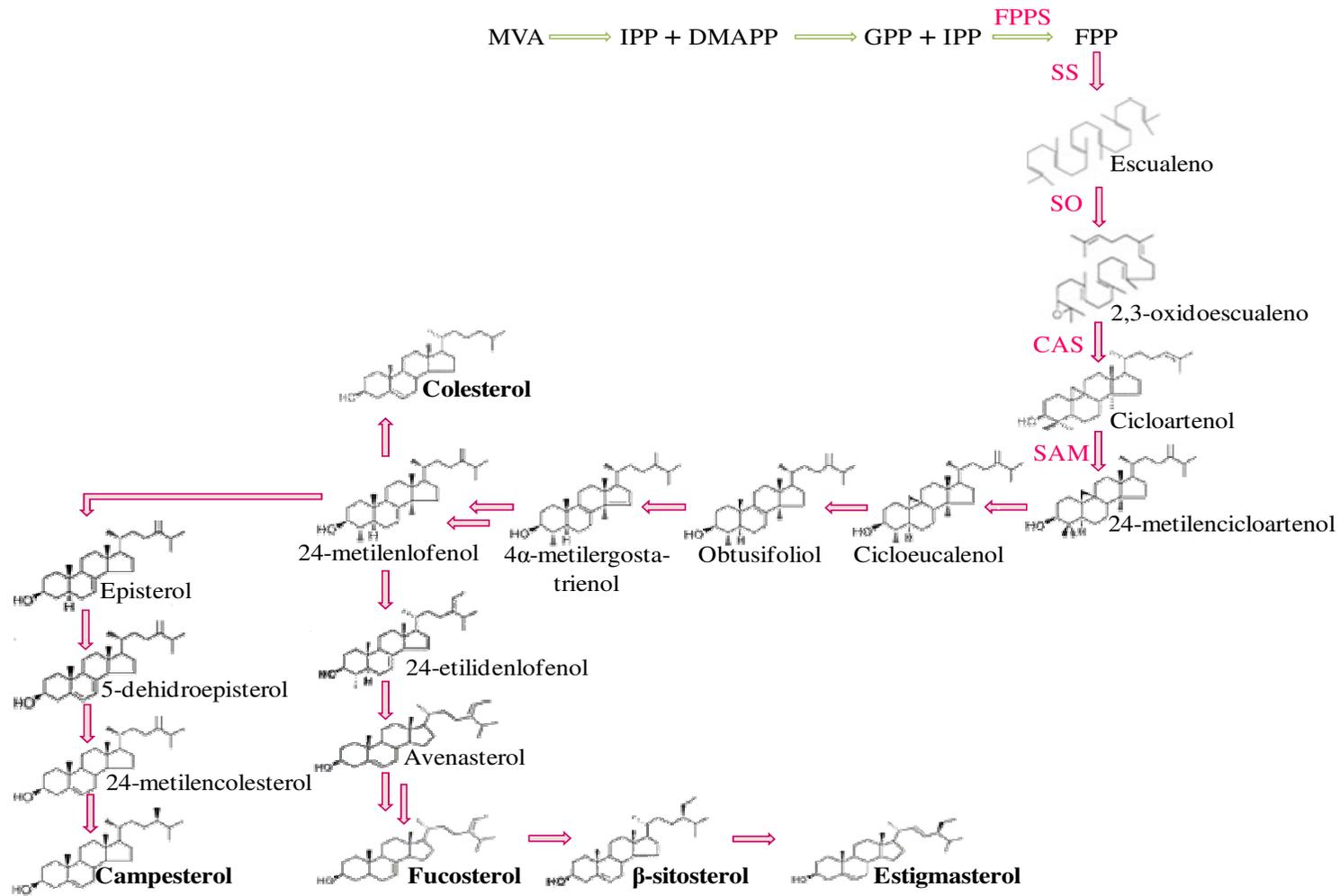


Figura 9. Ruta de biosíntesis de los esteroides vegetales. Las enzimas de la ruta específica que conducen a la síntesis de fitosteroides se muestran en rosa. SS, escualeno sintasa; SO, escualeno epoxidasa; CAS, cicloartenol sintasa; SAM, S-adenosil-L-metionin-esterol-C-metiltransferasa

partir de éste pueden ser metilados de nuevo en la posición C24 en una reacción enzimática que provoca una bifurcación biológicamente importante en la vía. Los esteroides que se someten a esta reacción de metilación en C24 están destinados a la producción de sitosterol y estigmasterol, que funcionan como esteroides de membrana mientras que los esteroides no modificados por esta reacción se acumulan como esteroides de membrana como el campesterol y potencialmente, pueden entrar en la biosíntesis de brassinosteroides.

II.5.3. Funciones de los fitosteroides en plantas

Los fitosteroides son compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo de los organismos eucariotas ya que constituyen componentes estructurales de las membranas biológicas y además sirven como precursores para la biosíntesis de hormonas esteroideas como los brassinosteroides en plantas (Schaller, 2003). Además, en los últimos años, gracias a la caracterización de los componentes enzimáticos de la ruta de biosíntesis de los esteroides vegetales y a la descripción fenotípica de un conjunto de mutantes de la ruta biosintética en *Arabidopsis thaliana* se ha realizado la identificación de los procesos del crecimiento y desarrollo que se ven influenciados por los esteroides (Posé y cols., 2009; Rasbery y cols., 2007). Así, los resultados obtenidos han demostrado un papel esencial de los esteroides en la señalización de hormonas. De hecho, estudios recientes sugieren que las proteínas unidas a la membrana, implicadas en el transporte polar de auxinas (Willemsen y cols., 2003; Men y cols., 2008) o de señalización de etileno (Souter y cols., 2002, 2004), presentan una alteración en su actividad y funcionalidad como consecuencia de una incorrecta composición en los esteroides de membrana.

Por otro lado, los esteroides de membrana además de contribuir a la fluidez y permeabilidad de la membrana, participan en el control de los procesos metabólicos asociados a la membrana y también son necesarios para el correcto tráfico de vesículas ya que interactúan no sólo con las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos sino también con proteínas que modulan el estado físico de la bicapa lipídica, restringiendo el movimiento de las cadenas de ácidos grasos (Boutté y Grebe, 2009). Los esteroides también actúan en la regulación de la actividad de las proteínas dentro de la membrana ya que afectan a la conformación de las mismas (y por lo tanto a su funcionalidad) y a su actividad, debido a interacciones directas esteroide-proteína. Así, los esteroides facilitan

la unión a la membrana y por tanto, la actividad de una proteína argonauta de *Arabidopsis* necesaria para la correcta función de los microARN (Brodersen y cols., 2012). Grandmougin-Ferjani y cols., (1997) demostraron que el estigmasterol actuaba como un modulador de la actividad H⁺-ATPasa de la membrana plasmática. Asimismo, los esteroides también pueden reorganizar el contenido lipídico en la bicapa formando dominios con una composición variada de lípidos, que dan lugar a alteraciones en la actividad de las proteínas asociadas a la membrana plasmática (Roche y cols., 2008; Kierszniowska y cols., 2009). En ese sentido, numerosos estudios han propuesto la existencia de microdominios en las membranas enriquecidos con esteroides y esfingolípidos que pueden ser aislados mediante el uso de detergentes denominados “rafts lipídicos” que pueden jugar un papel importante en el reclutamiento de componentes moleculares implicados en las rutas de señalización relacionadas con la defensa (Mongrand y cols., 2004; Bhat y cols., 2005; Laloi y cols., 2007).

Recientemente, también se les ha atribuido a los fitosteroides un papel relacionado con la defensa de las plantas frente a diversos tipos de estrés tanto biótico como abiótico (Devarenne y cols., 2002; Griebel y cols., 2010). Posé y cols., (2009) revelaron que los fitosteroides juegan un papel esencial en la localización de las NADPH oxidasas de membrana requeridas para la regulación de ROS y la tolerancia a sequía. Además, en plantas de *Arabidopsis*, la sobreexpresión de la enzima HMGS, responsable de proporcionar los precursores para la biosíntesis de fitosteroides, parece estar implicada en el aumento de la resistencia frente a *Botrytis cinerea* y H₂O₂ (Wang y cols., 2012). Estos autores demostraron que los fitosteroides juegan un papel clave en la inmunidad innata frente a bacterias patógenas a través de la regulación del flujo de nutrientes en el apoplasto mediado por la enzima SS, que cataliza el primer paso de la ruta de biosíntesis de fitosteroides. Asimismo, Griebel y cols., (2010) utilizando un mutante de la enzima SAM2 en *Arabidopsis*, implicada en la biosíntesis de fitosteroides, también participaba en la inmunidad innata contra bacterias patógenas. Así, la expresión del gen que codifica para la enzima C22 desaturasa, que convierte β-sitosterol a estigmasterol, resultó fuertemente inducida tras la inoculación del patógeno *Pseudomonas syringae*. Más aún, esa inducción de la formación de estigmasterol resultó ser independiente de las rutas de señalización de defensa clásicas, incluyendo SA, AJ y etileno. Además, la aplicación exógena de compuestos generadores de ROS dio lugar a una inducción en la biosíntesis de estigmasterol en hojas.

II.5.4. Actividad biológica de los fitosteroles

Los fitosteroles son particularmente abundantes en el reino vegetal: están presentes en los frutos, semillas, hojas y tallos de prácticamente todos los vegetales conocidos (Ling y Jones, 1995). Por este motivo, también están presentes normalmente en nuestra dieta. Se estima que la ingesta diaria de fitosteroles, la que obviamente es muy variable ya que depende de los hábitos alimentarios de la población, se encuentra en un rango que va desde los 160 mg/día hasta los 500 mg/día. Los fitosteroles químicamente identificados suman más de 25 estructuras diferentes, pero son sólo tres los que están en mayor proporción: el β -sitosterol (C29), el campesterol (C28) y el estigmasterol (C29), quienes en su conjunto constituyen el 95-98% de los fitosteroles identificables en extractos vegetales. Los fitosteroles comparten con el colesterol el núcleo central de la molécula, la estructura ciclopentano perhidrofenantreno. La diferencia estructural de los fitosteroles con el colesterol y entre los diferentes fitosteroles radica en la cadena hidrocarbonada lateral. En el colesterol esta cadena está formada por ocho carbonos y es saturada. En los fitosteroles está formada por 9 o 10 carbonos y, en algunos de ellos, presenta un doble enlace (estigmasterol). Los fitoestanoles están en menor proporción que los fitosteroles en el reino vegetal, pero pueden ser formados por la reducción química del doble enlace de la posición D-5 de la estructura cíclica. Industrialmente se preparan los respectivos derivados saturados del β -sitosterol (sitostanol), del campesterol (campestanol) y del estigmasterol (estigmastanol). La diferencia estructural existente a nivel de la cadena lateral de los fitosteroles y de los fitoestanoles con el colesterol es la responsable de los particulares efectos hipocolesterolémicos atribuidos a estos esteroides vegetales.

Numerosas evidencias experimentales han demostrado que los esteroides vegetales tienen un importante efecto hipocolesterolémico, reduciendo tanto los niveles de colesterol total como los de colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (Varady y cols., 2007). El efecto mejor estudiado de los esteroides vegetales es la inhibición de la absorción intestinal de colesterol, tanto el procedente de la dieta (300 mg/día) como el colesterol endógeno circulante en la bilis (100 mg/día) que al ser parcialmente reabsorbido en el intestino constituye, la principal forma de captación. Los esteroides vegetales, al ser más hidrofóbicos que el colesterol, pueden competir con él y de esta manera, se produce una disminución de la incorporación del colesterol en las

micelas lo que se traduce en una disminución de la absorción intestinal de colesterol. A dosis elevadas de esteroides vegetales, la absorción de colesterol disminuye entre un 30-50% (Ostlund y cols., 2006). Además, los esteroides vegetales pueden reducir la tasa de esterificación del colesterol en el enterocito (afectando a la actividad de las enzimas implicadas) y consecuentemente, reducen la cantidad de colesterol exportado a la sangre en forma de quilomicrones. También se ha sugerido que, en presencia de esteroides vegetales, la tasa de precipitación del colesterol puede incrementarse y, por tanto desplazarse a una forma no-absorbible o menos absorbible.

Actualmente se conoce que los fitoesteroides y fitoestanoles poseen propiedades inmunomoduladoras que podrían ser beneficiosas para la prevención del cáncer de ovario (McCann y cols., 2003), cáncer de mama (Awad y cols., 2007), control de la hiperplasia prostática benigna (Lowe y Ku, 1996; Awad y cols., 2001) y daño tisular asociado a inflamación (Bouic y cols., 2001). Estos estudios sugieren que una dieta rica en fitoesteroides puede ser fuertemente protectora contra estos tipos de cáncer, ya que se desencadena un aumento de la respuesta antitumoral, inhibición del crecimiento tumoral, afectan al ciclo celular y promueven apoptosis a través de la inducción del metabolismo de esfingolípidos y la estimulación de la formación de ceramidas (Awad y cols., 2005; Kritchevsky y Cheng, 2005; Woyengo y cols., 2009). Además, los esteroides aumentan la respuesta celular de los linfocitos T tanto *in vivo* como *in vitro* (Bouic y cols., 1996, 2001; Calpe-Berdiel y cols., 2009; Bradford y Award, 2007) y promueven la expresión o actividad de factores endógenos inhibidores de la angiogénesis, proceso necesario para el crecimiento de tumores y desarrollo de la metástasis (Quesada y cols., 2006).

Por último, numerosos estudios sugieren que los fitoesteroides pueden actuar como prooxidantes o antioxidantes dependiendo de su estructura química y de las condiciones de procesado de los alimentos (Guillén y Manzanos, 1998). Así, dependiendo de la estructura química, los fitosteroides. Además, también presentan acción antimicrobiana, antifúngica y antibacteriana (Ling y Jones, 1995).

II.6. Cultivos celulares de tejo (*Taxus x media*) como fuente de taxanos

El tejo (*Taxus* sp) es un árbol dioico de follaje verde oscuro que puede alcanzar 15 ó 20 metros de altura y, a pesar de ser árboles de crecimiento lento, son muy

longevos, pudiendo superar en algunos casos los 1500 años de vida (Lewington y Parker, 1999). El tejo, es una planta gimnosperma perteneciente a la familia Taxaceae, en la que se incluyen 24 especies y 55 variedades (Spjut, 2007). De todas ellas, destaca la presencia de 8 especies, que aunque son muy similares, se diferencian en su distribución geográfica: *T. baccata* (tejo europeo), *T. brevifolia* (tejo del Pacífico), *T. canadensis* (tejo de Canadá), *T. chinensis* (tejo de China), *T. cuspidata* (tejo japonés), *T. globosa* (tejo mexicano) y *T. wallichiana* (tejo del Himalaya). Además, hay dos híbridos reconocidos: *Taxus x media* como resultado del cruzamiento entre *T. baccata* y *T. cuspidata* y *Taxus x hunnewelliana* como resultado del cruzamiento entre *T. cuspidata* y *T. canadensis* (Rehder, 1925).

El árbol del tejo se caracteriza por poseer un tronco grueso, de hasta 1.5 metros de diámetro, con la corteza de color pardo-grisácea. Sus ramas son largas y crecen horizontalmente. Las hojas son muy numerosas, largas y estrechas, de color verde oscuro por el haz y más pálidas por el envés. Sus flores masculinas se agrupan en forma de espigas, mientras que las femeninas constan de un único ovario, sencillo, sin estilo ni estigma, rodeado en la base por un disco circular, que es el que dará lugar a la pulpa del fruto, el cual es una semilla simple, de forma ovalada, cubierta por una cúpula roja que recibe el nombre de arilo, abierta por el ápice, viscosa y carnosa en la madurez, hecho que sucede en el otoño (Figura 10).

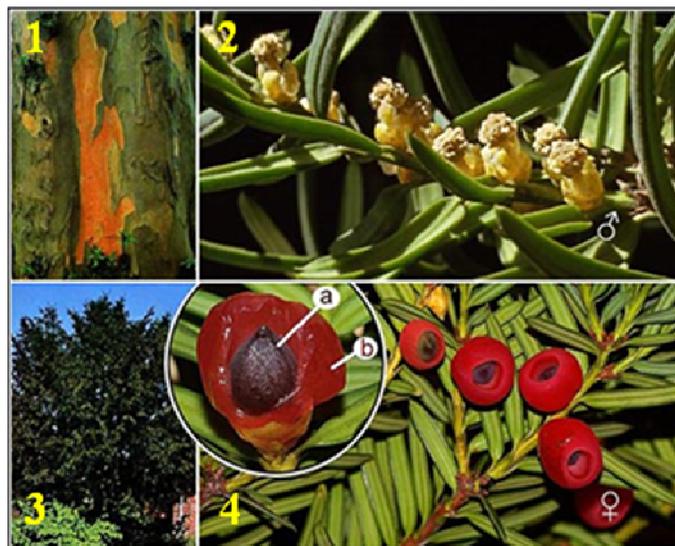


Figura 10. Detalles de la planta de *Taxus* sp. 1, corteza del árbol; 2, flores masculinas; 3, árbol con ramas frondosas; 4, semilla de tejo (a) rodeada por el arilo (b).

Esta planta ha sido cultivada desde la antigüedad como ornamental y para su explotación en la industria maderera debido a la buena calidad, dureza y resistencia de la madera (Cope, 1998). También ha sido utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de reumatismos, artritis, afecciones hepáticas y molestias de las vías urinarias (Wilson y cols., 2001). En homeopatía, estas plantas se han utilizado para tratar el dolor de cabeza, neuralgias, cistitis, reumatismo y varias afecciones de corazón y riñones (Stohs, 2004). También se han usado como antihelmíntico, antimalárico, antirreumático y para tratamiento de la bronquitis y el asma (Küpeli y cols., 2003). Aunque su uso es peligroso ya que a excepción de la pulpa del arilo, toda la planta es tóxica, en dosis controladas puede servir para estimular la actividad cardíaca y elevar la tensión y además presenta actividad expectorante al actuar sobre las vías respiratorias y recientemente, también se le han atribuido propiedades antifúngicas y antibacterianas (Nisar y cols., 2008). Además, se está investigando la utilización del material obtenido del tejo para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica ya que se ha observado que el agua de extracción de la madera del tejo muestra una protección sobre los huesos debido a que previene la disminución de la masa ósea mediante la inhibición de su resorción (Yin y cols., 2006).

Sin embargo, el gran interés que despierta el árbol del tejo es la presencia de los alcaloides diterpénicos, fundamentalmente el taxol, ya que es el compuesto más utilizado actualmente en la quimioterapia frente a diversos tipos de cáncer. Además de estos compuestos, los árboles de tejo son una fuente de compuestos con importante actividad biológica como los lignanos, flavonoides, esteroides y sus derivados glucosilados (Gurbuz y cols., 2004) que entre sus numerosas aplicaciones destacan por su actividad antitumoral, antiinflamatoria, antioxidante y antitrombótica, entre otras (Onrubia y cols., 2010).

II.6.1. Taxol y taxanos relacionados

El taxol es un alcaloide diterpénico complejo que se encuentra presente en las diferentes especies vegetales de *Taxus* sp. Se aisló por primera vez de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) en donde se encuentra en mayor cantidad (Wani y cols., 1971). El taxol ha generado una gran expectación debido a su potente actividad antitumoral ya que es considerado como uno de los agentes quimio-terapéuticos contra el cáncer más prometedor. Su capacidad antitumoral se basa, a diferencia de la mayoría

de compuestos anticancerígenos, en su capacidad para promover la polimerización de la tubulina a la vez que estabiliza los microtúbulos ya formados rompiendo el equilibrio microtúbulo/tubulina y provocando la parada del ciclo celular y consecuentemente, la muerte de las células mitóticamente activas (Schiff y cols., 1979). Esta capacidad ha hecho posible que el taxol se haya aprobado y establecido desde 1992 por la FDA como un importante y efectivo agente antineoplásico frente a un amplio número de tumores (Zhong, 2002). Actualmente se ha probado muy eficaz frente a tumores sólidos de pulmón, colon, piel, ovarios, mama y próstata, frente al sarcoma de Kaposi asociado al SIDA y también, frente a algunas leucemias. Paclitaxel y docetaxel, compuesto análogo al taxol desarrollado durante los estudios de obtención del taxol por semi-síntesis a partir de la 10-deacetilbacatina III (DAB III), son los nombres genéricos del Taxol[®] y Taxotere[®], marcas registradas de las empresas Bristol-Myers Squibb y Rhône-Poulenc, respectivamente.

Hasta ahora prácticamente todo el taxol utilizado en la quimioterapia contra el cáncer y en estudios científicos procede de la extracción directa del árbol o de su semi-síntesis a partir de precursores como la bacatina III y la DAB III, aislados también directamente de la planta. Sin embargo, la demanda mundial para este compuesto excede el suministro que se realiza a partir de su aislamiento de las diferentes especies de tejo, ya que su contenido es relativamente bajo (< 0.01 % en PS de corteza) (Cameron y Smith, 2008).

Por tanto, a consecuencia de la elevada demanda que existe, debido a su importante aplicación en medicina, el tejo, como fuente natural del producto, se está viendo amenazado día tras día como resultado de los procesos destructivos para la planta que implican la extracción de estos compuestos (Pant y Samant, 2008). Además, los árboles de tejo crecen lentamente y, al ser su recolección destructiva, se han investigado otros sistemas de producción alternativos. Así, con el fin de mejorar los bajos rendimientos obtenidos por unidad de biomasa y el de proteger y aligerar la presión sobre esta especie vegetal se han realizado otras aproximaciones para obtener taxol. Además de la extracción directa de la planta, de su obtención por semi-síntesis, o de su síntesis química completa (Nicolaou y cols., 1994; Holton y cols., 1994) mediante un proceso caro y comercialmente inviable, existen otras vías de producción de taxol como son su producción a partir de tejidos o células mediante cultivo *in vitro*, su

obtención por fermentación fúngica o por medio de técnicas de ingeniería genética aplicadas a su producción en microorganismos (Guo y cols., 2006).

II.6.2. Producción biotecnológica del taxol

Los bajos rendimientos en la extracción de taxol a partir de la corteza del tejo, han dirigido los esfuerzos hacia su producción en cultivo celular a partir de varias especies de este género. Sin embargo, este proceso está limitado por su alto coste así como por los problemas que presenta su producción a gran escala. Por ello, es necesario conseguir líneas celulares altamente productivas con las que poder abaratar los costes. En este sentido, se están usando técnicas de selección de células productoras en combinación con protocolos de optimización de los medios de cultivo, elicitación y mejora de los procesos de extracción.

La producción biotecnológica del taxol ha sido estudiada desde principios de la década de los 90. Los primeros trabajos realizados mostraban que los callos y las suspensiones celulares obtenidos a partir de tallos jóvenes de *Taxus* sp podían producir cantidades similares de taxol al producido por la planta (Fett-Neto y cols., 1992; Wickremesinhe y Arteca, 1993; Gibson y cols., 1993) siendo por ello en la actualidad, una realidad comercial.

Sin embargo, para la mayoría de los cultivos celulares de *Taxus*, productores de taxol, es necesario incrementar la productividad para hacer el proceso económicamente competitivo. Entre las principales estrategias empleadas para incrementar esa productividad destaca la optimización de las condiciones de cultivo, el cribado y la selección de líneas celulares altamente productoras y la inducción del metabolismo secundario mediante la adición de elicitores.

El aumento de la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares vegetales a través de elicitación ha abierto una nueva área de investigación que podría tener importantes beneficios para la industria farmacéutica. Numerosos compuestos se han utilizado con el fin de incrementar la producción de taxol entre éstos se incluyen, variaciones en el medio de cultivo con combinaciones de hormonas diferentes (Cusidó y cols., 2002) o combinación de fuentes de carbohidratos (Choi y cols., 2000; Wang y cols., 2001). Otros incluyen la adición de precursores biosintéticos (Srinivasan y cols.,

1996; Bentebibel y cols., 2005), así como elicitores abióticos, como lantano (Wu y cols., 2001a) o sulfato de vanadilo (Cusidó y cols., 1999) o bióticos como extractos fúngicos (Yuan y cols., 2002a; Lan y cols., 2003; Li y Tao 2009), celulasas (Roberts y cols., 2003), ácido araquidónico. (Bonfill y cols., 2003), SA (Wang y cols., 2007), etileno (Mirjalili y Linden, 1996) o incluso una mezcla de diferentes tipos de elicitores (Khosroushahi y cols., 2006). Otras estrategias incluyen el uso de disolventes orgánicos (Wang y cols., 2001), ultrasonidos de baja energía (Wu y Ge, 2004), campos magnéticos (Shang y cols., 2004) o luz UV-B (Zu y cols., 2011).

Los jasmonatos juegan un papel importante en los procesos de transducción de la señal que regulan las respuestas de defensa en plantas (Farmer y Ryan, 1992). Entre los jasmonatos, MJ ha sido ampliamente utilizado como inductor en cultivos de células de *Taxus* sp. Los esfuerzos se han centrado en el establecimiento de la concentración más apropiada de elicitores. El primer estudio realizado con MJ en cultivos celulares de *T. baccata* fue realizado por el grupo de investigación de Yukimune y cols., (1996), en el cual mostraron que la concentración de 100 μ M de MJ permitió incrementar la producción de taxanos del orden de 120-130 veces, obteniendo 48.3 y 53.5 mg/ L de taxol y bacatina III, respectivamente. Por otro lado, Ketchum y cols., (1999) mostraron que existía una relación entre la concentración del elicitores y la edad de células con respecto a la acumulación de taxol. Sin embargo, aunque MJ fue eficaz cuando se añadía a los cultivos de 14 días de edad (3.8 mg de taxol/ L), la respuesta mejoró cuando el elicitores se añadió a cultivos celulares de 8 días de edad (14.6 mg de taxol/ L). Sin embargo, no todas las líneas celulares utilizadas por estos autores respondieron de la misma manera al tratamiento con MJ ya que la acumulación de taxol mensual fluctuó.

El uso de elicitores fúngicos, así como metales pesados y otros productos químicos han sido ampliamente descritos (Yuan y cols., 2002a; Lan y cols., 2003; Li y Tao, 2009). Yu y cols., (2001) obtuvieron una mayor acumulación de taxol (11.5 mg/ L) después de la elicitación conjunta de cultivos celulares de *T. chinensis* con SA y un extracto fúngico siendo ésta del orden de 1.5, 2.3 y 7.5 veces mayor respecto al tratamiento individual con extracto fúngico, SA y control, respectivamente. Además, estos autores describieron que la adición conjunta de SA y el extracto fúngico mejoró la viabilidad celular y la acumulación de taxol mediante la reducción de la peroxidación lipídica. Wu y cols., (2001) mostraron que la adición de lantano (5.8 mM) a diferentes

cultivos celulares de *T. chinensis* durante la fase de crecimiento aumentó la producción de taxol en casi tres veces, de 2.61 a 9.89 mg/ L durante un período de cultivo de 28 días. Cusidó y cols., (1999) describieron que la producción de taxol (13.1 µg/ gPS) y baccatina III (16 mg / gPS) se mejoraba en los cultivos celulares de *T. baccata* después del tratamiento con 50 µM VSO₄, favoreciendo la acumulación de taxanos en el medio extracelular y facilitando así su extracción y purificación.

Es importante señalar que los elicitores pueden tener efectos diferentes cuando se añaden al mismo cultivo celular. Así, Bonfill y cols., (2003) mostraron que la adición de MJ en cultivos celulares de *T. media* aumentó los niveles de taxol, baccatina III y 10-deacetyl taxol (DAT), mientras que la adición de ácido araquidónico o VOSO₄ aumentó DAB III y cefalomanina, respectivamente. Por lo tanto, se debe tener en cuenta antes de establecer un sistema de producción óptimo no sólo la concentración del elicitador, sino también su estructura química y naturaleza.

II.6.3. Biosíntesis del taxol

En las últimas décadas, se han realizado importantes avances en el conocimiento de la ruta biosíntesis del taxol y otros taxanos relacionados mediante estudios metabólicos y genéticos. Actualmente, se conocen la mayor parte de los pasos metabólicos involucrados en esta vía y se han identificado y clonado algunos genes que codifican para enzimas claves del proceso (Croteau y cols., 2006). No obstante, la mejora de los rendimientos en la producción de taxol depende de una comprensión completa de los pasos biosintéticos relevantes, de las enzimas que catalizan esta secuencia de reacciones así como los genes que codifican estas enzimas, especialmente aquellos responsables de los pasos limitantes de la ruta de biosíntesis (Jennewein y cols., 2004).

Como compuesto diterpénico, el taxol se forma a partir del GGPP, el cual se obtiene a partir de 3 moléculas de IPP y una molécula de DMAPP por acción de la enzima GGPP sintasa (Hefner y cols., 1998). Así, la biosíntesis del taxol implica, al menos, 19 pasos enzimáticos comenzando a partir de la ciclación del GGPP para formar el taxadieno. A continuación, este compuesto va a sufrir ocho oxidaciones mediadas por citocromos P450 (P450), cinco acil/aroíl transferasas, una epoxidación, una

aminomutasa, dos esterificaciones con CoA y una N-benzoilación para obtener finalmente el taxol (Figura 11).

El origen del IPP y DMAPP no es claro, ya que tanto la ruta plastídica (Eisenreich y cols., 1996.) como la citosólica (Lansing y cols., 1991; Zamir y cols., 1992) ocurren en las plantas, y la ruta predominante va a depender de la etapa de crecimiento de la planta. Srinivasan y cols., (1996) sugirieron que el IPP procedente de la ruta citosólica podría desempeñar un papel en la producción de taxol en la fase inicial de crecimiento de las células de *Taxus* sp, mientras que Wang y cols., (2003) propusieron que la translocación de IPP a través de la membrana plastidial sólo se produce durante la fase de crecimiento tardío del cultivo. Sin embargo, estudios realizados en cultivos celulares de *T. baccata* han mostrado que la biosíntesis del taxol está bloqueada por la adición de fosmidomicina (un inhibidor de la ruta plastídica) y mevinolina (un inhibidor de la vía citosólica), lo que indica que el IPP puede proceder de ambas rutas (Cusidó y cols., 2007).

La primera etapa específica de la síntesis de taxol (Figura 12) es la ciclación del GGPP a taxa-4(5), 11(12)-dieno (94%) y taxa-4(20),11(12)-dieno (6%) por acción de la enzima taxadieno sintasa (TXS), que son los primeros compuestos específicos de la ruta de biosíntesis del taxol que contienen el esqueleto de taxano (Koepp y cols., 1995). TXS es una proteína monomérica de 85 kDa, similar en propiedades a otras diterpeno ciclasas de angiospermas y gimnospermas, la cual ha sido purificada y secuenciada y el gen que codifica para esta enzima ha sido secuenciado y clonado (Wildung y Croteau, 1996; Hezari y cols., 1995, 1997). El curso temporal de la actividad de la TXS en comparación con la producción de taxol en cultivos de células *T. canadensis* sugiere que la ciclación de GGPP es un paso lento de la ruta, ya que ni taxadieno ni los primeros compuestos intermedios de la ruta se acumulan en los tejidos o cultivos de células de *Taxus* sp sino que se produce una rápida conversión de estos metabolitos en reacciones posteriores (Koepp y cols., 1995; Hefner y cols., 1996; Hezari y cols., 1997).

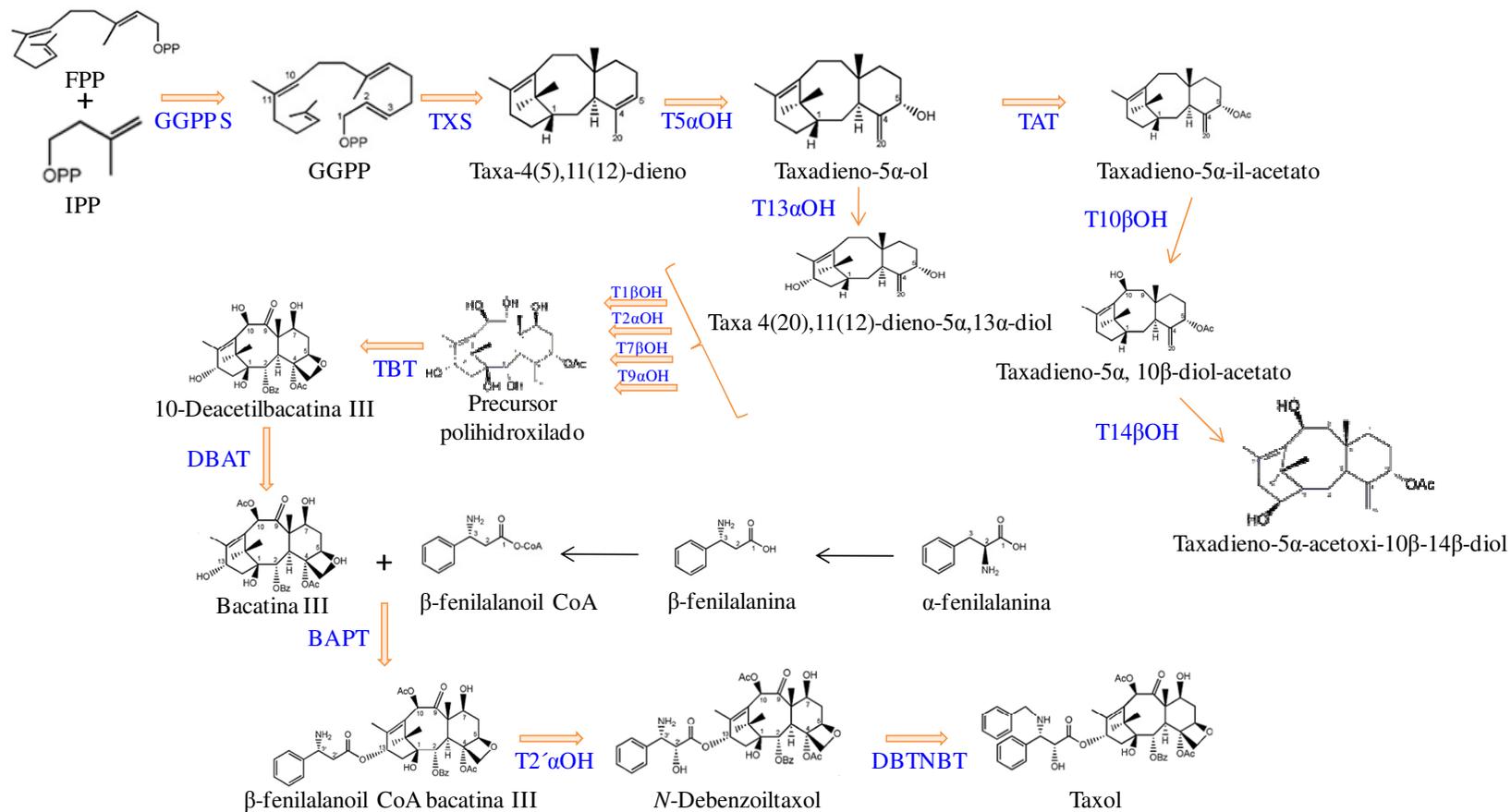


Figura 11. Ruta biosintética del taxol. GGPPS, geranigeranilpirofosfato sintasa; TXS, taxadieno sintasa; T5 α OH, taxano 5 α -hidroxilasa; TAT, taxadieno-5 α -ol-*O*-acetil transferasa; T13 α OH, taxano 13 α -hidroxilasa; T10 β OH, taxano 10 β -hidroxilasa; T14 β OH, taxano 14 β -hidroxilasa; T1 β OH, taxano 1 β -hidroxilasa; T2 α OH, taxano 2 α -hidroxilasa; T7 β OH, taxano 7 β -hidroxilasa; T9 α OH, taxano 9 α -hidroxilasa; TBT, taxano-2 α -*O*-benzoil transferasa; DBAT, 10-deacetylbatatina III-10-*O*-acetiltransferasa; BAPT, bacatina III:3-amino-13-fenilpropanoiltransferasa; T2' α OH, taxano 2' α -hidroxilasa; DBTNBT, debenzoiltaxol *N*-benzoiltransferasa.

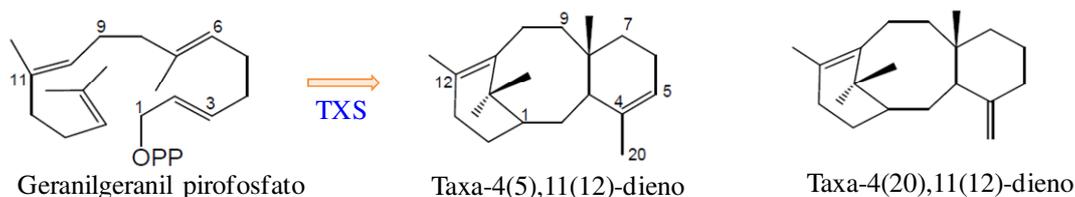


Figura 12. Ciclación de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) catalizado por la enzima taxadieno sintasa (TXS) que produce dos compuestos isómeros de taxadieno.

El segundo paso específico en la biosíntesis del taxol es una hidroxilación, dependiente del P450, reacción catalizada por la enzima taxadieno 5 α -hidroxilasa (T5 α OH) la cual cataliza no sólo la inserción regio- y estereoespecífica del oxígeno en posición C5 α del núcleo del taxano, sino también la migración del doble enlace desde la posición 4(5) a la posición 4(20) del anillo del taxano (Figura 13), para dar el taxa 4(20),11(12)-dieno-5 α -ol (taxadieno-5 α -ol) (Hefner y cols., 1996). Esta enzima es una proteína de 56 kDa que tiene en su extremo N-terminal, una secuencia de inserción en la membrana del retículo endoplasmático. Sin embargo, aunque esta etapa es lenta, el producto de la reacción no se acumula, lo que indica que esta hidroxilasa no es un paso limitante en la ruta (Ketchum y Croteau, 2006). A partir de aquí, tiene lugar una bifurcación en la ruta y el sustrato, taxadieno-5 α -ol, puede ser modificado por una transferasa o una hidroxilasa (Figura 14). La enzima taxadieno-5 α -ol-O-acetil transferasa (TAT) que carece del extremo N-terminal, cataliza la acilación del taxadieno-5 α -ol en la posición C5 para formar el taxadieno-5 α -il-acetato (Walker and Croteau, 2000a). Por otro lado, la enzima taxadieno-13 α -hidroxilasa (T13 α OH), es una P450 que hidroxila al taxadieno-5 α -ol en la posición C13 dando lugar a taxa 4(20), 11(12)-dieno-5 α , 13 α -diol (Wheeler y cols., 2001). A su vez, el taxadieno-5 α -il-acetato puede ser fácilmente hidroxilado por la enzima taxano 10 β -hidroxilasa (T10 β OH) en la posición C10 dando lugar al taxadieno-5 α , 10 β -diol-acetato. Esta enzima es una monooxigenasa dependiente de P450 no específica por lo que también puede modificar a otros taxanos (Schoendorf y cols., 2001).

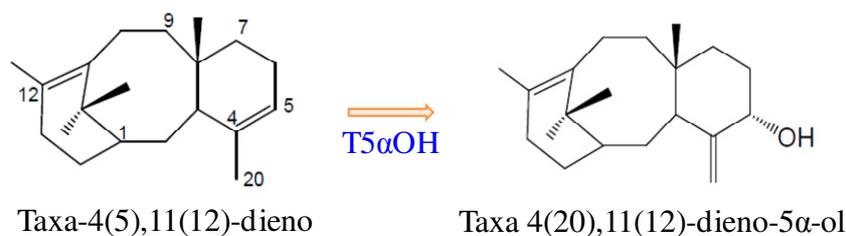


Figura 13. Hidroxilación del C5 a partir del taxadieno y migración del doble enlace desde la posición 4(5) a la posición 4(20) catalizada por la enzima taxadieno 5 α -hidroxilasa (T5 α OH).

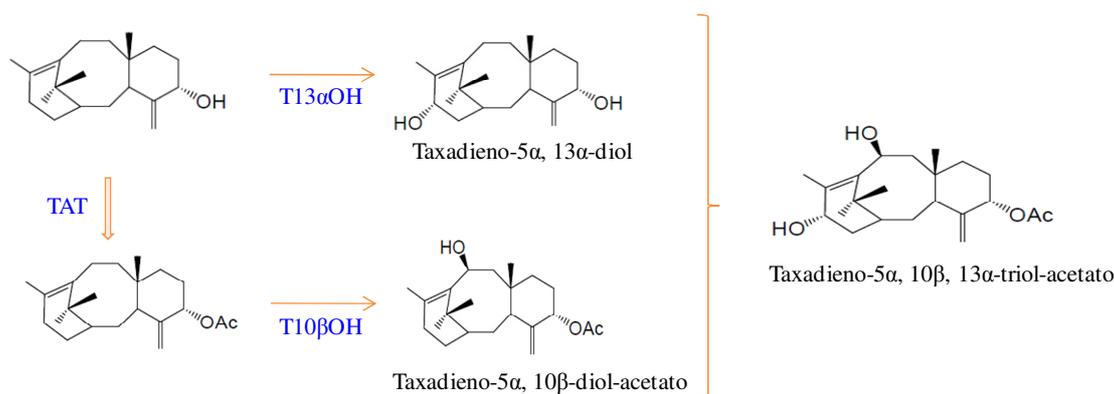


Figura 14. Primera bifurcación de la ruta de síntesis del taxol. El taxadieno-5 α -ol puede ser modificado por TAT o T13 α OH. Tras la acilación, otras hidroxilasas pueden actuar como sustrato.

A continuación, la enzima taxano 14 β -hidroxilasa (T14 β OH), hidroxila al taxadieno-5 α , 10 β -diol-acetato dando lugar al taxadieno-5 α -acetoxi-10 β -14 β -diol (Jennewein y cols., 2003) (Figura 11). Sin embargo, esta enzima T14 β OH no puede estar implicada en la síntesis del taxol, (ya que éste no está sustituido en la posición C14), sino que más bien parece ser la enzima responsable de una bifurcación temprana de la ruta que conduce a la síntesis de los taxanos 14 β -hidroxilados como es el caso de la taxuyunanina C. El conocimiento de esta ruta alternativa llevada a cabo por la T14 β OH puede suponer un punto de control, ya que su regulación negativa podría facilitar un mayor flujo de intermediarios hacia la síntesis de taxol (Croteau y cols., 2006).

Después de la formación del taxadieno-5 α , 10 β , 13 α -triol acetato, los pasos siguientes en la ruta de biosíntesis del taxol incluyen varias hidroxilaciones en las

posiciones C1, C2, C7 y C9, la oxidación de C9 y la epoxidación del doble enlace C4-C5. Estas hidroxilaciones están mediadas por enzimas P450 pero no se conoce el orden exacto en el que tienen lugar. Así, teniendo en cuenta la frecuencia de oxidación de los taxanos encontrados en cultivos celulares, una posible secuencia validada por análisis filogenéticos de oxigenasas P450 clonadas previamente sería: C5, C10, C13, C2, C9, C7 y finalmente C1 (Vongpaseuth y Roberts, 2007). Sin embargo, más que compuestos intermedios en la biosíntesis de taxol, algunos de estos taxanos podrían ser productos obtenidos en los cultivos *in vitro* (Onrubia, 2012).

Aunque se han propuesto diversos mecanismos para la formación del anillo de oxetano (Floss y Mocek, 1995; Croteau y cols., 2006), actualmente se acepta que el proceso implica la epoxidación del doble enlace 4(20) seguido por la migración del grupo α -acetoxi de C5 a C4 junto con la expansión del oxirano al grupo oxetano. La enzima que epoxida el doble enlace C4-C20 todavía no se ha caracterizado funcionalmente y la expansión del anillo de oxirano a oxetano es también un paso que no se conoce completamente (Figura 15).

A partir de ese posible precursor polihidroxiado, la 10-deacetil-2-debenzoilbacatina III, por acetilación del grupo hidroxilo 2α y por acción de la enzima taxano- 2α -O-benzoil transferasa (TBT) (Walker y Croteau, 2000b), da lugar a la DAB III (Figura 15). A continuación, se produce la acetilación del hidroxilo C10 de la DAB III dando lugar a la bacatina III por acción de la enzima 10-deacetilbacatinaIII-10-O-acetil transferasa (DBAT) (Walker y Croteau, 2000b), la cual usa DAB III y acetil CoA como sustratos (Figura 11).

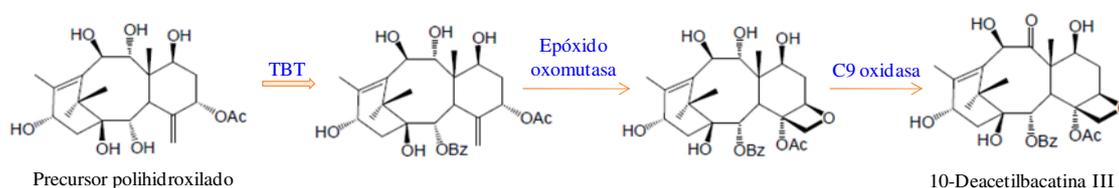


Figura 15. Formación de 10-deacetilbacatina III a partir del precursor polihidroxiado por acción de la enzima taxano- 2α -O-benzoil transferasa (TBT) y posterior formación del anillo de oxetano.

Tras la formación de bacatina III, tiene lugar la esterificación del grupo hidroxilo de la posición C13 con la cadena lateral β -fenilalanoil CoA, un paso esencial en la

biosíntesis del taxol. Esta cadena lateral se obtiene a partir del aminoácido α -fenilalanina por la acción de la enzima fenilalanina aminomutasa (PAM) (Floss y Mocek, 1995). Una éster-CoA ligasa podría ser la enzima responsable de la formación final de la cadena lateral, aunque la secuencia genética correspondiente no se ha clonado hasta el momento. La unión de la cadena lateral transcurre con una esterificación inicial del hidroxilo del C13 con β -fenilalanoil CoA para dar el N-debenzoil-2'-deoxitaxol, mediante la acción de la enzima C13-*O*-fenilpropanoil-CoA transferasa (BAPT) (Walker y col., 2002a) (Figura 16).

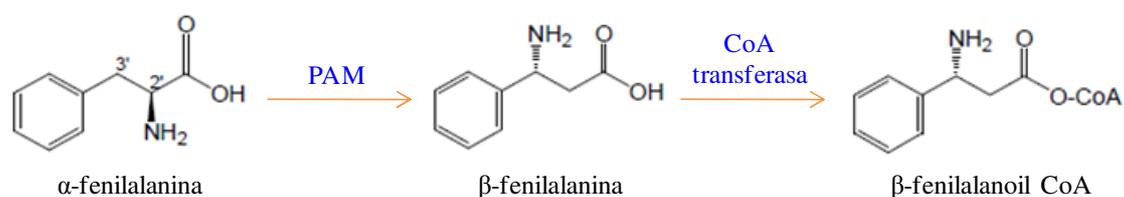


Figura 16. Síntesis de β -fenilalanoil CoA a partir de α -fenilalanina. PAM, fenilalanina aminomutasa.

Estudios realizados por Walker y cols., (2004), demostraron que la enzima C13-transferasa podía enlazar β -fenilalanina y β -fenilisoserina. La transferencia productiva, pero menos eficiente, de β -fenilisoserina a baccatina III, en comparación con la transferencia de β -fenilalanina, sugiere que la hidroxilación 2' en la cadena lateral podría ocurrir antes de la transferencia, en lugar de después de la transferencia de β -fenilalanina. Esta hidroxilasa, que participa en la formación de la cadena lateral, se asemeja a otras taxano hidroxilasas y se puede asumir que pertenece a la familia de las P450. De acuerdo a los estudios realizados por Long y Croteau, (2005) y Long y cols., (2008), parece que la N-benzoil transferasa (DBTNBT) es responsable de la última etapa que conduce a la síntesis de taxol a partir de N-debenzoiltaxol (Figura 11), ya que no hay evidencias de hidroxilación directa de β -fenilalanina en la posición 2', o en 2'-deoxitaxol, mientras que 3-N-debenzoil-2'-deoxitaxol puede ser hidroxilado en la posición 2 de la cadena lateral. Además, DBTNBT prefiere N-debenzoiltaxol más que N-debenzoil-2'-deoxitaxol por un factor de eficiencia catalítica de dos. DBTNBT es una proteína cuya secuencia de aminoácidos presenta homología con otras aciltransferasas de *Taxus* (Walker y cols., 2002b). Así, el actual sustrato para esta enzima *in planta* es el N-debenzoiltaxol, pero también puede dar lugar a la producción la cefalomanina si en lugar de transferir el grupo N-benzoilo, transfiere un grupo N-tigloilo a la cadena lateral.

Actualmente, la mayoría de las enzimas de la biosíntesis de taxol han sido secuenciadas, clonadas y caracterizadas, pero algunas de ellas siguen sin conocerse (Tabla 2). Por ello, el conocimiento detallado de la ruta biosintética completa del taxol, de los enzimas que catalizan la secuencia de reacciones involucradas en el proceso, especialmente en los pasos que se efectúan lentamente, así como los genes que codifican para dichos sistemas enzimáticos, sería con toda seguridad el mayor apoyo al desarrollo y/o mejora de los diversos sistemas biológicos que actualmente se utilizan para la producción de taxol y taxanos relacionados.

Tabla 2. Lista de las enzimas conocidas que participan en la biosíntesis de taxol. Abreviatura asociada y publicación en la que aparecieron clonados los genes por primera vez.

Enzimas conocidas de la biosíntesis del taxol	Abreviatura	Publicación
geranilgeranil difosfato sintasa	GGPPS	Hefner y cols., 1998
taxadieno sintasa	TXS	Wildung y Croteau, 1996
taxadieno-5 α -hidroxilasa	T5 α OH	Jennewein y cols., 2004
taxano-13 α -hidroxilasa	T13 α OH	Jennewein y cols., 2001
taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α -ol-O-acetil transferasa	TDAT	Walker y cols., 2000c
taxano-10 β -hidroxilasa	T10 β OH	Schoendorf y cols., 2000
taxano-14 β -hidroxilasa	T14 β OH	Jennewein y cols., 2003
taxano-2 α -hidroxilasa	T2 α OH	Chau y Croteau, 2004a
taxano-7 β -hidroxilasa	T7 β OH	Chau y cols., 2004b
taxano-1 β -hidroxilasa	T1 β OH	-
C4,C20-epoxidasa	-	-
Oxomutasa	-	-
taxano-2 α -O-benzoil transferasa	TBT	Walker y Croteau, 2000b
10-deacetilbaccatina III-10-O-acetil transferasa (taxadieno-10 β -O-acetil transferasa)	DBAT	Walker y Croteau., 2000a
taxano-9 α -hidroxilasa	T9 α OH	-
fenilalanina aminomutasa	PAM	Walker y cols., 2004
β -fenilalanina-CoA ligasa	-	-
Baccatina III: 3-amino-3- fenilpropanoil transferasa (taxano-C13-O-fenilpropanoil-CoA transferasa)	BAPT	Walker y cols., 2002a
2' α -hidroxilasa		-
3'-N-benzoil-2'-deoxitaxol N-benzoil transferasa	DBTNBT	Walker y cols., 2002b.

III. Rutas de transducción de la señal mediadas por elicitores que conducen a la producción de metabolitos secundarios

En la últimas décadas, la mayoría de las investigaciones relacionadas con la producción de metabolitos secundarios en plantas han ido encaminadas hacia el estudio de los genes que participan en las rutas de biosíntesis de estos metabolitos así como en la identificación de factores de transcripción, intentando revelar los pasos de transducción de las señales que subyacen a la activación del metabolismo secundario por parte del elicitador, y también hacia la manipulación genética de los factores de transcripción o genes implicados en la biosíntesis (Sato y cols., 2001). Sin embargo, debido a la falta de información detallada acerca de los genes implicados en las rutas de biosíntesis y su regulación, así como las vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados, el éxito en la ingeniería metabólica es hasta ahora muy limitado. Por ello, el conocimiento de las rutas de transducción de la señal que tienen lugar tras la percepción del elicitador por parte de las células productoras de metabolitos secundarios, permite caracterizar un modelo de funcionamiento del sistema productor de metabolitos secundarios elicitador-cultivo celular que sirva como referencia para la detección de cuellos de botella o puntos críticos en la aplicación de esta tecnología.

La secuencia de procesos de señalización que tiene lugar tras la percepción del elicitador por las células vegetales y que finaliza con la síntesis de metabolitos secundarios ha sido objeto de numerosos estudios siendo un área de investigación que permanece activa (Zhao y Sakai, 2003; Zhao y cols., 2005; Vasconsuelo y Boland, 2007). El primer paso en el mecanismo de elicitación es común en los sistemas animales y vegetales e implica la percepción del estímulo por parte de proteínas receptoras de membrana desencadenándose una serie de respuestas que divergen haciéndose específicas de animales o plantas. Estas respuestas se integran en las denominadas “redes de señalización”. De esta manera, las respuestas bioquímicas que se suceden después del reconocimiento del estímulo (Radman y cols., 2003) incluyen:

- Cambios en los flujos de iones a través de la membrana (Mathieu y cols., 1991): flujos de Ca^{2+} al citoplasma desde el medio extracelular y movilización del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Mithofer y cols., 2001; Castañeda y Pérez, 1996; Gelli y cols., 1997); estimulación del flujo de K^+ y Cl^- (Bach y cols., 1993; Ivashikina y cols., 2001); acidificación del citoplasma causada por la inactivación de ATP-ases

de H^+ (Lebrun-García y cols., 1999; Armero y Tena, 2001), despolarización de la membrana plasmática (Pugin y cols., 1997) y alcalinización del medio extracelular (Bolwell y cols., 1995).

- Cambios rápidos de fosforilación por la activación de PQ (Felix y cols., 1991; Yang y cols., 1997; Romeis, 2001), estimulación de PQ activadas por mitógeno (MAPK) (Droillard y cols., 2000; Agrawal y cols., 2002) y activación de proteínas-G (Luan, 1998; Roos y cols., 1999).
- Implicación de segundos mensajeros: inosítidos fosfatos y diacilglicerol (Mahady y cols., 1998) capaces de mediar en la liberación de Ca^{2+} intracelular, NO (Delledonne y cols., 2002; Huang y cols., 2002a) y activación de la ruta de señalización de los octadecanoides (Piel y cols., 1997). Síntesis de AJ y/o SA como segundos mensajeros (Memelink y cols., 2001; Katz y cols., 2002).
- Activación de NAD(P)H oxidasas responsables de la generación de ROS tales como el anión superóxido y H_2O_2 . El H_2O_2 puede actuar también como un segundo mensajero y activar la transcripción de genes de defensa.
- Acumulación de proteínas relacionadas con la defensa del tipo proteínas PR, como, quitinasas y glucanasas, endogalacturonasas que contribuyen a la liberación de oligómeros pécticos de señalización (elicitors endógenos), glicoproteínas ricas en hidroxiprolina e inhibidores de proteasas (Stinzi y cols., 1993; Benhamou, 1996; Moreno y cols., 1996).
- Muerte celular en el lugar de la infección (respuesta hipersensible) (Kelly y cols., 1995).
- Cambios estructurales de la pared celular (lignificación de las paredes celulares, deposición de calosa, activación de la ruta fenilpropanoide) (Kauss y cols., 1989).
- Activación transcripcional de los correspondientes genes de respuesta de defensa (Memelink y cols., 2001; Cormack y cols., 2002).
- Síntesis o acumulación de metabolitos secundarios (Pedras y cols., 2002).

En cualquier caso, la eficacia de la elicitación como una herramienta para mejorar la producción de metabolitos secundarios depende de una interacción compleja entre el elicitor y la célula vegetal. Así, un mismo elicitor puede estimular el metabolismo secundario en diferentes cultivos celulares y, por otra parte, los cultivos celulares pueden ser sensibles a distintos elicitors.

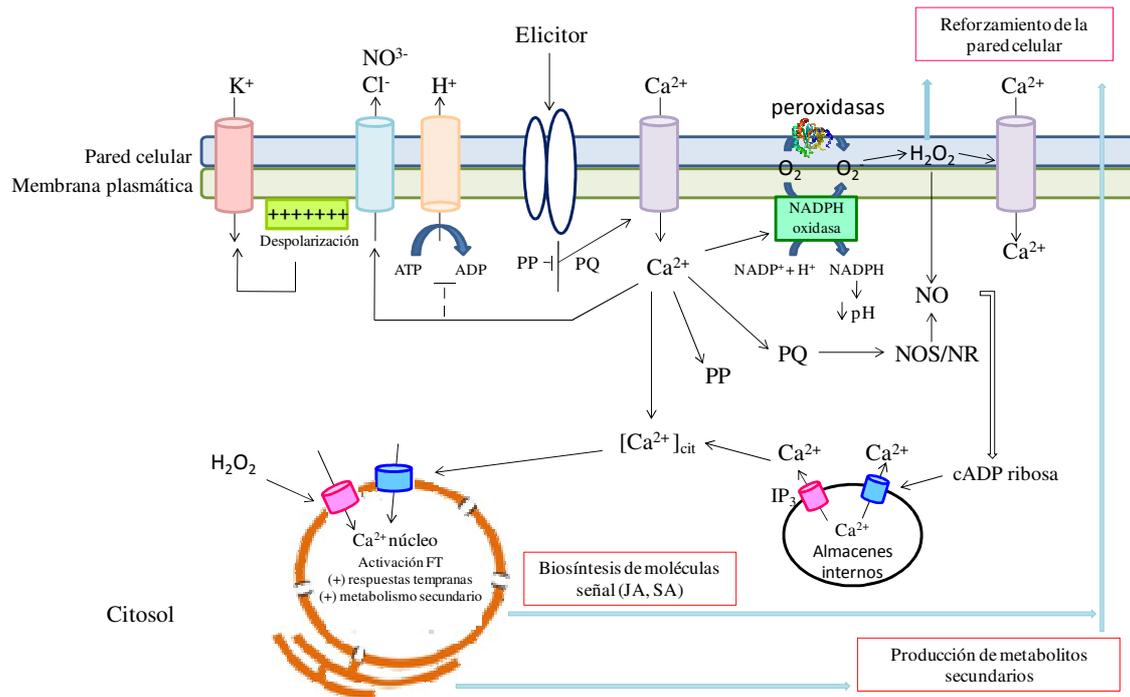


Figura 17. Esquema de los eventos de señalización desencadenados después de la percepción de un elicitador por un receptor de membrana. FT, factores de transcripción; NOS, óxido nítrico sintasa; NR, nitrato reductasa; JA, jasmonatos. Adaptado de Zhao y cols., 2005 y García-Brugger y cols., (2006).

III.1. Implicación del calcio en la señalización intracelular inducida por la elicitación

El calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero implicado en numerosas vías de señalización de la planta, que se activa por una gran variedad de estímulos ambientales y por factores endógenos dando lugar a determinadas respuestas fisiológicas. La concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) se encuentra rigurosamente regulada por la coordinación de los flujos pasivos (canales de Ca^{2+}) y de transporte activo (Ca^{2+} -ATPasas y Ca^{2+} -antiporter) a través de la membrana plasmática y/o del sistema de endomembranas (Bush, 1995; Sanders y cols., 1999, 2002). Numerosos estudios han demostrado la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en respuesta a diferentes señales, incluyendo hormonas, estrés lumínico, elicitores bióticos y abióticos (Reddy, 2001; Rudd y Franklin-Tong, 2001; White y Broadley, 2003; Almagro y cols., 2012). Estos cambios en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ pueden ser causados por una absorción de Ca^{2+} desde el medio extracelular, o por la movilización de Ca^{2+} de los orgánulos internos y/o por ambos (Lecourieux y cols., 2006).

El reconocimiento y la percepción de elicitores por las células vegetales a través de receptores específicos conducen a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, que actúa como mensajero secundario modulando las vías de señalización celular (Boller y Felix, 2009). Estas vías de señalización incluyen la regulación de PQ, PP, fosfolipasas, proteínas G, NADPH oxidasas, canales iónicos así como la producción ROS, NO, SA, etileno y AJ que finalmente dirigen la activación de la expresión de genes de defensa (Nürnberger y Scheel, 2001).

Uno de los eventos clave para regular las respuestas de defensa lo constituye la fosforilación/desfosforilación de proteínas. En ese sentido, las modificaciones post-traduccionales de proteínas por fosforilación reversible es un proceso clave en la regulación de muchas funciones en plantas, incluyendo las respuestas de defensa inducida por elicitores (Dietrich y cols., 1990; Felix y cols., 1991). Así, las modificaciones del estado de fosforilación de las proteínas se han estudiado durante el tratamiento con elicitores (Lecourieux-Ouaked y cols., 2000; Peck y cols., 2001.). De hecho, Lecourieux-Ouaked y cols., (2000) mostraron que en presencia de estaurosporina (un inhibidor general de serina/treonina PQ) se inhibió el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ dirigido por criptogeína en células de tabaco. Estos datos sugieren la implicación de eventos de fosforilación/desfosforilación de proteínas entre el reconocimiento del elicitador y la activación de canales permeables a Ca^{2+} . Asimismo, Nühse y cols., (2003) identificaron la syntaxina entre las proteínas fosforiladas aisladas de la membrana plasmática de células de Arabidopsis elicidadas con el péptido flagelina. La syntaxina es fosforilada por PQ dependientes de Ca^{2+} y está involucrada en la fusión de membranas y la exocitosis, por lo que se sugirió que la señal de Ca^{2+} podría estimular la exocitosis de metabolitos relacionados con la defensa.

En otros casos, la fosforilación/desfosforilación de proteínas puede dar lugar a la activación e inactivación de proteínas que son esenciales para los procesos celulares. Muchas PQ activadas por mitógeno (MAPK) y PQ dependientes de Ca^{2+} desempeñan un papel en las respuestas de defensa, que concluyen en la producción de metabolitos secundarios (Morris, 2001). Ligterink y cols., 1997 demostraron que una MAPK que regula la activación del estallido oxidativo inducido por elicitores en células de perejil, estaba regulada por los niveles de Ca^{2+} . Además, las MAPK están implicadas en la transducción de señal de etileno y en la ruta de biosíntesis de AJ y en otras vías de

señalización celular, incluyendo la biosíntesis de fitoalexinas en cultivos de células de perejil (Kwak y Lee, 1997; Lebrun-García y cols., 1998; Ouaked y cols., 2003). Del mismo modo, los procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas están implicados en la transducción de señales a lo largo de todo el proceso de elicitación, desde la percepción del elicitor y los cambios en los flujos de iones y de Ca^{2+} inducidos por el elicitor (Dietrich y cols., 1990), la alcalinización del medio/acidificación citoplasmática, la producción de ROS, la biosíntesis y señalización de etileno y JA, la biosíntesis de NO y la biosíntesis de metabolitos secundarios (Kwak y Lee, 1997; Liu y cols., 1999; Morris, 2001).

III.2. Implicación de las especies reactivas de oxígeno y del óxido nítrico en la señalización intracelular dirigida por elicitores

III.2.1. Especies reactivas de oxígeno

Otro evento significativo en las respuestas de defensa de las plantas es el estallido oxidativo, una respuesta temprana de las células vegetales que se produce tras el ataque por patógenos o por el tratamiento con un elicitor. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), fundamentalmente el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), son productos intermediarios tóxicos que se forman como resultado de sucesivas etapas de reducción del O_2 atmosférico. Existen varias fuentes para la generación de ROS en plantas, incluyendo la NADPH oxidasa, las peroxidasas apoplásticas y otras oxidasas en las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas (Shetty y cols., 2008). La generación de ROS en cultivos celulares tratados con elicitores depende principalmente de la NADPH oxidasa y de peroxidasas apoplásticas (Bolwell y Wojtaszek, 1997). Las NADPH oxidasas de membrana se activan en general en las plantas en respuesta a la infección por patógenos o elicitores (Sandalio y cols., 2001; Dat y cols., 2000; Aziz y cols., 2007; Vandelle y cols., 2006; Achard y cols., 2008; Navarro y cols., 2008). Además, la generación de ROS puede ser regulada diferencialmente por Ca^{2+} y la fosforilación/desfosforilación de proteínas (Simon-Plas y cols., 2002; Lecourieux y cols., 2002).

Las ROS ejercen varios efectos sobre las respuestas de defensa de la planta, incluyendo el refuerzo de la pared celular, respuesta hipersensible y la activación de genes relacionados con la defensa, así como la inducción de metabolitos secundarios

(Levine y cols., 1994). En algunos cultivos de células vegetales, las ROS pueden ser suficientes para que tenga lugar la inducción y acumulación de metabolitos secundarios, mientras que en otros casos no ocurre así. En algunas plantas, el H₂O₂ media la acumulación inducida por elicitores de metabolitos secundarios, tales como los indolalcaloides en *Catharanthus roseus* (Zhao y cols., 2001) o el capsidiol en tabaco (Perrone y cols., 2003). Por el contrario, Sánchez-Sampedro y cols., (2008), usando cultivos celulares de *S. mariannum* elicitados con MJ, demostraron que el H₂O₂ no actuaba como segundo mensajero en la producción de silimarina inducida por la presencia del elicitador, ya que la síntesis de silimarinas no se vio afectada tras la inhibición de la generación de ROS por acción de un potente inhibidor de la NADPH oxidasa, el ioduro de difenilo (DPI) a cualquiera de las concentraciones empleadas.

El estallido oxidativo y su función señalizadora se ha demostrado en otras situaciones de estrés como la sequía (Schillmiller y Howe, 2005), exposiciones a la radiación UV (Yannarelli y cols., 2006), altas temperaturas (Suzuki y Mittler, 2006) y metales pesados. Sin embargo, el estrés abiótico conlleva una inducción de los sistemas antioxidantes que controlan los niveles tóxicos de las ROS. Además, los análisis transcriptómicos demuestran un solapamiento en las respuestas a estrés biótico y abiótico, lo que sugiere que la señalización en plantas es una compleja red de interconexiones que tienen en común a las ROS (Fujita y cols., 2006).

III.2.2. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso con una gran variedad de implicaciones fisiológicas en células animales y vegetales (Lamattina y cols., 2003; Tuteja y cols., 2004). Las plantas poseen de varias fuentes para la producción de NO, entre las que se incluyen, la formación de NO dependiente de nitrato reductasa (NR), la actividad NO sintasa (NOS), la cual es dependiente de arginina y otras fuentes de producción no enzimáticas (Wilson y cols., 2008; Besson-Bard y cols., 2008).

El 30% de los procesos regulados por NO están asociados a respuestas de defensa (Besson-Bard y cols., 2009). La forma en la que esta molécula da lugar a una respuesta incluye modificaciones post-traduccionales de proteínas las cuales afectan directa o indirectamente al metabolismo de la planta y a la expresión de genes (Baudouin, 2011), que codifican para proteínas PR y enzimas implicadas en la síntesis y

respuesta al AJ y etileno (Murgia y cols., 2004, Huang y cols., 2002a, Guo y cols., 2003). Así, estudios recientes han sugerido que el NO juega un papel clave en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas y en las respuestas de defensa (Flores y cols., 2008; Hong y cols., 2008; Palaván-Unsal y Arisan, 2009). Además, la producción de NO en los tejidos y células vegetales tiene lugar en respuesta a estreses bióticos (Garcês y cols., 2001), invasión por patógenos (Delledonne y cols., 1998) y elicitores fúngicos (Foissner y cols., 2001).

La acumulación de metabolitos secundarios a menudo se produce en plantas sometidas a estrés incluyendo varios elicitores o moléculas de señal. Por lo tanto, la producción de NO inducida por elicitores puede ser esencial para la biosíntesis de metabolitos secundarios entre los que se incluyen aquellos que presentan importancia farmacológica (Xu y cols., 2007), por lo que el conocimiento de las vías de transducción de la señal dirigidas por elicitores y que conducen a la producción de estos metabolitos de alto valor añadido es importante ya que se podría optimizar su producción industrial (Zhang y cols., 2012). En este sentido, numerosos estudios han mostrado que el NO está implicado en la inducción de la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares de plantas medicinales como ginseng (Hu y cols., 2003), catarantina (Xu y Dong, 2005), artemisina (Zheng y cols., 2008) y taxanos (Wang y cols., 2006). Así, Hu y cols., (2003) utilizaron el ácido oligalacturónico para inducir la acumulación de saponinas mediada por NO en cultivos celulares de *P. ginseng*. Por otro lado, Wang y cols., (2006) encontraron que el tratamiento con ultrasonidos de cultivos celulares de *T. yunnanensis* inducía rápidamente y de forma dosis-dependiente la producción de NO, aumentando también la producción de taxol y bacatina III. Estos resultados muestran que el NO puede ser inducido rápidamente por elicitores bióticos y abióticos. Además, el NO también está implicado en la regulación de enzimas clave de las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios como la HMGR y fenilalanina amonioliasa (PAL). Wu y cols., (2009) demostraron que la expresión de HMGR y PAL implicadas en la biosíntesis de siconina podía ser incrementada por nitroprusiato de sodio (NPS), un donador de NO, en cultivos celulares de *Onasma paniculatum*. En cultivos celulares de *T. chinensis*, la actividad PAL se incrementó tanto por el NO endógeno, generado por el tratamiento con ultrasonidos, como por el tratamiento con NPS. Resultados similares obtuvieron Hao y cols., (2009) tras el tratamiento de cultivos celulares de *G. biloba* con

luz UV-B, observando la activación de PAL y la estimulación de la biosíntesis de flavonoides.

III.3. Elicitación como herramienta para el estudio del proteoma extracelular

Las plantas, han desarrollado mecanismos biológicos únicos y altamente sofisticados para controlar su crecimiento y desarrollo así como para responder a los cambios ambientales ya sean bióticos o abióticos. Uno de esos sistemas biológicos implicados es la secreción celular, la cual permite la liberación de productos intracelulares, como proteínas y metabolitos, en el espacio extracelular (EEC). Así, el término EEC se utiliza generalmente para referirse a "todo lo que se encuentra fuera de la membrana plasmática", y está compuesto de la pared celular y el espacio intercelular en el que los productos se mueven libremente. A ese fluido que se localiza dentro del EEC se le denomina líquido apoplástico o fluido extracelular y está compuesto de proteínas secretadas, como las enzimas digestivas, metabolitos, iones y otras muchas sustancias (Agrawal y cols., 2010).

En el apoplasto se producen importantes procesos de comunicación intra- e intercelular, especialmente los relacionados con la defensa y el desarrollo (Kusumawati y cols., 2008). Está bien establecido que las proteínas secretoras están involucradas en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos y fisiológicos, tales como la expansión de las células, la comunicación célula-a-célula, de señalización, de respuesta a estrés biótico y abiótico y la interacción con receptores específicos en la matriz extracelular (Ellis y cols., 2007; Jung y cols., 2008). De ese modo, las proteínas secretadas en el líquido apoplástico incluyen tanto proteínas constitutivas como a las que son secretadas en respuesta a señales ambientales. Así, se ha propuesto la coexistencia de dos tipos diferentes de orgánulos secretores en las células: los orgánulos secretores constitutivos y los regulados (Kim y cols., 2006; Brunner y cols., 2009). Los orgánulos secretores constitutivos (o vía secretora constitutiva) son capaces de liberar su contenido de forma independiente de cualquier estímulo extracelular o intracelular. Por el contrario, el proceso de secreción de los orgánulos secretores regulados (o vía secretora regulada) es controlado por estímulos extracelulares y/o intracelulares que son específicos del tipo celular. La vía del retículo endoplasmático (RE)/Golgi es un

proceso de secreción clásico bien conocido y ampliamente caracterizado en los organismos multicelulares, tanto en plantas como en animales. En esta vía, las proteínas integrales de la membrana plasmática, así como las proteínas secretadas se sintetizan típicamente en el RE y pasan a través del aparato de Golgi, aunque algunas vesículas secretoras pueden pasar por alto el aparato de Golgi en su camino hacia la vacuola (Dupree, 1999). Así, el término secretoma se define como "el conjunto de las proteínas secretadas en el EEC por una célula, tejido, órgano u organismo en cualquier momento dado y bajo determinadas condiciones a través de mecanismos de secreción conocidos y desconocidos que implican orgánulos secretores constitutivos y regulados".

A pesar de la importancia de estas proteínas en el estrés ambiental o frente a patógenos, en el reconocimiento célula-célula y en el desarrollo, siguen siendo menos conocidas que el proteoma intracelular y esto es, en parte, debido a la incapacidad para obtener el material apoplástico sin dañar el material vegetal y contaminar las muestras con proteínas citoplásmicas. Por ello, debido a la importancia del apoplasto se hace necesaria una identificación fidedigna de las proteínas procedentes de este compartimento con el fin de determinar su función. En este sentido, el empleo de cultivos celulares en suspensión, ofrece la ventaja de que durante el aislamiento de estas proteínas apoplásticas, el daño celular es mínimo o no se produce (Kusumawati y cols., 2008). Así, el medio extracelular en el que crecen los cultivos celulares vegetales puede considerarse como un amplio espacio intercelular que forma un continuo con la pared de la célula vegetal (Kärkönen y Koutaniemi, 2010). Por esta razón, las suspensiones celulares constituyen una fuente óptima para el aislamiento, identificación y caracterización de proteínas localizadas en la pared celular ya que el espacio intercelular, en este caso el medio extracelular, se obtiene directamente mediante técnicas no destructivas.

Sin embargo, a pesar del papel central de las proteínas apoplásticas en la mayoría de los procesos que controlan el crecimiento y el desarrollo (Fry, 2004) el proteoma del apoplasto está menos caracterizado que otros compartimentos subcelulares, y por lo tanto la comprensión de la fisiología de la pared celular es todavía muy limitada. Por ello, la identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en la matriz extracelular puede ayudarnos a comprender el papel de este compartimento celular en defensa. Para abordar este problema, la proteómica se ha convertido en los

últimos años una herramienta útil para desentrañar las redes metabólicas que tienen lugar en las paredes celulares. Con los recientes avances en la tecnología de espectrometría de masas (Wu y cols., 2006), ha sido posible identificar las proteínas de un tejido u órgano dado (Rose y cols., 2004). En comparación con otros métodos para el aislamiento de proteínas de la pared celular, tales como la infiltración al vacío (Boudart y cols., 2005; Zhu y cols., 2006) y el fraccionamiento subcelular (Chivasa y cols., 2002; Watson y cols., 2004), el medio extracelular de una suspensión celular puede ser fácilmente separado de las células sin ruptura celular proporcionando una fuente conveniente, continua y única de las proteínas de la pared celular (Chivasa y cols., 2006).

III.3.1. Tipos de proteínas funcionales de la pared celular

Las paredes celulares vegetales son estructuras complejas compuestas de polisacáridos y proteínas. Los modelos actuales describen la disposición de sus componentes en dos redes estructuralmente independientes que interactúan y que están embebidas en una matriz de pectina (Carpita y Gibeaut, 1993; Cosgrove, 2000). Las microfibrillas de la celulosa y la hemicelulosa constituyen la red primaria y las proteínas estructurales forman la red secundaria. Según Jamet y cols., (2006), se consideran proteínas de la pared celular todas aquellas secretadas al espacio extracelular, así como a las proteínas localizadas entre la membrana plasmática y la pared celular.

Alrededor del 90 % de las proteínas de la pared celular se pueden clasificar en diferentes categorías en base a sus funciones bioquímicas o biológicas (Tabla 3) (Jamet y cols., 2006). Sólo se ha demostrado experimentalmente la función bioquímica de un pequeño grupo de este tipo de proteínas, asumiendo así que las proteínas que comparten dominios conservados tienen la misma actividad. Entre ellas se encuentran las glicosido hidrolasas, las pectinesterasas y las liasas, las expansinas, las óxido-reductasas, las proteínas estructurales, la mayoría de las cuales son proteínas arabinogalactano, y las proteínas implicadas en la señalización (Jamet y cols., 2006).

Tabla 3. Proteínas unidas a la pared celular mediante enlaces débiles. Las proteínas se agrupan en clases y subclases de acuerdo con su función biológica. Datos tomados de Jamet y cols., (2006).

Clasificación según la función proteica	Porcentaje de proteínas identificadas en <i>Arabidopsis</i>	
	Total	Parcial
Proteínas que actúan sobre los polisacáridos	29.5 %	
Glucósido hidrolasas		21 %
Esterasas y liasas		5.5 %
Expansinas		3.0 %
Oxido-reductasas	13.5 %	
Peroxidasas		6.0 %
Proteínas estructurales	1.5 %	
Proteínas implicadas en la señalización	8.0 %	
Proteasas	10.0 %	
Proteínas que interactúan con dominios	10.0 %	
Tipo lectina		2.5 %
Tipo LRR		3.5 %
Inhibidores de enzimas		3.0 %
Otras proteínas	26.5 %	

a) Las proteínas de secreción

Las proteínas clásicas de la pared celular presentan tres características que surgen de la naturaleza del mecanismo de transporte responsable de su translocación desde el citoplasma al espacio extracelular. Primera, las pre-proteínas poseen un péptido señal en el extremo N-terminal que es el responsable de conducir las al retículo endoplasmático (von Heijne, 1990; Rapoport, 1992), que constituye el primer orgánulo en la ruta de secreción (Vitale y Denecke, 1999). El péptido señal no posee una secuencia de aminoácidos consenso, pero se caracteriza por presentar una región “n” cargada positivamente en el extremo N-terminal y una región “h” hidrofóbica central, seguida por una región “c” polar que contiene el sitio de rotura. Segunda, las proteínas clásicas de la pared celular no presentan el tetrapéptido KDEL o HDEL en el extremo C-terminal, que son secuencias conservadas de retención en el retículo endoplasmático

y que sirven para prevenir la secreción de las enzimas residentes en el lumen de este orgánulo (Vitale y Denecke, 1999; Crofts y cols., 1999). En la ruta de secreción, las proteínas abandonan el RE para dirigirse al complejo de Golgi donde se empaquetan en vesículas que se dirigen a la membrana plasmática, hacia la matriz extracelular. Las proteínas integrales de la membrana plasmática también se transportan a lo largo de esta ruta, pero son embebidas en la bicapa lipídica debido a la existencia de un dominio hidrofóbico que posteriormente se transformará en un dominio transmembrana de la proteína. La tercera característica de las proteínas clásicas de la pared celular es la ausencia de este dominio transmembrana en sus secuencias de aminoácidos y la ausencia de un pro-péptido C-terminal (Chivasa y cols., 2002).

b) Proteínas no clásicas de la pared celular

Las proteínas no clásicas o no canónicas de la pared celular son todas aquellas proteínas conocidas previamente como proteínas intracelulares. La presencia de estas proteínas en la pared celular y por tanto, en el medio extracelular, resulta confusa ya que no poseen un péptido señal, el cual es necesario para dirigirse por la ruta de secreción hacia la pared por lo que su función no está clara (Slabas y cols., 2004). Actualmente, estas proteínas no canónicas representan alrededor del 50% de las proteínas identificadas mediante el análisis del secretoma. Este hecho sugiere la existencia de nuevos mecanismos secretores independientes de las vías clásicas secretoras RE/Golgi. Sin embargo, estas proteínas que carecen de péptido señal y que parecen estar implicadas en las respuestas de defensa frente a diversos tipos de estrés, podrían tener un papel dual (extra- y/o intracelular). Curiosamente, la mayoría de estas proteínas que han sido identificadas están relacionadas con el estrés o ataque de patógenos (Nickel y Seedorf, 2008). En este sentido, Cheng y cols., (2009) demostraron que las plantas también respondían al estrés causado por el SA mediante la liberación de un gran número de estas proteínas en el apoplasto. No obstante, las funciones intracelulares de estas proteínas están bien caracterizadas pero no así sus funciones extracelulares. Por ello, la presencia de estas proteínas no canónicas ha sido objeto de numerosas revisiones en los últimos años (Ding y cols., 2012; Krause y cols., 2013; Drakakaki y Dandekar, 2013).

III.3.2. Proteínas relacionadas con la patogénesis

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) son proteínas que se sintetizan y se acumulan en tejidos de la planta en situaciones de infección o en situaciones relacionadas, como heridas (asociadas al ataque por depredadores) o tratamiento con agentes químicos (Agrawal y cols., 1999; Dangl y Jones, 2001; Nimchuk y cols., 2003; Scherer y cols., 2005). Las proteínas PR se identificaron por primera vez en plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV) (van Loon y van Kammen, 1970). Además de su inducibilidad en situaciones relacionadas con la defensa, algunos genes que expresan proteínas PR presentan una expresión ligada al desarrollo de la planta por lo que se pueden localizar en órganos asociados a la reproducción, como semillas y flores y en tubérculos (van Loon, 1999). Este tipo de proteínas pueden ser inducidas por la aplicación de sustancias químicas, que mimeticen el efecto de la infección o induzcan algún estrés (van Loon y Van Strien, 1999).

Una de las posibles funciones descritas para estas proteínas es la de actuar como señales morfogénicas en el desarrollo de la planta, a la vez que contribuyen a generar señales para la puesta en marcha de la respuesta de defensa, por ejemplo, a través de la degradación de componentes de la pared celular de los patógenos. De esta manera, un nivel basal existente de estas proteínas también podría tener la función de acelerar y amplificar los procesos de defensa. También, se ha visto que en muchos tejidos y órganos responsables de la reproducción se encuentran proteínas PR que se acumulan de manera constitutiva y aunque su presencia puede representar una estrategia de defensa de la planta, no son dependientes de un proceso infectivo (van Loon, 1999).

Actualmente las PRs se clasifican en 17 familias según sus secuencias nucleotídicas o proteicas y función (Tabla 4) (van Loon y cols., 2006).

Tabla 4. Familias de proteínas PR. Tomado de van Loon y cols., (2006).

Familia	Miembro tipo	Propiedades
PR-1	PR1-a de tabaco	Antifúngica
PR-2	PR-2 de tabaco	β -1,3-glucanasas
PR-3	PR-P,PR-Q de tabaco	Quitinasas de tipo I,II,IV,V,VI,VII
PR-4	PR-R de tabaco	Quitinasa de tipo I,II
PR-5	PR-S de tabaco	Tipo taumatina
PR-6	Inhibidor I de tomate	Inhibidor de proteasas
PR-7	P69 de tomate	Endoproteinasa
PR-8	Quitinasa de pepino	Quitinasas de tipo III
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina en tabaco	Peroxidasa
PR-10	PR-1 de perejil	Similar ribonucleasas
PR-11	Quitinasa de clase V de tabaco	Quitinasas de tipo I
PR-12	Rs-AFP3 de rábano	Defensina
PR-13	THI2.1 de Arabidopsis	Tionina
PR-14	LTP4 de cebada	Proteína transferidora de lípidos
PR-15	OxOa (germina) de cebada	Oxalato oxidasa
PR-16	OxOLP de cebada	Tipo oxalato oxidasa
PR-17	PRp27 de tabaco	Desconocida

Las proteínas de la familia PR-1 fueron las primeras en ser identificadas en la interacción tabaco/virus TMV y son las que se acumulan en mayor cantidad en el tejido infectado (Buchel y Linthorst, 1999). A pesar de ser muy abundantes, no se conoce con exactitud su función aunque se ha descrito que algunas de ellas presentan actividad antifúngica. En esta familia se encuentran tanto proteínas ácidas como básicas. Son proteínas de un peso molecular comprendido entre 14-17 kDa. La familia PR-2 recoge a las proteínas con actividad β -1,3-glucanasa. Las glucanasas de clase I son proteínas básicas y vacuolares mientras que las de clase II son ácidas y extracelulares. El modo de acción se basa en su capacidad para hidrolizar los β -1,3-glucanos presentes en la pared celular de hongos. Como resultado de su actividad hidrolítica se pueden liberar fragmentos de pared de hongo que son reconocidos por la planta y que funcionan como elicitores de la respuesta inducida. Además de participar en la defensa vegetal, las β -1,3-glucanasas participan también en el proceso de desarrollo normal de la planta, como la germinación del polen, fertilización, embriogénesis, maduración del fruto,

germinación de las semillas y la movilización de las reservas del endospermo de cereales (Leubner-Metzer y Meins, 1999). Las quitinasas son proteínas PR que pertenecen a las familias PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11. Son proteínas ácidas o básicas, con pesos moleculares entre 26 y 43 kDa, que se agrupan en cinco clases en base a sus características estructurales y funcionales. La familia PR-8 incluye quitinasas que tienen también actividad lisozima. Al igual que las β -1,3-glucanasas, las quitinasas también pueden encontrarse en tejidos vegetales de manera independiente a la infección. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en bacterias, hongos, animales y plantas (Neuhaus, 1999; Kasprzewska, 2003). Su mecanismo de acción se basa en la hidrólisis de los enlaces β -1,4 entre los residuos de N-acetilglucosamina de la quitina, principal componente de la pared celular de muchos hongos y del exoesqueleto de invertebrados. En ciertas plantas, la expresión de las glucanasas y las quitinasas se produce coordinadamente tras la infección por un patógeno, heridas o tratamiento con etileno y su aparición se ha relacionado con procesos de resistencia *in vitro* (Vogeli y cols., 1988). La familia PR-5 se compone de proteínas denominadas *tipo taumatina* debido a la gran similitud de secuencia que presentan con la proteína taumatina del arbusto *Thaumatococcus danielli*. Al igual que las proteínas PR-1, se identificaron por primera vez en la interacción tabaco/TMV. Se trata de un grupo de proteínas de pequeño tamaño (25 kDa), cuya expresión se induce por infección viral y fúngica, así como en respuesta a estrés osmótico y heridas (Liu y cols., 2010). Los inhibidores de proteasas componen la familia PR-6. Estas proteínas se acumulan de forma natural en órganos de reserva como semillas y tubérculos y también se inducen en respuesta a herida, ya sea herida mecánica o la causada por insectos fitófagos. Además de actuar frente a insectos, también se ha descrito que pueden actuar inhibiendo el crecimiento de hongos, aunque todavía se desconoce su mecanismo de acción (Heitz y cols., 1999). La endoproteinasa P69 de tomate es el representante de la familia PR-7 y su expresión se induce en plantas infectadas por viroides (Vera y Conejero, 1988). La familia PR-9 incluye las peroxidasas que pueden ser básicas o ácidas, vacuolares o extracelulares. Su función está directamente relacionada con la defensa ya que se encuentran implicadas en el reforzamiento de la pared celular catalizando la deposición de ligninas en respuesta a la infección por patógenos o insectos (Almagro y cols., 2009). Las PR-10 tienen como principal característica su localización citosólica y su actividad ribonucleasa (Datta y Muthukrishnan, 1999). Las familias PR-12, PR-13 y PR-14 incluyen las defensinas, tioninas y proteínas transportadoras de lípidos respectivamente.

Son proteínas con actividad antimicrobiana y se caracterizan por su bajo peso molecular, su naturaleza básica y el hecho de ser ricas en residuos de cisteína (van Loon y van Strien, 1999). Las familias PR-15 y PR-16 se componen de oxidasas de oxalato, también conocidas como germinas. Son proteínas oligoméricas muy resistentes a la desnaturalización por calor y SDS. En la interacción planta-patógeno, estas proteínas son las responsables de la producción de H_2O_2 a partir de oxalato, necesario para los procesos de polimerización mediados por la peroxidasa (van Loon y van Strien, 1999). Por último, la familia PR-17 está compuesta por un nuevo tipo de proteínas de masa molecular próxima a 25 kDa que presentan homología con las proteínas inducidas por patógenos de trigo y tabaco (Christensen y cols., 2002). Su mecanismo de acción en la respuesta de defensa de las plantas aún se desconoce.

III.3.2.1. Peroxidasas

Las peroxidasas están presentes en todas las plantas terrestres. Son miembros de una amplia familia multigénica, que incluye 138 miembros en arroz (Passardi y cols., 2004a) y 73 miembros en el genoma de *Arabidopsis* (Welinder y cols., 2002) y participan en una amplia gama de procesos fisiológicos a lo largo de todo el ciclo de vida de las plantas, probablemente debido al alto número de isoformas y la multitud de reacciones en las que participan (Passardi y cols., 2005). Así, están involucradas en el metabolismo auxínico, la formación de lignina y suberina, los entrecruzamientos de los componentes de la pared celular, la defensa contra agentes patógenos y la elongación celular, entre otros. Las peroxidasas que se inducen por la infección con patógenos, pertenecen a la familia PR-9 (van Loon y cols., 2006) y se expresan para limitar la extensión de la infección a través de la creación de un entorno altamente tóxico mediante la producción de ROS (Passardi y cols., 2005). En efecto, la actividad o la expresión de genes de peroxidasas en las plantas superiores es inducida por hongos (Sasaki y cols., 2004), bacterias (Young y cols., 1995), virus (Hiraga y cols., 2000) y viroides (Vera y cols., 1993). De hecho, catalizan la oxido-reducción de una amplia variedad de sustratos con peróxido de hidrógeno (Hiraga y cols., 2001; Passardi y cols., 2004b) por lo que confieren resistencia frente a estreses bióticos y abióticos a través de diferentes mecanismos.

III.3.2.2. Quitinasas

Las quitinasas catalizan la escisión hidrolítica del enlace $\beta(1\rightarrow4)$ presente en polímeros de N-acetilglucosamina, principalmente en la quitina. Las quitinasas están presentes en diversos organismos incluyendo animales y plantas, en donde desempeñan principalmente un papel en la defensa del organismo contra el ataque de patógenos (Cohen-Kupiec y cols., 1998; Patil y cols., 2000; Hamel y Bellemare, 1995). Sin embargo, las quitinasas pueden estar implicadas no sólo en los procesos relacionados con la defensa o en respuestas a diferentes tipos de estrés, sino también en procesos de crecimiento y desarrollo (Goormachtig y cols., 1998; Regalado y cols., 2000). Por lo tanto, es posible encontrarlas en todos los órganos y tejidos de plantas, tanto en el apoplasto como en la vacuola.

Estas proteínas presentan un grupo amplio y diverso de enzimas que se diferencian no sólo en la localización espacial y temporal, sino también en su estructura y la especificidad de sustrato (Collinge y cols., 1993; Brunner y cols., 1998). Así, las quitinasas se pueden dividir en dos categorías: exoquitinasas, que poseen actividad sólo para el extremo no reductor de la cadena de quitina, y endoquitinasas que hidrolizan los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Las plantas superiores sintetizan 7 clases diferentes de quitinasas, que difieren tanto en estructura y especificidad de sustrato como en los mecanismos de catálisis y sensibilidad a los inhibidores.

Las quitinasas vegetales se clasifican en base a sus propiedades físico-químicas y tipo de actividad enzimática en tres clases diferentes de proteínas PR: PR-3 que incluye quitinasas de clase Ia, Ib, II, IV, VI y VII; quitinasas de clase III que pertenecen a PR-8 y las quitinasas de clase V del grupo de proteínas PR-11. Además, dentro de la clase PR-4, se encontraron algunas proteínas con baja actividad endoquitinasa entre las proteínas de unión a quitina. La mayoría de las quitinasas de clase Ia, III y VI tienen un alto pI y se encuentran en las vacuolas. Las quitinasas ácidas pertenecientes a la clase Ib, II, III, IV y VI son por lo general secretadas hacia el apoplasto (Kasprzewska, 2003).

Dado que la mayoría de las quitinasas se inducen por factores de estrés y algunas de sus isoformas muestran propiedades antifúngicas en ensayos *in vitro*, se encuentran directamente implicadas en los mecanismos de defensa activa o pasiva contra patógenos

(Hamel y Bellemare, 1995; Krishnaveni y cols., 1999). En ese sentido, el desarrollo de la inducción de estas enzimas en tejidos sanos, por ejemplo, en la germinación de las semillas o de frutos maduros, se ha interpretado como un mecanismo de defensa de las plantas frente a posibles ataques de patógenos en los órganos sensibles o mecánicamente sin protección (Robinson y cols., 1997; Wu y cols., 2001; Ding y cols., 2002).

III.3.2.2. Glucanasas

Las β -1,3-glucanasas son enzimas abundantes altamente reguladas y distribuidas en las plantas (Leubner-Metzger y Meins, 1999; Hrmova y Fincher, 2001). Estas enzimas catalizan la escisión hidrolítica de los enlaces β -1,3-D-glucosídicos de los β -1,3-glucanos, siendo la parte de estas enzimas de tipo endo-glucanasas. Las glucanasas se inducen en respuesta a la infección de plantas con patógenos y son, por lo tanto, incluidas dentro de la familia de proteínas PR-2. Aunque el principal interés de las glucanasas se centra en su papel en la defensa de la planta contra los patógenos, existen evidencias de que estas enzimas también están implicadas en diversos procesos fisiológicos y de desarrollo en la planta infectada, incluyendo la división celular (Scherp y cols., 2001), el crecimiento, la maduración del polen y el desarrollo del tubo polínico (Meikle y cols., 1991; Dóblin y cols., 2001); microesporogénesis (Bucciaglia y Smith, 1994; Worrall y cols., 1992), la fertilización (Ori y cols., 1990.), la embriogénesis (Helleboid y cols., 2000), la germinación y el desarrollo de semillas (Buchner y cols., 2002; Leubner-Metzger, 2003), la latencia de los brotes (Rinne y cols., 2001) y en respuestas a la luz, el frío, el ozono y la radiación UV-B (Leubner-Metzger y Meins, 1999).

Las glucanasas constituyen una familia de proteínas que presentan diferentes isoformas que difieren en tamaño, punto isoeléctrico, estructura primaria, localización celular y el patrón de regulación. Así, las glucanasas que pertenecen a la familia de las PR-2, están altamente reguladas en respuesta a factores de desarrollo, hormonales, ambientales y relacionados con la patogénesis (Simmons, 1994; Leubner-Metzger y Meins, 1999). En general, las glucanasas y las quitinasas son co-inducidas en plantas infectadas con patógenos virales, bacterianos y por hongos y en respuesta a elicitores, incluyendo glucanos fúngicos como β -1,3-glucano, quitosano y N-acetilquitooligosacáridos.

Objetivos

A la vista de los antecedentes descritos en la introducción, el objetivo general de la presente memoria se centra en el análisis de las respuestas de defensa desencadenadas tras la percepción de diferentes elicitores por cultivos celulares vegetales sometidos a elicitación. Para ello, se analizará la producción de metabolitos secundarios de naturaleza terpenoide y el análisis de las proteínas extracelulares relacionadas con la defensa. Además, se analizarán los eventos tempranos implicados en la cascada de señalización intracelular así como, la expresión de los genes que se encuentran implicados en las rutas biosintéticas, que se activan como respuestas de defensa vegetal.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos concretos:

- I. El estudio de la producción de compuestos de naturaleza sesquiterpénica en suspensiones celulares de *C. annuum*.
- II. El estudio del proteoma extracelular de cultivos celulares de *C. annuum* y *C. chinense* elicitados con M- β -CD y MJ.
- III. La caracterización de la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota* y el estudio de la implicación del Ca^{+2} , eventos de fosforilación/desfosforilación de proteínas, NO y H_2O_2 en la ruta de señalización dirigida por M- β -CD para la producción de fitosteroles.
- IV. El estudio del proteoma extracelular de suspensiones celulares de zanahoria en condiciones control y elicitadas con M- β -CD y MJ.
- V. La caracterización de la producción de taxol y otros taxanos relacionados en suspensiones celulares de *T. x media* elicitadas con CD y MJ.
- VI. El estudio del perfil de expresión de los genes que codifican para las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de taxanos en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con CD y MJ.

Material y Métodos

I. Material vegetal y condiciones de cultivo

I.1. Inducción y mantenimiento de callos

Las líneas celulares de *Capsicum annuum* y *C. chinense* fueron cedidas amablemente por la Dra. Bernal Pita da Veiga, de la Universidad de La Coruña, perteneciente al Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Los microcallos recibidos en placa se mantuvieron en oscuridad a 25 °C y cuando se dispuso de suficiente biomasa celular se transfirieron a matraces de 250 mL de capacidad que contenían 100 mL de medio de cultivo basado en el descrito por Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementado con vitaminas, hormonas, hidrolizado de caseína, sacarosa (Tabla 1) y agar (8 g/L), ajustándose el pH a 5.8. Los callos friables (Figura 1) se subcultivaron cada tres semanas sobre medios sólidos con agar.

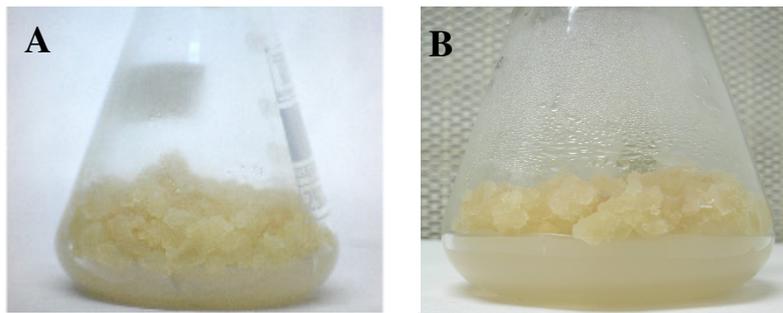


Figura 1. Callos de pimiento crecidos en matraz. **A.** *C. annuum* y **B.** *C. chinense*.

La inducción de callos de *D. carota* se realizó a partir de células pertenecientes a la región cambial de la raíz de zanahoria. Para ello, el material vegetal se lavó inicialmente con agua jabonosa y se eliminaron los extremos basal y apical de la raíz, para obtener cilindros de 2-3 cm de longitud. A continuación, los cilindros se desinfectaron por inmersión en una solución de etanol al 70% durante 1 min y posteriormente, se sumergieron en hipoclorito sódico al 20% que contenía Tween 20 al 0.1% durante 30 min. Transcurrido este tiempo y trabajando en la cabina de flujo laminar, los cilindros se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se eliminaron los tejidos externos que habían estado en contacto con el agente desinfectante y se dividieron en porciones triangulares que se depositaron en una placa Petri que contenía medio de cultivo MS suplementado con vitaminas, hormonas, hidrolizado de caseína,

sacarosa y agar, ajustándose el pH a 6.0 antes de la esterilización del medio en el autoclave (Tabla 1).

Transcurridas 2-3 semanas, se observó la aparición de los microcallos sobre el explanto de zanahoria (Figura 2A). Estos microcallos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad a una irradiancia de 18.4 w/ m² a 25 °C. Cuando se dispuso de suficiente biomasa celular se transfirieron a matraces de 250 mL de capacidad que contenían 100 mL del medio de cultivo descrito anteriormente (Tabla 1, Figura 2B). Los callos se subcultivaron cada tres semanas y se utilizaron para la obtención de suspensiones celulares.

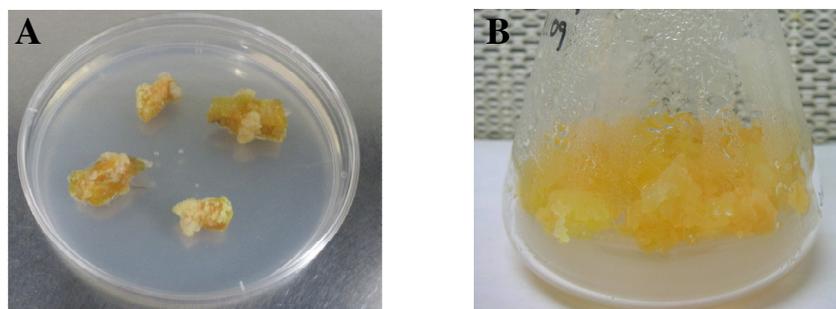


Figura 2. Microcallo crecido en placa Petri (A) y callo de zanahoria crecido en matraz (B).

Por otro lado, la línea celular transgénica de *Taxus × media*, portadora del gen que codifica para la enzima taxadieno sintasa (TXS) de *T. baccata*, bajo el control del promotor CaMV35S (Expósito y cols., 2010) fue amablemente cedida por los Dres Rosa M^a Cusidó y Javier Palazón del grupo de investigación Biotecnología vegetal: Producción de fitofármacos de la Universidad de Barcelona. Los cultivos celulares de *T. × media* se mantuvieron en la oscuridad, en placas Petri (Figura 3) que contenían medio de cultivo Gamborg B₅ (GB5) (Gamborg y cols., 1968) suplementado con vitaminas, hormonas, sacarosa-fructosa y Phytigel (Tabla 1). El pH se ajustó a 5.8 antes de la esterilización del medio en el autoclave.

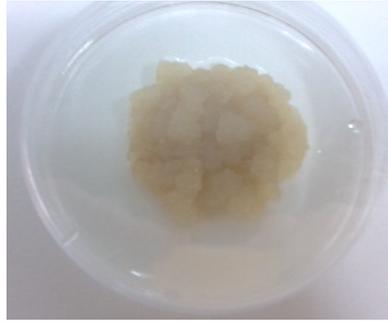


Figura 3. Callo de *T. x media* mantenido en medio de crecimiento (GB5).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para la inducción y mantenimiento de los callos de *D. carota* (MS) y para el mantenimiento de los callos de *Capsicum sp* (MS) y *T. x media* (GB5). *(Morel y Wetmore, 1951). ** Phytigel

CONSTITUYENTES DEL MEDIO DE CULTIVO	<i>Capsicum sp</i> MS	<i>D. Carota</i> MS	<i>T. x media</i> GB5
Macronutrientes	mg/ L		
KNO ₃	1900	1900	2527.5
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	370	246.5
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	440	150
NH ₄ NO ₃	1650	1650	-
KH ₂ PO ₄	170	170	-
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	-	-	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	134
Hierro			
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	37.2	37.2	37.2
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Micronutrientes			
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	0.83
MnSO ₄ x H ₂ O	16.9	16.9	10
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8.63	8.63	2
KI	0.83	0.83	0.75
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025	0.025	0.025
Reguladores del crecimiento			
2.4 diclorofenoxiacético	3	1	1
Picloram	-	-	2
Kinetina	0.05	-	0.1
GA ₃	-	-	0.5
Vitaminas			
Pantotenato cálcico*	1	1	-
Mioinositol*	100	100	-
Biotina*	0.01	0.01	-
Piridoxina*	1	1	2
Tiamina*	1	2	20
Ácido Nicotínico*	1	3	2
Otros componentes			
Hidrolizado de caseína	250	250	-
Sacarosa	30000	20000	5000
Fructosa	-	-	5000
Agar	8000	8000	2700**

I.2. Iniciación y mantenimiento de suspensiones celulares

Las suspensiones celulares se iniciaron mediante la transferencia de porciones de callo friable a matraces de 250 mL de capacidad, que contenían 100 mL de los medios de cultivos líquidos sin agar descritos anteriormente para cada una de las especies vegetales (Tabla 1). Las suspensiones celulares de *C. annuum*, *C. chinense*, *D. carota* y *T. × media* (Figura 4) se mantuvieron en agitación a 115 rpm en un agitador orbital a una temperatura de 25 ± 1 °C en luz y/o oscuridad, y se subcultivaron periódicamente en función de la curva de crecimiento característica de cada línea celular.



Figura 4. Suspensiones celulares de *C. annuum* (a), *D. carota* (b) y *T. × media* (c).

II. Medida del crecimiento celular

II.1. Caracterización del crecimiento celular

Para la realización de la curva de crecimiento se partió de suspensiones celulares bien establecidas, las cuales se filtraron en condiciones estériles. Las células filtradas se pesaron, transfiriendo 40 g de PF de células a cada matraz de 500 mL de capacidad conteniendo 200 mL de medio de cultivo. Al día siguiente del inicio de la suspensión celular se recogieron los datos correspondientes al primer punto de la curva, considerando este tiempo cero (t_0). El resto de las muestras se recogieron a intervalos de 48 h, durante un periodo de 28, 16 y 20 días para la línea celular de *C. annuum*, *D. carota* y *T. x media*, respectivamente. La curva de crecimiento se obtuvo mediante la medida de diferentes parámetros característicos del crecimiento:

1. Volumen de empaquetamiento celular (VEC): indica el porcentaje de volumen celular en relación al volumen total de suspensión celular. Para su determinación se tomaron dos alícuotas de 3-5 mL de suspensión celular en agitación, por matraz y día de recogida, utilizando una pipeta estéril para cada muestra. A continuación, se

centrifugaron a $99\times g$, durante 5 min a 4 °C, en una centrífuga de mesa refrigerada Heraeus Sepatech.

2. Medida del PF: las alícuotas recogidas de cada suspensión se filtraron con la ayuda de una bomba de vacío hasta eliminar completamente el medio de cultivo. Posteriormente, las células se lavaron abundantemente con agua fría y a continuación, se pesaron en una balanza de precisión PACISA (modelo Precisa 125A).

3. Medida del PS: después de medir el PF, las células se depositaron en filtros de papel Watman pre-pesados y se mantuvieron en una estufa a 60 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se pesaron y se calculó el peso seco restando el peso de los filtros.

La caracterización de la curva de crecimiento se realizó en base a los parámetros cinéticos “velocidad de crecimiento en la fase exponencial” (V_{exp}), “volumen de empaquetamiento celular máximo” ($VEC_{m\acute{a}x}$) y “tiempo de agotamiento” (T_a), obtenidos a partir de los datos cinéticos de la curva de crecimiento, como se indica a continuación:

- Velocidad de crecimiento en la fase exponencial (V_{exp}): se define como el incremento de biomasa en el intervalo de tiempo transcurrido durante la etapa lineal de la fase exponencial de la curva de crecimiento.

$$V_{exp} = \Delta VEC / \Delta t$$

- Biomasa máxima ($VEC_{m\acute{a}x}$): es el umbral superior al que tiende el aumento de la biomasa.

- Tiempo de agotamiento (T_a): tiempo estimado a partir del cual, la escasez de nutrientes comienza a provocar estrés y muerte celular.

II.2. Determinación de la viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular, una alícuota de las suspensiones celulares se incubó durante 5 min en el medio de crecimiento, que contenía una disolución de diacetato de fluoresceína (DAF) y de yoduro de propidio (IP) ambos a la concentración de 0.01% (p/v). El DAF es un colorante vital que, al penetrar en las células, es hidrolizado por hidrolasas ligadas a la membrana (Stubberfield y Shaw, 1990) y por las esterasas citoplasmáticas (Steward y cols., 1999) quedando la fluoresceína libre, la cual emite fluorescencia verde a 510 nm cuando se ilumina con luz azul de 493 nm. Por el

contrario, el IP marca selectivamente las células muertas al intercalarse entre las bases del ADN, lo que permite visualizar los núcleos de las células muertas de color rojo ($\lambda_{\text{emisión}} = 620 \text{ nm}$) cuando se excitan con una $\lambda = 530 \text{ nm}$ (Duncan y Widholm, 1990). La fluorescencia se observó con un microscopio de fluorescencia Leica usando filtros específicos.

III. Tratamientos de elicitación

Como metodología común a todos los ensayos de elicitación, en primer lugar se filtraron las células utilizando un embudo esmerilado con placa filtrante de borosilicato cuyo tamaño de poro era de 40-90 μm , acoplado a un matraz kitasato. Para separar el medio de las células se realizó un ligero vacío utilizando para ello una bomba de agua. Todas las manipulaciones de las células se realizaron en condiciones estériles dentro de la cabina de flujo laminar y utilizando material estéril. Una vez eliminado el medio de cultivo, las células se lavaron con medio de cultivo fresco y se volvió a aplicar vacío. A continuación, se pesaron y se añadieron a los matraces para realizar los diferentes tratamientos.

III.1. Experimentos de elicitación en cultivos celulares de *Capsicum* sp

Los experimentos de elicitación de pimiento se realizaron con suspensiones celulares de *C. annuum* y *C. chinense* en fase estacionaria (crecidas durante 20 días). Las células de *Capsicum* sp se trataron con 50 mM de β -CD, 100 μM de MJ y la combinación de ambos elicitores, además del tratamiento control, utilizando una densidad celular de 200 g PF de células/ L. Los β -CD se añadieron a los medios de cultivo antes de esterilizar a 121 °C durante 20 min para ser utilizados como medios de elicitación. Asimismo, el MJ se disolvió en etanol y se adicionó a los medios de cultivo una vez esterilizados, mediante filtración utilizando filtros de 0.22 μm y realizando el proceso en la cabina de flujo laminar. Las suspensiones celulares se incubaron durante 96 h en un agitador orbital (115 rpm) a 25 °C en oscuridad.

III.2. Experimentos de elicitación en cultivos celulares de *D. carota*

En general, y salvo que en el experimento se especifique de otra forma, se utilizaron 4 g de PF de células en 20 mL de medio de cultivo (200 g/ L) en matraces de 100 mL de capacidad. Las suspensiones celulares se incubaron durante 144 h con los

elicitores, salvo en los ensayos de producción de fitosteroles a lo largo del tiempo, que se incubaron hasta 168 h.

Para realizar las elicitaciones con cultivos celulares de zanahoria se utilizaron las células que se encontraban al inicio de la fase estacionaria del crecimiento. Las suspensiones celulares se sometieron al tratamiento con 50 mM de β -CD, además del tratamiento control. Las β -CD se añadieron a los medios de cultivo y éstos se esterilizaron a 121 °C durante 20 min antes de ser utilizados como medios de elicitación. La metodología empleada en los experimentos de elicitación fue la siguiente:

1. Estudio temporal y comparativo de los distintos tipos de ciclodextrinas.

La elicitación de las suspensiones celulares de zanahoria se realizó utilizando dos tipos de β -CD, las metiladas al azar (M- β -CD) y las hidroxipropiladas (HP- β -CD) a una concentración de 50 mM. Los cultivos se incubaron a 25 °C en un agitador orbital (115 rpm) bajo un fotoperiodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad, durante diferentes periodos de tiempo hasta un máximo de 168 h.

2. Elicitación de suspensiones celulares de zanahoria de diferentes edades celulares con ciclodextrinas metiladas al azar.

Para realizar estos experimentos, se utilizaron células de diferente edad celular que se correspondían con cada una de las fases de la curva crecimiento, concretamente 4, 6, 10 y 14 días que se corresponden con el inicio de la fase exponencial o log (día 4), fase exponencial (día 6), inicio de la fase estacionaria (día 10) y fase estacionaria (día 14). De esta manera, utilizando suspensiones celulares a estas cuatro edades celulares se realizó la elicitación de los mismos con 50 mM de M- β -CD.

3. Elicitación de suspensiones celulares de zanahoria de diferentes densidades celulares con diferentes concentraciones de ciclodextrinas metiladas al azar.

Para determinar cuál era la densidad celular óptima para la producción de fitosteroles, se utilizaron tres densidades celulares que eran representativas de todo el rango de la curva de crecimiento, concretamente 100, 200 y 340 g PF de células/ L (que se corresponde con 25, 50 y 75% de VEC). De esta manera, utilizando suspensiones

celulares a estas tres densidades celulares se realizó la elicitación de mismas con diferentes concentraciones de M- β -CD (10, 30, 50 y 70 mM).

4. Elicitación de suspensiones celulares de zanahoria con ciclodextrinas metiladas al azar solas o en combinación con jasmonato de metilo.

La elicitación de las suspensiones celulares de zanahoria se realizó utilizando 50 mM de M- β -CD solas o en combinación con 100 μ M de MJ. El MJ se disolvió en etanol y se adicionó a los medios de cultivo una vez esterilizados, mediante filtración utilizando filtros de 0.22 μ m y realizando el proceso en la cabina de flujo laminar. Los cultivos se incubaron a 25 °C en un agitador orbital (115 rpm) bajo un fotoperiodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad, durante diferentes periodos de tiempo hasta un máximo de 168 h.

Además, se realizaron experimentos de elicitación utilizando distintas concentraciones de MJ (50, 100, 150 y 200 μ M) tanto en presencia como en ausencia de 50 mM de M- β -CD. También se realizó un tratamiento control sin elicitores y un tratamiento sólo con M- β -CD. Asimismo, se realizó un tratamiento que contenía etanol a la máxima concentración empleada en el experimento (1%) para conocer el efecto que provoca su adición sobre la producción de metabolitos.

5. Elicitación de suspensiones celulares de zanahoria en presencia de ciclodextrinas metiladas al azar, jasmonato de metilo y luz UV-A o C.

Para realizar estas elicitaciones se utilizaron matraces de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de elicitación que contenía, 50 mM de M- β -CD solas o en combinación con 100 μ M de MJ y 4 g de PF de células (equivalente a una densidad celular intermedia, correspondiente a un VEC de 50%). Una vez añadidas las células a los medios de elicitación, se realizaron irradiaciones con luz UV-A o C (10 mW/ cm²; 360 y 254 nm, respectivamente) durante 15, 30 y 60 min a 15 cm de distancia de la lámpara de luz UV. Se realizaron controles en presencia y ausencia de elicitores y/o luz UV.

La irradiación con luz UV se realizó en condiciones asépticas trabajando en el interior de una cabina de flujo laminar y en agitación continua a 115 rpm. Para ello, dentro de la cabina se introdujo un agitador orbital y sobre éste se colocó la lámpara de luz UV, de modo que las suspensiones celulares se mantuvieron en agitación continua

durante todo el tratamiento con la luz UV. Para que la irradiación con luz UV fuese directa sobre las células, las suspensiones se trasvasaron a vasos de plástico estériles que se mantuvieron abiertos. Transcurrido el tiempo de tratamiento con la luz UV se transfirieron a sus correspondientes matraces. Posteriormente, las suspensiones celulares se mantuvieron durante 144 h en las mismas condiciones que en los experimentos anteriores.

6. Estudios de señalización realizados en zanahoria

Para el estudio de la ruta de señalización implicada en la producción de fitosteroles se utilizaron los compuestos que se muestran en la Tabla 2. Estos compuestos se adquirieron en Sigma-Aldrich (España).

Estos experimentos se realizaron según se describe en el apartado III.3 Tratamientos de elicitación. Para ello, se utilizaron matraces de 100 mL de capacidad y una densidad celular de 200 g PF/ L (50% de VEC). Se utilizaron como elicitores M- β -CD (50 mM). En este caso, los compuestos utilizados para estudiar el mecanismo de señalización se añadieron 90 min antes que los elicitores con el propósito de que estas moléculas tuviesen tiempo suficiente para actuar sobre sus dianas. Además, la producción de fitosteroles en estos experimentos se midió a las 24 h, tiempo mínimo a partir del cual comienza a observarse producción de fitosteroles.

a) Elicitación de suspensiones celulares de zanahoria en presencia de antagonistas de calcio.

Para comprobar si la producción de fitosteroles era dependiente de la entrada de Ca^{2+} extracelular se utilizó un agente secuestrador de Ca^{2+} , EGTA a una concentración de 10 mM con el fin de secuestrar el Ca^{2+} del medio de cultivo. Esta concentración de EGTA fue calculada en base al contenido de Ca^{2+} del medio de cultivo al pH del mismo. No obstante, para esa concentración de EGTA quedó una concentración de Ca^{2+} libre (16 μM), efecto que es dependiente del pH del medio (6.0).

Además, también se utilizó un bloqueador de los canales de entrada del Ca^{2+} extracelular, LaCl_3 a una concentración de 0.5 mM (Lecourieux y cols., 2005). Para comprobar si estos compuestos podían actuar como elicitores por sí mismos se utilizaron también en ausencia de M- β -CD.

Para estudiar si la producción de fitosteroles era dependiente del Ca^{2+} intracelular se realizó la elicitación de las suspensiones celulares de zanahoria con M- β -CD, en presencia de neomicina (Neo, 100 μM) y/o rojo rutenio (RR, 10 μM). Neo actúa inhibiendo la salida de Ca^{2+} de los compartimentos subcelulares vía inosítidos fosfato (IP_3) y RR bloquea la liberación de Ca^{2+} desde los compartimentos intracelulares dependientes de receptores de rianodina.

b) Elicitación de suspensiones celulares de zanahoria en presencia de inhibidores de protein quinasas y protein fosfatasas.

Para determinar la implicación de proteín quinasas (PQ) en la cascada de señalización dirigida por los elicitores para biosíntesis de fitosteroles se utilizaron inhibidores específicos de Tyr-PQ (genisteína, Gen), Ser/Thr-PQ (estaurosporina, Est) y MAPK (apigenina, Ap). En el estudio de la posible implicación de protein fosfatas (PP) en la cascada de señalización que dirigen los elicitores en la biosíntesis de fitosteroles, se utilizó un inhibidor de PP-2A (cantaridina, Can) y otro de Tyr-PP (óxido de fenilarsina, OFA) a las concentraciones detalladas en la Tabla 2.

c) Elicitación de suspensiones celulares de zanahoria en presencia de inhibidores de H_2O_2 y NO.

Para comprobar si el óxido nítrico (NO) y/o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) están implicados en la cascada de señalización que conduce a la biosíntesis de fitosteroles desencadenada por la adición de elicitores, se utilizó un inhibidor de la NO sintasa (Nw-nitro-L-arginina, L-NNA), un secuestrador de NO (carboxi-2-fenil-4,4,5,5,-tetrametilimidazoleline-1-oxyl-3-óxido, cPTiO), un donador de NO (nitroprusiato sódico, NPS) y un inhibidor de NADPH oxidasa (ioduro de difenilo, DPI).

Tabla 2. Reactivos utilizados para estudiar la cascada de señalización inducida por elicitores.

	Compuesto	Abreviatura	Concentración (μM)	Efecto
Calcio	Acido etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético	EGTA	10000	Secuestrador de Ca^{2+} extracelular
	Cloruro de lantano	La^{3+}	500	Bloqueador de canales de Ca^{2+} extracelular
	Neomicina	Neo	100	Bloqueador de canales de Ca^{2+} intracelular dependiente de IP_3
	Rojo rutenio	RR	10	Bloqueador de canales de Ca^{2+} intracelular dependiente de receptores de rianodina
Inhibidores de protein quinasas	Genisteína	Gen	10	Tirosin protein quinasa (Tyr-PQ)
	Estaurosporina	Est	5	Serin/treonin protein quinasa (Ser/Thr-PQ)
	Apigenina	Ap	500	Protein kinasa activada por mitógeno (MAPK)
Inhibidores de protein fosfatasas	Cantaridina	Can	5	Protein fosfatasa 2A (PP-2A)
	Óxido de fenilarsina	OFA	10	Tirosin protein fosfatasa (Tyr-PP)
Inhibidores de NO y H_2O_2	Carboxi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolelino-1-oxyl-3-óxido	cPTIO	500	Secuestrador de NO del medio
	Nw-nitro-L-arginina	L-NNA	100	Inhibidor irreversible de NO sintasa constitutiva y reversible de NO sintasa inducible
	Nitroprusiato sódico	NPS	10	Liberador de NO <i>in situ</i>
	Ioduro de difenilo	DPI	10	Inhibidor específico de NADPH oxidasa

III.3. Experimentos de elicitación en cultivos celulares de *T. × media*

La biosíntesis del taxol y otros compuestos relacionados tiene lugar, especialmente, al final de la fase de crecimiento exponencial y durante la fase de crecimiento estacionario (Cusidó y cols., 2002). Por ello, y con la finalidad de optimizar tanto la formación de biomasa como la producción de taxanos, se estableció un cultivo en dos fases. En primer lugar, se hizo crecer la biomasa celular en un medio óptimo para el crecimiento (GB5, Tabla 1) y, a continuación, se transfirieron las células a un medio óptimo para la producción de taxanos que consistía en un medio GB5 (Gamborg y cols., 1968) suplementado con vitaminas, 3% de sacarosa, 2 mg/ L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0.1 mg/ L de benciladenina y 0.5 mg/ L de GA₃, ajustando el pH a 5.8 antes de autoclavar. Para ello, pasados 14 días de cultivo (fase estacionaria) en medio óptimo para el crecimiento, las células se filtraron utilizando un embudo esmerilado con placa filtrante de borosilicato cuyo tamaño de poro era de 40-90 μm, acoplado a un matraz kitasato. Para separar el medio de las células se realizó un ligero vacío utilizando una bomba de agua. Todas las manipulaciones de las células se realizaron en condiciones estériles dentro de la cabina de flujo laminar y utilizando material estéril. Una vez eliminado el medio de cultivo, se lavaron las células con medio de cultivo fresco y se volvió a aplicar vacío. A continuación se pesaron las células transfiriéndolas después a su medio óptimo de producción.

En general, se utilizaron 4 g de PF de células en 20 mL de medio de cultivo (200 g/ L) en matraces de 100 mL de capacidad. Las suspensiones celulares se mantuvieron en oscuridad a 25 °C sobre un agitador orbital a 115 rpm durante diferentes periodos de tiempo hasta un máximo de 20-24 días. Las elicitaciones se realizaron en el medio óptimo para la producción al cual se le adicionó, 50 mM de CD de distinta naturaleza (β y γ -CD) y tipo (β -CD metiladas al azar (M- β -CD) y β -CD hidroxipropiladas (HP- β -CD)), solas o en combinación con 100 μM de MJ.

Puesto que la fase de desarrollo del cultivo celular es un factor clave en la biosíntesis de metabolitos secundarios, los elicitores indicados se adicionaron al medio óptimo de producción en dos momentos diferentes del cultivo. En el caso de las CD, éstas se adicionaron al medio de cultivo en el momento de la transferencia de las suspensiones celulares desde el medio óptimo para el crecimiento al medio óptimo para la producción, mientras que el MJ se adicionó al medio, después del mantenimiento de las células durante 7 días tanto en el medio óptimo de producción (medio control) como

en el medio de producción suplementado con CD, es decir, cuando las células se encontraban ya determinadas y adaptadas a la biosíntesis de los metabolitos secundarios de interés (Figura 5).

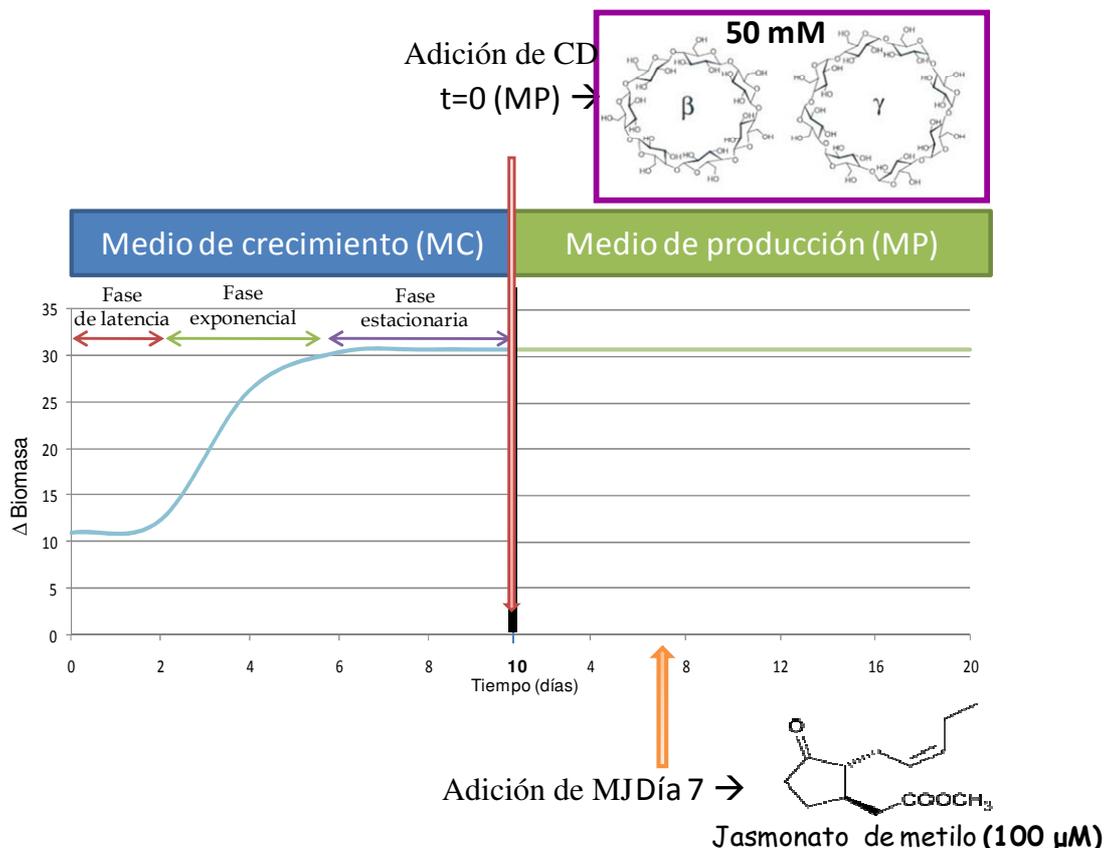


Figura 5. Diseño experimental de las elicitaciones realizadas en cultivos celulares de *T. × media*.

IV. Extracción de metabolitos

IV.1. Extracción de compuestos sesquiterpénicos en cultivos celulares de *C. annuum*

Una vez realizados los experimentos de elicitación, la extracción de los compuestos presentes en el medio extracelular de los cultivos de pimiento se realizó mediante partición de fases con acetato de etilo (1:1, v/v), añadiendo a la fase acuosa NaHCO_3 al 3% (p/v) y NaCl al 10% (p/v) con el fin de obtener una clara separación de fases. Transcurrida 1 h, la fase orgánica se recogió y se realizó una segunda extracción de la fase acuosa durante 1 h más con el fin de recoger todos los compuestos presentes en el medio extracelular. Pasado ese tiempo se recogió la fase orgánica (acetato de etilo) y se evaporó en un rotavapor a 40 °C a vacío. El residuo seco fue resuspendido en 1 mL de metanol para su posterior análisis mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD) y cromatografía de gases/ masas (GC/MS).

IV.2. Extracción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota*

a) La extracción de los compuestos presentes en el medio extracelular de los cultivos de zanahoria se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el apartado IV.1. para la extracción de los compuestos de naturaleza sesquiterpénica en cultivos celulares de *C. annuum*.

b) La extracción de los compuestos presentes en las células de zanahoria se llevó a cabo a partir de células que fueron previamente filtradas y liofilizadas. Antes de empezar el protocolo de extracción se trituraron bien para obtener un polvo fino. En estas condiciones se añadieron 4 mL de metanol al 90% por cada 100 mg de polvo de células en tubos de vidrio y las muestras se calentaron durante 8 min a 80 W en un microondas y se filtraron para recuperar el sobrenadante (extracto metanólico). A continuación, el metanol se evaporó con nitrógeno gaseoso y la fase acuosa se resuspendió en agua: acetato de etilo (1:2, v/v) hasta obtener una clara separación de fases. Por último, la fase orgánica se evaporó con nitrógeno gaseoso y posteriormente, el extracto seco se resuspendió en 1 mL de metanol para su análisis mediante GC/MS.

IV.3. Extracción de taxanos en cultivos celulares de *T. × media*

a) La extracción de taxanos a partir de medio extracelular se realizó según el método descrito por Cusidó y cols., (1999). Para ello, se añadió al medio extracelular (un 25% de su volumen) diclorometano y se agitó durante 2 min en un vórtex. A continuación, se sonicó en un baño de ultrasonidos durante 1 h. La fase orgánica se evaporó a 60 °C, redisolviendo el residuo seco en 500 µL de metanol para su análisis mediante HPLC-DAD.

b) La extracción de taxanos de las células, se realizó a partir de células que fueron previamente filtradas y liofilizadas. Antes de empezar el protocolo de extracción se trituraron bien para obtener un polvo fino. En estas condiciones se añadieron 4 mL de metanol al 90% por cada 100 mg de polvo de células en tubos de vidrio y las muestras se calentaron durante 8 min a 80 W en un microondas y se filtraron recogiendo el sobrenadante (extracto metanólico). Este proceso se repitió dos veces. A continuación, se añadieron 4 mL de hexano al extracto metanólico y se centrifugó a 2500 × g durante 20 min a temperatura ambiente, descartando a continuación la fase hexánica. La fase acuosa se resuspendió en 6 mL de agua:diclorometano (1:2, v/v) hasta obtener una

separación de fases. Después de recuperar la fase orgánica, la fase acuosa se volvió a resuspender en 6 mL de agua: diclorometano (1:2, v/v). A continuación, ambas fases orgánicas se mezclaron y se evaporaron juntas. Por último, el residuo seco se resuspendió en 500 μ L de metanol para su análisis mediante HPLC-DAD.

V. Identificación y cuantificación de metabolitos

Los extractos metanólicos procedentes de la extracción de compuestos sesquiterpénicos, fitosteroles y taxanos intra- y extracelulares se filtraron a través de filtros de nylon de 0.22 μ m de tamaño de poro y 13 mm de diámetro.

La identificación y cuantificación de los sesquiterpenos y fitosteroles presentes en el medio extracelular de *C. annum* y en el medio extracelular y en las células de *D. carota*, se realizó utilizando un sistema cromatográfico Agilent Technologies 6890 Network GS System equipado con un detector de masas Agilent 5973. La separación de los compuestos se realizó sobre una columna capilar Agilent 19091 S-433 HP-5MS (30 m \times 0.25 mm), con un flujo de 1.0 mL/ min con helio como gas portador. La temperatura del inyector se ajustó a 250 $^{\circ}$ C y el volumen de inyección fue de 1 μ L. El programa de análisis consistió en un inicio a 60 $^{\circ}$ C con subida hasta 310 $^{\circ}$ C alcanzando una temperatura máxima de 350 $^{\circ}$ C. La identificación y cuantificación de los diferentes compuestos se llevó a cabo mediante la comparación del espectro de masas y el tiempo de retención, con el espectro de masas obtenido de la base de datos (NBS 75K) o de patrones externos comerciales.

Para la identificación y cuantificación de los taxanos presentes en el medio extracelular y en las células de los cultivos celulares de *T. \times media* se utilizó un sistema cromatográfico de HPLC equipado con un detector de diodos array (DAD, Diode Array Detector) Agilent 1100 Series. La separación se realizó sobre una columna Supelcosil LC-F (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. Los disolventes usados en la fase móvil fueron acetonitrilo (B): agua (A). El gradiente empleado fue el siguiente: 25% B min 0, 60% B min 38, 100% B min 40, 45% B min 45, 25% B min 55. El volumen de inyección fue de 15 μ L. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 mL/ min. La extracción de los cromatogramas se realizó a 230 nm. La identificación y cuantificación de los taxanos se llevó a cabo utilizando una recta de calibrado realizada previamente con los patrones comerciales.

VI. Metodología empleada para los estudios proteómicos

VI.1. Precipitación y cuantificación de proteínas presentes en el medio extracelular

Para la precipitación de las proteínas presentes en el medio extracelular, las muestras se dializaron en tampón acetato sódico 50 mM (pH 5) durante 24 h en oscuridad, en una cámara refrigerada a 8 °C. A continuación, se precipitaron las proteínas del medio extracelular añadiendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 95% de saturación. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en Tris-HCl 50mM, pH 7.5 y se dializaron en este tampón durante toda la noche a 4 °C. Las muestras dializadas se concentraron en un Amicon Ultra (Millipore) y se usaron para los análisis electroforéticos.

Para la cuantificación del contenido total de proteína presente en el medio extracelular se realizó el microensayo de Bio-Rad basado en el método colorimétrico de Bradford (1976), aplicable a muestras de proteínas con una concentración entre 1 y 20 mg, utilizando albúmina de suero bovino (fracción V) como estándar para su valoración. Las muestras y los estándares se diluyeron con agua destilada en un volumen de 800 μL al que se añadieron 200 μL del reactivo concentrado. Posteriormente, se agitaron y después de 15 min de reacción se tomó lectura de la absorbancia a 595 nm. Con los valores de absorbancia de la albúmina se realizó la recta patrón y mediante extrapolación en dicha recta, se calculó la concentración de proteína total en las alícuotas proteicas de las suspensiones celulares.

VI.2. Determinación del patrón de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

En este tipo de electroforesis las proteínas se desnaturalizan por calor, se despliegan y el SDS se une a ellas neutralizando sus cargas, de manera que se separan de acuerdo a su peso molecular.

En primer lugar se preparó el gel separador, compuesto por acrilamida/bisacrilamida al 10%, tampón Tris-HCl (1.5 M, pH=8.8) al 25% y SDS al 0.1%. La mezcla se desgasificó durante 15 min, tras los cuales se añadió persulfato amónico (APS) al 0.05% y TEMED al 0.15%. Posteriormente, el medio de polimerización se vertió entre los cristales del sistema MiniProtean III de Bio-Rad y se recubrió con una fina capa de agua. El gel se dejó polimerizar durante 45 min aproximadamente. El gel concentrador se preparó a partir de acrilamida/ bisacrilamida al 4%, tampón Tris-HCl

(0.5 M, pH=6.8) al 25% y SDS al 0.1%. Después de desgasificar durante 15 min, se añadió APS al 0.08% y TEMED al 0.2%. Esta disolución se añadió sobre el gel separador polimerizado, eliminando previamente el agua que lo recubría y dejando polimerizar durante otros 45 min.

El tampón de carga se preparó al 12.5% en tampón Tris-HCl (0.5 M, pH=6.8), glicerol al 25%, SDS al 2% y azul de bromofenol al 0.01%. Las muestras dializadas se prepararon en tampón de carga y agua destilada (2:1, v/v) y se desnaturalizaron por calentamiento en un baño a 100 °C durante 10 min. Como marcador de peso molecular se utilizó un estándar de peso molecular que contenía fosforilasa b (113000 Da), seroalbúmina (92000 Da), ovalbúmina (52300 Da), anhidrasa carbónica (35300 Da), inhibidor de tripsina de soja (28700 Da) y lisozima (21300 Da).

La migración del gel se realizó en tampón glicina 192 mM, Tris 25 mM pH=8.8 y SDS al 10%, aplicando una corriente de 200 V y 400 mA de intensidad durante 45 min con una fuente BioRad, a temperatura ambiente.

Tinción de los geles con azul brillante de Coomassie

Tras finalizar la electroforesis desnaturalizante, las proteínas se tiñeron siguiendo el protocolo de tinción con azul brillante de Coomassie. Para ello, el gel se incubó durante 3 h en una solución de teñido que contenía 10% (v/v) de una solución de azul brillante de Coomassie al 1% en agua, 10% (v/v) de ácido acético glacial y 40% de metanol. Transcurrido este tiempo se realizó el desteñido del gel con una solución de desteñido que contenía 30% (v/v) de metanol y 10% de ácido acético glacial. El lavado del gel se realizó durante periodos cortos de 15 min, en agitación suave, hasta que las bandas del gel fueron claramente visibles. Los geles se conservaron en agua destilada hasta el momento de ser fotografiados.

Tinción de los geles con plata

Tras finalizar la electroforesis desnaturalizante, las proteínas se tiñeron con el método de la plata (Oakley y cols., 1980), siguiendo el protocolo de Pharmacia (PlusOne Silver Staining Kit, Protein). Para ello, el gel se incubó durante 30 min en una solución sensibilizadora que contenía tiosulfato sódico al 0.2% (v/v), acetato sódico al 6.8% (p/v) y etanol al 30% (v/v). A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 min con agua destilada y seguidamente se procedió a la tinción del gel con una solución de plata

compuesta por nitrato de plata al 0.25% (v/v) y formaldehído al 0.015% (v/v) durante 20 min. Se volvió a lavar el gel con agua destilada (2 veces) y las proteínas se revelaron en una solución que contenía carbonato sódico al 2.5% (p/v) y formaldehído al 0.0074% (v/v). Finalmente, la reacción se detuvo con una solución que contenía EDTA- Na_2 al 1.46% (p/v). Los geles se conservaron en agua destilada hasta el momento de ser fotografiados.

Las bandas de interés del gel, se recortaron manualmente y fueron desteñidas con reductores químicos para eliminar la plata, según los protocolos descritos por Meywald y cols., (1996) y Scheler y cols., (1998), con ligeras modificaciones. Para ello, se añadieron 50–100 μL de una solución de desteñido que contenía 30 mM de ferricianuro potásico y 100 mM de tiosulfato de sodio (1:1; v/v) hasta cubrir las bandas del gel. La intensidad de la tinción se controló hasta que el color marrón desapareció y por último, las bandas se lavaron varias veces con agua destilada para detener la reacción.

VI.3. Técnicas proteómicas y bioinformáticas

Los análisis proteómicos se realizaron en el Servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Madrid.

VI.3.1. Digestión de proteínas

Tras el proceso de desteñido de las bandas, éstas se depositaron en placas de 96 pocillos y se procesaron automáticamente en un Proteineer DP (Bruker Daltonics, Alemania). Para la digestión proteica (Schevchenko y cols., 1996), las piezas del gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y se trataron con acetonitrilo. Las proteínas se redujeron con ditioneitol (DTT) 10 mM en bicarbonato amónico 50 mM, y se alquilaron con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Las proteínas se digirieron con tripsina de cerdo modificada (calidad para secuenciación; Promega) a una concentración final de 15 ng/ μL en bicarbonato amónico 25 mM durante 4 h a 37 °C. Los péptidos se eluyeron del gel con ácido trifluoroacético 0.5% en agua durante 30 min a 25 °C.

VI.3.2. Adquisición de los espectros de MS y MS/MS

La espectrofotometría de masas es un método que determina con exactitud la relación masa/carga (m/z) de los iones en el vacío permitiendo de esta manera, la determinación concreta de la masa molecular. Para conseguir las huellas peptídicas, la proteína se digiere con un compuesto que la escinde por un sitio específico (tripsina) y se determina la masa de cada uno de los péptidos resultantes (fragmentos trípticos). Estas masas se utilizan posteriormente para identificar estos péptidos realizando una búsqueda en la base de datos.

En este método, los fragmentos peptídicos generados por el método anterior se fragmentan de nuevo obteniéndose como resultado fragmentos peptídicos más cortos, o fragmentos iónicos. Los espectros de fragmentación de los péptidos trípticos se utilizaron para identificar ese péptido en las bases de datos. En ambos casos, estas aproximaciones requieren que la proteína en cuestión haya sido previamente identificada por su huella peptídica y que los espectros de fragmentación de los fragmentos trípticos se encuentren en la base de datos. Cuando no es así, se puede realizar la secuenciación *de novo*. Las diferencias de masas entre fragmentos secuenciales se corresponden con masas conocidas de los aminoácidos individuales permitiendo, de esta manera, deducir la secuencia de la proteína sin información correlativa adicional, directamente a partir de las secuencias depositadas en la base de datos.

Espectrometría MALDI-TOF/TOF

El espectro de masas se obtuvo mediante análisis automático en un espectrómetro de masas Bruker Reflex IV MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) mediante el software FlexControl 1.1. Los espectros obtenidos se procesaron con el software Xtof 5.1.1 para el análisis de datos crudos. Cada espectro se calibró internamente con dos iones de referencia provenientes de la autólisis de tripsina, concretamente con los péptidos de 842.510 Da y de 2211.105 Da, obteniéndose un error medio en la medida de la masa de ± 30 ppm en el rango entre 800-3000 m/z . Además, todos los contaminantes conocidos se excluyeron durante el proceso. Los parámetros usados para analizar los datos establecieron un umbral de fondo de 20 (relación señal/ruido) y una resolución superior a 4000 (FWHM). Para la identificación de proteínas, las masas de los péptidos trípticos se transfirieron a la interfaz BioTools 2.0

(de Bruker Daltonics) para buscar en la base de datos del NCBIInr usando el software Mascot (www.matrixscience.com; Matrix Science, UK). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: carbamidometil cisteína como modificación fija debido al tratamiento con yodoacetamida, metioninas oxidadas como modificación variable, una tolerancia de masa peptídica de 80 ppm y tolerancia de hasta un sitio de rotura tríptica sin digerir. En todas las identificaciones proteicas, la probabilidad de puntuaciones fue superior a la mínima puntuación establecida como significativa con un valor de $p < 0.05$.

Espectrometría ESI MS/MS

La ionización por electronebulización (Electrospray Ionization, ESI) genera una amplia colección de iones metaestables, fácilmente fragmentables, pero requiere una purificación previa de las muestras por cromatografía capilar de alta resolución (nano-HPLC). La confinación de los iones generados en una trampa iónica y su posterior fragmentación en una cámara de colisión, permite la obtención de información secuencial.

Los péptidos trípticos resultantes se secaron y se disolvieron en tampón ESI A (0.5% de ácido acético en agua). La cromatografía líquida del análisis ESI MS/MS se realizó de la siguiente manera: las fracciones se depositaron en una columna de fase reversa C18 de 100 mm x 100 μm (New Objective, MA) y se fraccionaron en un sistema cromatográfico Famos-Switchos-Ultimate (LCPackings, Países Bajos) con un gradiente lineal del 5-40 % de tampón ESI B (90% de acetonitrilo, 0.5% de ácido acético en agua) a 450 nL/ min durante 90 min. Los péptidos eluidos de la columna se analizaron directamente en un espectrómetro de masas de trampa iónica Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics, Alemania). Los espectros de fragmentación MS/MS se obtuvieron mediante conmutación automática entre el modo MS y MS/MS usando exclusión dinámica. Las búsquedas de la base de datos se realizaron con las últimas versiones de las bases de datos NCBIInr y SwissProt usando el software MASCOT (<http://www.matrixscience.com/home.html>).

VI.3.3. Secuenciación *de novo*

Las bandas de interés del gel, teñidas con plata, se recortaron manualmente y fueron reducidas y Cys-alkiladas antes de la digestión tríptica, según el protocolo

descrito por Casado-Vela, (2008). Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos, secados usando un speed-vac y se resuspendieron en ácido fórmico al 0.1%.

Los péptidos se eluyeron en una columna Zorbax RP C18 (75 μm \times 15 cm) (Agilent) usando un gradiente lineal de 40 min desde 3 hasta 60% de acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico usando un sistema cromatográfico HPLC 1200 (Agilent) a una velocidad de flujo constante de 300 nL/ min. Los péptidos se escanearon y fragmentaron con un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de nanospray Proxeon. Los tres iones precursores más intensos, que van de 400 a 2000 m/z , se escanearon y se midieron en el espectrómetro de masas con una resolución de 60000 a 400 m/z . Los iones precursores se fragmentaron utilizando alta energía de disociación, con nitrógeno como gas de colisión según el protocolo descrito por Olsen y cols., (2007) y los fragmentos iónicos generados se midieron en un analizador de masas Orbitrap con una resolución de 7500 a 400 m/z .

Los parámetros de búsqueda usando SEQUEST fueron los siguientes: carbamidometil cisteína como modificación fija, metioninas oxidadas como modificación variable, una tolerancia del ion precursor de 2 ppm y una tolerancia del fragmento iónico de 0.1 Da. La búsqueda en la base de datos de los espectros de fragmentación se realizó en la base de datos NCBI nr (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>). Sólo aquellos péptidos con más de cinco aminoácidos, con valores de X_{corr} por encima de 1.5, 2.0 y 2.5 para las especies simple, doble y triplemente cargadas, respectivamente y con probabilidades de péptidos por encima de 0.5, se aceptaron como identificaciones positivas.

La secuenciación *de novo* de los fragmentos trípticos se realizó usando el software Peaks Studio v 4.5 (www.bioinformaticssolutions.com). La tolerancia de error de la masa fue de 0.01 Da y 0.02 Da para los precursores y los fragmentos, respectivamente. Sólo aquellas secuencias con scores ≥ 50 , valores de calidad ≥ 0.75 y que contenían cadenas de aminoácidos ≥ 4 , con confianza ≥ 99.5 se consideraron como candidatos válidos. Además, los péptidos secuenciados *de novo* también se validaron manualmente usando el software BlastP (Altschul y cols., 1997).

VI.3.4. Técnicas bioinformáticas

a) Búsqueda de secuencias en la base de datos

Muchas secuencias de proteínas de diferencias especies vegetales se han contrastado y por homología, se han identificado en las bases de datos más importantes y comúnmente utilizadas para este fin como el National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

b) Búsqueda de secuencias homólogas

La búsqueda de secuencias homólogas se realizó mediante la técnica algorítmica BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a través de la página del EBI. El BLAST constituye una herramienta muy útil para la búsqueda de alineamientos locales básicos y proporciona información sobre la estructura y la función de la nueva proteína encontrada. Para realizar la búsqueda de las secuencias homólogas se usaron dos herramientas BLAST: el NCBI-BLAST2 (Pearson, 1990) y el MPsrch que es capaz de identificar secuencias de forma exitosa donde BLAST falla o incluso da falsos positivos.

En ambos casos, las condiciones en las que se realizó el BLAST fueron las especificadas por defecto en la página del EBI, excepto en aquellos casos en los que era necesario ampliar la búsqueda, para lo que se disminuyó el umbral, o se quitó el filtro para encontrar un mayor número de secuencias.

VII. Análisis del perfil génico de cultivos celulares elicitados de *T. × media*

VII.1. Recogida de muestras

Las suspensiones celulares de *T. × media* se sometieron a cuatro tratamientos diferentes: control, 50 mM de M-β-CD, 100 μM de MJ y la combinación de ambos. El tratamiento control no contenía ni M-β-CD ni MJ. Para realizar estos tratamientos se utilizó una densidad final de 200 g PF de células/ L. Puesto que los elicitores se adicionaron al medio óptimo de producción en dos momentos diferentes del cultivo, las células se muestrearon a 4, 24, 72 y 96 h en el tratamiento control y con 50 mM de M-β-CD solas (ya que éstas fueron adicionadas al medio de cultivo en el momento de la

transferencia de las suspensiones celulares desde el medio óptimo para el crecimiento al medio óptimo para la producción) y 7, 8, 10 y 11 días en el tratamiento control, 50 mM de M- β -CD, 100 μ M de MJ y la combinación de ambos, ya que el MJ fue adicionado al medio, después del mantenimiento de las células durante 7 días creciendo tanto en el medio óptimo de producción (medio control) como en el medio de producción suplementado con M- β -CD. Una vez separadas las células del medio extracelular, se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

VII.2. Aislamiento y purificación de ARN

El ARN total se aisló a partir de células congeladas (100 mg de PF) utilizando el kit de extracción “REAL ARNzol SPIN KIT” (REAL). Además, para que el análisis de la expresión génica sea correcto, la muestra de ARN tiene que estar libre de restos de ADN genómico, puesto que su presencia implicaría la aparición de falsos positivos o de resultados erróneos. Para ello, se siguió la metodología descrita por el kit Turbo DNA-free™ (AMBIION). Debido a la inestabilidad del ARN y su facilidad para degradarse se trabajó a 4°C, utilizando DEPC (dietilpirocarbonato, que es un inactivador de ARNasas) en todas las soluciones acuosas, y usando material libre de ARNasas (doblemente autoclavado).

VII.3. Cuantificación del ARN total

Para que el análisis de la expresión génica se desarrolle correctamente hay que realizar una buena cuantificación del ARN del que se dispone, para posteriormente aplicar la misma cantidad de ARN a todas las muestras. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, USA). Una vez realizada la cuantificación, se realizó un gel de agarosa al 1.2% para visualizar las dos bandas típicas del RNA total, cargando la misma cantidad de material en todos los pocillos y comprobando, de este modo, que el ARN no se había degradado y que la cuantificación era correcta.

VII.4. Síntesis de ADNc

El ARN purificado (1 μ g) se utilizó para obtener ADNc a través de una reacción de transcripción reversa utilizando el kit de retrotranscripción M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez obtenido, se cuantificó la concentración de ADNc mediante el espectrofotómetro

Nanodrop® (NanoDrop Technologies Inc., USA). Una vez terminado todo este proceso, las muestras de ADNc se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su utilización.

VII.5. PCR cuantitativa a tiempo real

El estudio de la expresión diferencial de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis del taxol, en suspensiones celulares de *T. × media* elicidadas con M-β-CD y MJ se realizó con ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (Lightcycler® 480 Instrument, Roche). Para la reacción de PCR a tiempo real se utilizó el kit SYBR® Green PCR Mastermix (Roche). La mezcla de reacción final contenía: 2.5 µL de SYBR® Green PCR Mastermix, 0.75 µM de cebador sentido, 0.75 µM de cebador antisentido, 0.5 µL de una dilución de ADNc 1:10. Las reacciones se prepararon en una placa de 384 pocillos MicroAmp™ (Applied Biosystems). Todas las muestras se analizaron por triplicado. Para ello, después de una activación inicial de la polimerasa a 95 °C durante 5 min, las muestras se sometieron a 45 ciclos de amplificación, cada uno comprendido por: desnaturalización (95 °C durante 10 min), hibridación (55 °C durante 10 min) y extensión (72 °C durante 10 min). La fluorescencia se midió al final del paso de hibridación de cada ciclo para controlar el progreso de la amplificación. La especificidad de los amplicones se comprobó a partir del análisis de las curvas de disociación después de los 45 ciclos de amplificación de la PCR. Los datos fueron analizados con el software LightCycler® 480 versión 1.5.0 SP3 (Roche).

Las secuencias de los genes utilizados para el análisis por PCR cuantitativa a tiempo real se diseñaron utilizando el software Primer3 version 4.0 (Tabla 3) y la eficiencia de la amplificación de cada gen objeto de estudio fue determinada empíricamente a partir de diluciones seriadas del ADNc y siguiendo la metodología descrita en el manual de usuario de Qiagen. Sólo se utilizaron aquellos genes que presentaban una eficiencia superior a 0.8.

En cuanto al gen de referencia, debido a que el genoma de *Taxus* no está secuenciado, la disponibilidad de genes endógenos referenciados es muy pobre, y por ello inicialmente se evaluaron dos genes que actuaran como control endógeno para las condiciones de nuestro experimento, la matorasa K (proteína implicada en la maduración del ARN de cloroplastos) y el ARNr 18S, ambos considerados constitutivos. Sin embargo, ambos genes mostraron una expresión variable en las

condiciones del experimento, por lo que se procedió a evaluar el fragmento de gen *TBC41*, cuya secuencia se obtuvo en experimentos realizados por el grupo de investigación de la Universidad de Barcelona mediante la técnica ADNc-AFLP, que permite hacer estudios de expresión génica sin conocimiento previo del genoma de la planta. Aunque no se sabe con exactitud a qué gen corresponde esta secuencia, éste tiene homología con una 3,5-epimerasa-4-reductasa (relacionada con el metabolismo de algunos componentes de la pared celular), y se determinó que este gen actuaba de forma satisfactoria como gen endógeno para las condiciones experimentales ensayadas.

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real. *Tbc 41*, control endógeno; *txs*, taxadieno sintasa; *dbat*, 10-deacetylbatatina III acetiltransferasa; *bapt*, batatina III 13-O- fenilpropanoil transferasa; *dbtnbt*, debenzoiltaxol *N*-benzoil transferasa; *t7 β oh*, taxano 7 β -hidroxilasa; *tbc595*, factor de transcripción; *abc*, transportadores ABC

Gen	Secuencia del cebador	Tamaño del amplicón (pb)
<i>tbc 41</i>	Sentido: 5'-CAA GAA GAA AGA GTC AGC AAA TGG-3' Antisentido: 5'-GGA ACG ACA TGA CAT TAT GAA TAG C-3'	91
<i>txs</i>	Sentido: 5'-TTC GCA CGC ACG GAT ACG- 3' Antisentido: 5'-TTC ACC ACG CTT CTC AAT TCG- 3'	114
<i>dbat</i>	Sentido: 5'- AGT TGG ATT TGG TGA TGC AA- 3' Antisentido:5'- ATC CAT GTT GCA CGA GAC TT- 3'	92
<i>bapt</i>	Sentido: 5'- TAA GCA CTC TAC AAC AAC AAT GG- 3' Antisentido: 5'- GCA TGA ACA TTA GTA TCT TGA TTC C- 3'	111
<i>dbtnbt</i>	Sentido: 5'- CGG GGG GTT TGT TGT GGG ATT A- 3' Antisentido: 5'- TTA GCC TCT CCC CTC GCC ATC T- 3'	104
<i>t7βoh</i>	Sentido: 5'- GGT CCG CCC AAA TTG CCA GAA- 3' Antisentido: 5'- CCC TGC AGA GCC CAA AAA ACC- 3'	110
<i>tb595</i>	Sentido: 5'- TGA GCT GCA TAT GTC CGT GTT GTA- 3' Antisentido: 5'- TCG CAT GAT TTT GAG AGG AAG CTT- 3'	88
<i>abc</i>	Sentido: 5'- AGC CTA TAA ATC CCT AGT GCA A- 3' Antisentido: 5'- GTT GCC TGC CAG TGT TAT TT- 3'	120

Resultados y Discusión

*Análisis metabolómico y proteómico de cultivos celulares
de Capsicum sp elicitados con ciclodextrinas y jasmonato
de metilo*

I. Antecedentes y objetivos

Las plantas responden al ataque de patógenos y/o factores externos a través de mecanismos de defensa inducibles y constitutivos. Las barreras estructurales o los depósitos de compuestos antimicrobianos estratégicamente posicionados, representan defensas constitutivas contra la colonización de los tejidos. Las respuestas de defensa inducidas incluyen la activación de genes relacionados con la defensa, que conducen al refuerzo de las paredes celulares vegetales y la acumulación de fitoalexinas y proteínas PR, como parte de un mecanismo promovido por la infección por patógenos o por el tratamiento con elicitores (Kim y Hwang, 2000; Zamboni y cols., 2006, Almagro y cols., 2009). La participación del AJ y su derivado más activo, MJ, en la cascada de transducción de la señal, ha conducido a la utilización de estas moléculas como inductores de mecanismos de defensa en una gran variedad de sistemas vegetales.

Numerosos autores han demostrado que los jasmonatos también provocan la acumulación de metabolitos secundarios en suspensiones celulares, por ejemplo, taxol en los cultivos celulares de *Taxus sp* (Yukimune y cols., 1996), ácido rosmarínico en cultivos *Coleus blumei* (Szabo y cols., 1999), ginsenósidos en cultivos celulares de *P. ginseng* (Yu y cols., 2002) y cultivos celulares de vid (Qu y cols., 2006). En los cultivos celulares de *C. annuum*, sólo un compuesto de naturaleza sesquiterpénica, el capsidiol que tiene actividad antifúngica y antimicrobiana (De Marino y cols., 2006), se sintetiza en respuesta a la presencia de celulasa y MJ (Ma, 2008). La adición de MJ también induce la producción de solavetivona en cultivos de raíces de *Hyoscyamus muticus*, la cual es un compuesto sesquiterpénico característico de la familia de las Solanáceas (Singh y cols., 1998). En vid, MJ también induce la acumulación de estilbenos (especialmente resveratrol y viniferinas) en hojas, bayas (Larronde y cols., 2003) y suspensiones celulares (Repka y cols., 2004; Lijavetzky y cols., 2008).

Por otro lado, en tomate o tabaco, los jasmonatos también son capaces de inducir la expresión de genes que codifican para proteínas PR tales como quitinasas y β -1,3-glucanasas (Enkerli y cols., 1993; Fukuda y Shinshi, 1994), que juegan un papel en el sistema de defensa de la planta (Kasprzewska, 2003). De hecho, algunos autores (Mauch y cols., 1988; Schröder y cols., 1992) han demostrado el efecto antifúngico de algunas quitinasas, especialmente en combinación con β -1,3-glucanasas. En *C. annuum*, la expresión de proteínas PR como quitinasa y β -1,3-glucanasa, se induce fuertemente

en hojas y tallos tras la infección con *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* o *Phytophthora capsici* (Hwang y cols., 1997; Lee y Hwang, 1996). Además, Kim y Hwang (2000) describieron que el tratamiento combinado de MJ con SA o la infección de hojas de pimiento con *X. campestris* pv *vesicatoria* inducía fuertemente la expresión de una proteína básica PR-1. Jung y cols., (2004) aislaron un ADNc que codificaba para una proteína extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) en respuesta a esta infección. La infección de los tejidos de pimiento con *P. capsici* o *Colletotricum gloeosporioides* también indujo la expresión de tres genes que codificaban para una peroxidasa (Do y cols., 2003). Asimismo, Kim y cols., (2002) aislaron y caracterizaron un gen que codifica una proteína homóloga a la proteína tipo taumatina (TLP) durante la interacción de frutos de pimiento maduros con el hongo *C. gloeosporioides*. La expresión de esta TLP se estimulaba tanto por el tratamiento con AJ como por heridas durante la maduración del fruto.

Con estos antecedentes y para el desarrollo de este capítulo se utilizaron los cultivos celulares de *C. annuum* y *C. chinense* elicitados con M- β -CD y MJ separadamente o en combinación con el fin de evaluar el efecto inductor de estos elicitors sobre la acumulación extracelular de metabolitos secundarios y proteínas relacionadas con la defensa y en el que se abordaron los objetivos siguientes:

- Estudio de la producción de compuestos de naturaleza sesquiterpénica en suspensiones celulares de *C. annuum*.
- Estudio del proteoma extracelular de cultivos celulares de *C. annuum* elicitados con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo.
- Estudio del proteoma extracelular de cultivos celulares de *C. chinense* elicitados con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo.

II. Caracterización de la curva de crecimiento de *Capsicum annuum*

La determinación de la curva de crecimiento se llevó a cabo en suspensiones celulares previamente estabilizadas a lo largo de los subcultivos, con el fin de determinar la duración de las distintas fases del crecimiento así como los parámetros cinéticos característicos. Para ello, se tomaron muestras periódicas desde el inicio de la suspensión celular hasta los 28 días de cultivo.

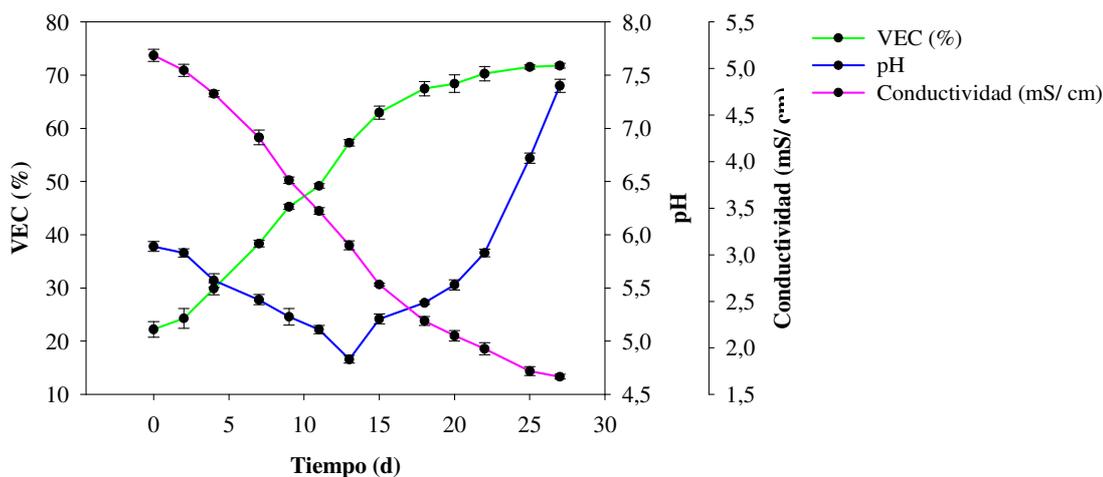


Figura 1. Representación de la curva de crecimiento, de las variaciones del pH y de la conductividad durante el cultivo de suspensiones celulares de *C. annuum*. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes.

Como se puede observar en la Figura 1, la curva de crecimiento de la suspensión celular fue típicamente sigmoideal, iniciada con una densidad celular del 22,2% (medida como VEC (%), que se corresponde con una densidad celular de 200 gPF/ L), se incrementó hasta el 72,8% (que se corresponde con 582 gPF/ L que a su vez equivale a 29,1 gPS/ L) y luego se estabilizó al alcanzar a la fase estacionaria del crecimiento, distinguiéndose un periodo corto de latencia o fase “lag” desde el inicio de la curva hasta que comienza el crecimiento de forma exponencial (desde el día 0 al día 2); la fase “log” que comprende desde el comienzo de la fase de crecimiento exponencial hasta que se observa disminución del crecimiento (desde el día 2 al día 15) y la fase “estacionaria” que abarcó desde el día 15 hasta el final del cultivo (día 28). Este cese del crecimiento a partir del día 18 determinó la necesidad de subcultivo a ese tiempo.

Por otra parte, la medida de la conductividad muestra una variación inversamente proporcional al crecimiento debido a que la conductividad del medio de

cultivo está directamente relacionada con la concentración de iones en el medio. Por lo tanto, se observa una disminución de los dos principales nutrientes aniónicos, los nitratos y fosfatos, que disminuyen en proporción a su consumo por las células. En cuanto al pH, éste va a estar condicionado por el metabolismo celular, que en el caso de las células cultivadas *in vitro*, dependerá principalmente, de la composición del medio de cultivo. En el caso de las suspensiones celulares de pimiento, el pH se ajustó inicialmente a 5.8. Como se observa en la Figura 1, el pH descendió en una unidad transcurridos 13 días de cultivo y a continuación, se incrementó bruscamente superando incluso el valor inicial, alcanzando hacia el final del cultivo un pH próximo a 7.5. Las células vegetales cultivadas *in vitro* tienden a utilizar aquella fuente de nitrógeno cuya incorporación les reporte un menor coste energético. Sin embargo, la incorporación de nitrógeno no sólo depende del coste energético, sino también de la relación de concentraciones de sales de amonio y de nitratos del medio de cultivo (Loulakakis y Roubelakis-Angelakis, 2001) e incluso de la disponibilidad, por parte de la célula, de moléculas capaces de reducir los nitratos y nitritos hasta amonio, lo cual, está directamente relacionado con el metabolismo de las células y sus fuentes de carbono.

II.1. Cinética de crecimiento de las suspensiones celulares

Para la determinación de los parámetros cinéticos, se han utilizado las ecuaciones descritas en el apartado II. de Material y Métodos. Dichos parámetros se muestran representados en la Figura 2.

El volumen de empaquetamiento celular (VEC) indica el porcentaje de volumen celular en relación al volumen total de suspensión celular. La caracterización de la curva de crecimiento se realizó en base a los parámetros cinéticos “velocidad de crecimiento en la fase exponencial” (V_{exp}), “volumen de empaquetamiento celular máximo” o biomasa máxima generada ($VEC_{m\acute{a}x}$) y “tiempo de agotamiento” (T_a), obtenidos a partir de los datos cinéticos de la curva de crecimiento.

Los valores de estos parámetros cinéticos fueron $VEC_{m\acute{a}x}$ del 72.8%, V_{exp} 2.79 y T_a de 18 días (Figura 2).

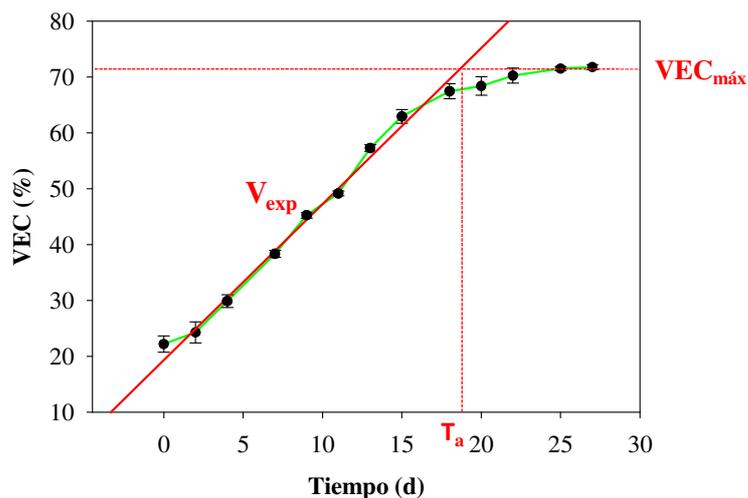


Figura 2. Curva de crecimiento de suspensiones celulares de *C. annuum* utilizada para mostrar los parámetros cinéticos.

III. Identificación y cuantificación de compuestos de naturaleza sesquiterpénica en cultivos celulares de *C. annuum* elicitados con ciclodextrinas y jasmonato de metilo

Tras la elicitación de suspensiones celulares de *C.annuum* con 50 mM de β -CD y 100 μ M de MJ, separadamente o en combinación, se realizó la extracción de los compuestos sesquiterpénicos presentes en el medio extracelular mediante partición de fases con acetato de etilo.

Para ello, en un primer momento, se realizó un análisis de los compuestos presentes en el medio extracelular mediante la utilización de un HPLC-DAD, con el fin de detectar la presencia en los medios de elicitación de compuestos característicos del género *Capsicum* mediante la utilización de patrones externos tales como capsicina y compuestos derivados de ésta y capsidiol, fitoalexina de naturaleza sesquiterpénica abundante en los frutos de pimiento. Sin embargo, los resultados obtenidos con esta técnica no arrojaron luz acerca de la presencia de estos compuestos de interés, por lo que se realizó un análisis mediante GC/MS del extracto metanólico obtenido tras la extracción.

Tanto los cromatogramas obtenidos de los extractos control como los resultantes de las muestras elicidadas con M- β -CD y MJ, separadamente o en combinación, presentaron un gran número de compuestos, muchos de los cuales no pudieron ser identificados a pesar de su abundancia, debido al escaso grado de fiabilidad o semejanza

(<90%) que presentaban cuando se comparaban con los espectros de masas de la base de datos o bien, debido a que no se encontraban espectros de masas de compuestos similares en la base de datos utilizada.

Entre los compuestos identificados destacó la presencia compuestos de naturaleza sesquiterpénica, como solavetivona y aromadendrano. La solavetivona es una fitoalexina característica de la familia de las Solanáceas que se acumula en los tubérculos en respuesta a infecciones fúngicas (Ribera y Zúñiga, 2012) mientras que el aromadendrano se caracteriza por ser un sesquiterpeno utilizado en el control de plagas, ya que actúa como un inhibidor de la hormona juvenil de insectos y como un elemento disuasorio además de presentar acción antifúngica (Moreira y cols., 2003). Estos dos compuestos se detectaron con un grado de fiabilidad superior al 90% cuando se realizaron los análisis comparativos del espectro de masas experimental y el obtenido en la base de datos.

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos del tratamiento de cultivos celulares de *C. annuum* control y los elicitados con 50 mM de M- β -CD y 100 μ M de MJ, individualmente o en combinación. Como se puede observar en dicha figura, la producción de estos compuestos resultó ser muy baja en los cultivos celulares control y en los tratamientos individuales de M- β -CD y MJ. Sin embargo, el tratamiento combinado de ambos elicitors provocó un aumento exponencial de la producción de ambos compuestos (2353 ± 80 μ g/gPS y 1094 ± 67 μ g/gPS de aromadendrano y solavetivona, respectivamente). Estos resultados indicaron que la acción conjunta de M- β -CD y MJ provocó un efecto sinérgico sobre la producción de estos metabolitos ya que la suma de los niveles individuales obtenidos en presencia de M- β -CD (46.1 ± 8.5 μ g/gPS y 63.7 ± 11.78 μ g/gPS de aromadendrano y solavetivona, respectivamente) o MJ (92.9 ± 15.15 μ g/gPS y 53.3 ± 22.54 μ g/gPS de aromadendrano y solavetivona, respectivamente) fue mucho menor que los niveles obtenidos con el tratamiento combinado.

Se han realizado numerosos estudios donde se ha identificado solavetivona como el compuesto que se biosintetiza tras la inducción de suspensiones celulares de diferentes especies vegetales con factores bióticos y/o abióticos. Así, Uegaki y cols., (1981) identificaron la presencia de solavetivona en suspensiones celulares de patata en respuesta al hongo patógeno *P. infestans*. Brindle y cols., (1983) también detectaron la

presencia de solavetivona en hojas de *Nicotiana sp* después de la infección con el virus del mosaico del tabaco. Recientemente, Tugizimana y cols., (2012) han identificado cinco compuestos sesquiterpénicos entre ellos solavetivona y capsidiol, en respuesta a la elicitación de cultivos celulares de tabaco elicitados con ergosterol (principal esteroide de las membranas fúngicas). El interés en la producción de solavetivona radica en sus propiedades farmacológicas, por su efecto antiinflamatorio, antifúngico, antimicrobiano y su actividad antitumoral (Jason Yoder, 2005).

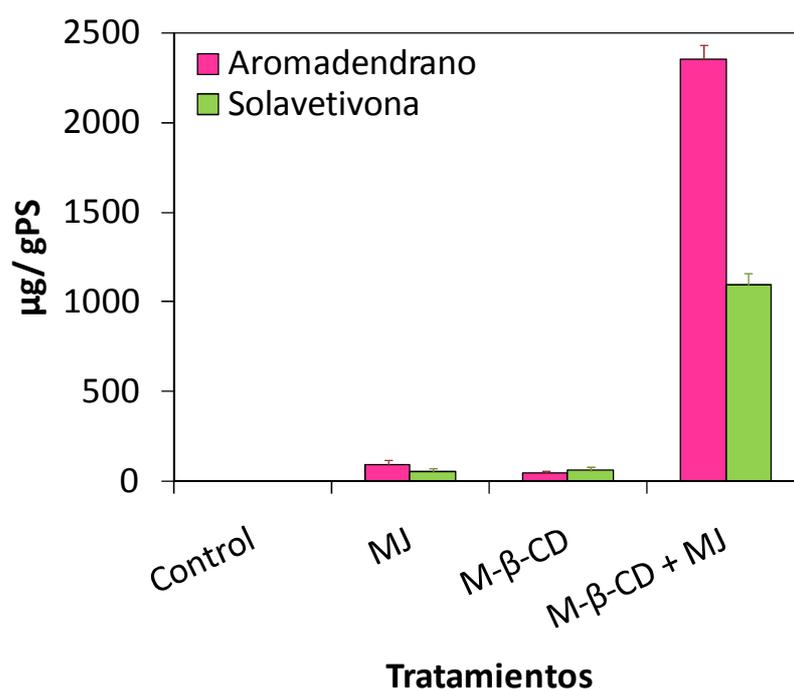


Figura 3. Productividad ($\mu\text{g/gPS}$) de solavetivona y aromadendrano en cultivos celulares de *C. annuum* elicitados con 50 mM de M- β -CD y 100 μM de MJ tras 96 h de elicitación. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes.

IV. Análisis del proteoma extracelular de cultivos celulares de *C. annuum* elicitados con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo

Tras la elicitación de las suspensiones celulares de *C. annuum* se realizó la extracción de las proteínas presentes en el medio extracelular. A continuación, la determinación de las proteínas extracelulares totales se realizó mediante electroforesis desnaturizante sobre geles de poliacrilamida teñidos con azul brillante de Coomassie.

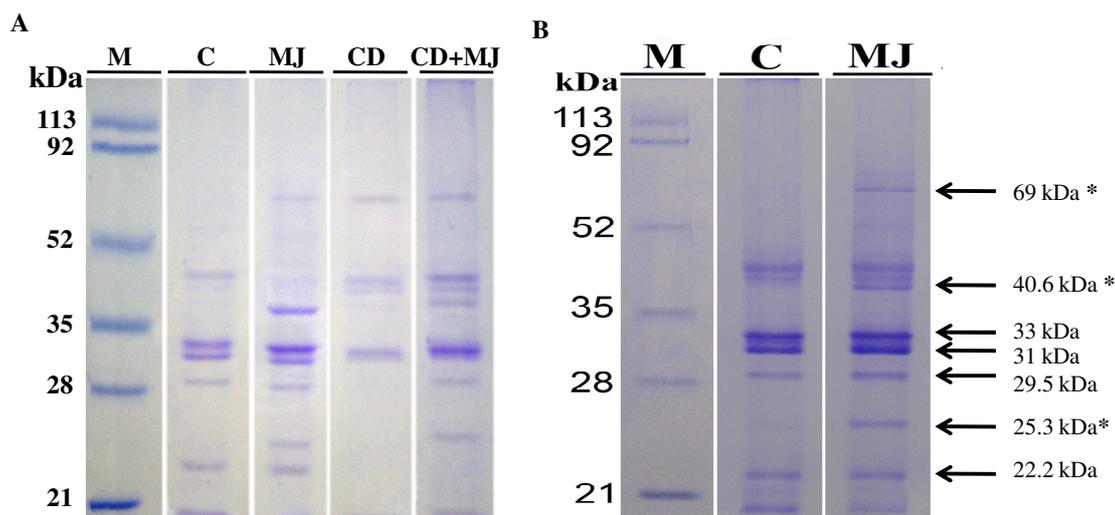


Figura 4. A. Patrón de proteínas totales del medio extracelular de suspensiones celulares de *C. annuum* realizado mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes, teñido con Coomassie. La calle M se corresponde con el marcador de peso molecular, la calle C con el control, la calle MJ con la suspensión celular elicitada con jasmonato de metilo, la calle CD con la suspensión celular elicitada con metil- β -ciclodextrinas y la calle CD+MJ al tratamiento combinado de la suspensión celular con metil- β -ciclodextrinas y jasmonato de metilo. B. Patrón de proteínas totales del medio extracelular de suspensiones celulares *C. annuum* control (calle C) y elicitadas con jasmonato de metilo (calle MJ) realizado mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes, teñido con Coomassie. El asterisco representa a las bandas de proteínas inducidas por la presencia de MJ.

Cuando se realizó el análisis comparativo de las bandas de proteínas extracelulares presentes en los cultivos celulares no tratados (control) y los cultivos celulares elicitados en presencia de 100 μ M de MJ (MJ y M- β -CD+MJ), se observó que el patrón de proteínas era similar (Figura 4A), destacando la presencia de tres bandas de proteínas que se correspondían con pesos moleculares aparentes de 25.3, 40.6 y 69 kDa y que resultaron ser inducibles por el tratamiento de las suspensiones celulares con MJ (Figura 4B). Por esa razón, se realizó el análisis proteómico de las bandas de proteínas correspondientes al tratamiento control y MJ (Figura 4B). Además, las bandas de proteínas con pesos moleculares aparentes inferiores a 46 kDa constituyeron las proteínas mayoritarias presentes en el medio extracelular. Así, debido a la simplicidad de la huella peptídica obtenida, se realizó el análisis proteómico del medio extracelular de las suspensiones celulares de *C. annuum* mediante RP-nanoLC ESI MS/MS. Para ello, se realizó la digestión con tripsina de las 7 bandas de proteínas extracelulares separadas mediante electroforesis (Figura 4) tanto de los cultivos control como de los elicitados con MJ y los diferentes fragmentos trípticos obtenidos se separaron por nanoLC ESI MS/MS.

Como se observa en la Tabla 1, tras el análisis de los fragmentos trípticos de la banda de proteínas con peso molecular aparente de 25.3 kDa en los cultivos celulares tratados con MJ, se identificaron 17 fragmentos trípticos cuyas secuencias de aminoácidos presentaron homología con proteínas PR de *Capsicum* sp (PR-1 (n° acceso AAK30143) y PR-4 (n° acceso BAD11073)), proteína de unión a quitina (CACBP1, n° acceso AAF18934) de *Capsicum*, PrP27 de *Nicotiana tabacum* (n° acceso BAA81904), proteína tipo NtPRp27 de *Solanum tuberosum* (n° acceso AAO22065) así como una quitinasa de clase I (n° acceso AAR90844) y proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR, n° acceso AAN62015) de *C. annuum*.

Los fragmentos trípticos obtenidos tras la digestión con tripsina de la banda de proteínas peso molecular aparente de 40.6 kDa inducida por MJ (Tabla 1), contenía 12 secuencias de aminoácidos que mostraron homología con una peroxidasa de *C. annuum* denominada CAPO1 (n° acceso AAL35364) y una peroxidasa de *Populus alba* x *P. tremula* var. *glandulosa*, denominada PoPOD1 (n° acceso AAX53172). Finalmente, las secuencias de aminoácidos descritas en la Tabla 1 correspondiente a la banda de proteínas de peso molecular aparente de 69 kDa, mostraron homología con enzimas hidrolíticas tales como LEXYL 1 y 2 (n° acceso BAC98298 y BAC98299, respectivamente) y arabinosidasas (n° acceso AAL18931) de *S. lycopersicum*, y pectinesterasa (n° acceso ABN08348) de *C. annuum*, así como una proteína nectarina IV (n° acceso AAX81588) de *N. langsdorffii* x *N. sanderae*.

Aparte de estas proteínas inducibles por MJ, se observó la presencia de otras proteínas PR en las bandas de proteínas de peso molecular aparente de 22.2, 29.5, 31 y 33 kDa, tanto en el tratamiento control como en los cultivos celulares de *C. annuum* elicitados con MJ (Tabla 2). Los fragmentos trípticos identificados presentaron secuencias de aminoácidos que eran homólogas a quitinasas, β -1,3-glucanasas, TLP y peroxidases, lo que sugiere que su expresión es principalmente constitutiva ya que están involucrados en las respuestas de crecimiento, desarrollo y defensa. De hecho, numerosos estudios han confirmado la expresión de estas proteínas PR en los medios extracelulares de los cultivos celulares no tratados de *Zinnia elegans*, *Cycas revoluta* y *T. baccata* (Novo Uzal y cols., 2009).

En relación a las bandas de proteínas inducidas por jasmonatos, varios autores (Lee y cols., 2001; Kim y Hwang, 2000; Park y cols., 2001) han descrito la presencia de

proteínas PR-1 y PR-4 y las proteínas de unión a quitina en tejidos de pimiento tratados con etefón, SA, MJ y patógenos. De hecho, Park y cols., (2001) demostraron que la expresión de los genes que codifican para la proteína PR básica PR4b estaba mediada por el AJ, mientras que PR-1 se indujo fuertemente cuando las hojas de pimiento se trataron con una combinación de SA y MJ. Estos resultados concuerdan con la presencia de secuencias de aminoácidos en las células de pimiento tratadas con MJ ya que mostraron homología con una proteína básica PR-1 de pimiento (CABPR1, n° acceso AAK30143; Kim y Hwang, 2000). Estas secuencias de aminoácidos de *Capsicum* sp que son idénticas a CABPR1 de tabaco y tomate (destacadas en negrita, Tabla 1), representan regiones peptídicas altamente conservadas en proteínas PR-1. De manera similar, dos secuencias de aminoácidos, TGAQTIVR y QIDTDGVGNQR, (fragmentos trípticos en cursiva, Tabla 1) mostraron homología con una proteína de unión a quitina (CACBP1, n° acceso AAF18934) aislada de la librería de ADNc de hojas de pimiento infectadas con *X. campestris* pv *vesicatoria* (Lee y cols., 2001). Estas secuencias de aminoácidos forman parte de la secuencia consenso, siendo idénticas en todas las proteínas comparadas de la familia de las Solanáceas (pimiento, tomate, tabaco y patata).

Tabla 1. Identificación de proteínas en base a los fragmentos trípticos obtenidos a partir del proteoma extracelular de cultivos celulares de *C. annuum* elicitados con 100 μ M de MJ usando nanoLC-ESI MS/MS y búsqueda de por homología de secuencia.

Bandas inducidas por MJ	Fragmento tríptico	Nº Acceso	Proteína	Masa nominal	Scores ^a
25.3 kDa	LAAFAQNYANQR MQHSGGPYGENLAAAFPQLNAAGAVK	AAK30143	CABPR-1 <i>Capsicum annuum</i>	20.481	148
	AWRSKYGWTAFCGPVGP	BAD11073	PR4b <i>Capsicum chinense</i>	22.508	230
	<i>TGAQTIVR, QIDTDGVGNQR</i>	AAF18934	CACBP1 precursor <i>Capsicum annuum</i>	22.956	145
	WDQGYDVTAR, FLDYCNSLR NGFVAQLNKK	BAA81904	NtPRp27 <i>Nicotiana tabacum</i>	27.418	144
	YIQGYSGDVR, NGFVAELNKK, TVDQLWSDYK	AAO22065	Proteína tipo NtPRp27 <i>Solanum tuberosum</i>	25.172	242
	NDNACQGKNNFYSYNAFITAAK, SFPFGTGTGDTAVR, EQGSPGDYCSQWPCAPGRK, GPIQISYNYNYGPCGR	AAR90844	Quitinasa clase I <i>Capsicum annuum</i>	13.175	468
	LSGTIPSSLGNLK LSGEIPISVLK	AAN62015	Proteína LRR <i>Capsicum annuum</i>	21.557	114
40.6 kDa	VGFYSSTCPRAESIVQSTVR, GYEVIDDAK, DSVLVTK, GLTWSVPTGR, ASDTSDLPGFTESVDSQK, VALDTGSVNNFDTSYFSNLR, GILESQK, LWTDDSTK, FGVEFGR	AAL35364	Peroxidasa CAPO1 <i>Capsicum annuum</i>	36.507	533
	GLLHSDQELFNGGSQDALVR, MGNISPLTGTNGEIR	AAX53172	Peroxidasa PoPOD1 <i>Populus alba x Populus tremula</i> var. <i>Glandulosa</i>	33.934	246

69 kDa	HYTAYDVDNWK, AISNNFATLMR LGFFDGNPK, IYGNLGP, QGIVLLK	BAC98298	LEXYL1 <i>Solanum lycopersicum</i>	84.081	280
	AMYNVGQAGLTYWSPNVNIYR, YGVAYVK, YNFNAK VTQQLDDTFNPPFK, AVTNNFATLMR, LGFFDGNPK NQLYGNLGP, QGIVLLK, NTAGSLPLSPK	BAC98299	LEXYL2 <i>Solanum lycopersicum</i>	69.724	518
	AFVSEYAVTGNDAGK	AAL18931	Arabinosidasa ARA-1 <i>Solanum lycopersicum</i>	74.698	76
	SVVDGWTTFR	ABN08348	Pectinesterasa <i>Capsicum annuum</i>	60.079	63
	VASVAPFGACFDSR	AAX81588	Nectarina IV <i>Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderæ</i>	47.746	69

^a Mascot scores

Las secuencias consenso de peroxidases están subrayadas.

Los péptidos con regiones altamente conservadas correspondientes a proteínas PR están marcadas en negrita.

La mayoría de las quitinasas y β -1,3-glucanasas que se identificaron, correspondían a las bandas de proteínas de peso molecular aparente de 29.5 y 31 kDa (Tabla 2) y sólo se identificó una quitinasa de clase I en la banda de proteínas de peso molecular aparente de 25.3 kDa que resultó ser inducida por MJ (Tabla 1). Las quitinasas y β -1,3-glucanasas son las principales proteínas extracelulares que se encuentran en estos cultivos celulares. De hecho, la mayoría de los fragmentos trípticos mostraron homología con quitinasas de *S. dulcamara*, *Bambusa oldhamii* y *N. tabacum*, endoquitinasas de *S. lycopersicum*, *Gossypium hirsutum*, *C. annuum* y *N. tabacum* y β -1,3-glucanasas de *N. tabacum*.

Numerosos estudios han demostrado que estas proteínas PR se expresan constitutivamente a bajos niveles en las plantas, pero son fuertemente inducidas cuando las plantas responden a la infección (Wu y Bradford, 2003). Shinya y cols., (2007) identificaron un nuevo gen de la quitinasa de clase IV (NtChiIV) en *N. tabacum* la cual se indujo transitoriamente por la presencia de un β -1,3-1,6-glucano de *Alternaria alternata*. Una comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de NtChiIV mostró un 64% de identidad con las quitinasas de clase IV de *A. thaliana*, 59% de identidad con *Oryza sativa* y 67% de identidad con *V. vinifera*. Por lo tanto, es bastante probable que los dos péptidos identificados en los cultivos celulares de pimiento (SIGFDGLNDPDIVAR y DAVISFK, Tabla 2), que coinciden con la secuencia de aminoácidos deducida de NtChiIV (Shinya y cols, 2007) representen un fragmento altamente conservado de estas quitinasas de clase IV. Del mismo modo, se identificaron fragmentos trípticos cuya secuencia de aminoácidos mostraron homología con una β -1,3-glucanasa de *N. tabacum* (Tabla 2). Linthorst y cols., (1990) demostraron que los genes que codifican β -1,3-glucanasas, tanto ácidas como básicas, y que se expresan constitutivamente en plantas de tabaco sanas, su expresión se incrementó fuertemente después de la infección con el virus del mosaico del tabaco o tras el tratamiento con SA. Una de las secuencias de aminoácidos que se encuentran en los cultivos celulares de pimiento (HFGLFSPNK) fue localizada 31 residuos de aminoácidos aguas arriba del extremo C-terminal, mientras que los otros dos (GSNIEVMLGLPNSDVK y DFVPDVK) fueron localizados 46 y 80 residuos de aminoácidos, respectivamente, aguas abajo del péptido señal, lo que indica que se trata de una proteína de secreción típica de la pared celular (Chivasa y cols., 2002), lo cual es coherente con su localización en los medios extracelulares de *C. annuum*.

Tabla 2. Identificación de proteínas constitutivas en base a los fragmentos trípticos obtenidos a partir del proteoma extracelular de cultivos celulares de *C. annuum* usando nanoLC-ESI MS/MS y búsqueda por homología de secuencia.

Bandas proteínas constitutivas	Fragmento tríptico	N° acceso	Proteína	Masa nominal	Scores^a
22.2 kDa	NNCPYTVWAASTPVGGGR, GQWTINAPPGTAMAR, TNCNFDGSGR, CHAIQCTANINGECPGSLR, VPGGCNNPCTTFGGQQCCTQGPCGPTLSK, CPDAYSPQDDATSTFTCPSTNYR	AAK97184	Proteína tipo taumatina <i>Capsicum annuum</i>	27.254	500
29.5 kDa	GFGTTGDTTAR, GPIQISHNYNYGPCGR, SAIWFWMTPQSPK, IGFYKR	AAP32201	Quitinasa 29 kDa <i>Solanum dulcamara</i>	29.454	257
	EGNQMGSGFYGR QPGYGVITNIINGGIECGK	Q05540	Endoquitinasa ácida 27 kDa (precursor) <i>Solanum lycopersicum</i>	27.023	141
	GFYTYDAFIAAAR, VPGYGVITNIINGGLECGK IGFYKR	Q39799	Endoquitinasa 1 (precursor) <i>Gossypium hirsutum</i>	35.613	240
	EQGSPGDYCSPSGQWPCAPGRK GPIQISYNYNYGPCGR, WQPSSADR RYCGILGVSPGDNLDCGNQR	AAY90154	Endoquitinasa <i>Capsicum annuum</i>	19.591	410

31 kDa	GPIQLSYNYNYGPAGK, IGFYQR	AAR18735	Quitinasa; BoCHI1 <i>Bambusa oldhamii</i>	36.195	102
	SIGFDGLNDPDIVAR, DAVISFK	BAF44533	Quitinasa clase IV <i>Nicotiana tabacum</i>	30.797	126
	EQGSPGDYCTPSGQWPCAPGR GPIQISHNYNYGPCGR WQPSSADR	P24091	Endoquitinasa B (precursor) <i>Nicotiana tabacum</i>	35.668	156
	GSNIEVMLGLPNSDVK DFWPDVK HFGLFSPNK	CAA37669	beta-1,3-glucanasa <i>Nicotiana tabacum</i>	40.452	163
	VGFYSSSTCPR, <u>AESIVQSTVR</u> , SHFQSDPTVAPG <u>LLR</u> , GYE <u>VIDDAK</u> ,GLTWSVPTGR, ASDTSDLPGFTESVDSQK, LWTDDST, FGVEFGR, GILESQK	CAH17986	Peroxidasa CAPOA1 <i>Capsicum annuum</i>	32.309	495
	GFEVIAQAK, LGGQTYT <u>VALGR</u> , EM <u>VALAGAHTVGFAR</u>	CAI48071	Peroxidasa aniónica <i>Capsicum chinense</i>	31.471	128
33 kDa	IGASLIR, MGNISPLTGT <u>DGEIR</u>	CAA66037	Peroxidasa PXP3-4 <i>Populus trichocarpa</i>	37.081	138
	MGASLLR, GFE <u>VIDNIK</u> , DSVVIL <u>G</u> GPWNVVK, FDNNYFK	BAA82306	Peroxidasa <i>Nicotiana tabacum</i>	34.805	262
	IGASILR, ISPLTGT <u>N</u> GEIR	BAD97435	Peroxidasa POX11 <i>Pisum sativum</i>	34.771	160

^a Mascot scores

Las secuencias consenso de peroxidases están subrayadas.

Asimismo, también encontramos dos secuencias de aminoácidos en la banda proteica de peso molecular aparente de 25.3 kDa que mostraron homología con proteínas que presentaban dominios LRR altamente conservados en los cultivos celulares de *C. annuum*. LRR es un dominio de unión a proteínas con una repetición de 24-26 residuos de aminoácidos, que proporciona un marco estructural para ciertas interacciones moleculares específicas. De hecho, las proteínas LRR participan en una serie de vías de transducción de señales y juegan un papel importante en la mediación de interacciones proteína-proteína. Jung y cols., (2004) aislaron una proteína extracelular que contenía dominios LRR, llamada CALRR1, a partir de hojas de pimiento infectadas con *X. campestris* pv *vesicatoria*. Además, el ARNm de CALRR1 estaba localizado en los tejidos del floema de diferentes órganos del pimiento durante la infección, lo que sugiere que esta proteína puede jugar un papel clave en la protección de las células del floema contra el estrés biótico.

Por otro lado, los fragmentos trípticos que mostraron homología con las peroxidasas CAPO1 y PoPOD1 fueron los únicos inducidos por MJ (banda de proteína de peso molecular aparente de 40.6 kDa, Tabla 1). Do y cols., (2003) clonaron los genes de CAPO1 en hojas de pimiento infectadas por una cepa no virulenta de *X. campestris* pv *vesicatoria*. La secuencia de aminoácidos deducida de CAPO1, en comparación con otras peroxidasas vegetales, fue 89% idéntica a una peroxidasa de tomate relacionada con la defensa (nº acceso T07008; Gadea y cols., 1996), 73% homóloga a la peroxidasa catiónica de cacahuete (nº acceso P22196; Buffard y cols., 1990), 49% idéntica a la peroxidasa relacionada con la lignificación de *A. thaliana* (nº acceso 11513747; Ostergaard y cols., 2000) y 43% homóloga a la peroxidasa de alfalfa inducida por patógenos (nº acceso JC4781). Do y cols., (2003) también describieron cambios no sólo en la expresión de genes de CAPO1 durante la respuesta hipersensible a *X. campestris* en hojas de *C. annuum*, sino también durante el proceso de infección de los tejidos de pimiento por *P. capsici* o *C. gloeosporioides*, lo que sugiere un papel de estas enzimas en respuesta a la infección por hongos oomicetos y bacterias en *C. annuum*. Además, se encontraron otros fragmentos trípticos en las bandas de proteínas constitutivas de peso molecular aparente de 31 y 33 kDa (Tabla 2) que se han correlacionado con otras peroxidasas de especies herbáceas y leñosas. Estas secuencias de aminoácidos contienen regiones que están altamente conservadas (Tabla 2) como GEIR en peroxidasas de *Populus* y *Pisum sativum*, VAL en una peroxidasa aniónica de *C. chinense* y GGP, que

constituye una región altamente conservada en la peroxidasa de *N. tabacum*. De manera similar, otras secuencias conservadas, tales como VIDNIK, se encontraron en las peroxidases de *N. tabacum* y *A. thaliana* (Tognolli y cols., 2002).

Las peroxidases están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos debido al alto número de isoformas que presentan y a la versatilidad de las reacciones en las que participan (Passardi y cols., 2004b). Entre esos procesos fisiológicos destacan la generación de una barrera física para limitar la invasión de patógenos mediante la entrecruzamiento de los componentes de la pared celular en respuesta a diferentes estímulos, tales como heridas e interacciones con patógenos (Almagro y cols., 2009). En este sentido, Bae y cols., (2006) aislaron el gen de la peroxidasa PoPOD1 de suspensiones celulares de álamo y analizaron su expresión en respuesta a diferentes estreses. PoPOD1 codificaba una proteína de 316 aminoácidos con un péptido señal N-terminal de 23 residuos, sin extensión C-terminal, lo que sugiere que era una proteína de secreción típica de la pared celular. Del mismo modo, su expresión estaba regulada en respuesta al estrés ambiental y reguladores del crecimiento como el AJ y ácido giberélico. Sin embargo, la expresión de genes se incrementaba significativamente por la presencia del elicitor bacteriano laminarina, lo que sugiere un papel fundamental en la defensa contra la invasión de patógenos, posiblemente a través de su participación en la rigidificación de la pared celular.

Finalmente, la banda de proteínas inducida por la presencia de MJ, con peso molecular aparente de 69 kDa, contenía fragmentos trípticos cuyas secuencias de aminoácidos mostraron homología con dos proteínas β -D-xilosidasas de tomate (designados como LEXYL 1 y 2, (Tabla 1)), que eran en un 74% similares entre sí. LEXYL1 de *S. lycopersicum* mostró un 65% de homología con una β -D-xilosidasa de *Arabidopsis* (Itai y cols., 2003). También se detectó un fragmento tríptico con una secuencia de aminoácidos homóloga a una proteína α -D-arabinofuranosidasa de tomate. Estas enzimas normalmente degradan los componentes hemicelulósicos, xilanos y arabinoxilanos de la pared celular. Por otro lado, la identificación de una pectinesterasa en los medios extracelulares de *C. annuum* podría estar relacionado con el reblandecimiento de la pared celular durante el crecimiento celular y/o el proceso de elicitación. Por lo tanto, la presencia de estas enzimas hidrolíticas en el proteoma extracelular de *C. annuum* sugiere su participación en la modificación de la arquitectura de la pared celular durante el crecimiento del cultivo celular bajo elicitación con MJ.

Además, se encontró un fragmento tríptico que coincidía con las secuencias de aminoácidos de Nectarina IV, un potente inhibidor de endoglucanasas secretado en el néctar de plantas de tabaco ornamentales (*N. langsdorffii* x *N. sanderae* var LxS8). Esta secuencia de aminoácidos también estaba presente en un precursor de un inhibidor de proteínas, concretamente de endoglucanasas fúngicas específicas de xiloglucano en tomate y sus homólogas en patata. La función principal de esta Nectarina IV estaba relacionada con la defensa o en respuesta a estrés ya que inhibió eficazmente a las endoglucanasas específicas de xiloglucano, aunque no se observó actividad inhibidora contra xilanasas (Saqlan Naqvi y cols., 2005).

V. Análisis del proteoma extracelular de cultivos celulares de *C. chinense* elicitados con jasmonato de metilo

Del mismo modo, se llevó a cabo el análisis del proteoma extracelular de suspensiones celulares de *C. chinense* elicitadas con 100 μ M MJ con el fin de evaluar el efecto del MJ como inductor de proteínas PR. Para ello, la determinación de las proteínas extracelulares totales se realizó mediante electroforesis desnaturizante sobre geles de poliacrilamida teñidos con azul brillante de Coomassie. La Figura 5 muestra el patrón de proteínas extracelulares totales obtenido a partir de suspensiones celulares de *C. chinense* elicitadas con MJ (calle MJ), en el cual destaca la presencia de dos bandas de proteínas específicas, de peso molecular aparente de 24 y 90 kDa, cuya expresión fue inducida por la presencia de MJ. Las secuencias de aminoácidos de los fragmentos trípticos obtenidos tras la microsecuenciación de la banda de proteínas con peso molecular aparente de 24 kDa (Tabla 3) mostraron homología con una proteína tipo NtPRp27 de *S. tuberosum* (NtPRp27, nº acceso AAO22065) y tres proteínas PR de *C. annuum* (quitinasa de clase I, LRR y proteína tipo germina (GLP) con nº acceso AAR90844, AAN62015 y AAR28997, respectivamente). Por otro lado, los fragmentos trípticos obtenidos tras la digestión de la banda de proteína inducida por MJ (con un peso molecular aparente de 90 kDa) (Tabla 3) contenía secuencias de aminoácidos que mostraron homología con una pectinesterasa de *C. annuum* (nº acceso ABN08348). Estos resultados mostraron que la aplicación exógena de MJ promovió la acumulación de proteínas extracelulares PR en suspensiones celulares de *C. chinense*, sugiriendo un papel para MJ en la mediación de la expresión de genes relacionados con la defensa en pimiento.

La inducción de quitinasas de clase I, proteínas de tipo LRR y pectinesterasas tras el tratamiento con MJ, ha sido descrita extensamente por varios autores (Wu y Bradford, 2003; Jung y cols., 2004; Yamagami y cols., 2009). Sin embargo, NtPRp27 y GLP nunca han sido descritas en suspensiones celulares de *C. chinense* elicidadas con MJ. Las secuencia de aminoácidos de los fragmentos trípticos relacionados con NtPRp27 mostraron homología con proteínas NtPRp27 de *N. tabacum* y *S. tuberosum*, las cuales respondieron claramente a la infección por hongos o virus, heridas mecánicas, SA, etileno y MJ, lo cual es coherente con muchas proteínas PR cuyos transcritos se acumulan en respuesta a estas moléculas señal (Okushima y cols., 2000; Zhen Dong y cols., 2003; Elvira y cols., 2008). En cuanto a las proteínas GLP, constituyen un grupo grande y heterogéneo de proteínas cuyas secuencias de aminoácidos presentaron entre 25-100% de homología y diferentes patrones de expresión (Godfrey y cols., 2007; Park y cols., 2004). Park y cols., (2004) describieron una proteína GLP en *C. annuum* (CaGLP1), la cual estaba implicada en la respuesta de defensa frente a una amplia gama de microbios patógenos, incluyendo virus y bacterias. Además, cuando las plantas fueron tratadas con SA o etileno, mostraron una acumulación rápida de transcritos de CaGLP. En contraste con nuestros resultados, la expresión de CaGLP1 no se vió afectada por el tratamiento con MJ (Hurkman y Tanaka, 1996). Por lo tanto, los diferentes efectos observados sobre la expresión de GLP, como resultado de la aplicación exógena de moléculas señal como etileno, SA y MJ sugieren que las proteínas GLP pueden desempeñar diversas funciones protegiendo a las plantas frente a los ataques de patógenos y diferentes estreses.

Aparte de estas proteínas inducibles por MJ, se observó la presencia de otras proteínas de tipo PR, en las bandas de proteínas de peso molecular aparente de 20 y 33 kDa, tanto en los cultivos celulares control (calle M, Figura 4) como en los cultivos elicitados con MJ (calle MJ, Figura 4), cuyos fragmentos trípticos presentaron secuencias de aminoácidos homólogas a endoquitinasas y peroxidasas, lo que sugiere que su expresión es principalmente constitutiva (Tabla 3). De hecho, estas proteínas PR se expresan constitutivamente en cultivos celulares no tratados como *V. vinifera* (Belchí-Navarro y cols., 2013a) y *S. lycopersicum* (Briceño y cols., 2012).

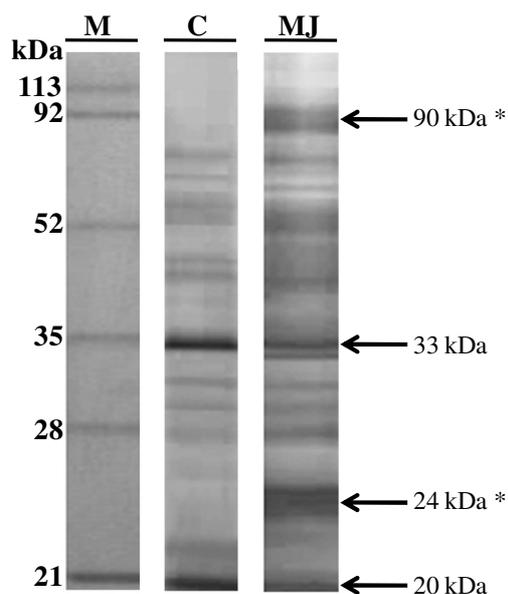


Figura 4. Patrón de proteínas totales del medio extracelular de suspensiones celulares *C. chinense* realizado mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes, teñido con Coomassie. La calle M se corresponde con el marcador de peso molecular, la calle C con el control y la calle MJ con la suspensión celular elicitada con jasmonato de metilo. El asterisco muestra las bandas de proteínas inducidas por la presencia de MJ.

Los resultados obtenidos muestran que la aplicación exógena de MJ induce un conjunto de proteínas PR tanto en suspensiones celulares de *C. annuum* como de *C. chinense*, lo que sugiere un papel fundamental de MJ como mediador de la expresión de productos génicos relacionados con la defensa en pimiento.

Tabla 3. Identificación de proteínas en base a los fragmentos trípticos obtenidos a partir del proteoma extracelular de cultivos celulares de *C. chinense* usando nanoLC-ESI MS/MS y búsqueda por homología de secuencia. El asterisco representa las bandas de proteínas inducidas por la presencia de MJ.

Bandas proteínas	Fragmento tríptico	Nº acceso	Proteína	Masa nominal	Score
20 kDa	GPIQISYNYNYGPCGR YCGILGVSPGDNLDCGNQR	AAY90154	Endoquitinasa <i>Capsicum annuum</i>	19.591	219
24 kDa*	YIQGYSGDVR	AAO22065	Proteína tipo NtPRp27 <i>Solanum tuberosum</i>	25.172	62
	NNFYSYNAFITAAK SFPGFGTTGDTAVR GPIQISYNYNYGPCGR	AAR90844	Quitinasa clase I <i>Capsicum annuum</i>	13.175	291
	LAGTVPLANK LSGEIPISVLK	AAN62015	Proteína LRR <i>Capsicum annuum</i>	21.557	114
	GEVFAFPR GLVHFQQN NGDVPAAVVA	AAR28997	Proteína tipo germina <i>Capsicum annuum</i>	23.295	144
33 kDa	GFEVIAQAK LGGQTYTVALGR EMVALAGAHTVGFAR	CAI48071	Peroxidasa aniónica <i>Capsicum chinense</i>	31.471	114
90 kDa *	IDAFQDTLYTHTLR TYLGRPWK	ABN08348	Pectinesterasa <i>Capsicum annuum</i>	60.079	133

*Análisis metabolómico y proteómico de cultivos celulares
elicitados de Daucus carota*

I. Antecedentes y objetivos

La zanahoria (*Daucus carota* L.) es una planta angiosperma originaria del centro asiático y del mediterráneo perteneciente a la familia de las Umbelíferas (*Apiaceae*) que ha sido empleada durante décadas como especie modelo en investigaciones biotecnológicas, siendo una de las especies pioneras usadas para desarrollar sistemas de cultivo de tejidos. Además, se han realizado numerosas investigaciones en zanahoria dirigidas al estudio de la regulación y función de genes y el metabolismo de plantas. La investigación aplicada, incluye el desarrollo de plantas resistentes a estreses tanto bióticos como abióticos y a modificaciones de las rutas biosintéticas. Además, las zanahorias constituyen un importante reservorio de compuestos bioactivos utilizados con fines medicinales, ya que se pueden desarrollar productos con fines farmacéuticos y para fitorremediación (Baranski, 2008).

Los fitosteroles o esteroides vegetales son un componente esencial de las membranas de todos los organismos eucariotas, y son responsables de su permeabilidad y fluidez (Piironen y cols., 2000; Posé y cols., 2009). En las plantas, se han identificado más de 200 tipos diferentes de fitosteroles siendo los más abundantes β -sitosterol, campesterol y estigmasterol, que constituyen el 95-98% de los esteroides de plantas (Lagarda y cols., 2006) y están presentes en todas las frutas y hortalizas por lo que se incluyen regularmente en la dieta humana. En general, los aceites vegetales se consideran una de las fuentes naturales más ricas de esteroides, seguidos por los cereales, productos a base de cereales y frutos secos (Piironen y cols., 2000). Durante los últimos 15 años, los fitosteroides han recibido mucha atención debido a sus propiedades para reducir el colesterol y proteger contra las enfermedades cardiovasculares (Moreau y cols., 2002; García-Llata y Rodríguez-Estrada, 2011). Aparte de este efecto reductor del colesterol, los fitosteroides presentan otras importantes propiedades farmacológicas, tales como actividades anti-inflamatorias y antioxidantes (Delgado-Zamarreño y cols., 2009) y además, ejercen efectos antitumorales contra algunos tipos de cáncer (Woyengo y cols., 2009). Los efectos beneficiosos de los fitosteroides en la salud humana han conducido a un aumento en el consumo de alimentos enriquecidos en esteroides vegetales que contienen estos compuestos bioactivos. Este hecho ha aumentado su demanda y ha conducido al desarrollo de estrategias para aumentar su producción a partir de otras fuentes naturales, ya que por ejemplo, las frutas y verduras contienen típicamente menos

de 0.05% en PF de fitosteroles, y nueces y aceites vegetales pueden contener más de 1% de fitosteroles (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).

Hoy en día, la metodología clásica de extracción de fitosteroles procedentes de materia prima vegetal, más empleada para fines comerciales, es la destilación por desodorización de aceites vegetales (Llamos y cols., 2008). Además, la gran cantidad de material necesario para extraer una cantidad significativa de los fitosteroles procedentes de fuentes naturales hace que el coste de estos productos y su impacto sobre el medio ambiente sean muy elevados. Con el objetivo de superar las limitaciones de los métodos clásicos de extracción de la materia prima vegetal, hemos desarrollado un método de producción y liberación de fitosteroles basado en el crecimiento de las células vegetales *in vitro*, a través de la adición al medio de crecimiento de β -CD y, opcionalmente, jasmonato de metilo (MJ). La ventaja más importante de estos cultivos celulares frente a plantas enteras es la facilidad de aislamiento del producto y purificación, especialmente cuando el producto es secretado en el medio (Cai y cols., 2012). En este sentido, el uso de compuestos que retiren los metabolitos *in situ* incrementa la productividad del sistema, un factor clave para la producción biotecnológica.

Por otro lado, los cultivos de células son capaces de responder a estreses bióticos y abióticos activando una gran variedad de mecanismos de defensa entre los que se incluyen la inducción de metabolitos secundarios y la expresión de proteínas PR que pueden ser acumulados en el espacio extracelular (Briceño y cols., 2012; Belchí-Navarro y cols., 2013a). La función de este espacio extracelular es crucial para la vida de la célula ya que se considera un compartimento dinámico que desempeña un papel fundamental no sólo en la determinación de los procesos relacionados con el crecimiento celular, el transporte, la osmorregulación, la adhesión celular y el intercambio gaseoso (Sakurai, 1998) sino también en la interacción con los factores ambientales incluyendo los necesarios para la nutrición y la defensa. De esta manera, la identificación de proteínas expresadas diferencialmente en el espacio extracelular puede ayudarnos a comprender el papel desempeñado por este compartimento celular en defensa.

Con estos antecedentes y para el desarrollo de este capítulo se utilizó el cultivo celular de *D. carota* elicitado como un sistema para el estudio de las respuestas de defensa, por lo que los objetivos generales que se plantean son los siguientes:

- la caracterización de la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota*.
- el estudio de la implicación del Ca^{+2} , eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas, NO y H_2O_2 en la ruta de señalización que dirige la producción de fitosteroles en suspensiones celulares elicítadas con M- β -CD.
- el estudio del proteoma extracelular de suspensiones celulares de zanahoria en condiciones control y elicítadas con M- β -CD y MJ, separadamente o en combinación.

II. Caracterización de la curva de crecimiento de *Daucus carota*

La determinación de la curva de crecimiento se llevó a cabo en suspensiones celulares previamente estabilizadas a lo largo de los subcultivos, con el fin de determinar la duración de las distintas fases del crecimiento así como los parámetros cinéticos característicos. Para ello, se tomaron muestras periódicas desde el inicio de la suspensión celular hasta los 16 días de cultivo.

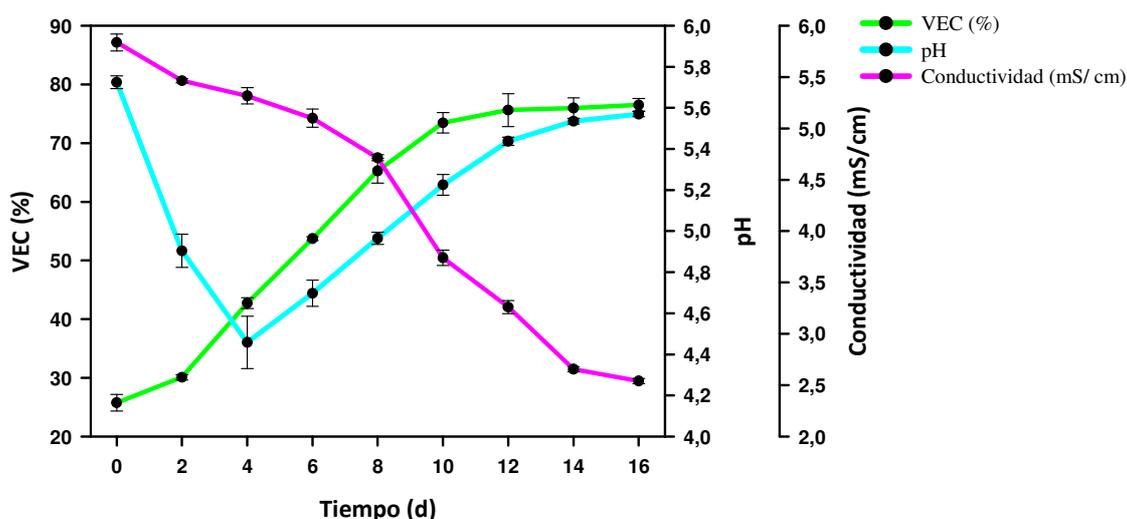


Figura 1. Representación de la curva de crecimiento, de las variaciones del pH y de la conductividad durante el tiempo del cultivo celular de *D. carota*. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes.

Como se puede observar en la Figura 1, la curva de crecimiento de la suspensión celular fue típicamente sigmoideal, con una densidad celular inicial del 25% (medida como VEC (%), que se corresponde con una densidad celular de 200 gPF/ L), la cual incrementó hasta el 76,5% (que se corresponde con 612 gPF/ L que a su vez equivale a 28,5 gPS/ L) y luego se estabilizó al llegar a la fase estacionaria del crecimiento. Así, se distingue un periodo corto de latencia o fase “lag” desde el inicio de la curva hasta que comienza el crecimiento de forma exponencial (desde el día 0 al día 2); la fase “log” que comprende desde el comienzo de la fase de crecimiento exponencial hasta que se observa el cese del crecimiento (desde el día 2 al día 10) y la fase “estacionaria” que abarcó desde el día 10 hasta el final del cultivo (día 16). Este cese del crecimiento a partir del día 10 determinó la necesidad de subcultivo cada 10 días.

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, la conductividad muestra una variación inversamente proporcional al crecimiento debido a que la conductividad del medio extracelular está directamente relacionada con la concentración de iones en el medio, la cual va disminuyendo conforme las células van consumiendo iones del medio. En cuanto al pH, que está condicionado por el metabolismo celular y por la composición del medio de cultivo, en el caso de las suspensiones celulares de zanahoria, se ajustó inicialmente a 6.0. Durante los primeros cuatro días de cultivo, este valor disminuyó en 1 unidad y a continuación, se incrementó hasta alcanzar el valor inicial y permaneció constante hasta el final del cultivo. Este descenso inicial del pH se debe al consumo de las sales de amonio mientras que el aumento sería el resultado de la asimilación de los nitratos ya que el consumo de las fuentes nitrogenadas es el factor más importante que modifica el pH del medio extracelular a lo largo de la curva de crecimiento (McDonald y Jackman, 1989).

II.2.1. Cinética de crecimiento de las suspensiones celulares

Para la determinación de los parámetros cinéticos sobre los que se ha basado la caracterización de la curva de crecimiento de *D. carota*, se han utilizado las ecuaciones descritas en el apartado II. de Material y Métodos. Dichos parámetros se muestran representados en la Figura 2.

Los valores de estos parámetros cinéticos fueron $VEC_{m\acute{a}x}$ del 76.5%, V_{exp} 5.87 y T_a de 10 días (Figura 2).

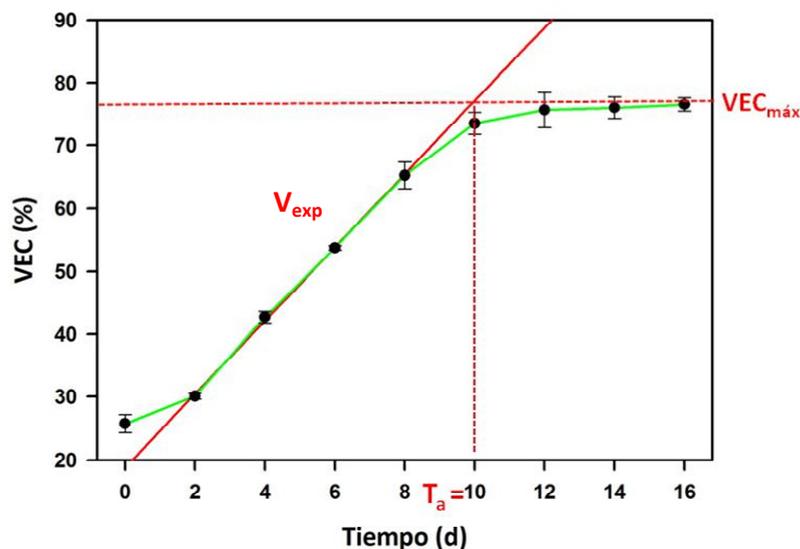


Figura 2. Curva de crecimiento de suspensiones celulares de *D. carota* utilizada para mostrar los parámetros cinéticos.

II.2.2. Identificación y cuantificación de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con ciclodextrinas

Tras la elicitación de suspensiones celulares de *D. carota* con 50 mM de β -CD se realizó la extracción de los fitosteroles presentes en el medio extracelular mediante partición de fases con acetato de etilo y el extracto metanólico obtenido fue analizado mediante GC/MS. De todos los compuestos presentes en el medio extracelular se identificaron y cuantificaron el campesterol (tiempo de retención (Tr): 27.58 min), estigmasterol (Tr: 27.87 min) β -sitosterol (Tr: 28.41 min) y fucosterol (Tr: 28.55 min) (Figura 3).

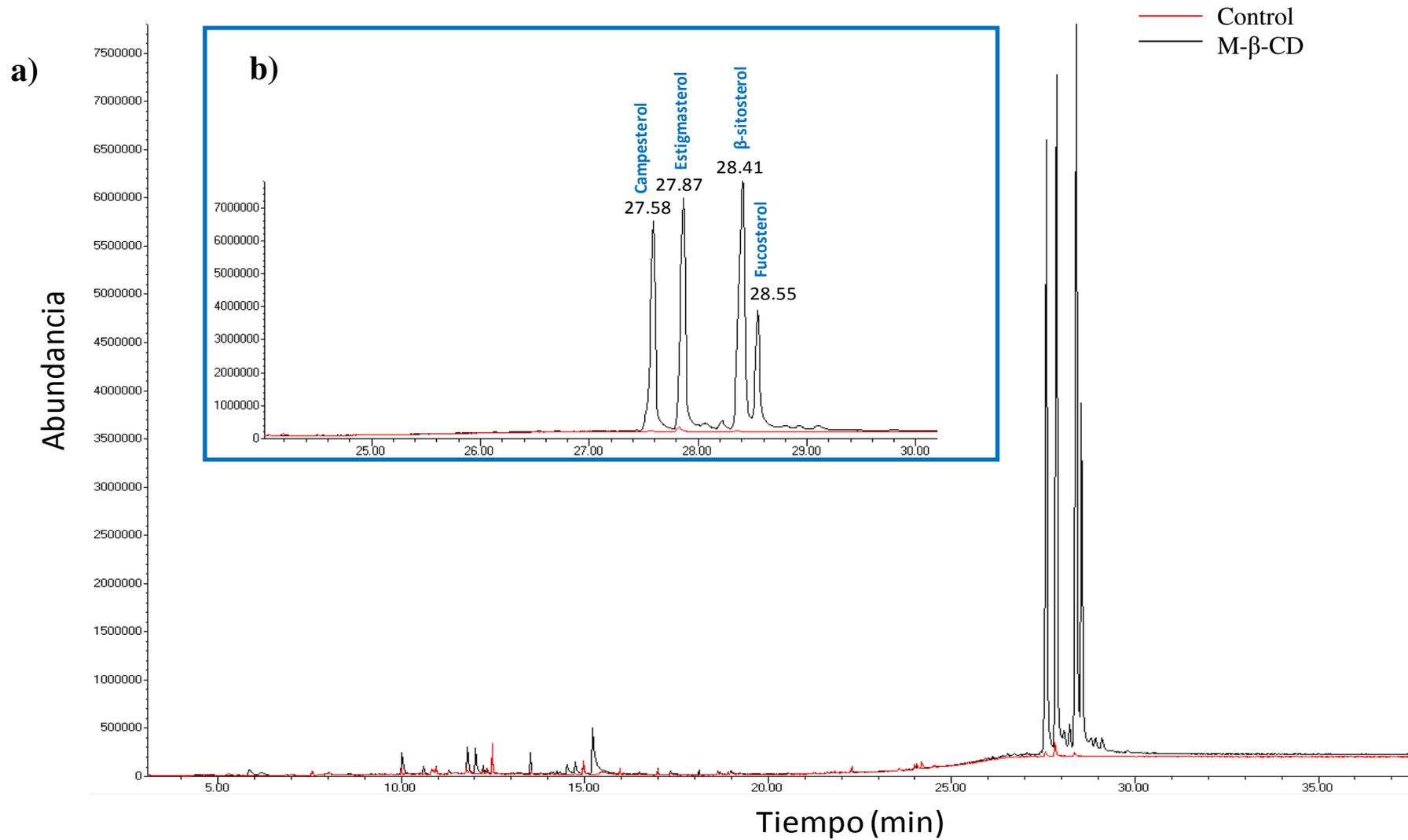


Figura 3. Cromatograma GC/MS del extracto metanólico de suspensiones celulares de *D. carota* control (—) y elicitado (—) con 50 mM de β -CD (a). Detalle del cromatograma ampliado (b).

III. Caracterización de la producción extracelular de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota*

III.1. Estudio temporal y comparativo del efecto de la adición de distintos tipos de ciclodextrinas sobre la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota*

Es bien conocido que las β -CD no sólo son capaces de formar complejos de inclusión con compuestos hidrofóbicos aumentando su solubilidad en soluciones acuosas sino que además, actúan como verdaderos elicitores promoviendo la biosíntesis de metabolitos secundarios en diferentes cultivos de células vegetales (Morales y cols., 1998; Bru y cols., 2006; Almagro y cols., 2011a, 2012; Briceño y cols., 2012).

El análisis de la producción de fitosteroles a lo largo del tiempo se realizó tomando muestras periódicamente hasta 168 h. La figura 4 muestra los resultados obtenidos del tratamiento de cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM de β -CD, tanto las metiladas al azar (M- β -CD) como las hidroxipropiladas (HP- β -CD), ya que Bru y cols., (2006) demostraron que esta concentración es suficientemente elevada para no ser un factor limitante en la producción de metabolitos. Los resultados indicaron que la acumulación extracelular de fitosteroles se incrementó linealmente hasta 144 h, en los cultivos celulares tratados con M- β -CD (151.16 ± 4.32 mg/ L) mientras que en los elicitados con HP- β -CD, los niveles de producción obtenidos fueron del orden de 2.7 veces inferior (55.11 ± 9.58 mg/ L) al cabo de 144 h. Además, esta acumulación extracelular de fitosteroles no se observó en los cultivos control (datos no mostrados).

En cuanto a los niveles de producción de cada fitosterol individualmente (expresado como % del total de esteroides producidos) (Figura 5A y 5B) se puede ver que conforme aumenta el tiempo de elicitación, el compuesto encontrado en mayor proporción en los cultivos celulares de *D. carota* elicitados con β -CD varía, siendo mayoritariamente acumulado el estigmasterol a las 24 h (51% y 40% con M- β -CD y HP- β -CD, respectivamente), y a medida que aumenta el tiempo de elicitación, su proporción va disminuyendo progresivamente a favor del β -sitosterol, siendo éste acumulado en mayor proporción a las 168 h (49% y 44% con M- β -CD y HP- β -CD, respectivamente) frente a un 19% de acumulación de estigmasterol con ambos tipos de β -CD. Sin embargo, la proporción de campesterol y fucosterol permanece constante a lo

largo del tratamiento (22% y 10%, respectivamente) tanto en los cultivos celulares elicitados con M- β -CD como en los tratados con HP- β -CD.

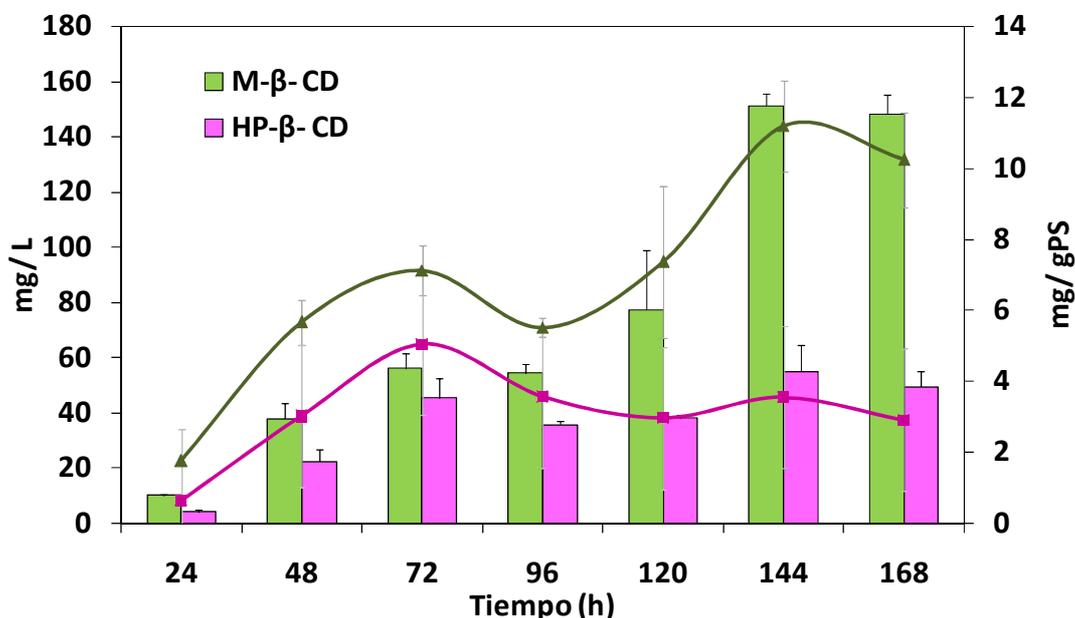


Figura 4. Variación de la acumulación extracelular de fitosteroles a lo largo del tiempo en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM de M- β -CD (■) y HP- β -CD (■). Las barras corresponden a mg/L y las líneas a mg/gPS. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes.

Numerosos estudios han demostrado la capacidad de las β -CD para extraer los lípidos que constituyen las membranas de células animales, aumentando su fluidez y permeabilidad (Zidovetzki y Levitan, 2007). Así, Piel y cols., (2007) han descrito las propiedades de unión a lípidos de los diferentes tipos de β -CD, analizando su capacidad para formar complejos solubles con el colesterol en los liposomas. En relación con su capacidad para extraer y solubilizar compuestos hidrófobos en comparación con las β -CD no sustituidas, las β -CD hidroxipropiladas son menos hidrófobas que las metiladas, por lo que las M- β -CD tienen una mayor capacidad para solubilizar colesterol en soluciones acuosas. Por lo tanto, las diferencias observadas en su capacidad para complejar los fitosteroles (Figura 4) podrían ser debidas a sus propiedades fisicoquímicas.

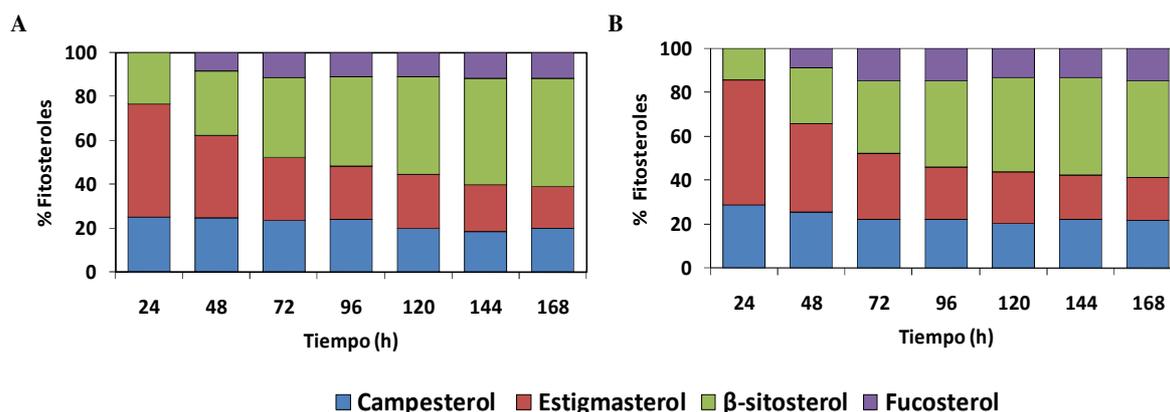


Figura 5. Proporción de fitosteroles, expresada como porcentaje del total de esteroles acumulados en el medio extracelular, en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con M-β-CD (A) y HP-β-CD (B).

III.2. Efecto de la edad celular sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota*

La división celular es un proceso que está estrechamente relacionado con la biosíntesis de moléculas esenciales como los fitosteroles, que contribuyen/ participan en la formación de nuevas membranas. Estudios llevados a cabo en semillas de lino en desarrollo, han demostrado que el contenido de fitosteroles disminuye a medida que aumenta el grado de maduración de éstas (Herchi y cols., 2009). Por ello, una vez establecidos el tiempo y el tipo de β-CD en los que se produce la mayor acumulación extracelular de fitosteroles, se procedió a determinar cuál era la edad celular (en base a la curva de crecimiento (Figura 1)) más apropiada para la producción de estos compuestos en los cultivos celulares de zanahoria. Para llevar a cabo estos experimentos, se utilizaron cultivos celulares de 4, 6, 10 y 14 días de edad que se correspondían con cada una de las fases de la curva de crecimiento y se elicitaron con 50 mM de M-β-CD. Como se puede observar en la Figura 6, la edad celular a la cual se produjo la mayor acumulación extracelular de fitosteroles fue 10 días (118.28 ± 11.15 mg/ L), momento en el cual las células comienzan a entrar en fase estacionaria observándose a continuación, una disminución en la acumulación extracelular de fitosteroles. Esta disminución en los niveles de fitosteroles podría explicarse debido a su conversión en otros compuestos lipídicos tal y como ocurre en el desarrollo de las semillas de lino (Herchi y cols., 2009). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de producción obtenidos cuando los cultivos celulares fueron elicitados a los 4, 6 o 14 días de edad celular (Figura 6).

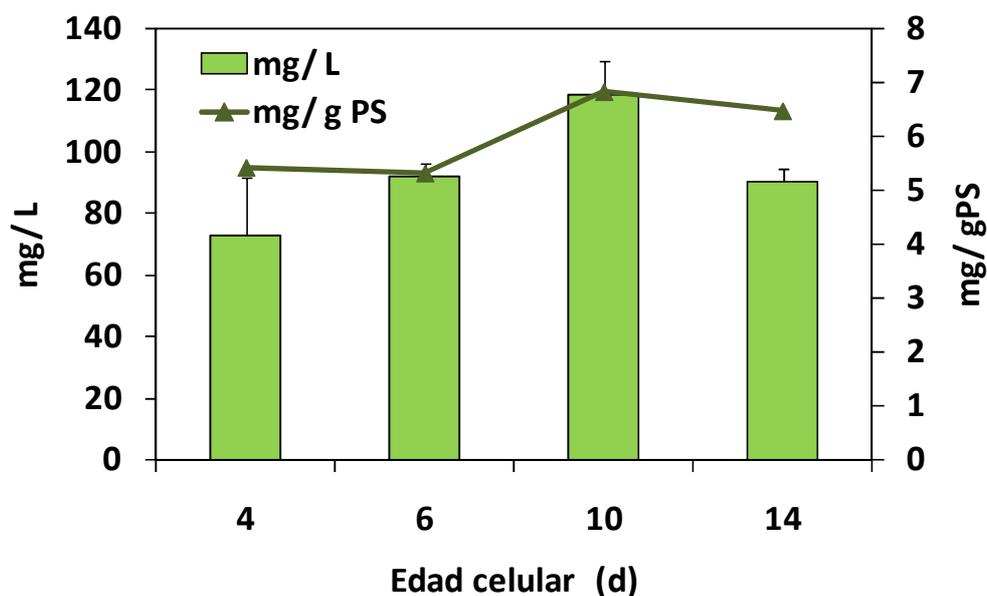


Figura 6. Efecto de la edad celular sobre la acumulación extracelular de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM de M- β -CD durante 144 h. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes. Las barras corresponden a mg/L y las líneas a mg/gPS.

III.3. Efecto de la densidad celular y de diferentes concentraciones de M- β -CD sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota*

Estudios realizados en células de plantas y mamíferos han demostrado que las M- β -CD actúan con eficacias diferentes en diferentes tipos de membrana y que requieren diferentes concentraciones y tiempos de incubación para la eliminación de los esteroides, sin destruir la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas (Zidovetzki y Levitan, 2007; Roche y cols., 2008). En este sentido, la cantidad de M- β -CD adicionada al medio de cultivo podría modificar el proceso de secreción y acumulación de fitosteroides en las suspensiones celulares de zanahoria y por otro lado, la densidad celular en el cultivo podría ser un parámetro clave en la producción de algunos compuestos usando la elicitación. Así, debido a los buenos resultados obtenidos en los ensayos anteriores con M- β -CD, se decidió estudiar el efecto que tendría sobre la producción de fitosteroides, la adición de distintas concentraciones de M- β -CD a diferentes densidades celulares. Para ello, suspensiones celulares de zanahoria de 10 días con tres densidades celulares diferentes (100, 200 y 340 gPF/L) se incubaron en presencia de distintas concentraciones de M- β -CD (10, 30, 50 y 70 mM) durante 144 h.

En la Figura 7 se observan los valores de producción de fitosteroles (mg/L y mg/gPS) de suspensiones celulares de zanahoria tratadas con diferentes concentraciones de M- β -CD a diferentes densidades celulares. Como puede observarse, los niveles de acumulación extracelular de fitosteroles se incrementan conforme aumentan, tanto la densidad celular como la concentración de M- β -CD siendo este incremento del orden de 1.5 veces mayor en los tratamientos realizados a intermedia (200 gPF/ L) y alta densidad (340 gPF/ L) con respecto a baja densidad celular (100 gPF/ L), a cualquiera de las concentraciones de M- β -CD ensayadas, aunque las diferencias en los niveles de producción de fitosteroles a densidad celular intermedia y alta, no son significativamente diferentes usando 30 y 50 mM de M- β -CD. Sin embargo, si tenemos en cuenta la productividad (mg/ gPS), la máxima acumulación extracelular de fitosteroles se alcanzó utilizando 50 mM de M- β -CD a densidad celular intermedia (200 gPF/ L).

Por todo ello, y a la vista de los resultados obtenidos, se estableció la concentración óptima de M- β -CD en 50 mM ya que era lo suficientemente elevada como para no limitar la producción y acumulación extracelular de fitosteroles en el medio de cultivo y una densidad celular intermedia (200 gPF/ L), lo cual podría hacer viable el proceso de escalado y paso a biorreactores convencionales posibilitando su producción industrial.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, pudimos establecer las condiciones óptimas para la producción de fitosteroles en cultivo celulares de zanahoria (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones óptimas establecidas para la obtención de fitosteroles en cultivos celulares de zanahoria elicitados.

Condiciones óptimas	
Tiempo óptimo de elicitación	144 horas
Edad celular	10 días
Densidad celular	200 gPF/ L
[M-β-CD]	50 mM

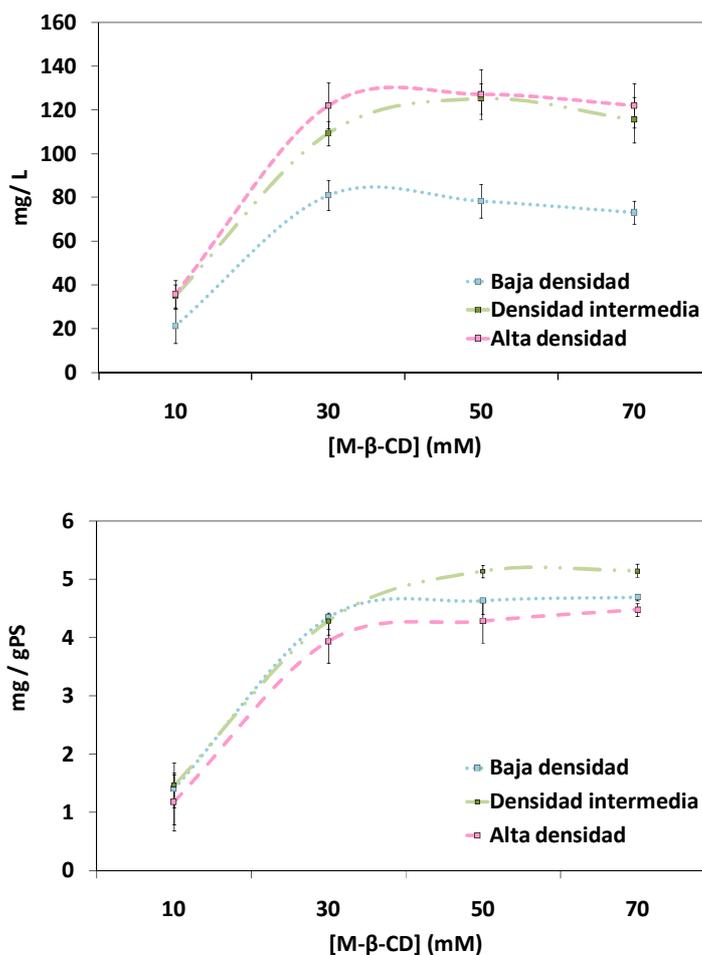


Figura 7. Efecto de la densidad celular (g/L) sobre la acumulación extracelular de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con diferentes concentraciones de M-β-CD durante 144 h. Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes.

III.4. Caracterización de la producción intracelular de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con M-β-CD

En la Figura 8 se muestra el contenido total de fitosteroles (intra- y extracelular) a lo largo del tiempo en cultivos celulares de *D. carota* control y elicitados con 50 mM M-β-CD. Como se observa en los cultivos control, la acumulación intracelular de fitosteroles se incrementó con el tiempo, alcanzando la máxima producción a las 168 h (70.08 ± 8.93 mg/L) no detectándose la presencia de estos compuestos en el medio extracelular. Sin embargo, cuando los cultivos celulares se elicitaron con M-β-CD, los niveles de producción intracelular de fitosteroles fueron considerablemente inferiores a los detectados en las células control, elevándose su concentración en el medio extracelular a lo largo de todo el cultivo, observándose la mayor acumulación de éstos en el medio de cultivo elicitado a las 144 h (95.69 ± 10.48 mg/L). Además, existe una

diferencia notable entre el contenido intra- y extracelular de fitosteroles ya que el contenido intracelular representa aproximadamente el 10% del contenido total de fitosteroles en los tratamientos realizados en presencia de M- β -CD, acumulándose la mayor parte de estos compuestos en el medio extracelular (~ 75 %).

Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de las M- β -CD para formar complejos de inclusión con moléculas hidrofóbicas como los fitosteroles, aumentando no sólo su solubilidad en soluciones acuosas sino también permitiendo su acumulación extracelular y facilitando su extracción desde el medio de cultivo.

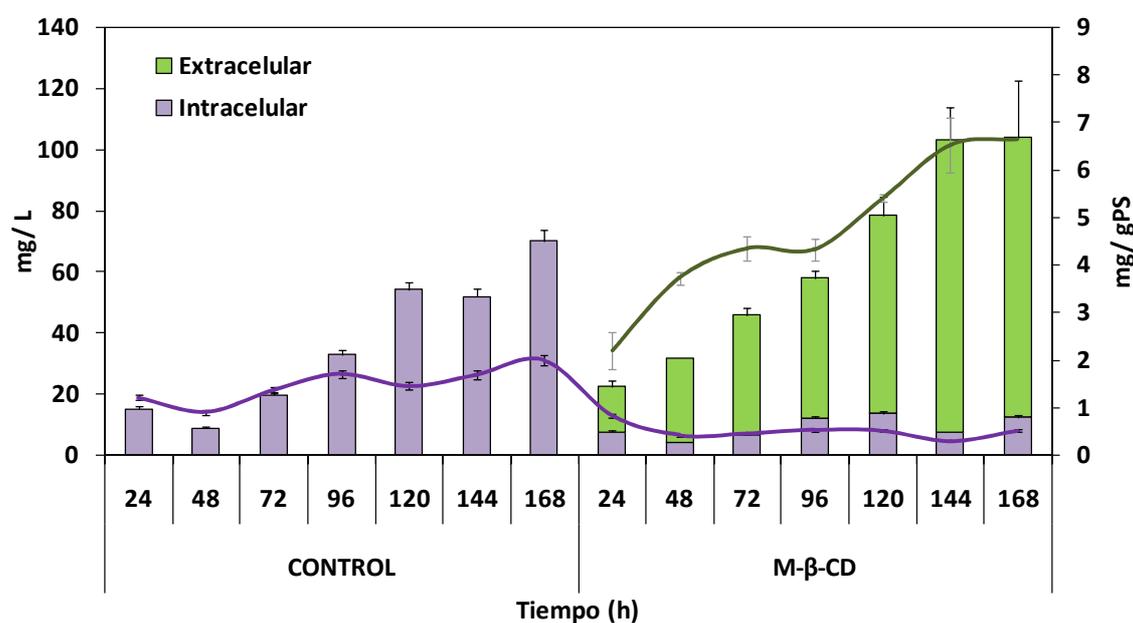


Figura 8. Contenido total de fitosteroles (intra- (■) y extracelular (■)) a lo largo del tiempo en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM M- β -CD. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes. Las barras corresponden a mg/ L y las líneas a mg/ gPS.

III.5. Efecto de la adición de jasmonato de metilo en presencia de M- β -CD sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota*

Existen numerosos estudios que demuestran que el MJ está implicado en la señalización local y sistémica del estrés biótico y abiótico (Turner y cols., 2002) así como en la regulación de procesos fisiológicos y expresión de genes. Asimismo, se sabe que la adición exógena de jasmonatos desencadena respuestas de defensa, entre las que se incluyen la biosíntesis de metabolitos en las plantas (Farmer y cols., 1992). Además, está bien establecido que el uso combinado de diferentes elicitors puede mejorar la

producción de metabolitos en multitud de cultivos celulares (Zhao y cols., 2000). Por tanto, una manera de incrementar la producción fitosteroles podría ser la adición de un segundo elicitor.

El estudio temporal de la producción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM de M- β -CD, solas o en combinación con 100 μ M de MJ, se realizó tomando muestras periódicamente hasta 168 h. Inicialmente, se optó por una concentración de 100 μ M de MJ ya que es considerada como la dosis óptima para inducir metabolitos en diferentes especies vegetales (Gundlach y cols., 1992; Ketchum y cols., 1999; Sánchez-Sampedro y cols., 2006) y además, resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación indicaron que el tratamiento combinado de 50 mM de M- β -CD y 100 μ M de MJ produjo un efecto sinérgico sobre la producción de metabolitos en suspensiones celulares de *V. vinifera* (Belchí-Navarro y cols., 2012), *C. roseus* (Almagro y cols., 2011a) y *S. lycopersicum* (Briceño y cols., 2012).

La figura 9 muestra los resultados obtenidos del tratamiento de cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM de M- β -CD y 100 μ M de MJ, solos o en combinación. Los resultados indicaron que la acumulación extracelular de fitosteroles se incrementó gradualmente hasta 120 h, tanto en los cultivos celulares tratados sólo con M- β -CD (64.85 ± 6.19 mg/ L; 5.41 ± 0.08 mg/ gPS) como en los combinados con M- β -CD y MJ (37.97 ± 7.93 mg/ L; 4.37 ± 1.08 mg/ gPS) y posteriormente, esta producción alcanzó un valor máximo que se mantuvo constante durante el resto del experimento. Sin embargo, con el tratamiento combinado no se consiguió incrementar la producción de fitosteroles, siendo del orden de 1.5 veces inferior en comparación con el tratamiento de M- β -CD solas. Además, en los experimentos realizados sólo en presencia de MJ, no se detectó producción de fitosteroles durante el periodo de tiempo analizado (datos no mostrados). Sin embargo, se observó un incremento en la producción de metabolitos relacionados con la defensa tales como eugenol, isoeugenol y 6-metoximeleina (cumarina característica del género *Daucus*) tanto en los cultivos celulares tratados sólo con MJ como en los tratamientos combinados con M- β -CD (datos no mostrados).

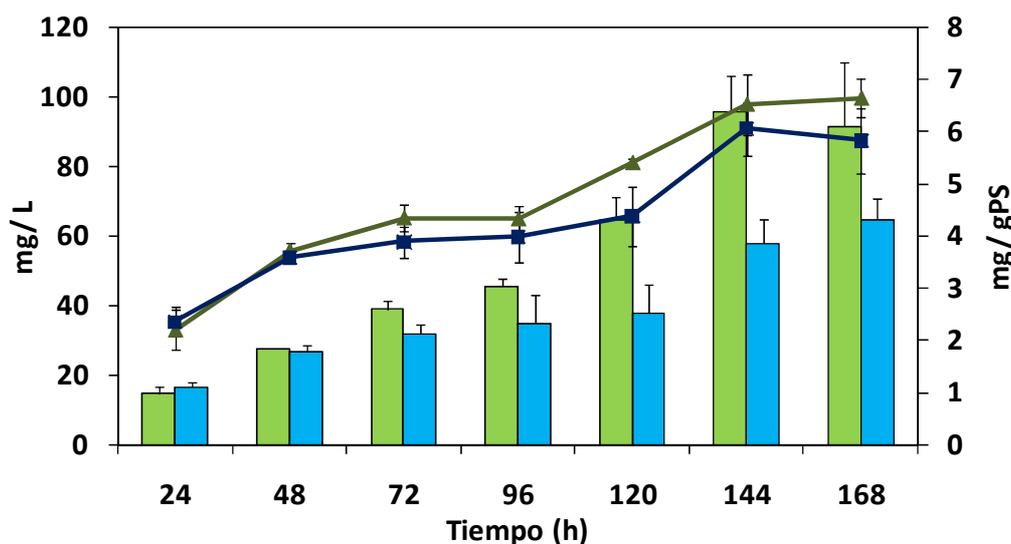


Figura 9. Variación de la acumulación extracelular de fitosteroles a lo largo del tiempo en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM de M-β-CD solas (■) o en combinación con 100 μM de MJ (■). Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes. Las barras corresponden a mg/ L y las líneas a mg/ gPS.

Esta disminución de la producción de fitosteroles en presencia de MJ podría estar relacionada con la reducción en la tasa de crecimiento (T_c , medida como gPF/ día) y/o de la división celular. Como se observa en la Figura 10, tanto los cultivos celulares elicitados sólo con M-β-CD como el tratamiento combinado de M-β-CD y MJ, presentan un aumento en la tasa de crecimiento, siendo este incremento del orden de 2 veces inferior en el tratamiento combinado de M-β-CD y MJ (15.8 gPF/ día) con respecto al tratamiento sólo con M-β-CD (32.5 gPF/ día).

Debido a la disminución de la producción de fitosteroles observada en los cultivos celulares de zanahoria elicitados en presencia de 100 μM de MJ, se procedió a evaluar el efecto de diferentes concentraciones de MJ (0, 50, 100, 150 y 200 μM), en combinación con 50 mM de M-β-CD, con el fin de comprobar si existía alguna concentración de MJ, capaz de incrementar la producción de fitosteroles por encima del valor obtenido en el tratamiento con M-β-CD (Figura 9). Los resultados indicaron que ninguna de las concentraciones de MJ ensayadas fue capaz de incrementar los niveles de producción (Figura 11) por encima del valor obtenido en el tratamiento con M-β-CD solas (104.66 ± 10.48 mg/ L), observándose además, una ligera disminución en la producción de fitosteroles conforme aumenta la concentración de MJ.

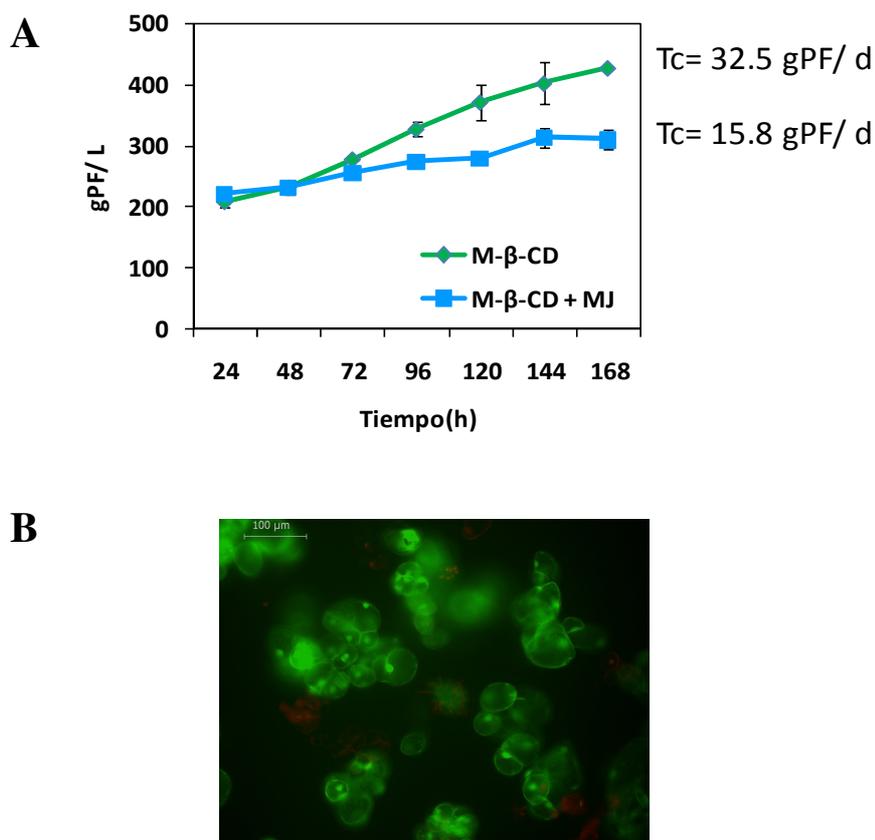


Figura 10. A. Efecto de la adición de 50 mM de M-β-CD solas (♦) o en combinación con 100 μM MJ (■) sobre el crecimiento de suspensiones celulares de *D. carota*. Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes. **B.** Viabilidad celular de los cultivos de zanahoria elicitados en presencia de 100 μM de MJ ensayada con DAF (células verdes, vivas) e IP (células rojas, muertas).

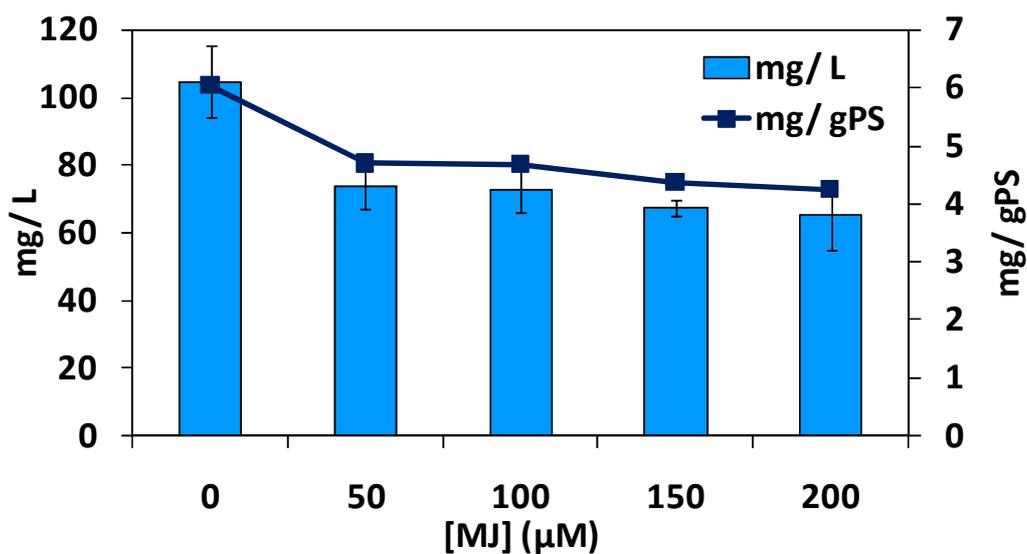


Figura 11. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de MJ (0, 50, 100, 150 y 200 μM) sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados en presencia de 50 mM de M-β-CD (0 μM de MJ) durante 144 h. Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes. Las barras corresponden a mg/L y las líneas a mg/gPS.

Los resultados mostraron que el crecimiento celular en presencia de M- β -CD fue similar al tratamiento conjunto de ambos elicitores (Figura 10A) pero la presencia de MJ provocó una disminución de la biomasa celular que no estaba asociada a una lisis celular (Figura 10B). Este efecto del MJ sobre el crecimiento celular podría ser debido a la desviación del flujo metabólico (distribución de carbono), que favorece la activación del metabolismo secundario sobre el metabolismo primario (Larronde y cols., 2003; Sivakumar y Paek, 2005). Además, este efecto del MJ sobre el crecimiento celular también ha sido descrito por Pauwels y cols., (2008) en cultivos celulares de *Arabidopsis*, donde la aplicación exógena de MJ (100 μ M) reprimió la progresión del ciclo celular. En este sentido, la acción del MJ sobre los cultivos celulares de zanahoria provocaría el cese de la renovación celular y con ello, el de la síntesis de nuevas membranas en las cuales, los fitosteroles son fundamentales, no afectando a la viabilidad celular. En efecto, Bonfill y cols., (2011) mostraron que el contenido en centelósidos en cultivos celulares de *Centella asiatica* aumentó debido al tratamiento con 100 μ M de MJ mientras que el contenido en fitosteroles disminuyó, lo que sugiere que el MJ activa la ruta biosintética de los centelósidos en detrimento de la de los fitosteroles, que están más relacionados con el crecimiento celular. Efectivamente, MJ, no sólo induce la producción de compuestos relacionados con la defensa, sino también modifica el patrón de crecimiento celular en diferentes cultivos de células vegetales (Krisa y cols., 1999; Almagro y cols., 2011a). Además, Tassoni y cols., (2005) observaron una reducción del crecimiento celular en los cultivos celulares de *V. vinifera* cv Barbera tratados con MJ. Kiselev y cols., (2007) también detectaron una inhibición del crecimiento celular en callos de *V. amurensis* tratados con diferentes elicitores.

III.6. Efecto de la luz UV-A y UV-C sobre la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota* elicidadas con M- β -CD y MJ

La radiación o luz ultravioleta (UV) es una parte minoritaria del espectro solar (comprende aproximadamente el 8-9% de la radiación solar), pero representa un factor ecológico importante que influye sobre los organismos y los ecosistemas (Day y Neale, 2002), y está relacionada con la aparición de diversos cambios adaptativos en los organismos a lo largo del desarrollo de la vida sobre la Tierra (Cockell y Knowland, 1999). La radiación UV se divide fundamentalmente en tres rangos de longitud de onda: UV-C (200-280 nm) que es extremadamente perjudicial para los organismos, pero es absorbida completamente por el ozono y el oxígeno, por lo que no resulta relevante bajo

las condiciones de radiación solar naturales; UV-B (280-320 nm) que representa sólo el 1.5 % del espectro de radiación UV y puede producir gran variedad de daños en las plantas y otros organismos; UV-A (320-400 nm) que representa aproximadamente el 6.3 % de la radiación UV que llega a la Tierra y es la parte menos peligrosa de la radiación UV (Hollósy, 2002). Por lo tanto, una fracción de la radiación UV-B y la totalidad de la radiación UV-A llegan a la superficie terrestre, donde provocan diversos efectos biológicos. Además, la efectividad de las respuestas biológicas a la radiación UV aumenta con el descenso de la longitud de onda, por lo que dichas respuestas están dominadas por la luz UV-B (Björn, 1999). En este sentido, los organismos pueden contrarrestar los efectos nocivos de la radiación UV-B mediante el desarrollo de medidas de protección y reparación, como la producción de compuestos absorbentes de la radiación UV tales como flavonoides, fenilpropanoides, etc., mecanismos antioxidantes y fotoprotectores, y procesos de reparación de proteínas y ADN (Jansen, 2002).

Por ello, la luz UV ha sido considerada un elicitador físico que induce la biosíntesis de numerosos metabolitos en cultivos celulares de *V. vinifera*, *C. roseus* (Almagro y cols., 2011b). Así, Ramani y Jayabaskaran (2008) observaron un aumento en la producción de catarantina y vindolina en cultivos celulares de *C. roseus*, ya que sus niveles aumentaron 3 y 12 veces, respectivamente cuando las células se irradiaron con luz UV-B durante 5 min. Keskin y Kunter (2010) también observaron que al irradiar un callo de *V. vinifera* durante 15 min con luz UV-C se producía un aumento significativo de los niveles de *trans*-resveratrol.

La Figura 12 muestra el efecto de diferentes tiempos de exposición a la luz UV-C sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados en presencia de 50 mM de M- β -CD solas o en combinación con 100 μ M de MJ. De manera similar a los resultados descritos anteriormente, la producción de fitosteroles fue mayor cuando los cultivos celulares se elicitaban sólo en presencia de M- β -CD (120.38 ± 8.89 mg/ L). Asimismo, cuando los cultivos celulares se expusieron a la luz UV-C durante tiempos cortos (15 y 30 min), el nivel de producción de fitosteroles obtenido fue similar al de las células no expuestas elicitadas sólo con M- β -CD, observándose un descenso brusco de la producción del orden de 2.5 veces inferior en relación al tratamiento con M- β -CD (células no expuestas) cuando el tiempo de exposición a la luz UV-C fue mayor (60 min). Sin embargo, cuando las células se elicitaban conjuntamente con M- β -

CD y MJ y se expusieron durante diferentes tiempos a la luz UV-C, se observó un ligero incremento en el contenido total de fitosteroles, aunque no se apreciaron diferencias significativas durante los tiempos de exposición ensayados. Estos resultados indicaron que la producción de fitosteroles se mantiene estable durante el tiempo de exposición a la luz UV-C a través de la presencia conjunta de los tres elicitors (M- β -CD, MJ y luz UV-C) aunque el nivel de producción obtenido fue del orden de 2 veces inferior al obtenido en el tratamiento combinado de M- β -CD y UV-C.

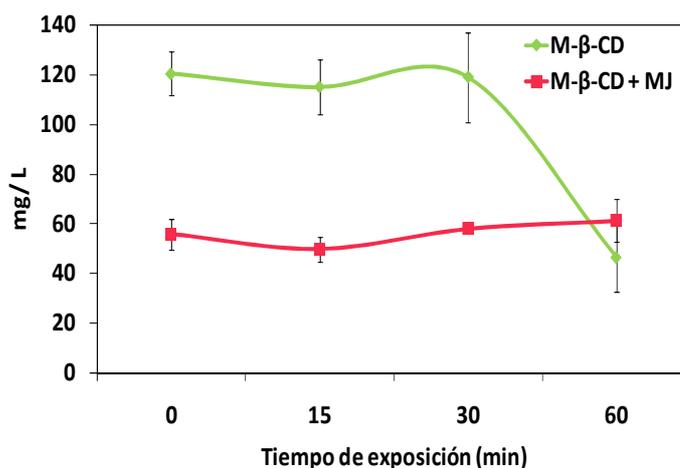


Figura 12. Efecto del tiempo de exposición (0, 15, 30 y 60 min) de luz UV-C (250 nm, 10 μ W/ cm²) sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM de M- β -CD solas o en combinación con 100 μ M de MJ durante 144 h. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes.

Por otro lado, la Figura 13 muestra el efecto de diferentes tiempos de exposición a la luz UV-A (15, 30 y 60 min) sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM de M- β -CD solas o en combinación con 100 μ M de MJ. Como se observa, la producción de fitosteroles fue mayor cuando los cultivos celulares se elicitaron sólo en presencia de M- β -CD (120.38 \pm 8.89 mg/ L), no detectándose la presencia de estos compuestos en las células tratadas con o sin MJ y expuestas a luz UV-A a los diferentes tiempos ensayados (15, 30 y 60 min) (datos no mostrados). Además, cuando los cultivos celulares de zanahoria se elicitaron con M- β -CD, solas o en combinación con MJ y se expusieron a la luz UV-A durante tiempos cortos, el contenido de fitosteroles fue disminuyendo ligeramente conforme aumentaba el tiempo de exposición, no existiendo diferencias significativas con respecto a las células no irradiadas en ambos experimentos, mientras que cuando las células se irradiaron durante tiempos de exposición prolongados, se observó un descenso brusco en la producción,

siendo éste del orden de 3.6 veces inferior, al cabo de 60 min de exposición a la luz UV-A (33.36 ± 15.09 mg/L) en comparación a las células no expuestas (120.38 ± 8.89 mg/L). Los resultados indicaron que la adición de un tercer elicitador (UV-A) a las células de zanahoria estimuladas con M- β -CD, solas o en combinación con MJ provocó una respuesta bifásica del cultivo en la producción de fitosteroles, alcanzando un valor similar al obtenido por las células no irradiadas cuando se expusieron 30 min bajo la luz UV-A (120.38 ± 8.89 mg/L y 77.45 ± 13.76 mg/L, respectivamente).

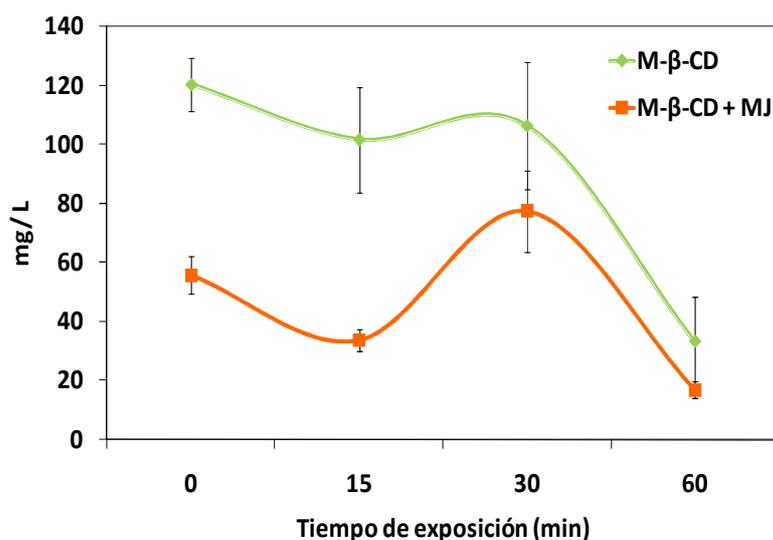


Figura 13. Efecto del tiempo de exposición (0, 15, 30 y 60 min) de luz UV-A (360 nm, $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) sobre la producción de fitosteroles en cultivos celulares de *D. carota* elicitados con 50 mM de M- β -CD solas o en combinación con $100 \mu\text{M}$ de MJ durante 144 h. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes.

Son muy pocos los estudios en los que se muestran los efectos de la luz UV sobre la producción de metabolitos en cultivos celulares de zanahoria y la mayoría de las investigaciones realizadas están dirigidas al aumento del contenido de antocianinas en cultivos celulares de *D. carota*, como mecanismo de defensa para proteger a las células de los efectos adversos de la luz UV (Gläbgen y cols., 1998). Schnitzler y cols., (1992) demostraron que el tratamiento simultáneo con luz UV y elicitores de origen fúngico en cultivos celulares de *D. carota*, provocó un incremento en la biosíntesis del compuesto fenólico, ácido 4-hidroxibenzoico, así como una inducción de las enzimas de la ruta fenilpropanoide. Sin embargo, en presencia del elicitador fúngico, los cultivos celulares eran incapaces de inducir la biosíntesis de antocianinas. En este sentido, además de la acumulación de fitosteroles, tras la exposición a la luz UV-A de los cultivos celulares de zanahoria tratados conjuntamente con M- β -CD y MJ se detectó la

cumarina 6-metoximeleína, así como compuestos derivados de la ruta fenilpropanoide. De hecho, tanto en los cultivos celulares tratados sólo con M- β -CD como en los tratamientos combinados con MJ, se identificaron compuestos fenólicos como eugenol e isoeugenol, mientras que el contenido de estos fenoles disminuyó cuando las células tratadas con M- β -CD se expusieron a la luz UV-A (datos no mostrados). Por el contrario, la exposición de las células elicidadas con M- β -CD y MJ y expuestas durante tiempos cortos (15 min) a la luz UV-A incrementó los niveles de estos compuestos que volvieron a disminuir cuando tiempo de exposición a la luz UV-A fue prolongado (60 min) (datos no mostrados).

IV. Ruta de señalización dirigida por los elicitores en la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota*

Los estudios sobre las vías de transducción de la señal desencadenados por la presencia de elicitores han revelado las similitudes existentes entre las moléculas usadas por plantas y animales para percibir y transmitir las señales asociadas a organismos invasores, que ponen de manifiesto la conservación en los dos reinos, de un sistema de señalización relacionado con la defensa (Nürnberg y cols., 2004). De este modo, tras la percepción del elicitor por parte de proteínas receptoras de membrana, tienen lugar diferentes eventos de señalización tempranos como el flujo de iones a través de la membrana plasmática (Ca^{2+} , H^+ , K^+ , Cl^-), eventos de fosforilación/desfosforilación de proteínas o activación de proteínas de membrana plasmática que conducen a la movilización o a la generación directa o indirecta de diversas moléculas señal como $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, NO y ROS. Estos componentes de las vías de transducción de la señal conducen a las respuestas de defensa inducidas por elicitores, tales como la activación de genes de defensa.

IV.1. Implicación del calcio en la producción de fitosteroles desencadenada por ciclodextrinas metiladas al azar

Durante el proceso de elicitación se desencadenan eventos de señalización que conducen a la inducción de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios. Por esta razón, se estudió el mecanismo molecular implicado en el proceso de elicitación de suspensiones celulares de zanahoria, en el cual se incluyen los eventos

tempranos de la ruta de señalización y su relación con eventos tardíos, en particular con la biosíntesis y acumulación de fitosteroles.

La implicación del Ca^{2+} en la vía de señalización desencadenada por M- β -CD y el origen del mismo se estudió mediante el uso de compuestos que regulan la entrada de Ca^{2+} así como la utilización de medios de cultivo que no contenían Ca^{2+} . Para averiguar si el origen del Ca^{2+} es extracelular, las suspensiones celulares de zanahoria se elicitaron en medios de cultivo carentes de Ca^{2+} o se trataron con compuestos que inhibían la entrada de Ca^{2+} desde el medio de cultivo específicamente, un quelante de Ca^{2+} , EGTA y un bloqueante de Ca^{2+} , concretamente LaCl_3 que es un inhibidor competitivo de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Para averiguar si el origen del Ca^{2+} es intracelular, las suspensiones celulares se trataron con compuestos que inhiben la liberación del Ca^{2+} desde los compartimentos intracelulares, concretamente RR y Neo que inhiben los canales de Ca^{2+} dependientes de rianodina y de IP_3 , respectivamente.

Para realizar el estudio de la implicación del Ca^{2+} en la producción de fitosteroles en cultivos celulares de zanahoria elicitados con 50 mM de M- β -CD, en primer lugar se procedió a evaluar el efecto que tendría la ausencia de Ca^{2+} en el medio de cultivo. Para ello, se utilizaron medios de cultivo carentes de Ca^{2+} y medios de cultivo completos a los que se añadieron dos concentraciones de EGTA (5 y 10 mM) (Figura 13). Los resultados se analizaron tras 24 h de elicitación en presencia de M- β -CD, tiempo mínimo a partir del cual se detectó la presencia de fitosteroles en el medio extracelular (Figura 4).

Los resultados mostraron que existía una fuerte dependencia del Ca^{2+} extracelular, ya que la producción de fitosteroles en cultivos celulares elicitados con M- β -CD, se redujo a la mitad en los medios carentes de Ca^{2+} en relación al medio completo (4.77 ± 0.73 y 9.81 ± 0.85 mg/ L, respectivamente). Además, cuando se utilizó EGTA a una concentración de 5 mM no se observaron diferencias en la producción de fitosteroles (13.3 ± 2.97 mg/ L) con respecto al tratamiento control que contenía M- β -CD en los medios con Ca^{2+} . Este resultado puede ser debido a que la concentración de Ca^{2+} que queda libre en el medio de cultivo tras la adición de 5 mM de EGTA (52 μM), es lo suficientemente elevada como para que se desencadene la señal que induce la producción de fitosteroles. Sin embargo, tras la adición de 10 mM de EGTA se produjo una disminución drástica de la producción de fitosteroles cuando las suspensiones

celulares se elicitaron con M- β -CD (3.12 ± 0.5 mg/L) estando incluso por debajo del valor obtenido en medios de cultivo carentes de Ca^{2+} (4.77 ± 0.73 mg/L). Esta concentración de EGTA (10 mM) deja libre en el medio de cultivo una concentración de Ca^{2+} de $16 \mu\text{M}$, lo que sugiere que esta mínima concentración de Ca^{2+} podría dirigir la escasa producción de fitosteroles observada. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de una dependencia parcial del Ca^{2+} extracelular sobre la producción de fitosteroles ya que se observa un fuerte descenso de dicha producción cuando en el medio de cultivo no hay Ca^{2+} (o se encuentra en cantidades menores a $16 \mu\text{M}$). Además, en los tratamientos control (sin M- β -CD) que contenían los medios completos y distintas concentraciones de EGTA (5 y 10 mM) no se observó producción alguna de fitosteroles (datos no mostrados).

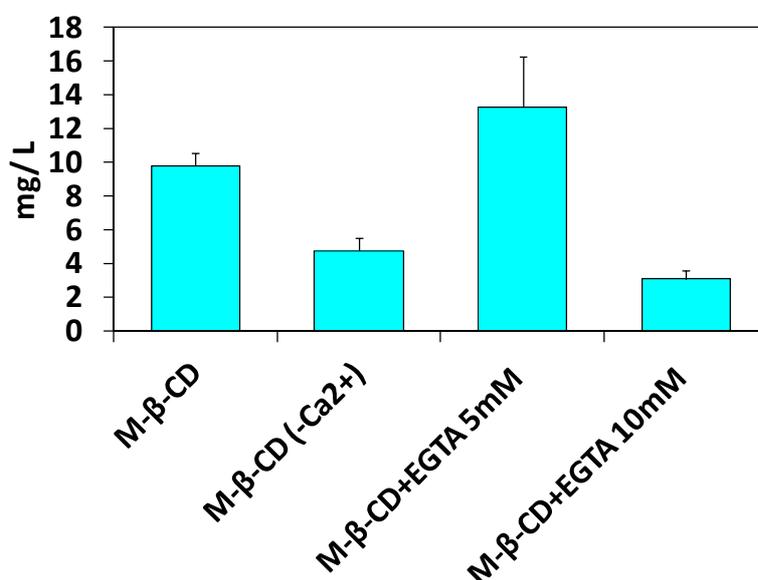


Figura 14. Efecto de la carencia de Ca^{2+} (-Ca²⁺) y de la adición de distintas concentraciones de EGTA (5 y 10 mM) sobre la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota* elicidadas con 50 mM de M- β -CD durante 24 h. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes.

Para seguir analizando si la producción de fitosteroles depende de los flujos de Ca^{2+} extracelular y/o intracelular, se realizó la elicitación de suspensiones celulares de zanahoria con M- β -CD durante 24 h, en medios de cultivo completos y medios carentes de Ca^{2+} a los que se añadieron un además del quelante de Ca^{2+} , EGTA (10 mM), un inhibidor de la entrada de Ca^{2+} extracelular, La^{3+} (500 μM , Lecourieux y cols., 2006) e inhibidores de la liberación de Ca^{2+} intracelular RR (10 μM , Allen, 1995) y/o Neo (100 μM , Lecourieux y cols., 2005).

Como se muestra en la Figura 15, la producción y acumulación extracelular de fitosteroles se redujo fuertemente cuando las suspensiones celulares fueron pre-tratadas con EGTA y/o La^{+3} y posteriormente elicitadas con M- β -CD durante 24 h en medios completos. Este descenso en la producción de fitosteroles fue más significativo en presencia del agente quelante que por la presencia del competidor por los canales de Ca^{2+} . Estos resultados sugieren que la producción de fitosteroles inducida por la presencia de M- β -CD es parcialmente dependiente del flujo de Ca^{2+} procedente del medio de cultivo.

Del mismo modo, también se ensayó el efecto de inhibidores de la liberación de Ca^{2+} procedente de los compartimentos intracelulares (Figura 15). Para ello, se utilizó RR, un inhibidor de los canales de Ca^{2+} intracelulares dependientes de rianodina y Neo, un inhibidor de fosfolipasa-C específica de la vía de los inosítidos fosfato. Así, cuando las suspensiones celulares de zanahoria se elicitaron con M- β -CD, se produjo un aumento significativo de la producción de fitosteroles. Sin embargo, la presencia conjunta de ambos inhibidores produjo una disminución significativa del contenido de fitosteroles (8.50 ± 0.62 mg/ L) aunque de valor similar al obtenido en el tratamiento sólo de M- β -CD (9.81 ± 0.85 mg/ L).

Estos resultados sugieren que se debe producir no sólo un incremento de la concentración del Ca^{2+} citosólico a través de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, sino también a través de la movilización del Ca^{2+} procedente de los orgánulos intracelulares, para que tenga lugar la producción de fitosteroles promovida por M- β -CD, ya que cuando se adicionaron M- β -CD a las suspensiones celulares pre-tratadas con todos los bloqueadores específicos de los canales de Ca^{2+} (intra- y extracelulares) junto con EGTA, se observó un descenso en la producción de fitosteroles (3.21 ± 0.38 mg/ L) a las 24 h de tratamiento (Figura 15) siendo este descenso similar al observado en el tratamiento sólo de EGTA en combinación con M- β -CD (3.12 ± 0.50 mg/ L).

Asimismo, para averiguar si esta baja producción de fitosteroles se debe al Ca^{2+} que contiene el medio de cultivo, las elicitaciones se realizaron en medios de cultivo carentes de Ca^{2+} añadiendo EGTA y los bloqueadores mencionados anteriormente. En la Figura 16 se observa que la producción de fitosteroles en suspensiones celulares elicitadas durante 24 h con M- β -CD en medios carentes de Ca^{2+} es de 4.77 ± 0.74 mg/

L, lo que significa una disminución de 2 veces en la producción de fitosteroles, con respecto a las suspensiones celulares elicidadas con M- β -CD en medios completos (9.82 ± 0.75 mg/ L). Esta producción disminuye de manera similar en los tratamientos realizados en ausencia de Ca^{2+} y en presencia de inhibidores específicos de los canales de Ca^{2+} de los almacenes internos llegando a valores de fitosteroles de 2 mg/ L.

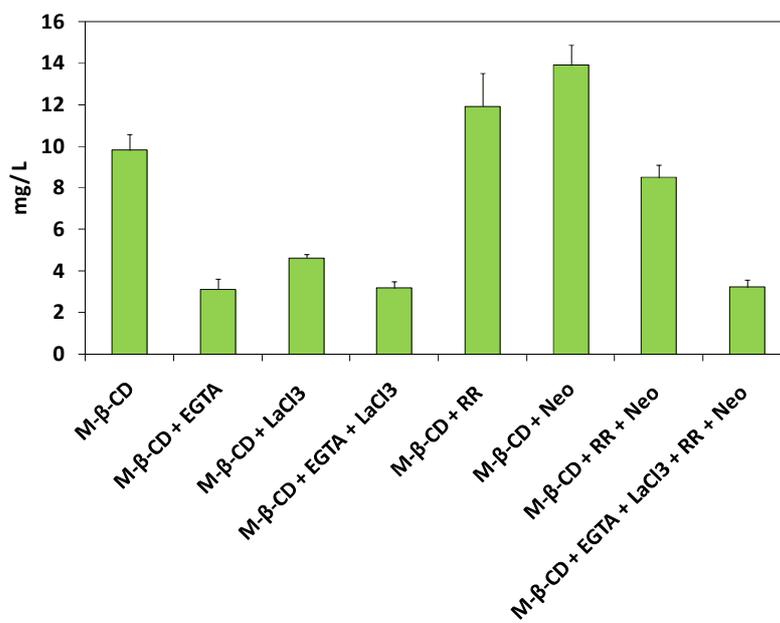


Figura 15. Efecto de diferentes bloqueadores y antagonistas de los flujos de Ca^{2+} extracelular e intracelular en la acumulación extracelular de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota* elicidadas con 50 mM de M- β -CD en medios completos al cabo de 24 h.

Sin embargo, los niveles de producción obtenidos en los cultivos celulares pre-tratados con EGTA y La^{3+} , y elicidados durante 24 h con M- β -CD en medios carentes de Ca^{2+} son similares a los alcanzados en suspensiones celulares elicidadas en medios deprivados de Ca^{2+} . A la vista de los resultados obtenidos se puede deducir que: i) la producción de fitosteroles es independiente de los flujos de Ca^{2+} extracelular ya que los medios estaban deprivados de Ca^{2+} y los niveles de producción alcanzados son similares a los obtenidos medios desprovistos de Ca^{2+} ; ii) que los niveles producción de fitosteroles en presencia de RR y Neo (inhiben los flujos de Ca^{2+} intracelulares dependientes de canales de rianodina y de IP_3 , respectivamente), son similares a los obtenidos en presencia de M- β -CD en medios completos, lo que sugiere que al inhibir un canal intracelular de Ca^{2+} , puede estar actuando el otro. En efecto, cuando ambos inhibidores se añaden simultáneamente en medios desprovistos de Ca^{2+} , los niveles de

fitosteroles disminuyen y se mantienen similares a los obtenidos en presencia de inhibidores de la entrada de Ca^{2+} desde el medio de cultivo.

Numerosos estudios sobre el Ca^{2+} han demostrado que diferentes reservorios de Ca^{2+} pueden ser utilizados en respuesta a diferentes estímulos. De hecho, Lecourieux y cols., (2002) mostraron que el incremento de Ca^{2+} en cultivos celulares elicitados de *N. plumbaginifolia* se produjo como consecuencia de una entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular en primer lugar, seguido de una liberación de Ca^{2+} desde los almacenes internos. Asimismo, el Ca^{2+} puede ser liberado desde un único reservorio. Así, Poutrain y cols., (2009) demostraron que la acumulación y biosíntesis de indolalcaloides monoterpénicos en cultivos celulares de *C. roseus* estaba regulada específicamente por el Ca^{2+} liberado del sistema de endomembranas, sugiriendo que la elevación del Ca^{2+} citosólico, procedente de los almacenes internos puede tener efectos contrarios sobre el metabolismo secundario dependiendo de que esa elevación sea promovida por la vía de IP_3 o por la de los receptores de rianodina.

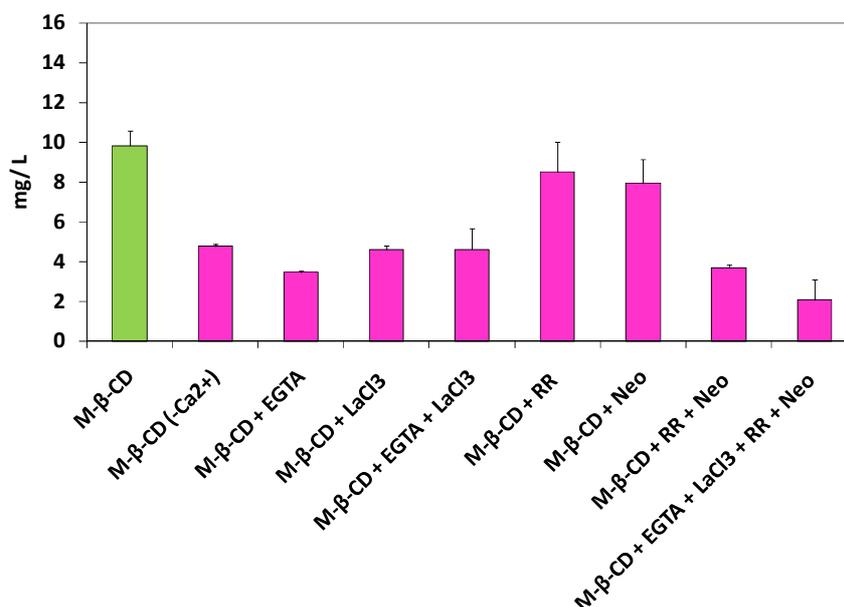


Figura 16. Efecto de diferentes bloqueadores y antagonistas de los flujos de Ca^{2+} extracelular e intracelular en la acumulación extracelular de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota* elicitadas con 50 mM de M-β-CD en medios de cultivo carentes de Ca^{2+} al cabo de 24 h. En color verde se muestra el nivel de producción extracelular de fitosteroles alcanzado tras 24 h de elicitación con 50 mM de M-β-CD en medios de cultivo completos.

Con el fin de analizar la secuencia de respuestas celulares activadas por los elicitores, se han utilizado una serie de compuestos que actúan sobre las rutas de señalización. Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan evidencias de la

participación del Ca^{2+} como mediador en la producción de fitosteroles inducida por elicitores en suspensiones celulares de zanahoria, el cual proviene de la entrada de Ca^{2+} extracelular y de la movilización de Ca^{2+} de los orgánulos ya que el tratamiento combinado con secuestrantes y bloqueadores específicos de los canales de Ca^{2+} (Figura 15) que inhiben el flujo de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y su entrada desde el medio de cultivo disminuyen los niveles de fitosteroles. A pesar de que existen numerosos estudios que demuestran que el Ca^{2+} juega un papel fundamental en diferentes procesos fisiológicos inducidos por estímulos externos, es la primera vez que se describe la implicación del Ca^{2+} en la ruta de señalización que conduce a la biosíntesis de fitosteroles.

IV.2. Implicación de eventos de fosforilación/desfosforilación en la producción de fitosteroles desencadenada por ciclodextrinas metiladas al azar

Para determinar la posible implicación de eventos de fosforilación/desfosforilación en la ruta de señalización dirigida hacia la producción de fitosteroles en suspensiones celulares de zanahoria elicidadas con M- β -CD se realizaron experimentos en presencia de inhibidores de proteín quinasas (PQ) tales como estaurosporina (Est), apigenina (Ap), genisteína (Gen). También se estudió el efecto de inhibidores de proteín fosfatasas (PP) como cantaridina (Can) y óxido de fenilarsina (OFA). Como puede observarse en la Figura 17, la producción de fitosteroles dirigida por M- β -CD fue parcialmente dependiente de eventos de desfosforilación de tirosin-proteínas ya que la acumulación de fitosteroles se redujo cuando las suspensiones celulares de zanahoria pre-tratadas con OFA se elicitaron con M- β -CD, mientras que el pre-tratamiento de los cultivos con Gen (inhibidor de tirosín PQ) dio lugar a un aumento significativo de la producción de fitosteroles. Además, la producción de fitosteroles fue ligeramente dependiente de eventos de fosforilación de Ser/Thr proteínas ya que la adición de M- β -CD a los cultivos celulares pre-tratados con Est redujo significativamente la acumulación de éstos en suspensiones celulares de zanahoria elicidadas con M- β -CD.

El proceso de fosforilación y defosforilación de proteínas no sólo está implicado en las vías de transducción de señales desencadenadas por elicitores sino que también participa directamente en la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios, aunque la identidad de la mayoría de las PQ y la función de fosforilación de estas

proteínas no es del todo conocida (Zhao y cols., 2005). En este estudio, los eventos de fosforilación/desfosforilación parecen estar implicados en las rutas de señalización que conducen a la biosíntesis de fitosteroles desencadenada por M- β -CD (Figura 17) ya que tanto los eventos de desfosforilación de Tyr-proteínas (OFA), como los eventos de fosforilación de Ser/Thr PQ (Est) parecen estar implicados en la producción de fitosteroles, no observándose una dependencia clara de eventos de fosforilación de proteínas dirigidos por MAPK (Apig) y Tyr PQ (Gen) ni de desfosforilación de Ser/Thr PQ llevada a cabo por protein fosfatasas tipo 2A (Cant). Por lo tanto, se requieren estudios más profundos para asignar una posible implicación de estas PQ y PP en la producción de fitosteroles dirigida por M- β -CD (Figura 17).

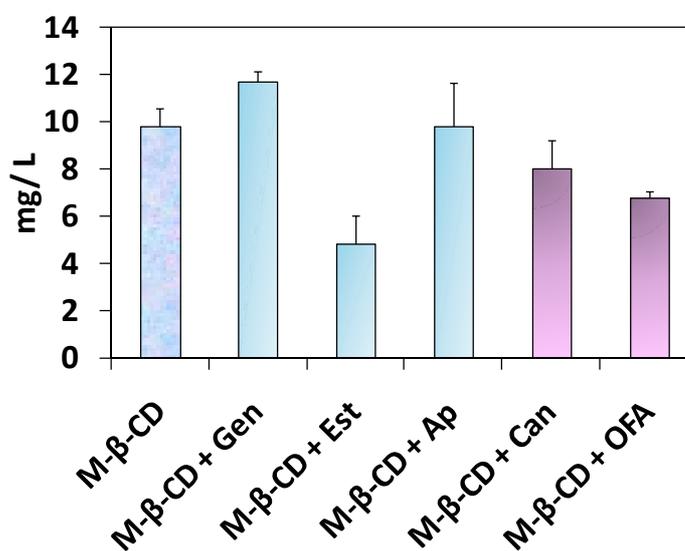


Figura 17. Efecto de diferentes diferentes inhibidores de PQ y PP en la acumulación extracelular de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota* elicidadas con 50 mM de M- β -CD durante 24 h.

IV.3. Implicación H₂O₂ y NO en la producción de fitosteroles dirigida por las ciclodextrinas metiladas al azar

Las reacciones de defensa incluyen el estallido oxidativo que conduce a la producción de O₂⁻ y H₂O₂. El H₂O₂ es una molécula clave implicada en la cascada de señalización dirigida por elicitores (Lecourieux y cols., 2006), que se acumula en las paredes celulares por la acción de la NADPH oxidasa de membrana plasmática. La producción de estas especies reactivas se inhibe en presencia de DPI (inhibidor específico de la NADPH oxidasa de membrana). Así, cuando los cultivos celulares de zanahoria se pre-trataron con DPI y se elicitaron con M- β -CD, no se observó ningún

cambio en la acumulación extracelular de fitosteroles, sugiriendo que el H_2O_2 no juega un papel determinante en la ruta de señalización para la producción de fitosteroles (Figura 18). Resultados similares fueron descritos por Sánchez-Sampedro y cols., (2008) en cultivos celulares de *S. marianum* en los cuales, la síntesis de silimarinas no se vió afectada por la inhibición de la generación de ROS ni en su caso, por la adición de H_2O_2 al cultivo. Estos resultados ponen de manifiesto que la producción de ROS no es un requerimiento esencial para la inducción de la síntesis de fitosteroles. Sin embargo, en cultivos celulares de *V. vinifera*, la producción de *trans*-resveratrol resultó ser claramente dependiente de la biosíntesis de H_2O_2 ya que la adición de DPI, inhibidor de la NADPH oxidasa, provocó una drástica disminución de la producción de *trans*-resveratrol tanto en los cultivos celulares elicitados con M- β -CD separadamente o en combinación con MJ (Belchí-Navarro y cols., 2013b).

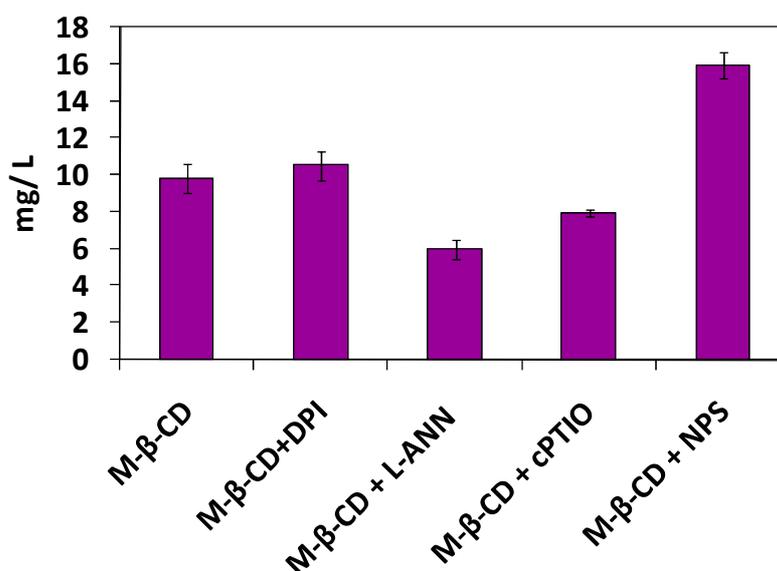


Figura 18. Efecto de diferentes efectores sobre la acumulación extracelular de fitosteroles en suspensiones celulares de *D. carota* elicidadas con 50 mM de M- β -CD durante 24 h.

Además, existen muchas evidencias que apoyan la idea de que el NO constituye una parte de la cascada de señalización que se activa en las células vegetales en respuesta a patógenos o elicitors (Wendehenne y cols., 2004). Para estudiar la posible implicación del NO en la ruta de señalización dirigida por M- β -CD para la producción de fitosteroles, las suspensiones celulares de zanahoria se pre-trataron con compuestos que actuaban inhibiendo la NOS (L-ANN), secuestrando NO (cPTiO) o donando NO (NPS). Como se aprecia en la Figura 18, la producción de fitosteroles fue parcialmente

dependiente de la producción de NO ya que se observó un descenso en su acumulación al añadir cPTiO. Además, una NOS parece ser la responsable de la biosíntesis de NO ya que el pre-tratamiento de las suspensiones celulares con L-ANN dio lugar a una disminución significativa de la producción de fitosteroles. Resultados similares han sido descritos en cultivos celulares de vid, donde la producción de *trans*-resveratrol se vio parcialmente afectada tras la aplicación de L-ANN y cPTiO y posteriormente elicitados con M- β -CD (Belchí-Navarro y cols., 2013b). Asimismo, el pre-tratamiento de los cultivos con NPS, dio lugar a un aumento de la acumulación de fitosteroles, lo que puede ser debido al sumatorio del NO endógeno y el aporte exógeno procedente del NPS favoreciendo en cualquier caso, dicha producción. En efecto, la adición de NPS a cultivos celulares ha sido una estrategia muy utilizada no solo para el aumento de la producción de metabolitos secundarios sino también, para promover el aumento de la biomasa celular. Además, la adición exógena de NO puede incrementar el efecto de los elicitores sobre la producción de metabolitos secundarios (Zhang y cols., 2012). En ese sentido, la aplicación de NPS y radiación UV-B en hojas de *G. biloba* y ultrasonidos en células de *T. yunnanensis* mejoró la producción de flavonoides y taxanos, respectivamente (Hao y cols., 2009; Wang y cols., 2006).

V. Análisis del proteoma extracelular en cultivos celulares de zanahoria elicitados con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo

La determinación de las proteínas extracelulares presentes en el medio de cultivo de suspensiones celulares de zanahoria control y elicitadas con M- β -CD y MJ, se realizó mediante electroforesis desnaturizante sobre geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) reveladas posteriormente con tinción de plata (Figura 19).

Como se observa en la Figura 19, el patrón de proteínas extracelulares totales fue relativamente simple tanto en los cultivos control como en los elicitados. Sin embargo, el perfil proteómico en las suspensiones celulares tratadas con M- β -CD solas o en combinación con MJ (Figura 19, calle CD y CD + MJ) fue ligeramente más complejo que el observado en los cultivos control y tratados sólo con MJ (Figura 19, calle C y MJ). Además, las proteínas con un peso molecular por debajo de 62 kDa constituyeron las proteínas mayoritarias en los cultivos celulares elicitados con M- β -CD

observándose además, diferencias en la intensidad de las bandas de proteínas específicas entre los tratamientos.

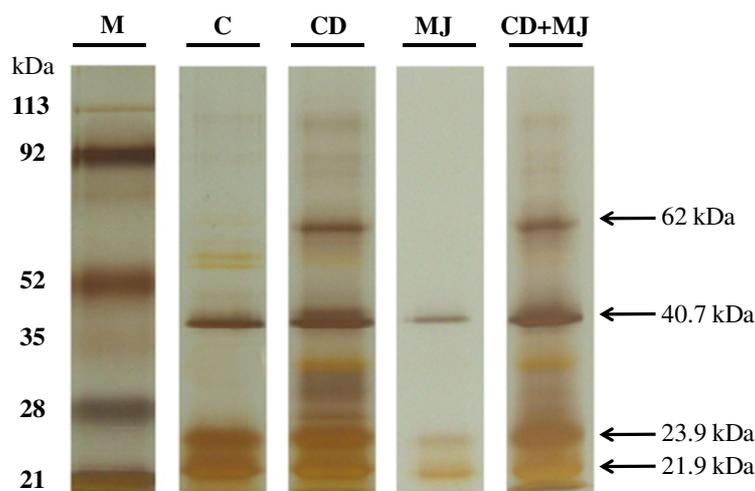


Figura 19. Patrón de proteínas totales del medio extracelular de suspensiones celulares de *D. carota* realizado mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes, teñido con tinción de plata. La calle M se corresponde con el marcador de peso molecular, la calle C con el control, la calle CD con la suspensión celular elicitada con M- β -CD, la calle MJ con la suspensión celular elicitada con jasmonato de metilo y la calle CD + MJ con la suspensión celular elicitada conjuntamente con M- β -CD y MJ.

Por ello, dada la simplicidad de la huella peptídica obtenida y con el fin de comprobar si M- β -CD y MJ, por separado o en combinación, eran capaces de alterar los niveles de proteínas relacionadas con la defensa, se llevó a cabo el análisis proteómico de las bandas de proteínas correspondientes a 20.4, 23.9 y 40.7 kDa mediante microsecuenciación por nanoLC ESI MS/MS. Sin embargo, esta aproximación requiere que la proteína en cuestión haya sido identificada previamente por su huella peptídica y que los espectros de fragmentación de los péptidos trípticos se encuentren depositados en las bases de datos. Cuando éste no es el caso, se puede realizar la secuenciación *de novo*, técnica muy valiosa cuando se trabaja en la identificación de proteínas en organismos que no son considerados modelo para los estudios de genómica funcional, como es el caso de *D. carota*.

De esta manera, mediante la comparación de los fragmentos trípticos obtenidos a partir de las bandas con peso molecular aparente de 40.7 kDa, tanto en los cultivos control como en los elicitados (Figura 19), se identificaron diferencialmente doce y tres fragmentos trípticos en los cultivos celulares tratados con M- β -CD y MJ, respectivamente (Tabla 2 y 3), lo cual sugiere que estos fragmentos trípticos son

producidos como consecuencia de la elicitación. Así, los fragmentos obtenidos tras la secuenciación de la banda de proteína con peso molecular aparente de 40.7 kDa en el tratamiento con M- β -CD, contenían secuencias de aminoácidos que presentaban homología con una glicoproteína secretada (EP4, n° acceso Q39689) y un precursor de la glicoproteína dérmica extracelular (EDGP, n° acceso Q05929) de *D. carota*, dos peroxidasas que presentaban homología a las de *Spinacia oleracea* y *A. thaliana* (n° acceso P93547 y Q9FX85, respectivamente), una proteína de *V. vinifera* (MADS-box, n° acceso Q8LLR0) y una proteína que contiene dominios de repeticiones ricas en leucina (LRR) y F-box (n° acceso Q9LJF8) de *A. thaliana* (Tabla 2).

Concretamente, en la banda de proteína correspondiente a 40.7 kDa en el tratamiento de las suspensiones celulares con M- β -CD, se identificaron tres fragmentos trípticos que mostraron homología con una glicoproteína denominada EP4, así como un fragmento tríptico obtenido tras la secuenciación *de novo* que mostró homología con una glicoproteína extracelular dérmica llamada EDPG de *D. carota*. Es bien conocido que las plantas producen inhibidores proteicos contra las enzimas que degradan la pared celular y que se secretan durante el ataque por patógenos (Juge, 2006; Lagaert y cols., 2009). EDPG es uno de esos inhibidores de proteínas, ya que muestra actividad inhibidora hacia las endo- β -1,4-glucanasas de *Aspergillus aculeatus* que actúan específicamente sobre el xiloglucano (Shang y cols., 2005) y además, se expresan en respuesta a estreses bióticos y abióticos por lo que juega un papel fundamental en los sistemas de defensa de las plantas y en los mecanismos de transducción de la señal (Ditt y cols., 2001). Por tanto, la inhibición de esta endo- β -1,4-glucanasa por EDPG constituye un componente importante del mecanismo de defensa en la zanahoria. De hecho, Yoshizawa y cols., (2011) han purificado y cristalizado tanto la EDPG como el complejo que se forma con la endo- β -1,4-glucanasa a partir de *A. aculeatus*. Además, Satoh y cols., (1995) demostraron que las suspensiones celulares de zanahoria son capaces de sintetizar y secretar al medio extracelular la proteína EDGP, que es inducida por heridas en la raíz de zanahoria, pero no por la infección con el patógeno *Erwinia carotova*. Como ocurre con EDPG, EP4 que es una glicoproteína de 45 kDa unida iónicamente a la pared celular que ha sido purificada a partir de cultivos celulares de zanahoria no embriogénicos por van Engelen y cols., (1995), también se acumula en el medio extracelular y sus niveles son mucho mayores cuando las células están expuestas a un elicitor. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la pared celular y

de sus proteínas asociadas, tanto en el desarrollo de las plantas como en la defensa frente a cualquier tipo de estrés. Además, otros dos fragmentos trípticos obtenidos tras la secuenciación *de novo* presentaron homología con una proteína MADS-box de *V. vinifera* y una proteína que contiene dominios de repeticiones ricas en leucina (LRR) y F-box de *A. thaliana* (Tabla 2). Las proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR) constituyen una familia de proteínas que juegan un papel crucial en el desarrollo, la defensa frente a patógenos así como en el reconocimiento de microorganismos formando parte importante en la inmunidad innata de las plantas (Di Matteo y cols., 2003). Así, el dominio LRR se ha encontrado en las estructuras primarias de un número de proteínas biológicamente activas, tales como los receptores de inmunidad innata, inhibidores de enzimas, moléculas de adhesión celular, proteínas de unión a ribosomas y receptores de hormonas, que pueden funcionar en el reconocimiento de ligandos y en la red de transducción de la señal (Jung y Hwang, 2007). Además, estos dominios LRR pueden actuar como sitios de interacción proteína-proteína, unión péptido-ligando y la interacción proteína-carbohidrato (Jones y Jones, 1997; Kajava 1998). Las proteínas de plantas que contienen dominios LRR extracelulares se clasifican en cinco clases en función de la organización de esos dominios: proteínas tipo inhibidor de poligalacturonasas, proteínas tipo LRR-extensina, proteínas tipo receptor, receptor tipo quinasa y proteínas con dominios LRR extracelulares simples. Este último tipo de proteínas LRR se han descrito en varias especies de plantas, como tomate (Torneró y cols., 1996) y pimiento (Jung y cols., 2004) y su expresión resultó ser fuertemente inducida tras la infección por patógenos. Por otro lado, las proteínas con dominios MADS representan una familia grande y diversa de factores reguladores que participan en diversos procesos biológicos, incluyendo la transición floral y la determinación del órgano floral. Además, la familia de genes MADS-box incluye tanto activadores de la transcripción como represores, que forman redes complejas de interacción entre sí, así como con factores reguladores tales como correpresores, proteínas de unión a ARN y factores de modificación post-traduccionales (Kagale y cols., 2010).

Por otro lado, tras la digestión tríptica de la banda de proteína con peso molecular aparente de 20.4 kDa en el tratamiento con M- β -CD, se identificó un único fragmento cuya secuencia de aminoácidos mostró homología con una proteína tipo taumatina (TLP) de *D. carota* (nº acceso Q8VYY2) (Tabla 2). Las TLP pertenecen a la familia de las PR-5, las cuales pueden tener múltiples actividades, desestabilizando la

membrana de hongos e incluso estimulando una vía de transducción de señal mediada por una proteína quinasa que provoca alteraciones en la pared celular (Monteiro y cols., 2003). En cuanto a la TLP inducida tras el tratamiento de los cultivos celulares de zanahoria con M- β -CD, encontrada en la banda de 20.4 kDa, ésta es similar en estructura a la encontrada en callos embriogénicos, plántulas y plantas maduras de zanahoria. Jung y cols., (2005) demostraron que esta TLP inducible era altamente específica de estrés hídrico e independiente de estrés causado por ácido abscísico, SA y MJ y no específica ni del órgano ni del estado de desarrollo. Además, esta TLP extracelular posee 14 residuos de cisteína, los cuales forman siete puentes disulfuro, confiriéndole una gran estabilidad en amplios rangos de temperatura y pH.

Además, en la banda de proteína de 62 KDa (Tabla 2) inducida por el tratamiento con M- β -CD, se identificaron cinco fragmentos trípticos mediante secuenciación *de novo*, cuyas secuencias de aminoácidos presentaron homologías con tres proteínas tipo reticulina oxidasa y cuatro fragmentos trípticos que mostraron homología con una proteína de unión celular (nº acceso Q6I6Y6) de *D. carota*, una proteína nectarina 5 (nº acceso Q84N20) de *N. langsdorffii* x *N. sanderae*, una proteína de la familia de las LRR (nº acceso Q10M75) de *O. sativa subsp. japonica* y una proteína poco conocida, Argonauta 10 (nº acceso Q9XGW1) de *A. thaliana*.

La reticulina oxidasa, también denominada enzima de unión a berberina, pertenece a la familia de las oxidorreductas unidas a FAD dependientes de oxígeno. Esta enzima es la responsable de la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolina y cataliza la oxidación estereoespecífica así como la formación de enlaces C-C de la reticulina, siendo esta última un precursor de la morfina (Winkler y cols., 2009). Custers y cols., (2004) identificaron una reticulina oxidasa en hojas de dos especies de la familia de las compuestas tratadas con SA. Además, esta enzima es común en la familia de las Papaveráceas. En estudios realizados en girasol, Dittrich y Kutchan, (1991) observaron que la expresión de los genes que codificaban para esta proteína se activaban cuando se producía una infección fúngica. Esta proteína puede usar una gran variedad de azúcares reducidos, sobre todo hexosas que se acumulan en la planta tras una infección por patógenos, dando lugar a producción de H₂O₂. Asimismo, Custers y cols., (2004) al añadir SA a hojas de *Lactuca sativa* y girasol observaron que la fracción de proteínas que tenía actividad antifúngica contenía secuencias que presentaban una alta homología a la reticulina oxidasa de *Eschscholzia californica* y *Papaver somniferum*. La reticulina

oxidasa también cataliza la formación de alcaloides de benzofenantridina que se sintetizan en ciertas especies de plantas de las familias de las Papaveráceas y las Fumaráceas en respuesta a ataques patógenos, actuando así como fitoalexinas (Dittrich y Kutchan, 1991; Dixon, 2001). En cuanto a la proteína nectarina 5, es una proteína de 65 kDa del tipo de las enzimas de unión a berberina, que está unida covalentemente a flavina y que presenta actividad oxidasa en respuesta a ataques microbianos (Carter y Thornburg, 2004). Estos autores indicaron, que esta proteína podría estar implicada en la regulación del estado oxidativo del néctar debido a la presencia de flavina y además, debido a su actividad glucosa oxidasa podría ser la responsable de los elevados niveles de H₂O₂ encontrados en el néctar y por tanto, podría estar relacionada con una respuesta de defensa de la planta frente a patógenos. Por último, el fragmento tríptico SFLADLPTK, obtenido tras la secuenciación *de novo*, presentó homología con una proteína argonauta (Tabla 2), que son componentes clave en el mecanismo de silenciamiento del ARN y protegen frente a agentes víricos, entre otras funciones (Scholthof y cols., 2011).

Tabla 2. Identificación de proteínas en base a los fragmentos trípticos obtenidos a partir del proteoma extracelular de cultivos celulares de *D. Carota* elicitados con 50 mM de M- β -CD usando nanoLC-ESI MS/MS y búsqueda por homología de secuencia.

Bandas de proteínas inducidas por M- β -CD	Fragmento tríptico	Secuencia homóloga	Nº Acceso	Proteína	Score	Masa nominal (kDa)
20.4 kDa	CPQAYSAYDDK		Q8VYY2	Proteína tipo Taumatina <i>Daucus carota</i>	66	22.080
40.7 kDa	SQTQGEAFDNFMPK YSLYQEPK ISTGELSDPPNSLK		Q39689	EP4 <i>Daucus carota</i>	198	41.838
	DASTLQYVTK	DASTLQYVT	Q05929	EDGP <i>Daucus carota</i>	73	45.841
	YEELQLTQR	YEELQRTQR	Q8LLR0	MADS-box <i>Vitis vinifera</i>	69	27.667
	TSSGCPNFESLVR	SGCPNLENLV	Q9LJF8	Proteína que contiene dominios LRR y F-box <i>Arabidopsis thaliana</i>	57	34.623
	DAPPNLTLR MSQLSVLTGTQGEIR ANLFTSDQLYTDSR YLGPTADSTMDQTFANN CTMLNVLTGTQEGLR	QGLFTSDQDLYTDSR PTQDPTMAQTFANN LNVLTGTQGEIR	P93547	Peroxidasa <i>Spinacia oleracea</i>	90	38.248
	TLLDSDQLR	LLDSDQ	Q9FX85	Peroxidasa 10 <i>Arabidopsis thaliana</i>	44	38.030

62 kDa

ATCAGEDLFWALR YFGVNFDR VGLVFNPYNR	GEDLFWA YFGENFDR IGLVFNPY	Q9SVG4	Proteína tipo reticulina oxidasa <i>Arabidopsis thaliana</i>	226	63.559
MNELSESALPFYPR	MNEFAESALPF	Q948L1	Proteína tipo (S)-reticulina oxidase <i>Daucus carota</i>	81	56.826
TVADPLNFFR	DPLNFFR	G8A1B6	Reticulina oxidasa <i>Medicago truncatula</i>	57	61.860
TPLLYDQTVFGTGK	TPILYDQTVFGTGK	Q6I6Y6	Proteína de unión celular <i>Daucus carota</i>	116	48.766
YGLAADHVLDAR	YGLAADNVLDAR	Q84N20	Nectarina V <i>Nicotiana langsdorffii</i> x <i>Nicotiana sanderae</i>	86	47.754
CSVVDLAR	CSVVDLSR	Q10M75	Proteína LRR <i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	65	113.071
SFLADLPTK	FLADLPTK	Q9XGW1	Proteína argonauta 10 <i>Arabidopsis thaliana</i>	59	110.868

Los fragmentos trípticos en negrita se obtuvieron mediante microsecuenciación

Asimismo, se identificaron tres fragmentos trípticos inducibles en los cultivos celulares elicitados con MJ (Tabla 3), que presentaron homología con una glicoproteína inducible (iEP4) (n° acceso O04702) de *D. carota*, una proteína citocromo P450 (n° acceso A3F4L9) de *Glycine max* y un precursor de esterasas (n° acceso Q7Y1X1) de *Hevea brasiliensis*. De estos tres fragmentos trípticos inducidos por MJ, destacó la presencia del fragmento obtenido mediante secuenciación *de novo*, YNDLTQYFNESLK, cuya secuencia de aminoácidos resultó ser casi idéntica a la glicoproteína EP4 descrita por van Engelen y cols., (1995), como una proteína inducible por MJ, denominada iEP4, con el fin de distinguir su secuencia de aminoácidos de la secuencia de EP4, a pesar de que es muy probable que este producto génico sea el mismo al descrito anteriormente para EP4. Bertinetti y Ugalde, (1996) demostraron que el ARNm de iEP4 estaba presente en cultivos celulares de zanahoria no elicitados a una concentración muy baja y que la presencia de un elicitor liberado por calor térmico obtenido a partir del micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* aumentó su nivel de expresión de 5 a 10 veces. Por lo tanto, es lógico pensar que la presencia de MJ podría estimular la expresión de esta proteína de 40.7 kDa (Figura 19 y Tabla 3). Otro fragmento tríptico identificado mediante secuenciación *de novo* en los cultivos celulares elicitados con MJ, presentó homología con un citocromo P450 obtenido a partir de suspensiones celulares de soja. Suzuki y cols., (1996) aislaron el ADNc que codifica para el citocromo P450 (CYP93A1) a partir de cultivos celulares de soja que habían sido tratados con 30 μ M de MJ. La secuencia de aminoácidos de este producto génico presentó entre el 30-40% de identidad con otros P450 de plantas. Estos P450 están implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, tales como flavonoides, terpenoides y alcaloides (Bolwell y cols., 1994). También se sabe que algunos de estos metabolitos se acumulan en suspensiones celulares después del tratamiento con MJ (Gundlach y cols., 1992; Sánchez-Sampedro y cols., 2005; Onrubia y cols., 2010a), por lo que es posible que esta proteína (CYP93A1) inducida por MJ esté implicada en la biosíntesis de estos metabolitos secundarios. De hecho, la implicación de dos citocromos P450, ha sido descrita en la biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides tales como cinamato 4-hidroxilasa (CYP73) (Teutsch y cols., 1993) y flavonoide 3',5'-hidroxilasa (CYP75) (Toguri y cols., 1993), respectivamente.

Tabla 3. Identificación de proteínas en base a los fragmentos trípticos obtenidos a partir del proteoma extracelular de cultivos celulares de *D. Carota* elicitados con 100 μ M de MJ usando nanoLC-ESI MS/MS y búsqueda por homología de secuencia.

Bandas de proteínas inducidas por MJ	Fragmento tríptico	Secuencia homóloga	Nº Acceso	Proteína	Score	Masa nominal (kDa)
40.7 kDa	YNDLTQYFNESLK	YNDLTQYFNSELK	O04702	iEP4 <i>Daucus carota</i>	98	42.641
	WWCCCEVLSGRMMR	ELLSGRMM	Q42798.1	Cytochrome P450 93A1 <i>Glycine max</i>	55	57.870
	ESLPLAAFHQVDVYTAK	LPLATFVHVDIYSVK	Q7Y1X1	Esterasa (precursor) <i>Hevea brasiliensis</i>	90	43.329

Aparte de estas proteínas inducibles por M- β -CD y MJ, también se observó la presencia de fragmentos trípticos que presentaron homología con proteínas PR, en las bandas de proteínas con peso molecular aparente de 23.9 y 40.7 kDa (Tabla 4) tanto en los cultivos control (calle C, Figura 19) como en los elicitados (calle CD, MJ, y CD + MJ; Figura 19), por lo que se consideraron como constitutivas. Estas proteínas PR fueron del tipo de las quitinasas de clase IV y peroxidasas que pertenecen a la familia de las PR-3 y PR-9, respectivamente (Tablas 2 y 4). En efecto, la expresión constitutiva de quitinasas y peroxidasas, ha sido numerosas veces demostrada en el medio extracelular de cultivos celulares no elicitados de *Zinnia elegans*, *Cycas revoluta*, *Taxus baccata* (Novo-Uzal y cols., 2009). De hecho, quince fragmentos trípticos, identificados a partir de banda de proteína de peso molecular aparente de 23.9 kDa, mostraron homología con una endoquitinasa ácida extracelular (EP3) de zanahoria, la cual pertenece a una pequeña familia de quitinasas de clase IV (Tabla 4). van Hengel y cols., (1998) describieron el patrón de expresión de los genes que codificaban para esta endoquitinasa EP3 en cultivos embriogénicos de zanahoria. Así, en base al patrón de expresión obtenido, se sugirió que las células de zanahoria que producen EP3 no desarrollaban embriones por sí mismas. De esta manera, parece ser que las quitinasas EP3 o algún producto de su actividad enzimática difunden a través del medio condicionado a las células y son capaces de ayudar en el desarrollo de embriones somáticos, y de este modo, desempeñan un papel importante en el proceso de embriogénesis somática. Por lo tanto, la función biológica de las quitinasas EP3 sería su participación en el reinicio la división celular en células embriogénicas y embriones como parte de un sistema celular nodriza que se requiere para la embriogénesis, aunque no está limitado a ella.

Tabla 4. Identificación de proteínas constitutivas en base a los fragmentos trípticos obtenidos a partir del proteoma extracelular de cultivos celulares de *D. Carota* usando nanoLC-ESI MS/MS y búsqueda por homología de secuencia.

Bandas de proteínas Constitutivas	Fragmento tríptico	Secuencia homóloga	Nº Acceso	Proteína	Score	Masa nominal (kDa)	
23.9 kDa	SAFLNALQSYSSFGTSGSADDSKR						
	AGYPCNANVK						
	VQSVTTQGFGATIR						
	AINSIECNGGSPDAVNSR						
	VSLYNSYCSK						
	FGVAPGDNQR						
	NFYTR						
	GPLQLTWNINYIDAGK						
	SNEFDGLNPNPDIVASDAVVSFR			Q96410	Quitinasa de clase IV (EP3) <i>Daucus carota</i>	566	29.289
	NFYTR						
AGYPCNANVK							
VQSVTSQGFGATIR							
AINSIECNGGSPDAVNSR							
VSLYNSYCSK							
FGVAPGDNQR							
40.7 kDa	VVSCSDIVALAAR						
	SPNVFDNK						
	YYVDLMNR						
	QGLFTSDQDLYTDSR			Q43782	Peroxidasa <i>Linum usitatissimum</i>	203	38.628
	NYPTQDSTMDKTFANLK	YPNQDTTMDKTFANL	Q75RW7	Peroxidasa <i>Coffea arabica</i>	126	23.530	
	LVSGCADLTALAAR	VVSCADLTALAAR	Q43032	Peroxidasa aniónica <i>Petroselinum crispum</i>	97	39.263	
	NAPPNLTLR	NAPPNLTLR	Q3S615	Peroxidasa <i>Phaseolus lunatus</i>	61	31.889	

De manera similar, los resultados obtenidos tras la digestión trípica de las bandas de proteínas de peso molecular aparente de 40.7 kDa, permitieron identificar trece fragmentos trípicos cuyas secuencias de aminoácidos mostraron homología con peroxidasas de *S. oleracea*, *A. thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Coffea Arabica*, *Petroselinum crispum* y *Phaseolus lunatus* (Tablas 2 y 4). Estas secuencias de aminoácidos contenía regiones muy conservadas (Passardi y cols., 2004) tales como GEIR, también encontrado en peroxidasas de *Populus*, *Vitis* y *Pisum sativum*, y VAL en peroxidasas de especies de *Capsicum* (Sabater-Jara y cols., 2010, 2011). Las peroxidasas secretoras de clase III pertenecen a la subfamilia de proteínas PR-9 (van Loon y cols., 2006), y desempeñan un papel reconocido en la defensa de las plantas a través de diversos mecanismos, como una producción masiva de especies reactivas del oxígeno, el refuerzo de la pared celular y lignificación y la producción de fitoalexinas (Almagro y cols., 2009, Belchí-Navarro y cols., 2013a).

*Análisis metabolómico y genómico en cultivos celulares
de Taxus x media elicitados con ciclodextrinas y
jasmonato de metilo*

I. Antecedentes y objetivos

Un aspecto característico de las plantas es su capacidad para sintetizar una enorme variedad de metabolitos secundarios que para el hombre suponen un importante recurso natural para la obtención de fármacos, aditivos alimentarios, nutraceúticos y compuestos químicos de diversas utilidades.

El taxol es un metabolito secundario de naturaleza diterpénica que fue obtenido por primera vez de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) en donde se encuentra en una proporción del orden del 0.01% en PS (Cameron y Smith, 2008) y presenta una elevada actividad antitumoral (Zhong, 2002). Su actividad antitumoral es debida a que promueve la polimerización de la tubulina rompiendo así el equilibrio de polimerización-despolimerización de los microtúbulos y bloqueando la división celular en la mitosis. Por este motivo, el taxol es una de las moléculas más importantes en la lucha contra el cáncer, siendo el principio activo de un 22% de los fármacos utilizados en quimioterapia en el mercado mundial. La mayor parte del taxol utilizado en la quimioterapia contra el cáncer procede de la extracción directa del árbol o de su semi-síntesis a partir de precursores como la bacatina III y la 10-deacetilbacatina III aislados también de la planta (Nicolaou y cols., 1994; Holton y cols., 1994). Sin embargo, la mayoría de las plantas que contienen compuestos de alto valor añadido son difíciles de cultivar o se encuentran en peligro de extinción debido a la sobreexplotación. Por otro lado, la síntesis química de estos compuestos es a menudo económicamente inviable debido a la complejidad de sus estructuras y los requisitos estereoquímicos. Por ello, la gran demanda mundial de este compuesto junto con el hecho de que su extracción implica la muerte de la planta ha llevado a una intensa búsqueda de nuevos sistemas de producción. En este sentido, el empleo de cultivos celulares de especies de *Taxus* constituye la alternativa más viable y con menor impacto ecológico para la producción de taxol y otros taxanos relacionados y además, proporcionan un sistema único para el estudio de la biosíntesis de los taxanos.

Con la finalidad de incrementar la productividad de taxol, así como de taxanos relacionados en los cultivos celulares, se han utilizado varias estrategias que incluyen la optimización de las condiciones de cultivo, la selección de líneas celulares altamente productivas así como el uso de precursores y elicitores. Sin embargo, a pesar de los avances conseguidos en este campo, la mejora biotecnológica de la producción de taxol

sólo se puede conseguir a través del conocimiento y la manipulación de su biosíntesis, la cual no es completamente conocida.

Con estos antecedentes y para el desarrollo de este capítulo se utilizó una línea celular de *Taxus x media* en diferentes condiciones de elicitación, como sistema para la producción biotecnológica de taxol y otros taxanos relacionados, por lo que los objetivos generales que se plantean son los siguientes:

- la caracterización de la producción de taxol y otros taxanos relacionados en suspensiones celulares de *T. x media*.
- el estudio del perfil de expresión de los genes que codifican para enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de taxanos en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con CD y MJ separadamente o en combinación.

II. Caracterización del crecimiento en suspensiones celulares de *T. x media*

Estudios previos realizados por el grupo de investigación de Biotecnología vegetal: Producción de fitofármacos en la Universidad de Barcelona, sobre la producción de taxanos en suspensiones celulares de diferentes especies de tejo, han demostrado que es posible incrementar la producción de estos metabolitos utilizando un cultivo en dos fases y la adición de elicitores (Cusidó y cols., 2002; Bonfill y cols., 2003; Expósito y cols., 2010). Por ello, como ya se ha indicado en Materiales y Métodos, en los estudios de elicitación planteados en este trabajo, se estableció un cultivo en dos fases, en el que en primer lugar se incrementó la biomasa manteniendo las células en el medio óptimo para el crecimiento para ser inoculadas posteriormente al medio óptimo para la producción de taxanos.

Con el fin de determinar con exactitud la duración de las distintas fases del crecimiento de la línea celular de *T. x media* utilizada en este ensayo, en primer lugar se llevó a cabo un estudio de su cinética. Para ello, la determinación del crecimiento, medido como volumen de empaquetamiento celular (VEC), que indica el porcentaje de volumen celular en relación al volumen total de suspensión celular, se realizó en suspensiones celulares de *T. x media* mantenidas en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento, previa estabilización a lo largo de varios subcultivos. Para ello, se tomaron muestras periódicas desde el inicio de la suspensión celular hasta los 20 días de cultivo. Como se puede observar en la Figura 1, la curva de crecimiento fue típicamente sigmoideal distinguiéndose la fase de latencia o “lag” desde su inicio hasta el comienzo del crecimiento exponencial (día 4); la fase “log” que comprendió desde el comienzo de la fase de crecimiento exponencial hasta que se observó una disminución de la acumulación de biomasa y la fase “estacionaria” que abarcó desde el día 14 hasta el final del cultivo. Para la determinación de la fase “log” se realizó una regresión lineal de todos los intervalos posibles, siendo el que más se ajustaba a una recta, el que comprendía desde el día 4 al 12 ($R^2=0.995$). La representación gráfica del crecimiento, determinó la necesidad de subcultivos cada dos semanas.

Además, la medida del VEC fue acompañada de la medida de pH y de la conductividad del medio de cultivo en el que las células crecían (Figura 1). En relación a la conductividad del medio, se observó una variación inversamente proporcional a la

curva de crecimiento. La conductividad del medio extracelular está directamente relacionada con la concentración de iones en el medio. Por lo tanto, cuando las células están en la fase de mayor actividad del metabolismo primario (fase exponencial), consumen una mayor cantidad de nutrientes minerales disminuyendo enormemente su concentración en el medio de cultivo. Durante la fase “lag” y “estacionaria”, la actividad del metabolismo primario es menor, por ello, las variaciones de la conductividad son también menores.

Por otro lado, los resultados mostrados en la Figura 1 indicaron que el pH inicial del medio de cultivo fue 4.94 ± 0.08 y este valor disminuyó en 1.5 unidades hasta el día 10 y a partir de ese día se observó un ligero incremento hasta el día 14 manteniéndose estable hasta el final del cultivo. Esta variación en el pH del medio extracelular fue debida fundamentalmente a la disponibilidad de las fuentes nitrogenadas y del estado energético de las células.

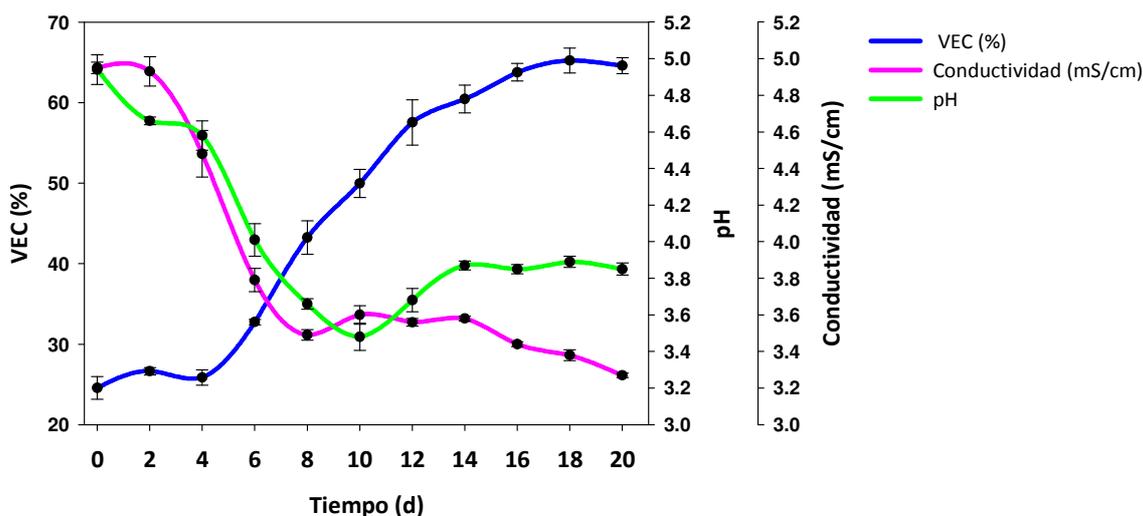


Figura 1. Representación de la curva de crecimiento, de las variaciones del pH y de la conductividad durante el tiempo de cultivo, en suspensiones celulares de *T. x media* crecidas en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes.

Asimismo, se determinaron los parámetros cinéticos descritos en el apartado II. de Material y Métodos. La caracterización de la curva de crecimiento se realizó en base a los parámetros cinéticos “velocidad de crecimiento en la fase exponencial” (V_{exp}), “volumen de empaquetamiento celular máximo” o biomasa máxima generada ($VEC_{m\acute{a}x}$) y “tiempo de agotamiento” (T_a), obtenidos a partir de los datos cinéticos de las curvas de crecimiento.

Los valores de estos parámetros cinéticos fueron $VEC_{m\acute{a}x}$ del 65.23 %, V_{exp} 4.02 y T_a de 14 días (Figura 2).

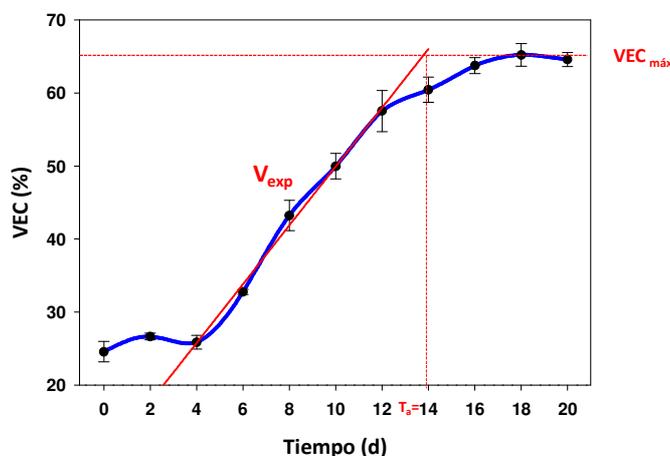


Figura 2. Curva de crecimiento de suspensiones celulares de *T. x media* utilizada para calcular los parámetros cinéticos.

II.1. Caracterización del crecimiento en suspensiones celulares de *T. x media* elicidadas con jasmonato de metilo y ciclodextrinas

Una vez establecidas las diferentes fases de la curva de crecimiento y los parámetros cinéticos en las suspensiones celulares de *T. x media* crecidas en el medio óptimo para el crecimiento, se determinó que el tiempo óptimo de cultivo para llevar a cabo los experimentos de elicitación era de 14 días. Transcurrido ese tiempo, las células se transfirieron del medio de cultivo óptimo para el crecimiento al medio de cultivo óptimo para la producción de taxanos que contenía 50 mM de M- β -CD, HP- β -CD y γ -CD solas o en combinación con 100 μ M de MJ y se mantuvieron en dicho medio en oscuridad durante 20 días, con el fin de comprobar si los diferentes elicitores utilizados afectaban al crecimiento celular. MJ fue adicionado 7 días después de la transferencia de las suspensiones celulares al medio óptimo de producción suplementado con CD, por lo que la elicitación con MJ fue de 13 días. El incremento de biomasa durante el tratamiento con los elicitores se determinó tal y como se describe en el apartado II. de Material y Métodos.

Como se observa en la Figura 3, a pesar de que las células estaban en un medio de cultivo óptimo para la producción, se observó un buen crecimiento de las mismas en

todos los tratamientos realizados hasta aproximadamente los 16 días para disminuir ligeramente hasta el final del cultivo. En estudios realizados anteriormente con la misma línea celular se pudo determinar un crecimiento activo de las células a pesar de crecer en el medio que activa la producción de compuestos secundarios (Onrubia, 2012). En el caso de las células tratadas con diferentes CD, éstas mostraron un aumento del crecimiento similar al obtenido en los tratamientos control (comprendido entre 10 y 30 g PS de células/ L) llegando incluso a ser más elevado en las células elicidadas con HP- β -CD, indicando que la elicitación con CD no afectaba negativamente al crecimiento celular y que la estructura y grado de polimerización de dichas moléculas podía ser la causa de la diferente respuesta de la suspensión celular. La adición de MJ al medio de cultivo ocasionó un descenso de la capacidad de crecimiento, hecho ya constatado en otros cultivos celulares de *Taxus* (Furmanowa y cols., 2000; Baebler y cols., 2005). Por otro lado, aunque inicialmente la capacidad de formación de biomasa en los cultivos celulares elicitados con MJ (solo o en combinación con las diferentes CD) siguieron la misma tendencia que los tratamientos control y de CD solas, tras la adición de éste (día 7 del cultivo) (Figura 3), se produjo una reducción significativa en la generación de la biomasa, observándose a partir del día 12 un incremento lineal de la misma que alcanzó niveles similares al control al final del experimento. Los valores de viabilidad celular (medida como porcentaje de células vivas en relación al total), corroboran este hecho ya que en los cultivos celulares tratados con MJ se observó una disminución de células vivas, aunque en ningún caso, ésta resultó ser menor del 70% (Figura 4A). Resultados muy similares fueron descritos por Expósito y cols., (2010) en cultivos celulares de *T x media*. En los demás cultivos estudiados, la viabilidad celular se mantuvo muy alta, confirmando los resultados ya comentados para la formación de biomasa.

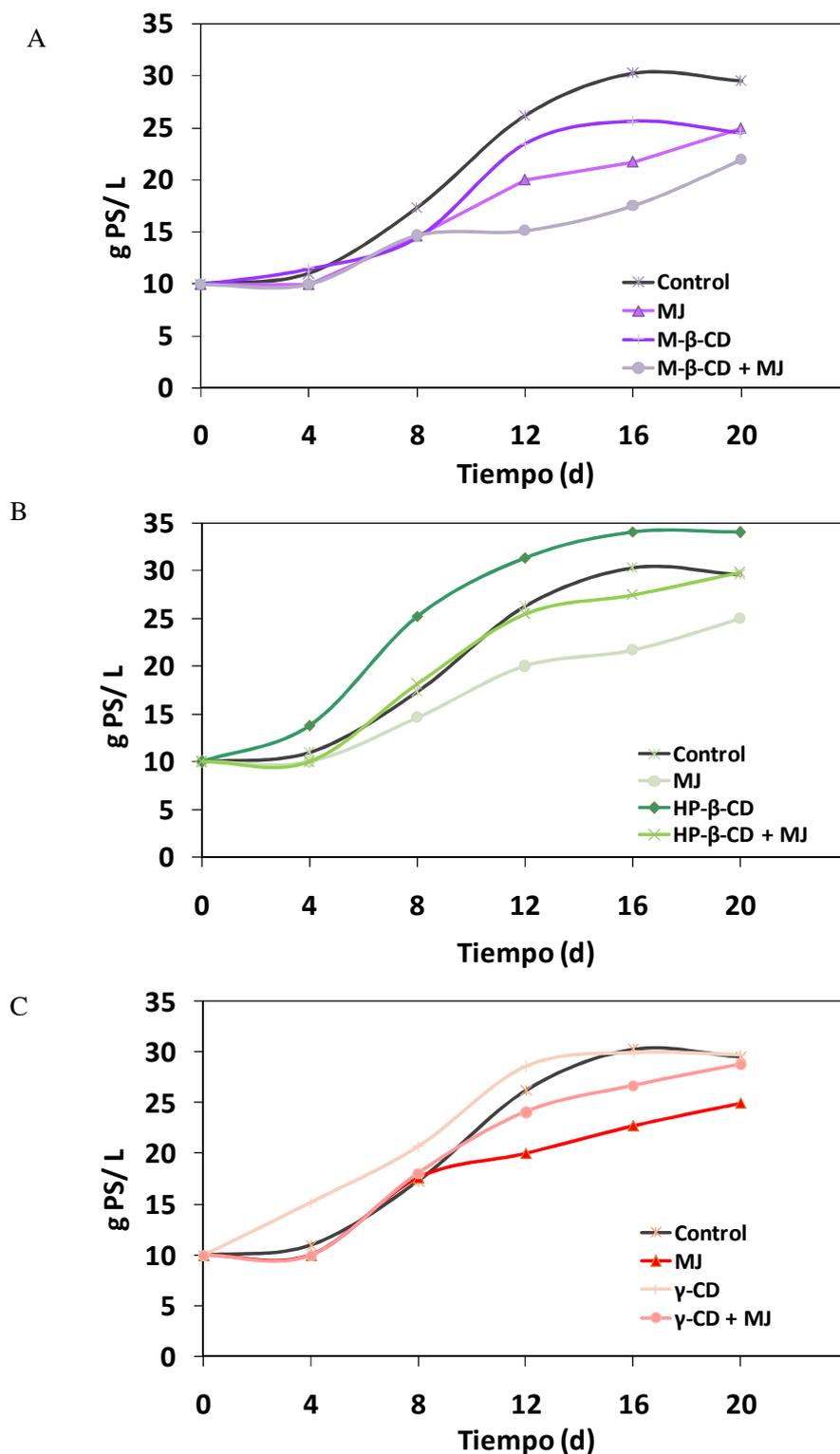


Figura 3. Variación de la biomasa celular durante la elicitación de cultivos celulares de *T. x media* con 50 mM de M-β-CD (A), HP-β-CD (B) y γ-CD (C) solas o en combinación con 100 μM de MJ. Las medidas están expresadas en g PS/ L y los valores representados son las medias ± DE de dos réplicas independientes.

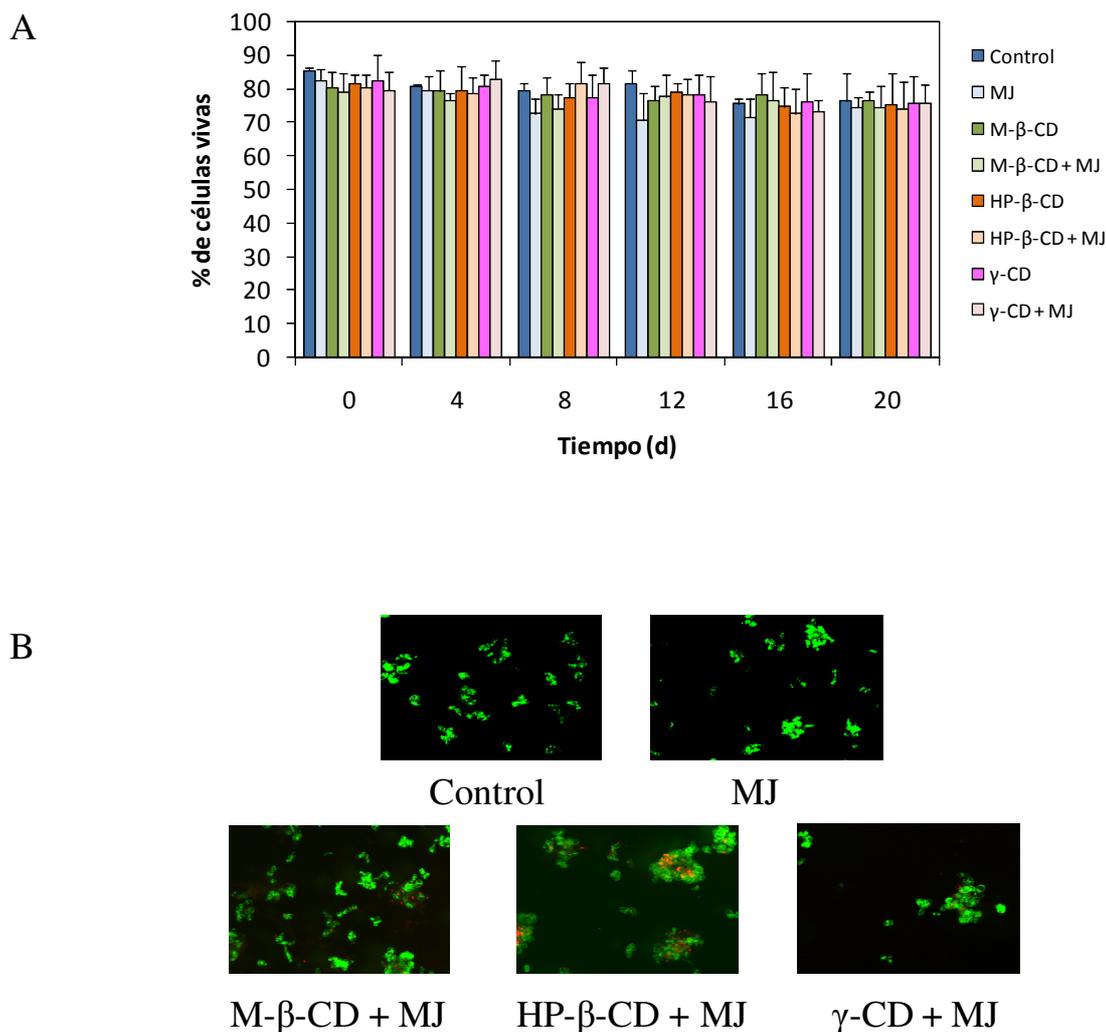


Figura 4. A. Viabilidad celular de los cultivos de *T. x media* crecidos durante 20 días en el medio de producción sin la adición de elicitores (control) o con 100 μ M de MJ solo o en combinación con 50 mM de CD. B. Imagen de las células teñidas con diacetato de fluoresceína (células verdes) y yoduro de propidio (células rojas).

Aunque la adición de un elicitador puede estimular la síntesis de metabolitos secundarios en cultivos celulares se ha demostrado que también puede provocar una inhibición del crecimiento y una rápida pérdida de la viabilidad celular. Diferentes autores (Yuan y cols., 2002b; Qiao y cols., 2003) analizaron si la disminución de la viabilidad celular se debía al efecto directo de los inductores o a la alta acumulación de metabolitos secundarios que podría resultar tóxico para las células. En este sentido, se han encontrado metabolitos secundarios que participan en los mecanismos de defensa que pueden inducir apoptosis celular (Knight y cols., 2001). Estudios realizados en cultivos celulares de *T. chinensis* y *T. baccata* revelaron que la formación de taxol podría estar relacionada con la muerte celular (Ma y cols., 2002; Expósito y cols.,

2009b). Además, Kim y cols., (2005) señalaron que, después del tratamiento con MJ, la pérdida de la viabilidad celular parecía estar relacionada con un nivel elevado de taxol y otros taxanos, en lugar de ser un efecto directo de la adición de MJ al medio de cultivo.

III. Identificación y cuantificación de taxanos en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con jasmonato de metilo y ciclodextrinas

Tras la elicitación de suspensiones celulares de *T. x media* en el medio de cultivo óptimo para la producción, suplementado con 50 mM de las CD consideradas en este estudio y 100 μ M de MJ, separadamente o en combinación, se realizó la extracción de los taxanos presentes en el medio extracelular y los extractos metanólicos obtenidos se analizaron mediante HPLC-DAD. De todos los taxanos presentes en el medio extracelular, se identificaron y cuantificaron el taxol, la 10-deacetilbacatina III, la bacatina III, el 10-deacetiltaxol y la cefalomanina (Figura 5).

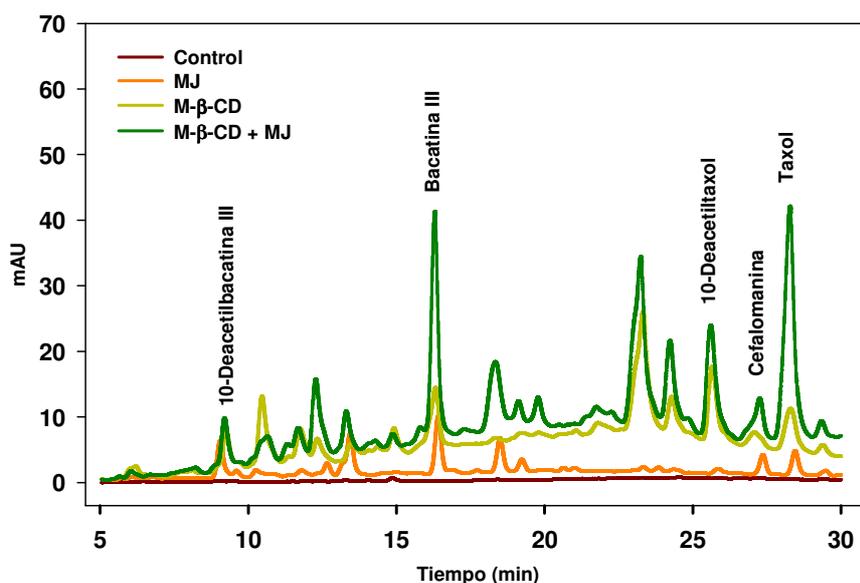


Figura 5. Cromatograma HPLC-DAD del extracto metanólico obtenido del medio extracelular de cultivos celulares de *T. x media* elicitados durante 20 días con 50 mM de M-β-CD y 100 μ M de MJ separadamente o en combinación.

IV. Caracterización de la producción de taxanos en suspensiones celulares de *T. x media*

IV.1. Estudio temporal y comparativo del efecto de la adición de distintos tipos de ciclodextrinas solas o en combinación con jasmonato de metilo sobre la producción de taxanos en suspensiones celulares de tejo

La fase de desarrollo del cultivo celular es un factor clave en la biosíntesis de compuestos secundarios, por ello, los elicitores se añadieron al medio de cultivo óptimo para la producción en dos momentos diferentes del cultivo. En el caso de las CD, éstas se adicionaron al medio de cultivo en el momento de la transferencia de las suspensiones celulares desde el medio óptimo para el crecimiento al medio óptimo para la producción, como se ha descrito en anteriores trabajos (Bru y cols., 2006), mientras que MJ se adicionó al medio después del mantenimiento de las células durante 7 días en el medio óptimo de producción. Diversos autores (Ketchum y cols., 1999; Kim y cols., 2005; Onrubia y cols., 2010a) han demostrado que la adición de MJ al medio a los 7 días de cultivo daba lugar a incrementos de producción más destacados puesto que las células ya se habían recuperado del estrés que representa la inoculación a medio fresco y además al haber mayor biomasa celular también podría implicar una mayor acumulación de los precursores de taxanos.

La presencia de MJ en el medio de cultivo condicionó el incremento de taxanos totales con respecto al cultivo control. En los cultivos elicitados con MJ, en el momento de la máxima producción, los contenidos de taxanos totales fueron más de 2 veces superiores a los correspondientes al cultivo control (Figura 6). La efectividad del MJ en el incremento de la producción de taxanos ha sido ya demostrada en numerosas ocasiones (Ketchum y cols., 1999; Yukimune y cols., 1996; Furmanowa y cols., 1996; Cusidó y cols., 2002; Bentebibel y cols., 2005).

La adición de las CD al medio de cultivo también ocasionó incrementos en el contenido de taxanos totales sin embargo, su mayor o menor eficacia como compuestos elicitores fue dependiente de su naturaleza química. La CD que más activó la biosíntesis de taxanos fue M- β -CD, que dio lugar a una producción de taxanos totales 2.4 veces superiores a la del control sin elicitar, seguida de la γ -CD (1.8 veces) y de la HP- β -CD (1.4 veces). A su vez, la producción máxima de taxanos en los cultivos elicitados con γ -

CD se alcanzó el día 16 de elicitación, mientras que en el caso de los cultivos elicitados con las otras CD ensayadas, tuvo lugar al final del cultivo (20 días) (Figura 6). La acción positiva de las CD sobre la activación del metabolismo secundario ya había sido demostrada previamente (Zamboni y cols., 2009). Así, en cultivos celulares de *V. vinifera* cv. Gamay, la producción de resveratrol se vio claramente incrementada por la adición de M- β -CD (Lijavetzky y cols., 2008; Martínez-Esteso y cols., 2011) y en cultivos celulares de *S lycopersicum* cv. Micro-Tom también se obtuvo una mayor producción de esteroides y taraxasterol tras la adición de CD al medio de cultivo (Briceño y cols., 2012). Sin embargo, esta es la primera vez que se ensaya la utilización de CD como elicitores con el fin de incrementar la producción de taxanos en suspensiones celulares de *T. x media*.

Resultados mucho más destacados se obtuvieron cuando las células fueron elicitadas con β - o γ -CD en combinación con MJ, el contenido total de taxanos se incrementó exponencialmente alcanzándose la máxima producción el día 16 (que se corresponde con 9 días de tratamiento con MJ) en el caso de las M- β -CD + MJ (103.80 ± 16.04 mg/L, Figura 6) y el día 20 en los cultivos elicitados con HP- β -CD + MJ y γ -CD + MJ (87.91 ± 12.74 y 175.77 ± 24.86 mg/L, respectivamente, Figura 6B y 6C).

Los resultados obtenidos (Figura 6) indican que la capacidad para producir y acumular taxanos en los cultivos celulares de *T. x media* elicitados conjuntamente con 50 mM de CD y 100 μ M de MJ varía en función de la naturaleza (β - y γ -CD) y el tipo de CD (M- β -CD y HP- β -CD) utilizadas como elicitor, tal como ya se ha indicado en los resultados correspondientes al crecimiento de los cultivos estudiados.

Los niveles de taxanos alcanzados corresponden a una productividad de 6.5 mg/L/día, 4.4 mg/L/día y 8.8 mg/L/día en los cultivos elicitados con MJ y M- β -CD, HP- β -CD y γ -CD, respectivamente. Estos valores de productividad se encuentran entre los más altos alcanzados en laboratorios académicos. La misma línea celular tratada con coronatina (1 μ M) dio lugar a unos valores de productividad de taxanos totales altos, del orden de 5 mg/L/día (Onrubia y cols., 2013a), pero la elicitación conjunta de CD con MJ superó ampliamente estos niveles.

Los valores de taxanos totales obtenidos en el tratamiento combinado de CD y MJ fueron siempre, como mínimo, 10 veces superiores a aquellos obtenidos en los

cultivos elicitados con cualquiera de las CD ensayadas o con MJ individualmente. A la vez, debemos destacar que los niveles de taxanos totales obtenidos en los cultivos tratados simultáneamente con MJ y cada una de las tres CD ensayadas, es decir M- β -CD, HP- β -CD o γ -CD resultaron ser del orden de 2.8, 3.0 y 5.5 veces superiores a la suma de taxanos totales obtenidos en los cultivos tratados con MJ más los alcanzados en aquellos suplementados individualmente con las CD estudiadas, siempre considerando el momento de producción máxima. Estos resultados sugieren que ambos tipos de elicitors actúan sinérgicamente en la producción de taxanos.

Por otro lado, los resultados mostrados en la Figura 7 indican que los cultivos celulares de *T. x media* elicitados con CD y MJ simultáneamente, tienen una elevada capacidad para excretar los taxanos desde las células productoras hacia el medio extracelular, observando una diferencia significativa entre el contenido intra- y extracelular de taxanos en todos los tratamientos realizados. Así, en los cultivos control, el contenido total de taxanos se mantuvo bajo a lo largo de todo el experimento en ambos espacios, observándose un ligero incremento a partir del día 12, acumulándose la mayor parte de éstos en el interior celular (~ 80%) transcurridos 20 días. En todos los cultivos estudiados se pudo observar que las CD adicionadas solas incrementan la capacidad de las células para excretar los taxanos formados ya que el porcentaje de excreción en los cultivos tratados con M- β -CD, HP- β -CD y γ -CD incrementó en 2, 1.6 y 1.5 veces, respectivamente, en relación al control sin elicitar. Bajo condiciones de elicitación con CD y MJ simultáneamente, el contenido total de taxanos en el interior de las células, a lo largo de todo el experimento, representó entre el 10-30% del contenido total, cuando las CD utilizadas fueron β -CD (M- β -CD y HP- β -CD), acumulándose, respectivamente una media del 87% y 74% de los taxanos formados en el medio extracelular. Sin embargo, cuando las células se estimularon con γ -CD y MJ, la capacidad celular para liberar los taxanos producidos al medio de cultivo resultó menor, obteniéndose niveles similares de taxanos intra- y extracelulares (~50% en ambos espacios al cabo de 20 días). También debemos destacar que la presencia de MJ en el medio de cultivo suplementado con CD potenció la capacidad celular para excretar los taxanos formados en todos los cultivos tratados con CD, ya que provocó un mayor porcentaje de excreción en todos ellos.

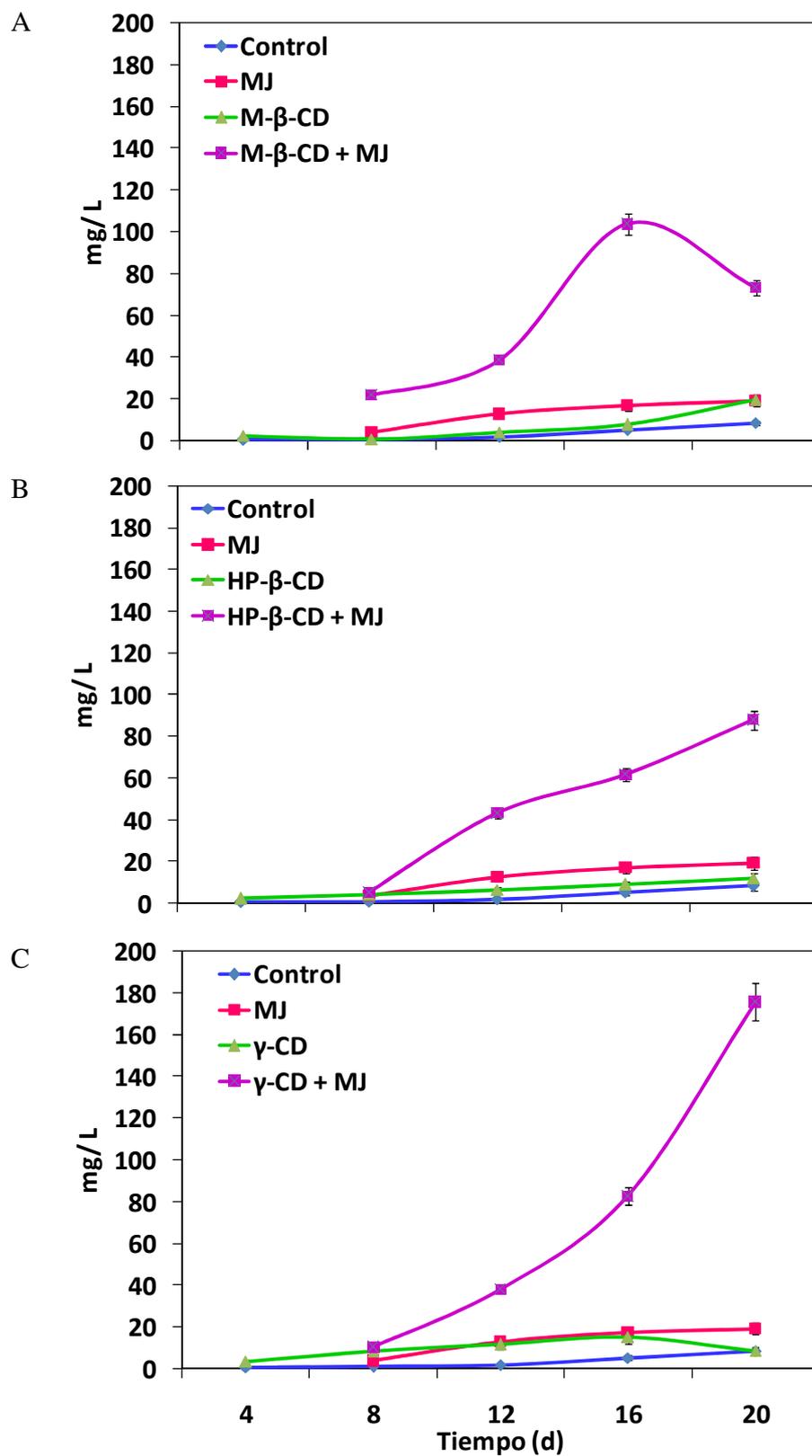


Figura 6. Variación de la producción de taxanos a lo largo del tiempo en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD (A), HP-β-CD (B) y γ-CD (C) separadamente o en combinación con 100 μM de MJ durante 20 días. Los valores representados son las medias ± DE de dos réplicas independientes.

Las CD, como se ha descrito en el apartado de Introducción son oligosacáridos cíclicos que se han mostrado muy eficaces en la inducción de respuestas de defensa en cultivos celulares de *V. vinifera* (Bru y cols., 2006), es decir, son compuestos que actúan como elicitores dando lugar a un marcado incremento de la producción de compuestos secundarios a la vez que también activa ciertos factores de transcripción (Zamboni y cols., 2009). Sin embargo, una de las propiedades más destacadas de las CD es, debido a su estructura molecular, formar complejos de inclusión con compuestos poco hidrosolubles, que facilitan su salida de las células y su aislamiento en el medio cultivo. Los resultados descritos hasta el momento demuestran que también en cultivos celulares de *T x media*, las CD ensayadas, y en especial las β -CD, probablemente separan los taxanos formados en el citoplasma activo y una vez en el medio de cultivo, también éstos quedan secuestrados. Todo ello es probablemente la causa de los altos niveles de producción alcanzados en los cultivos tratados con β -CD y MJ, ya que los procesos de retroinhibición y la posible toxicidad de los taxanos, que generalmente limitan la producción, en este caso no son patentes.

Los resultados obtenidos demuestran que, aunque la elicitación conjunta de MJ con γ -CD resultó ser el tratamiento que condicionó los mayores niveles de taxanos totales, la capacidad de las células para liberar los taxanos formados fue limitada. Contrariamente, en los cultivos tratados simultáneamente con MJ y M- β -CD la liberación de los taxanos al medio de cultivo fue casi total, aunque los niveles de producción no fueron tan elevados (Figura 7). Por ello, en el momento de máxima producción, se encontraron mayores concentraciones de taxanos en el medio suplementado con MJ y M- β -CD que en aquel suplementado con MJ con γ -CD, hecho que resultó básico para el planteamiento de los nuevos ensayos llevados a cabo en este trabajo de Tesis Doctoral.

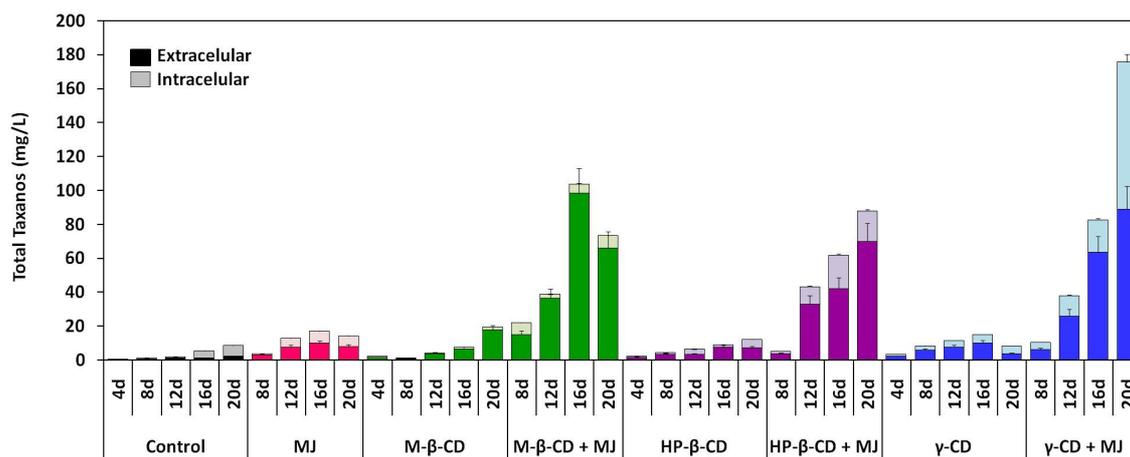


Figura 7. Capacidad de excreción de taxanos desde las células productoras (colores claros) hacia el medio extracelular (colores oscuros) en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD (■), HP-β-CD (■) y γ-CD (■) separadamente o en combinación con 100 μM de MJ (■) durante 20 días. Los valores representados son las medias ± DE de dos réplicas independientes.

En cuanto a los niveles de producción de cada taxano individualmente (expresado como % del total de taxanos producidos) (Figura 8) se puede ver que, el taxano encontrado en mayor proporción en los cultivos celulares de *T. x media* varió dependiendo del tipo de CD. En el caso de las β-CD metiladas al azar (M-β-CD, Figura 8A), el taxano más abundante, fue el taxol, el cual representó aproximadamente entre el 70-80 % del contenido total de taxanos siendo el 2º taxano más abundante la bacatina III, que representó el 15%. Por otro lado, en presencia de CD hidroxipropiladas (HP-β-CD, Figura 8B), se obtuvo una producción de taxanos variable a lo largo del tiempo acumulándose en mayor proporción el taxol (65-70%) durante los primeros 12 días de elicitación, el cual disminuyó hasta el 30-45% hacia el final del experimento siendo el taxano más abundante en este intervalo la bacatina III, que representó alrededor del 45%. Sin embargo, cuando las células fueron elicidadas con γ-CD (Figura 8C) se incrementó significativamente la producción de bacatina III a partir de 16 días en detrimento del taxol siendo aproximadamente el 56% frente a un 23% de taxol. Este hecho demuestra la importancia de la capacidad excretora de las células productoras para la formación de taxol, ya que, aunque los niveles de taxanos totales fueron muy superiores en este último cultivo con respecto a los demás, los niveles de taxol obtenidos resultaron significativamente menores. Probablemente la toxicidad de este compuesto para la propia célula que lo produce limitó su biosíntesis, hecho que provocó la acumulación de su precursor inmediato, la bacatina III.

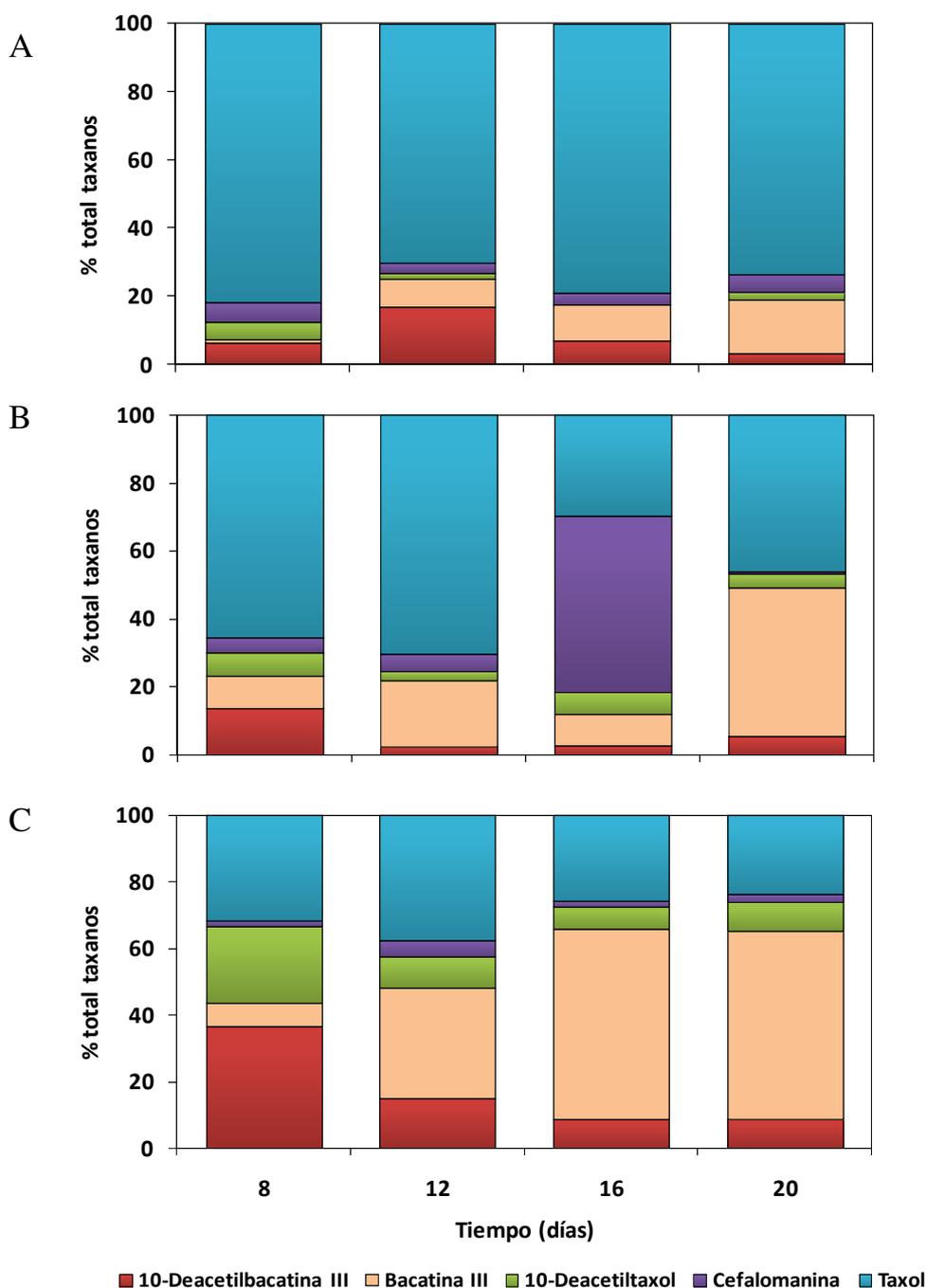


Figura 8. Proporción de taxanos, expresado como porcentaje del contenido total de taxanos, en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M- β -CD (A), HP- β -CD (B) y γ -CD (C) en combinación con 100 μ M de MJ a lo largo del tiempo.

Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de las CD para formar complejos de inclusión con los taxanos permitiendo no sólo la acumulación extracelular de estos compuestos, evitando su efecto tóxico sobre las células productoras, sino también facilitando su recuperación del medio extracelular por lo que se abre una nueva

vía para la producción de estos metabolitos a partir de suspensiones celulares de *T. x media* elicidadas conjuntamente con CD y MJ.

V. Análisis de los niveles de expresión de los genes que codifican enzimas clave de la ruta de biosíntesis de taxanos utilizando cultivos celulares de *T. x media* elicitados con jasmonato de metilo y ciclodextrinas separadamente o en combinación

Una vez establecido que, el tratamiento más efectivo resultó ser la adición de M- β -CD junto con MJ puesto que además de condicionar una alta producción de taxol y taxanos de interés, también promovía su liberación, de forma que dichos compuestos se encontraban casi exclusivamente en el medio de cultivo, se procedió a analizar la relación entre los niveles de acumulación de taxanos y la expresión de los genes que codifican para enzimas clave de la ruta de biosíntesis del taxol. Para ello, los cultivos celulares de *T. x media* se elicitaron con 50 mM de M- β -CD y 100 μ M de MJ separadamente o en combinación y se mantuvieron durante 23 días en oscuridad, en el medio de cultivo óptimo para la producción. Durante ese tiempo, se recogieron muestras periódicas para analizar, tanto el contenido total e individual de taxanos mediante HPLC-DAD como el perfil de expresión de los genes que codifican para enzimas clave que controlan la biosíntesis de estos compuestos, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), con el fin de buscar una interrelación entre los resultados obtenidos en los estudios metabólicos y los transcriptómicos llevados a cabo.

La Figura 9 muestra el contenido total de taxanos obtenido tras la elicitación de los cultivos celulares de *T. x media* con M- β -CD sola o en combinación con MJ. Como se puede observar en dicha figura, el contenido total de taxanos incrementó significativamente cuando las células fueron transferidas al medio óptimo para la producción en presencia de estos elicitors ya que, en los cultivos control, la acumulación total de taxanos se mantuvo baja durante todo el experimento, observándose un ligero incremento a partir del día 10 del cultivo, el cual se mantuvo estable en torno a 5 mg/ L hasta el día 21. En los cultivos celulares elicitados en presencia de M- β -CD solas, la cantidad de taxanos acumulados fue oscilante, situándose los niveles de producción entre 5 y 18 mg/ L. Por el contrario, bajo condiciones de elicitación en presencia únicamente de MJ, se observó un aumento significativo de la

producción total de taxanos tras la adición del mismo (día 7 del cultivo), alcanzándose los mayores niveles de producción a partir del día 18 (40.33 ± 6.05 mg/ L). Del mismo modo, cuando las células se trataron con ambos elicitores, se produjo un incremento lineal en la acumulación total de taxanos, alcanzando valores máximos tras 23 días de tratamiento (142.21 ± 17.22 mg/ L). Es destacable de nuevo el efecto sinérgico de ambos elicitores, sobre la producción de taxanos puesto que, en el momento de la máxima producción, el total de taxanos de los cultivos elicitados individualmente con M- β -CD y MJ resultó ser aproximadamente 3 y 9 veces superior al control, en cambio en los cultivos suplementados con ambos elicitores, el nivel de taxanos alcanzado superó en 23 veces el de los cultivos control.

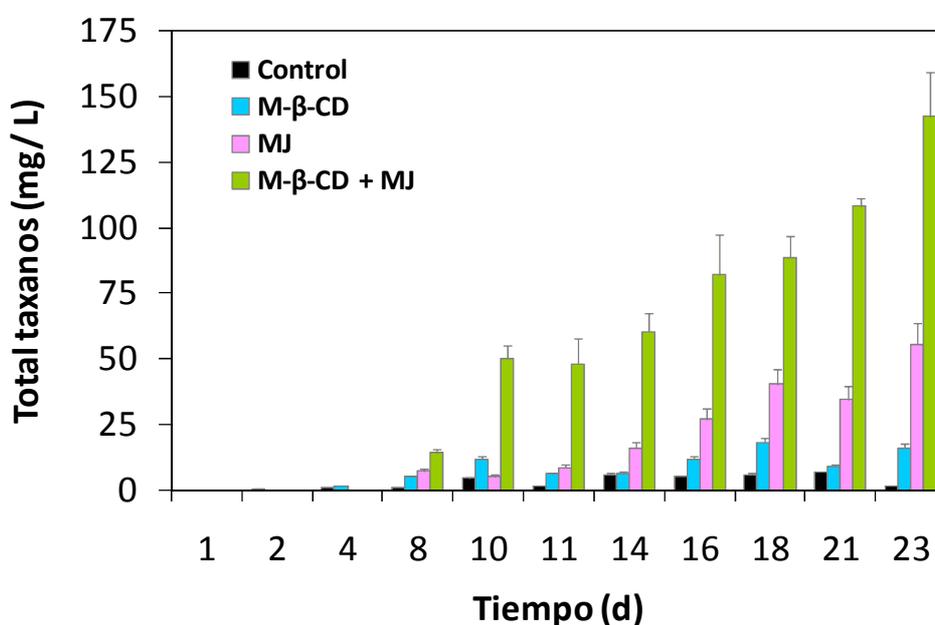


Figura 9. Contenido total de taxanos (extra- e intracelular) en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M- β -CD separadamente o en combinación con 100 μ M de MJ durante 23 días. Los valores representados son las medias \pm DE de dos réplicas independientes.

Asimismo, con el fin de conocer el mecanismo de acción de estos elicitores sobre la biosíntesis de taxanos, se determinaron los perfiles de transcripción de algunos genes que codifican para diferentes enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis del taxol y otros taxanos relacionados, mediante qRT-PCR y su relación con el perfil de acumulación de los taxanos analizados. Los genes, cuyo patrón y niveles de expresión

se estudiaron fueron: *TXS* (taxadieno sintasa), que controla el primer paso comprometido de la ruta de biosíntesis del taxol; *T7 β OH* (taxano 7 β -hidroxilasa) y *DBAT* (10-deacetilbacatina III-10 β -*O*-acetiltransferasa), que controlan pasos intermedios de la ruta; *BAPT* (bacatina III-3-amino-13-fenilpropanoiltransferasa) y *DBTNBT* (3'*N*-benzoiltransferasa) que están implicadas en los últimos pasos de la ruta biosintética del taxol. Además, con el fin de estandarizar los resultados, seleccionamos como valor de referencia (nivel de expresión =1), el nivel de acumulación del ARNm de cada gen en los cultivos celulares que se encontraban 14 días creciendo en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento. Así, para llevar a cabo este estudio, la expresión de los genes considerados fue determinada desde el día 1 hasta el día 11 en el caso de los tratamientos control y de M- β -CD, y desde 1h hasta 96 h después de la adición de MJ en los tratamientos de MJ sólo y en combinación con M- β -CD, ya que éste fue adicionado al medio de cultivo óptimo para la producción una vez que las células habían estado creciendo durante 7 días en dicho medio suplementado o no con M- β -CD.

La expresión de los genes estudiados no se vió significativamente incrementada por la presencia de M- β -CD individualmente en el medio de cultivo ya que en la mayoría de ellos, la acumulación de sus transcritos no duplicó el valor de referencia. Tampoco los cultivos control presentaron incrementos claros de acumulación de transcritos de los genes estudiados por lo que básicamente se comentarán los cambios en los patrones de expresión observados en los cultivos elicitados con MJ o MJ junto con M- β -CD. Puesto que el MJ fue adicionado el día 7 de cultivo, los resultados se comentarán en base a la adición de dicho elicitor, es decir considerando los tiempos de determinación de la expresión génica a partir de dicho momento.

La expresión del primer gen implicado en la ruta biosintética del taxol, *TXS*, fue fuertemente incrementada por la presencia de los elicitores a partir del día 7 del cultivo (Figura 10). La acumulación de transcritos de gen *TXS* en los cultivos celulares tratados con MJ, incrementó considerablemente tras 4 horas de tratamiento (7d-4h), alcanzándose los mayores niveles de acumulación tras 72 horas después de la adición del mismo. En ese punto los niveles de ARNm para el gen *TXS* fueron del orden de 16.7 veces superiores al tratamiento control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vongpaseuth y Roberts, (2007), quienes mostraron que la expresión de genes implicados en los primeros pasos de la ruta de biosíntesis del taxol (GGPPS y *TXS*)

aumentaban 6 h después de la elicitación con MJ, alcanzando el máximo de 1-2 días después de la elicitación.

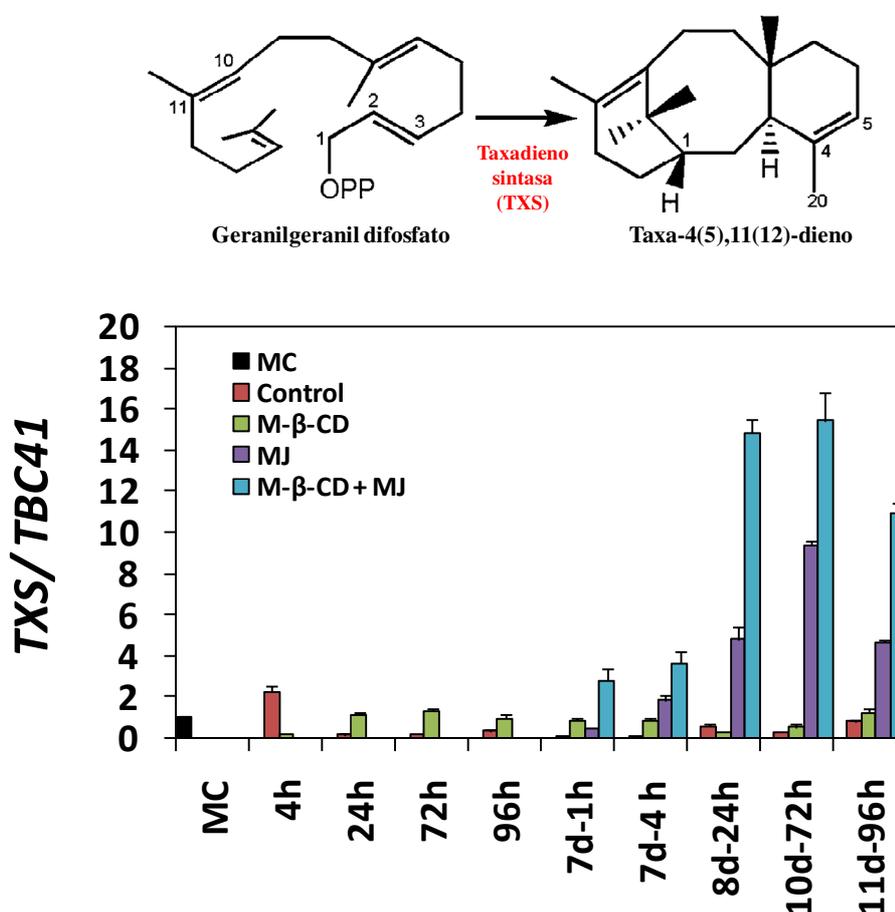


Figura 10. Variación de la expresión relativa de del gen *TXS* en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD y 100 μM de MJ separadamente o en combinación. Los ARN mensajeros se analizaron mediante qRT-PCR frente al gen de referencia *TBC41*. MC: cultivos celulares crecidos durante 14 días en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento. Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes.

Asimismo, la expresión de *TXS* fue mayor en el tratamiento con ambos elicitores en todos los tiempos analizados, alcanzándose el máximo nivel de expresión, con una acumulación de transcritos 16 veces superior al valor de referencia, entre los 8 y 10 días después de la adición de MJ, para posteriormente disminuir aunque se mantuvo elevado hasta el día 11 del cultivo. En este sentido, la combinación de ambos elicitores provocó un incremento de la expresión de *TXS* que fue del orden de 1.5 veces superior a la suma obtenida del tratamiento individual con M-β-CD y MJ en el punto 10d-72h, existiendo

también en este caso, un efecto sinérgico entre ambos elicitores sobre los niveles de expresión de gen *TXS* (Figura 10).

En los pasos intermedios de la ruta de biosíntesis del taxol, la enzima $T7\beta OH$ cataliza la hidroxilación del C7 del esqueleto de taxano. Al igual que en el caso anterior, la expresión del gen *T7 βOH* también aumentó después de la elicitación. Como muestra la Figura 11, la acumulación de transcritos de este gen fue significativamente mayor en los cultivos celulares tratados con MJ, solo o en combinación con M- β -CD, que en los cultivos tratados sólo con M- β -CD y en los cultivos control. Así, bajo condiciones de elicitación con MJ, la expresión de *T7 βOH* se incrementó inmediatamente tras la adición del mismo (día7-1h), alcanzando el máximo nivel de expresión tras 4 horas de elicitación, momento en que la acumulación de sus transcritos resultó ser 150 veces el valor de referencia. A continuación, disminuyó (8d-24h) para aumentar nuevamente (10d-72h), manteniéndose estable hasta las 96h estudiadas. Por otro lado, cuando las células se elicitaron con M- β -CD, los niveles de acumulación de transcritos de *T7 βOH* se mantuvieron bajos, sólo del orden de 6.7 veces superiores al valor de referencia, durante todo el experimento. Sin embargo, la acción conjunta de ambos elicitores provocó un muy marcado incremento de la expresión de *T7 βOH* , observándose dos picos máximos de expresión transcurridas 4 y 72 horas de elicitación (con acumulaciones de transcritos superiores a 400 veces el valor de referencia), que fueron del orden de 71.4 y 99 veces superiores, respectivamente, a la suma de los niveles de expresión encontrados en las células tratadas con M- β -CD y MJ a esos tiempos, mostrando de nuevo un claro efecto sinérgico entre ambos elicitores (Figura 11).

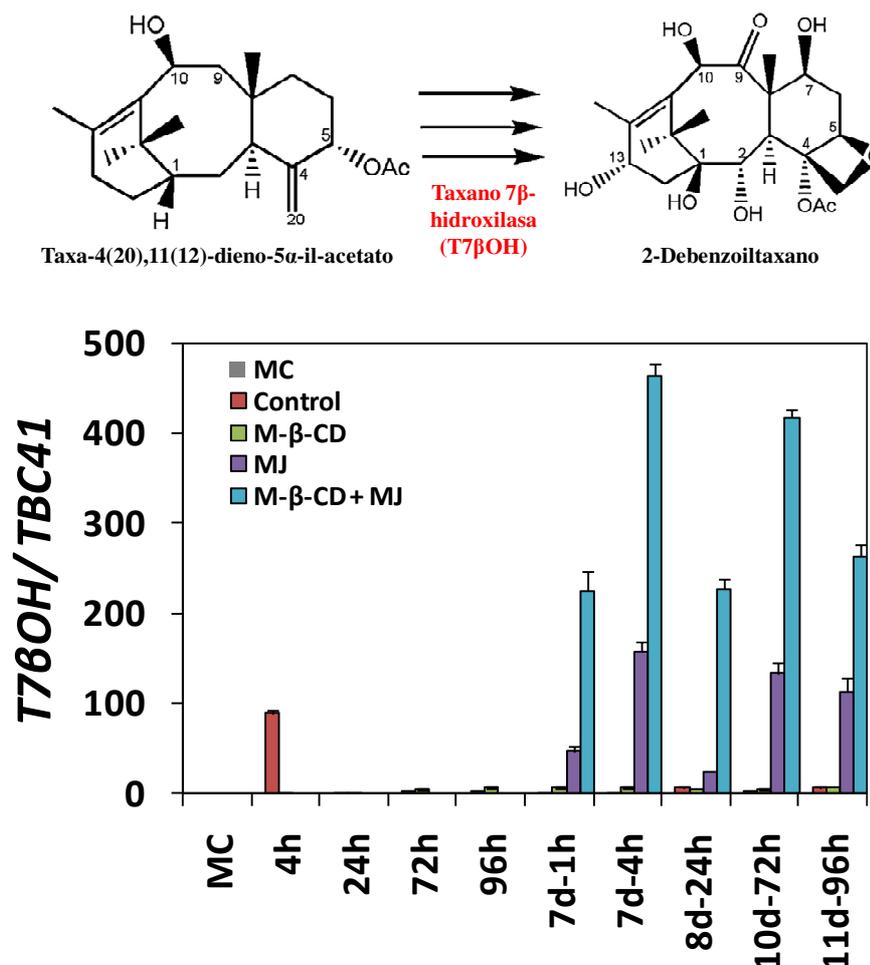


Figura 11. Variación de la expresión relativa de del gen *T7βOH* en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD y 100 μM de MJ separadamente o en combinación. Los ARN mensajeros se analizaron mediante qRT-PCR frente al gen de referencia *TBC41*. MC: cultivos celulares crecidos durante 14 días en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento. Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes.

Por otro lado, también se estudió el nivel de expresión del gen que codifica para la enzima DBAT, responsable de la conversión de 10-deacetilbacatina III a bacatina III. Como se observa en la Figura 12, la expresión del gen *DBAT* también incrementó bajo condiciones de elicitación con MJ, aunque se observó un incremento inicial en el tratamiento control y de M-β-CD a las 4 y 24 horas, respectivamente, disminuyendo durante el resto del experimento. En el caso de los cultivos celulares tratados con MJ, la expresión del gen *DBAT* se incrementó desde el inicio (7d-1h) y alcanzó el nivel máximo a las 72 horas (10d-72h) (2.4 y 12.7 veces superior al valor de referencia y al control, respectivamente), disminuyendo a las 96h. Una vez más, la acción combinada de ambos elicitors produjo la mayor acumulación de transcritos, observándose aparentemente dos picos máximos de expresión, transcurridas 4 y 72 horas de

elicitación, que fueron del orden de 14.1 y 24.3 veces superiores a la suma de los niveles de expresión de las células tratadas con M- β -CD y MJ individualmente a esos tiempos, haciendo patente de nuevo un efecto sinérgico entre ambos elicitors.

Sin embargo, que el incremento de expresión de este gen debido a la elicitación fue poco destacado ya que en ningún caso superó a 7 veces el valor de referencia, respuesta mucho más limitada que la que se observó en los genes estudiados anteriormente. Es decir la respuesta del gen *DBAT* a la elicitación con M- β -CD y MJ resultó limitada.

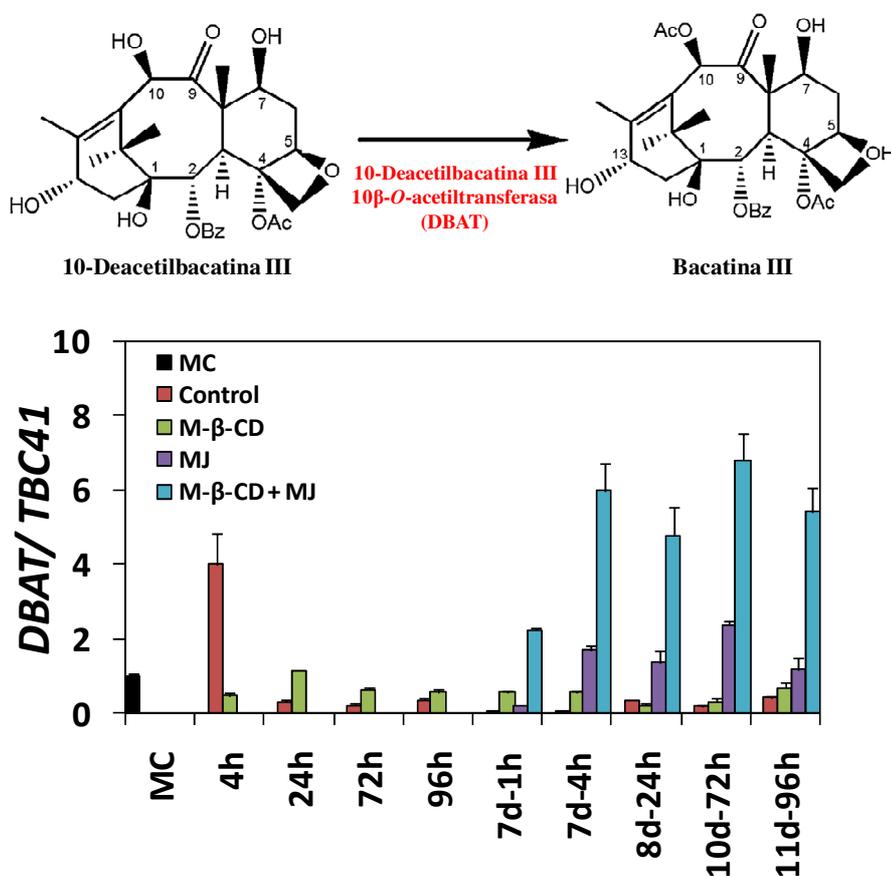


Figura 12. Variación de la expresión relativa de del gen *DBAT* en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M- β -CD y 100 μ M de MJ separadamente o en combinación. Los ARN mensajeros se analizaron mediante qRT-PCR frente al gen de referencia *TBC41*. MC: cultivos celulares crecidos durante 14 días en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento. Los valores representados son las medias \pm DE de tres réplicas independientes.

Con el fin de establecer la relación que puede existir entre la producción de taxanos y la acumulación de transcritos de los genes involucrados en su biosíntesis,

debemos considerar que la DAB III y la bacatina son dos compuestos cuya producción podría estar regulada por la expresión de los genes estudiados hasta el momento, es decir, los genes *TXS*, *T7 β OH* y *DBAT*. Los niveles de producción de DAB III (Figura 13A) fueron variables tanto en los cultivos control como en los cultivos elicitados con M- β -CD y MJ individualmente, manteniéndose bajos (< 5 mg/ L) a lo largo de todo el experimento, mientras que en el tratamiento combinado se observó un incremento (14.03 mg/ L) al final del mismo. Sin embargo, los niveles más elevados de bacatina III se obtuvieron en presencia MJ solo o en combinación con M- β -CD (a lo largo de todo el experimento) (Figura 13B). Estos resultados sugieren una transformación activa de la DAB III en bacatina III en la línea celular de *T. x media* estudiada. El hecho de que la acumulación de bacatina III fuese tan elevada en relación a la acumulación de DAB III podría indicar que, aunque la expresión del gen que codifica para la enzima DBAT no era muy elevada (Figura 12), si que fue suficiente para dar lugar a la cantidad de enzima activa necesaria para no limitar el proceso biosintético que lleva a la síntesis de taxol. Es decir, la enzima DBAT no parece controlar un paso limitante de esta ruta biosintética. En ese sentido, Onrubia y cols., (2013a), indicaron que la enzima DBAT, probablemente no controla un paso flujo-limitante y que la producción de bacatina III depende más de los niveles de precursores formados que de la cantidad de enzima formada.

Los dos últimos genes estudiados, implicados en la ruta de biosíntesis del taxol, codifican dos transferasas, el gen *BAPT* (Figura 14) que codifica para la enzima BAPT que es responsable de la unión de la cadena lateral a bacatina III, dando lugar a la formación de taxanos que contienen derivados de la β -fenilalanina como cadena lateral y el gen *DBTNBT* (Figura 15A) que codifica para la enzima DBTNBT, que está implicada en la benzoilación de la cadena lateral, último paso metabólico que conduce a la síntesis del taxol. Como se observa en dichas figuras, tanto los cultivos control como los elicitados con M- β -CD, presentaron un ligero incremento en la expresión de estos dos genes durante todo el tiempo del experimento, aunque en ningún caso resultaron superiores a 10 veces el valor de referencia, es decir, también en este caso, el incremento de expresión de ambos genes en condiciones de elicitación fue limitado (Figuras 14 y 15A).

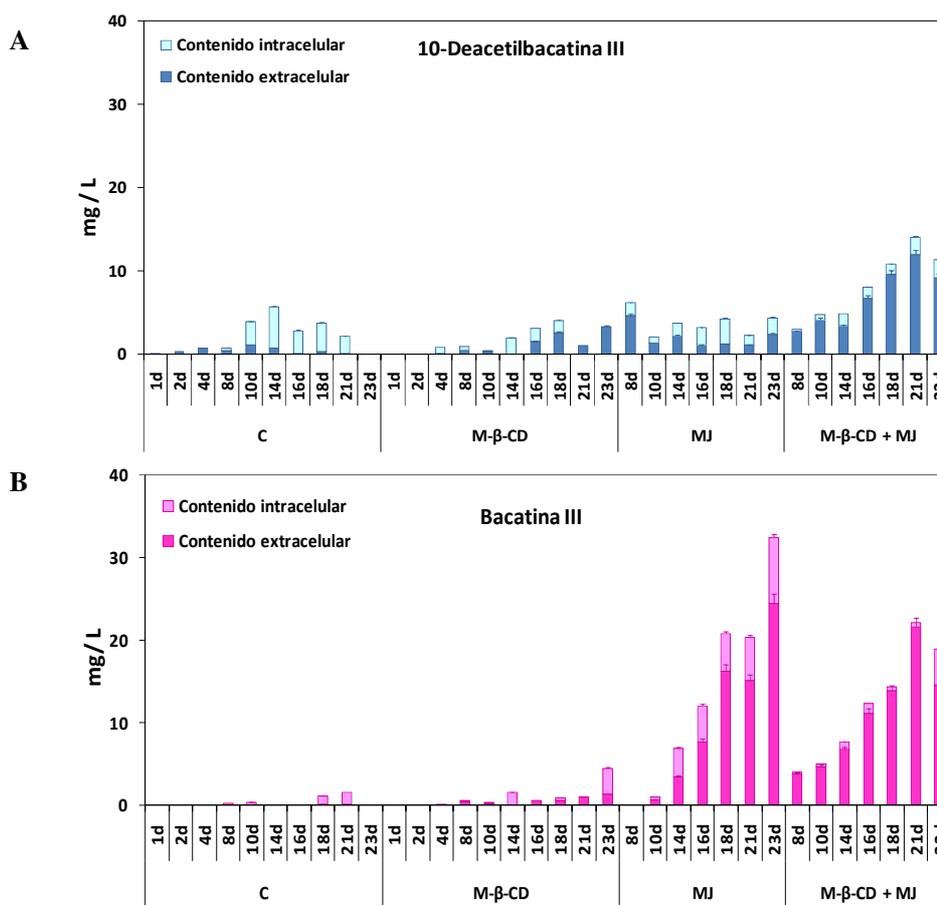


Figura 13. Contenido total (extra- + intracelular) de 10-deacetilbacatina III (A) y bacatina III (B) en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD y 100 μM de MJ separadamente o en combinación, durante 23 días en medio de cultivo óptimo para la producción. Los valores representados son las medias ± DE de dos réplicas independientes.

En las células tratadas sólo con MJ, la acumulación de transcritos para el gen *BAPT* comenzó después de 1h de elicitación alcanzando su máximo a las 96 horas (11d-96h), con niveles de expresión 42.4 veces superiores al tratamiento control, mientras que en el caso de gen *DBTNBT*, la mayor acumulación de transcritos tuvo lugar a partir de 72 horas (10d-72h) de elicitación (7.63 veces superior al control en ese punto). Sin embargo, la combinación de ambos elicitores provocó un efecto sinérgico tanto en el nivel de expresión del gen *BAPT* como en el del gen *DBTNBT*. En el caso concreto de *BAPT* (Figura 14), los mayores niveles de expresión se observaron durante las primeras 4 horas de tratamiento y a continuación, disminuyeron progresivamente hasta alcanzar el mismo nivel de expresión que al final del tratamiento con MJ individualmente (11d-96h). En el caso del gen *DBTNBT* (Figura 15A), la presencia conjunta de MJ y M-β-CD produjo dos picos máximos transcurridas 1 (7d-1h) y 72 horas (10d-72h) de elicitación, que fueron del orden de 2.5 y 1.5 veces superiores a la suma de los niveles de expresión

encontrados en las células tratadas con MJ y M-β-CD individualmente, en esos dos puntos. Un hecho destacable es que la presencia de M-β-CD en el tratamiento combinado produjo una activación más temprana de estos dos genes, con respecto a la observada en los cultivos elicitados con tan sólo MJ, como se observa en las Figuras 14 y 15A.

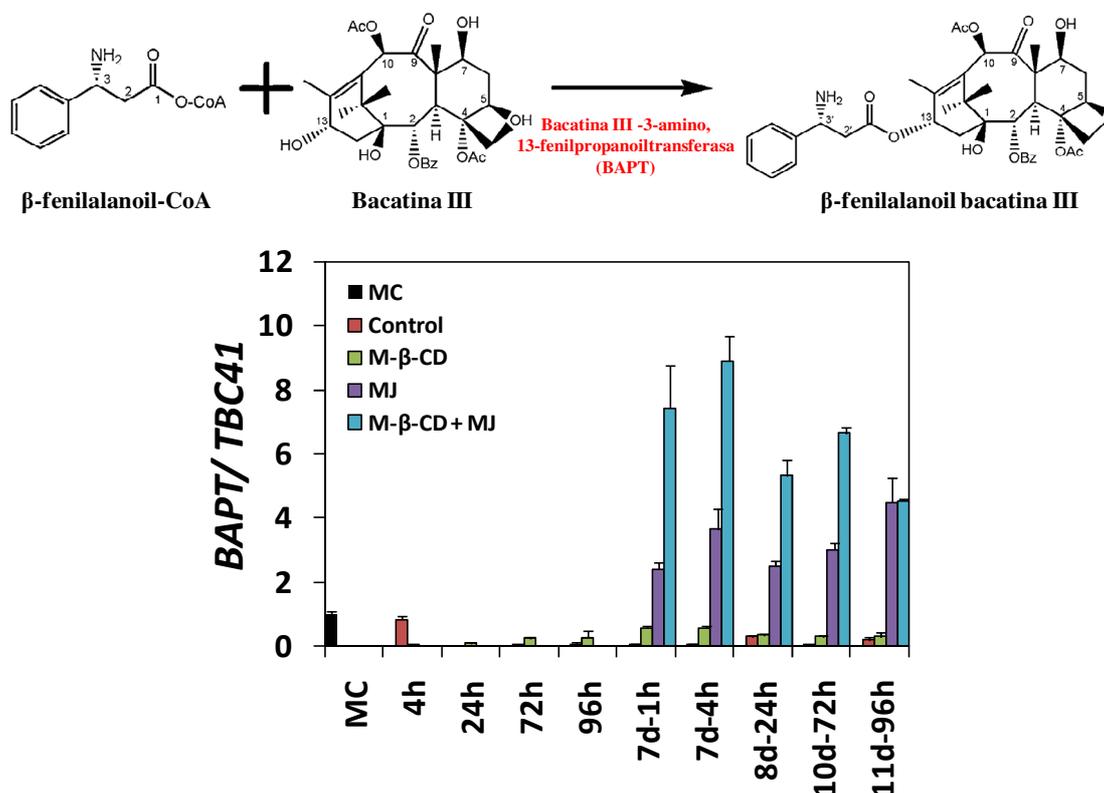


Figura 14. Variación de la expresión relativa del gen *BAPT* en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD y 100 μM de MJ separadamente o en combinación. Los ARN mensajeros se analizaron mediante qRT-PCR frente al gen de referencia *TBC41*. MC: cultivos celulares crecidos durante 14 días en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento. Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes.

En relación a la biosíntesis del taxol, que se sintetiza después de la benzoilación del 3'-*N*-debenzoiltaxol por acción de la enzima DBTNBT, se observó la mayor acumulación en el tratamiento conjunto de M-β-CD y MJ, al final del experimento (65.01 mg/ L) (Figura 15B), mientras que en el caso de los cultivos celulares tratados con MJ y M-β-CD por separado, la cantidad de taxol acumulado fue de 5.9 y 13.9 mg/ L, respectivamente, mostrando un efecto sinérgico por la acción conjunta de ambos elicitores. Este incremento en los niveles de producción del taxol no se correlacionaron con el incremento de la expresión del gen *DBTNBT* inducido por la presencia de ambos

elicitores, ya que, en dichas condiciones, los niveles de taxol resultaron prácticamente 60 veces superiores a los contenidos del cultivo control, mientras que la expresión de este gen tan sólo incrementó en unas 6-8 veces. La limitada acumulación de transcritos para los genes *BAPT* y *DBTNBT* no pueden pues responder a la destacada producción de taxol encontrada en los cultivos celulares de *T x media* elicitados conjuntamente con MJ y M- β -CD.

Asimismo, también se cuantificaron el deacetiltaxol (DAT) y la cefalomanina. Como se observa en la Figura 16, el contenido de DAT y cefalomanina fue indetectable o muy bajo (≤ 5 mg/ L) tanto en los cultivos control como en los cultivos celulares elicitados con M- β -CD y MJ individualmente. Sin embargo, la presencia conjunta de ambos elicitores dio lugar a un aumento de su producción, siendo máxima entre los días 16-18 (16.6 mg/ L) y el día 23 (37.9 mg/ L) en el caso del DAT y la cefalomanina, respectivamente. En cuanto a su biosíntesis, probablemente bacatina III y β -fenilalanoil CoA sean necesarias para la biosíntesis del DAT, así como la enzima BAPT. Sin embargo, no está claro si el DAT se forma como un producto de la degradación del taxol o si se forma a través de una reacción secundaria de la ruta de biosíntesis del taxol. En cuanto a la cefalomanina, también requiere de la enzima BAPT para su formación, pero no de DBTNBT. De hecho, la cefalomanina es muy similar estructuralmente al taxol, sólo difieren en la presencia de un grupo *N*-tigloilo en la posición C3' de la cadena lateral en lugar de un grupo *N*-benzoilo. Dado que los niveles de taxol fueron mayores que los de cefalomanina, se podría sugerir que la/las etapa/s metabólica/s que conducen a la síntesis de esta última se producen con menos eficiencia que las conducentes a la formación de taxol.

Los resultados descritos indican que los niveles de transcripción de estos genes podrían, en la mayoría de los casos, estar correlacionados con los niveles de taxanos producidos en presencia de M- β -CD separadamente o en combinación con MJ, ya que el efecto sinérgico observado en la acumulación de taxanos es consecuencia del efecto sinérgico detectado en la expresión de genes, aunque los niveles máximos de transcritos se alcanzan al inicio de la elicitación, mientras que la mayor acumulación de taxanos se produce transcurridos 23 días de tratamiento (Figura 9).

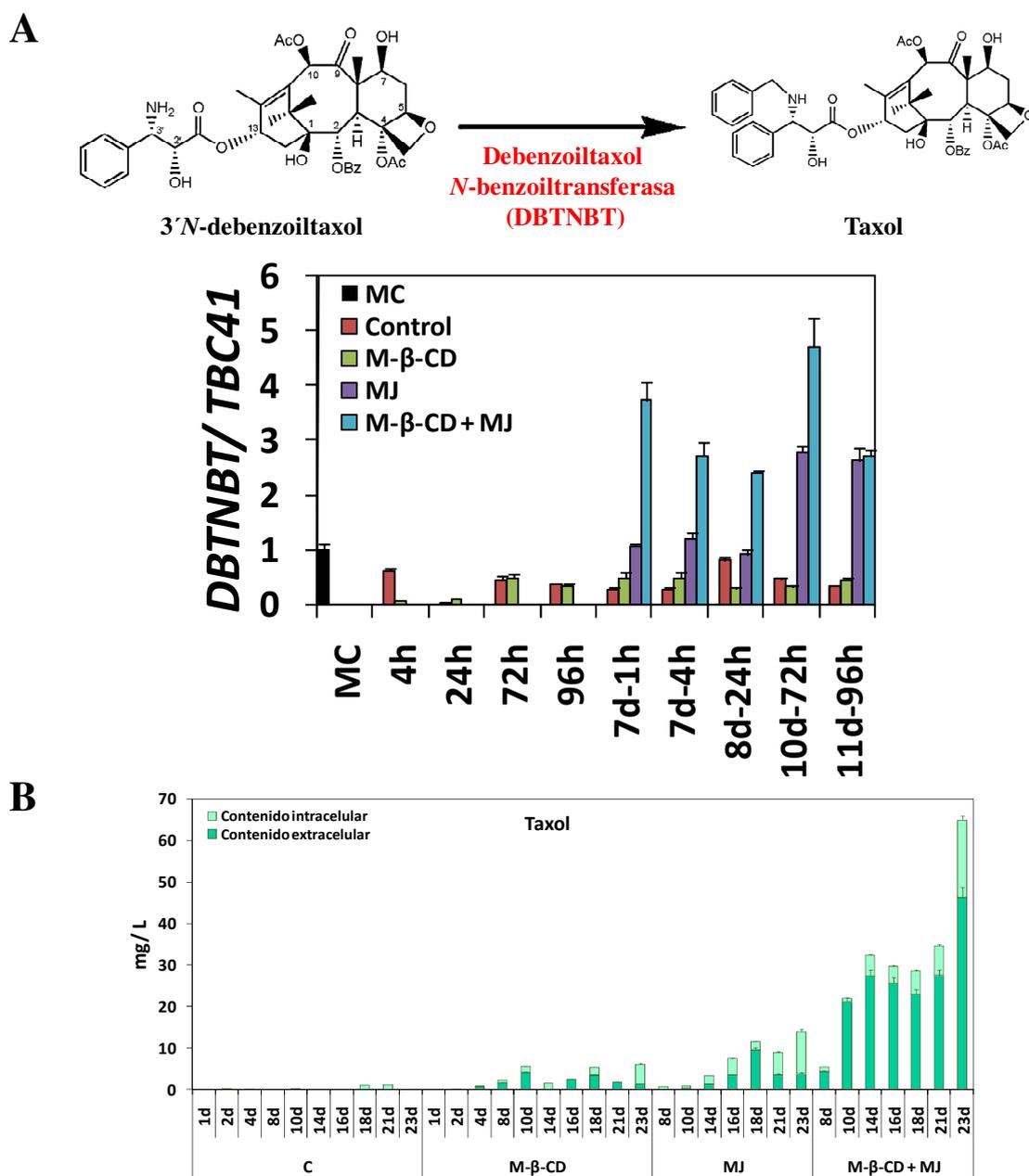


Figura 15. Variación de la expresión relativa de del gen *DBTNBT* (A) y del contenido total (extra- + intracelular) de taxol (B) en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD y 100 μM de MJ separadamente o en combinación. Los ARN mensajeros se analizaron mediante qRT-PCR frente al gen de referencia *TBC41*. MC: cultivos celulares crecidos durante 14 días en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento. Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes.

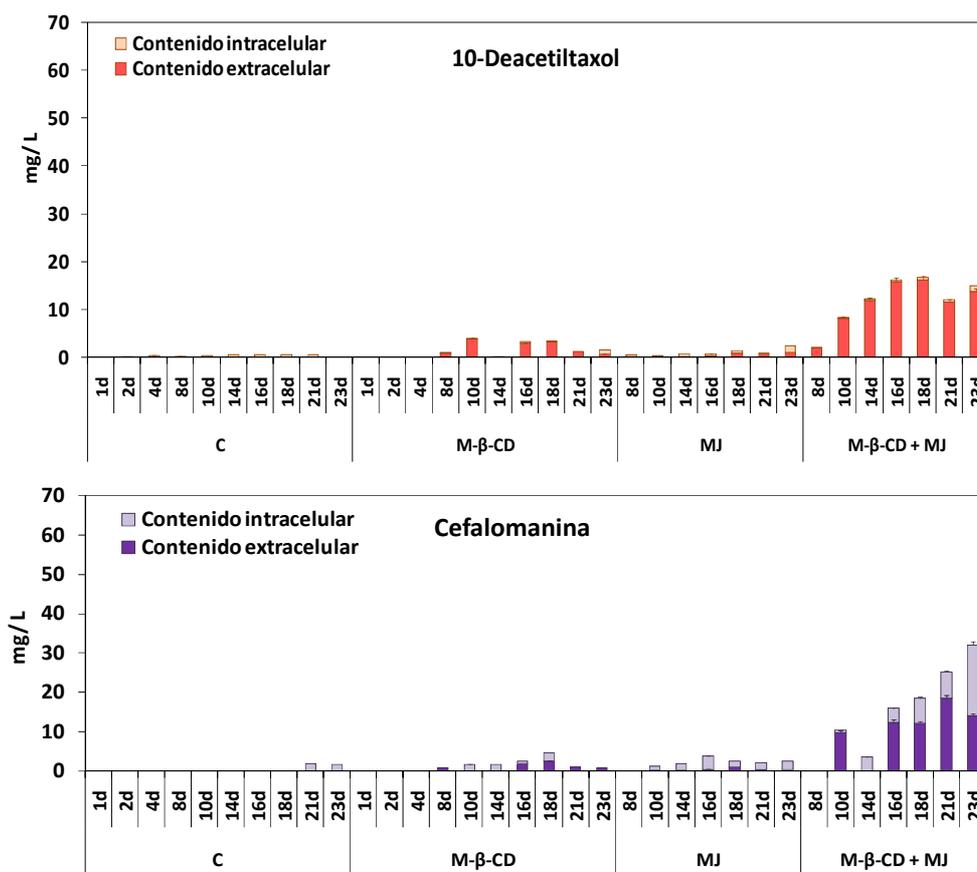


Figura 16. Contenido total (extra- + intracelular) de 10-deacetyl taxol y cefalomanina en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD y 100 μM de MJ separadamente o en combinación, durante 23 días en medio de cultivo óptimo para la producción. Los valores representados son las medias ± DE de dos réplicas independientes.

Los bajos niveles de expresión de los genes estudiados, en condiciones control, podrían ser la explicación de los muy bajos contenidos de taxol y taxanos relacionados en la línea celular de *T. x media* estudiada, por lo que se demuestra que la elicitación es una estrategia necesaria para la activación de genes implicados en la ruta secundaria que lleva a su formación y en consecuencia para la obtención biotecnológica de niveles elevados de dichos compuestos de interés.

También es destacable el hecho de que la máxima expresión de los genes relacionados con la biosíntesis del taxol tiene lugar a las pocas horas/días de la elicitación, sin embargo, los máximos niveles de taxanos se alcanzan posteriormente (7-10 días). Ello podría indicar que las enzimas formadas persisten de manera estable y activa, aún después de desaparecer los transcritos que las codifican. Nims y cols.,

(2006), demostraron en cultivos celulares de *T. cuspidata* que los transcritos del gen *TXS* no persistían más de 30 horas después de la elicitación. Sin embargo, este punto requeriría estudios más profundos de las actividades enzimáticas a lo largo del tiempo de elicitación y un conocimiento más amplio de otros factores que también podrían tomar parte en la regulación de este proceso biosintético.

Durante las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios metabólicos y genéticos que han dado lugar a avances significativos en el conocimiento de la ruta de biosíntesis del taxol. Sin embargo, la ruta biosintética completa así como las enzimas implicadas en ella no son completamente conocidas. En este sentido, utilizando la técnica ADNc-AFLP en cultivos celulares de *Taxus*, el grupo de investigación de la Universidad de Barcelona ha encontrado algunos genes cuyo nivel de expresión aumenta considerablemente en respuesta a la adición de MJ. De esa forma se ha conseguido secuenciar y clonar posibles genes reguladores que podrían estar directamente implicados en la biosíntesis y/o regulación del taxol. Uno de ellos, resultó de especial interés, el *TB595*, cuya secuencia se encuentra protegida bajo patente (Patente EE.UU. 61/337689), ya que podría ser un gen regulador involucrado en la respuesta de MJ que conduce a la biosíntesis de metabolitos secundarios y que codifica para una posible proteína reguladora denominada *taximin* implicada en los sistemas de defensa de las plantas (Onrubia y cols., 2012).

Por ello, se realizó el análisis de la expresión de los genes que codifican para la proteína *taximin* (*TB595*) así como para el gen que codifica para un transportador ABC (*ABC*) obtenidos, mediante la técnica ADNc-AFLP, con el objetivo de comprobar cuál era su patrón de expresión en los cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M- β -CD y 100 μ M de MJ, solos o en combinación. Los resultados indicaron (Figura 17) que los mayores niveles de expresión del gen *TB595* se obtuvieron cuando los cultivos celulares se encontraban en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento durante 14 días (MC) y durante las primeras 4 horas en el medio de cultivo óptimo para la producción (cultivos control y elicitados con MJ), observándose posteriormente, una disminución drástica en la acumulación de transcritos hasta el final del experimento en todos los tratamientos (Figura 17). Resultados similares fueron obtenidos en los estudios de ADNc-AFPL realizados en cultivos celulares de *T. baccata* elicitados con 100 μ M de MJ en los cuales, la mayor activación transcripcional de este gen tuvo lugar durante las primeras horas de crecimiento de las células en el medio de cultivo óptimo

para la producción tanto en cultivos control como en los elicitados con MJ, poniendo de manifiesto su participación en la regulación como factor de transcripción relacionado con el metabolismo secundario.

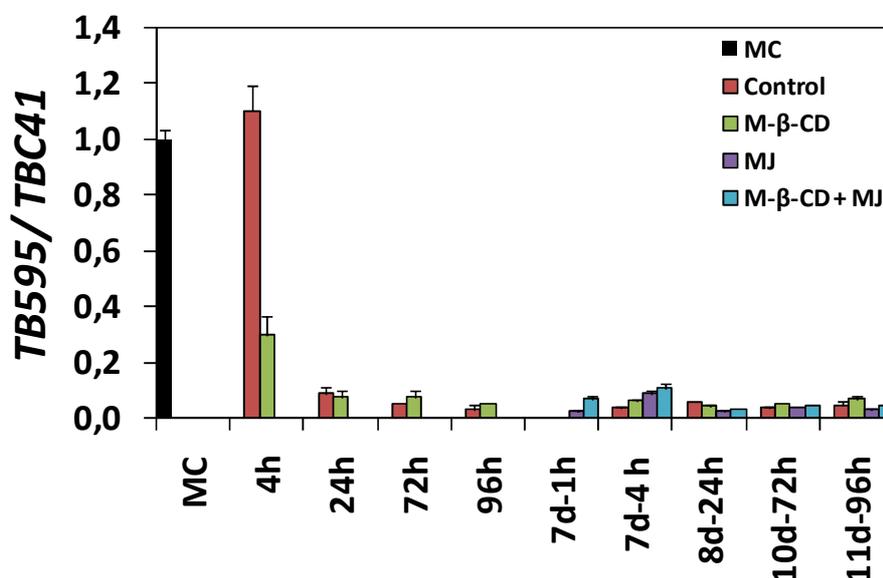


Figura 17. Variación de la expresión relativa de del gen *TB595* en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD y 100 μM de MJ separadamente o en combinación. Los ARN mensajeros se analizaron mediante qRT-PCR frente al gen de referencia *TBC41*. MC: cultivos celulares crecidos durante 14 días en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento. Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes.

En cuanto a los niveles de expresión del gen que codifica para el transportador ABC (*ABC*), se observó un aumento en la acumulación de transcritos para este gen en los cultivos tratados con MJ, que alcanzó su máximo a las 4h de elicitación, alcanzando valores más de 12 veces superiores al valor de referencia. Sin embargo, mucho más efectiva resultó la elicitación simultánea con MJ y M-β-CD, ya que provocó un máximo de expresión tan sólo después de 1h de la elicitación conjunta, llegando a niveles de acumulación de transcritos de 23 veces el valor de referencia y más del doble del observado en este tiempo para el cultivo elicitado con MJ (Figura 18).

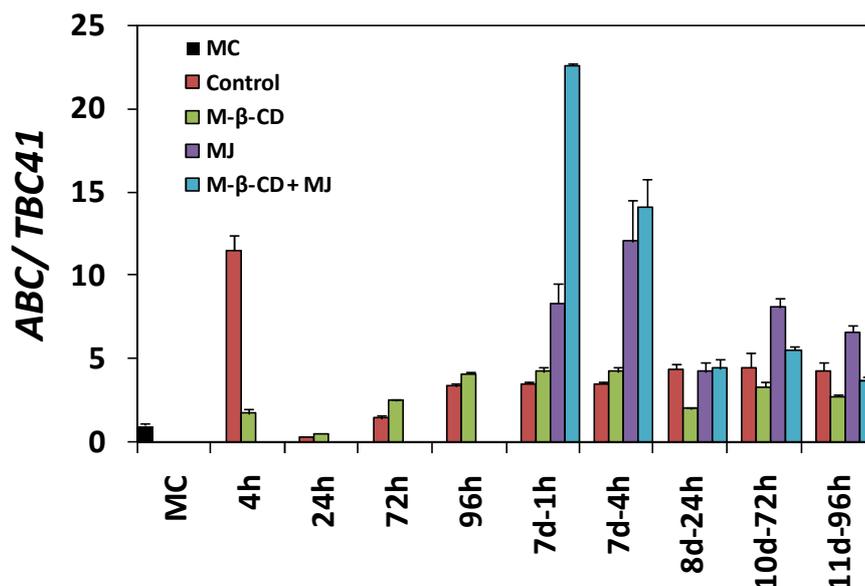


Figura 18. Variación de la expresión relativa del gen *ABC* en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con 50 mM de M-β-CD y 100 μM de MJ separadamente o en combinación. Los ARN mensajeros se analizaron mediante qRT-PCR frente al gen de referencia *TBC41*. MC: cultivos celulares crecidos durante 14 días en el medio de cultivo óptimo para el crecimiento. Los valores representados son las medias ± DE de tres réplicas independientes.

Al considerar los contenidos de bacatina III y taxol en los cultivos celulares elicitados con MJ o MJ junto con M-β-CD se puede observar que mientras que los niveles de bacatina III son altos en ambos cultivos, los de taxol son muy superiores en el cultivo tratado con ambos elicitores que en aquel tratado con tan sólo MJ. Este hecho podría ser debido, como se ha indicado anteriormente a que la acumulación de transcritos para los dos genes que actúan en la formación de taxol (*BAPT* y *DBTNBT*) es superior en los cultivos tratados con MJ y M-β-CD conjuntamente que en los tratados únicamente con MJ. A la vez, los transcritos para ambos genes se acumulan en momentos más tempranos de la elicitación cuando actúan ambos elicitores simultáneamente. Sin embargo, los niveles de expresión de ambos genes no son tan destacados como para responder a las diferencias tan acusadas en los niveles de taxol observadas entre ambos tratamientos. Por ello se debe considerar que la alta y muy temprana expresión del gen *ABC* observada en los cultivos doblemente elicitados podría contribuir decisivamente a los elevados niveles de producción de taxol. El gen *ABC* codifica probablemente para una proteína integral de membrana, y por ello con alta estabilidad, que colaboraría a transferir las inclusiones de CD-taxol o el taxol libre

desde el citosol celular al medio de cultivo. Esta liberación constante de taxol podría ser la razón de una activa biosíntesis y acumulación extracelular ya que disminuirían claramente los procesos de retroinhibición y/o de toxicidad que podrían tener lugar en el citoplasma activo debido a la presencia de taxol, dando por ello las altas producciones de taxol obtenidas en este trabajo. El hecho de que el taxol y otros taxanos formen complejos de inclusión con las CD, a la vez que disminuye su toxicidad celular, también previene la posible degradación enzimática intra- y especialmente extracelular a la que están sometidos dichos compuestos (Cai y cols., 2012). La capacidad de las suspensiones celulares para liberar al medio de cultivo los productos de interés sintetizados es un punto muy importante a tener en cuenta cuando se pretende llevar a cabo la producción biotecnológica de un compuesto interés. Una alta capacidad de excreción por parte de las células productoras al medio de cultivo permite el establecimiento de sistemas continuos a nivel de biorreactor sin destruir la biomasa celular, a la vez que los procesos requeridos para extraer y purificar los compuestos de interés son más sencillos, biosostenibles y económicamente mucho más viables.

Conclusiones

I. Los experimentos de elicitación de suspensiones celulares de *C. annuum* en presencia de CD y MJ separadamente o en combinación, permitió la identificación de compuestos de naturaleza sesquiterpénica como el aromadendrano y la solavetivona. Además, la adición combinada de estos elicitores a cultivos celulares de *C. annuum* produjo una acumulación más elevada de estos compuestos que cuando se utilizaron por separado observándose por tanto, un efecto sinérgico sobre su producción. La ausencia de estos compuestos en los cultivos control sugiere que su síntesis se produce como consecuencia de la elicitación.

II. El análisis comparativo de las bandas de proteínas extracelulares presentes en los cultivos celulares de *C. annuum* control y los cultivos celulares elicitados en presencia de MJ solo o en combinación con M- β -CD mostró la presencia de tres bandas de proteínas que resultaron ser inducibles por el tratamiento de las suspensiones celulares con MJ. El análisis proteómico de estas tres bandas permitió la identificación de proteínas PR cuyas secuencias de aminoácidos presentaron homología con quitinasas, peroxidasas y otras enzimas hidrolíticas. Aparte de estas proteínas inducibles por MJ, se observó la presencia de proteínas PR constitutivas cuyas secuencias de aminoácidos eran homólogas a quitinasas, β -1,3-glucanasas, proteínas tipo taumatina y peroxidasas que están involucradas en el crecimiento, desarrollo y respuestas de defensa.

III. El análisis del patrón de proteínas extracelulares totales obtenido a partir de suspensiones celulares de *C. chinense* elicitadas con MJ mostró la presencia de dos bandas de proteínas específicas cuya expresión fue inducida por la presencia de MJ. Los fragmentos trópticos obtenidos tras la microsecuenciación de esas bandas, contenían secuencias de aminoácidos que presentaron homología con proteínas PR del tipo NtPRp27, quitinasas, proteínas tipo germina y una pectinesterasa, sugiriendo un papel de MJ en la mediación de la expresión de genes relacionados con la defensa en pimiento. Además de estas proteínas inducidas por MJ, se identificaron endoquitinasas y peroxidasas que se encontraban presentes tanto en tratamientos control como elicitados.

IV. La elicitación de suspensiones celulares de *D. carota* con β -CD dio lugar a la acumulación extracelular de fitosteroles, la cual resultó ser dependiente principalmente del tipo de β -CD (M- β -CD) y del tiempo de incubación (144 h), y en menor medida, de la edad (10

días) y densidad celular (200 gPF/ L). Las M-β-CD resultaron ser las mejores moléculas para extraer y acumular los fitosteroles a partir de cultivos celulares de zanahoria mejorando, no sólo la producción de estos compuestos sino también, favoreciendo su recuperación del medio de cultivo sin destrucción de la biomasa celular. Sin embargo, el uso de otros elicitores (MJ y luz UV) separadamente o en combinación con M-β-CD, no incrementó la producción de fitosteroles sino que indujo la biosíntesis de compuestos relacionados con la defensa.

V. Los resultados obtenidos de los estudios de señalización proporcionan evidencias de un papel del Ca^{2+} en la mediación de la producción de fitosteroles dirigida por M-β-CD en suspensiones celulares de *D. carota*, mostrando la existencia de dos vías activadas por M-β-CD para la producción de fitosteroles, una vía independiente del Ca^{2+} , y otra en la que el aumento del Ca^{2+} citosólico se produce bien por la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular o bien por la movilización del Ca^{2+} procedente de los orgánulos intracelulares. Por otra parte, la producción de fitosteroles fue dependiente del estado de fosforilación/desfosforilación de ciertas proteínas a través de Ser-Thr-PQ y de Tyr-PP. Además, la producción de fitosteroles desencadenada por M-β-CD fue parcialmente dependiente de óxido nítrico e independiente de H_2O_2 .

VI. El análisis del proteoma extracelular de suspensiones celulares de *D. carota* mostró un perfil proteómico ligeramente más complejo en las suspensiones celulares tratadas con M-β-CD solas o en combinación con MJ, que el observado en los cultivos control y tratados sólo con MJ. Entre las proteínas identificadas en los cultivos celulares elicitados con M-β-CD individualmente, destacó la presencia de fragmentos trípticos cuyas secuencias de aminoácidos mostraron homología con proteínas características del género *Daucus* (TLP, EP4 y EDPG) y peroxidasas de *Spinacia oleracea* y *Arabidopsis thaliana*. Además, la identificación de las proteínas mediante secuenciación *de novo* de la banda de 62 kDa permitió la identificación de proteínas tipo reticulina oxidasa. Asimismo, se identificaron tres fragmentos trípticos inducibles en los cultivos celulares elicitados con MJ, que presentaron homología con una glicoproteína inducible (iEP4) de *D. carota*, un citocromo P450 de *Glycine max* y un precursor de esterasas de *Hevea brasiliensis*. También se identificaron proteínas constitutivas que presentaron homología con quitinasas y peroxidasas.

VII. Los resultados obtenidos tras la elicitación de los cultivos celulares de *T. x media* con CD (de diferente tipo y naturaleza) y MJ, muestran que la producción de taxanos aumenta considerablemente cuando cualquier tipo de CD se añade junto con MJ, favoreciendo la secreción de taxanos hacia el medio extracelular, en donde se acumulan para alcanzar una concentración mayor que en las células. Este aumento en la producción extracelular de taxanos es dependiente de la naturaleza (β y γ) y tipo (M- β -CD y HP- β -CD) de CD, observándose además, una sinergia en la acción de los dos elicitores a tiempos largos, siendo ese aumento más destacable en el caso del tratamiento combinado de M- β -CD y MJ, por lo que se seleccionó esta β -CD para la realización de los experimentos posteriores.

VIII. Tras el análisis comparativo del perfil metabolómico y genómico en cultivos celulares de *T. x media* elicitados con M- β -CD y MJ individualmente o en combinación, se observó que tanto el gen *TXS* como el gen *T7 β OH* resultaron fuertemente inducidos tras la elicitación con ambos elicitores, sin limitar la acumulación de taxanos. Sin embargo, la expresión de los genes que codifican para las transferasas *DBAT*, *BAPT* y *DBTNBT* y que son responsables de la formación de bacatina III, la unión de la cadena lateral a bacatina III y la formación de taxol, respectivamente, mostraron una respuesta menor a la elicitación, lo que sugiere que estos genes estén probablemente implicados en las etapas limitantes de la ruta de biosíntesis de taxol. Además, los niveles de transcripción de estos genes, en la mayoría de los casos, podrían estar correlacionados con los niveles de taxanos producidos en presencia de M- β -CD separadamente o en combinación con MJ, ya que el efecto sinérgico observado en la acumulación de taxanos resultó ser una consecuencia del efecto sinérgico detectado en la expresión de genes, aunque los niveles máximos de transcritos se alcanzan al inicio de la elicitación, mientras que la mayor acumulación de taxanos se produce transcurridos 23 días de tratamiento.

Bibliografía

- Abe I, Rohmer M, Prestwich GD** (1993) Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem Rev*, 93:2189-2206
- Achard P, Renou JP, Berthome R, Harberd NP and Genschik P** (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol*, 18:656-660
- Agrawal AA, Tuzun S, Bent E** (1999) Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology, and agriculture. American Phytopathological Society (APS Press)
- Agrawal GK, Jwa NS, Lebrun MH, Job D, Rakwal R** (2010) Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, 10:799-827
- Agrawal GK, Rakwal VR, Iwahashi H** (2002) Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, OsMSRMMK2, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. *Biochem Biophys Res Commun*, 294:1009-1016
- Allen R** (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol*, 107:1049-1054
- Almagro L, Bru R, Pugin A, Pedreño MA** (2012) Early signaling network in tobacco cells elicited with methyl jasmonate and cyclodextrins. *Plant Physiol Biochem*, 51:1-9
- Almagro L, Gómez-Ros L, Belchí-Navarro S, Bru R, Ros-Barceló A, Pedreño MA** (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot*, 60:377-390
- Almagro L, López-Pérez AJ, Pedreño MA** (2011a) New method to enhance ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures based on the use of cyclodextrins. *Biotechnol Lett*, 33:381-385
- Almagro L, Sabater-Jara AB, Belchí-Navarro S, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA** (2011b) Effect of UV light on secondary metabolite biosynthesis in plant cell cultures elicited with cyclodextrins and methyljasmonate. En: Hemanth KN, Vasanthaiiah MCA (ed) Abiotic stress. In Tech, USA, 3:115-136
- Aloni B, Karni L, Deventurero G, Turhan E, Aktas H** (2008) Changes in ascorbic acid concentration, ascorbate oxidase activity, and apoplastic pH in relation to fruit development in pepper (*Capsicum annuum* L.) and the occurrence of blossom-end rot. *J Hortic Sc Biotechnol*, 83:100–105
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25:3389-3402
- Antoniali S, Leal PAM, Magalhães AMD, Fuziki RT, Sanches J** (2007) Physico-chemical characterization of Zarco HS'yellow bell pepper for different ripeness stages. *Scientia Agricola*, 64:19-22
- Armero J, Tena M** (2001) Possible role of plasma membrane H⁺-ATPase in the elicitation of phytoalexin and related isoflavone root secretion in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings. *Plant Sci*, 161:791-798
- Ashour M, Wink M, Gershenzon J** (2010) Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. En: *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, pp 258-303.
- Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto JC, Rial-Otero R, Simal-Gandara J** (2009) A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloid*, 23:1631-1640
- Avanci NC, Luche DD, Goldman GH, Goldman MHS** (2010) Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet Mol Res*, 9:484-505
- Awad AB, Chinnam M, Fink CS, Bradford PG** (2007) β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine*, 14:747-754

- Awad AB, Fink CS, Trautwein EA, Ntanios FY** (2005) β -Sitosterol stimulates ceramide metabolism in differentiated Caco2 cells. *J Nutr Biochem*, 16:650-655
- Awad AB, Fink CS, Williams H, Kim U** (2001) *In vitro* and *in vivo* (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Cancer Prev*, 10:507-513
- Aziz A, Gauthier A, Bézier A, Poinssot B, Joubert JM, Pugin A, Heyraud A and Baillieul F** (2007) Elicitor and resistance-inducing activity of β -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with β -1,3 glucans and α -1,4 oligogalacturonides. *J Exp Bot*, 58:1463-1472
- Bach M, Schnitzler JP, Seitz HU** (1993) Elicitor-induced changes in Ca^{2+} influx, K^{+} efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplast of *Daucus carota* L. *Plant Physiol*, 103:407-412
- Bach TJ** (1995) Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants—a review. *Lipids*, 30:191-202
- Bae EK, Lee H, Lee JS, Noh EW, Jo J** (2006) Molecular cloning of a peroxidase gene from poplar and its expression in response to stress. *Tree Physiol* 26:1405-1412
- Baebler S, Hren M, Camloh M, Ravnikar M, Bohanec B, Plaper I, Uzman R, Žel J** (2005) Establishment of cell suspensions cultures of yew (*Taxus x media* Rehd.) and assessment of their genomic stability, *In Vitro Cell Dev Biol—Plant*, 41:338–343
- Banthorpe DV, Wirz-Justice A** (1972) Terpene biosynthesis. Part VI. Monoterpenes and carotenoids from tissue cultures of *Tanacetum vulgare* L. *J Chem Soc Perk T 1*, 1769-1772.
- Baranski R** (2008) Genetic transformation of carrot (*Daucus carota*) and other apiaceae species. *Trans Plant J*, 2:18-38
- Barboza GE, Bianchetti LDB** (2005) Three new species of Capsicum (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil. *Syst Bot*, 30:863-871
- Baudouin, E** (2011) The language of nitric oxide signalling. *Plant Biology*, 13:233-242
- Belchí-Navarro S, Almagro L, Lijavetzky D, Bru R, Pedreño MA** (2012) Enhanced extracellular production of *trans*-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. *Plant Cell Rep*, 31:81-89
- Belchí-Navarro S, Almagro L, Sabater-Jara AB, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA** (2013a) Induction of *trans*-resveratrol and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited suspension cultured cells of *Vitis vinifera* cv Monastrell. *J Plant Physiol*, 170:258-264
- Belchí-Navarro S, Almagro L, Sabater-Jara AB, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA** (2013b) Early signaling events in grapevine cells elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Plant Physiol Biochem*, 62:107-110
- Belchí-Navarro S, Pedreño MA, Corchete P** (2011) Methyl jasmonate increases silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cell cultures treated with β -cyclodextrins. *Biotechnol Lett*, 33:179-184
- Benhamou N** (1996). Elicitor-induced plant defense pathway. *Trends Plant Sci*, 1:233-240
- Bentebibel S, Moyano E, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Eibl R, Pinol MT** (2005) Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnol Bioeng*, 89:647-655
- Bertinetti C, Ugalde RA** (1996) Studies on the response of carrot cells to a *Sclerotinia sclerotiorum* elicitor: induction of the expression of an extracellular glycoprotein mRNA. *Mol Plant Microbe In*, 9:658

- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 59:21–39
- Besson-Bard A, Astier J, Rasul S, Wawer I, Dubreuil-Maurizi C, Jeandroz S, Wendehenne D** (2009) Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Sci*, 177:302-309
- Bhat RA, Panstruga R** (2005) Lipid rafts in plants. *Planta*, 223:5-19
- Bishayee A, Sarkar A, Chatterjee M** (1995) Hepatoprotective activity of carrot (*Daucus carota* L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. *J Ethnopharmacol* 47:69-74
- Björn LO** (1999) UV-B effects: Receptors and targets. In *Concepts in photobiology*. Springer Netherlands (pp 821-832)
- Boller T, Felix G** (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Ann Rev Plant Biol*, 60:379-406
- Bolwell GP, Bozak K, Zimmerlin A** (1994) Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*, 37:1491-1506
- Bolwell GP, Buti VS, Davies DR, Zimmerlin A** (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res*, 23:517-532
- Bolwell GP, Wojtaszek P** (1997) Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol*, 51:347–366
- Bonfill M, Mangas S, Moyano E, Cusido RM, Palazón J** (2011) Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104:61-67
- Bonfill M, Palazón J, Cusidó RM, Joly S, Morales C, Piñol MT** (2003) Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Taxus x media* cells. *Plant Physiol Biochem*, 41:91-96
- Bosland PW** (1996) Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA, 479-487.
- Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerré-Tugayé MT, Pont-Lezica R** (2005) Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, 5:212–221
- Bouic PJ** (2001) The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4:471-475
- Bouic PJD, Etsebeth S, Liebenberg RW, Albrecht CF, Pegel K, Van Jaarsveld PP** (1996) Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int J Immunopharmacol*, 18:693-700
- Boutté Y, Grebe M** (2009) Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 12:705-713
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem*, 72:248-254
- Bradford PG, Awad AB** (2007) Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res*, 51:161-170
- Briceño Z, Almagro L, Sabater-Jara AB, Calderón AA, Pedreño MA, Ferrer MA** (2012) Enhancement of phytosterols, taraxasterol and induction of extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *J Plant Physiol*, 169:1050-1058

- Brindle PA, Kuhn P, Threlfall D** (1983) Accumulation of phytoalexins in potato cell suspension culture. *Phytochemistry*, 22:2719-2721
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Schaller H, Khafif M, Schott G, Bendahmane A, Voinnet O** (2012) Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:1778-1783
- Bru R, Sellés S, Casado-Vela J, Belchí-Navarro S, Pedreño MA** (2006) Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J Agric Food Chem*, 54:65-71
- Brunner F, Stintzi A, Fritig B, Legrand M** (1998) Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant*, 14:225-234
- Brunner Y, Schvartz D, Couté Y, Sánchez JC** (2009) Proteomics of regulated secretory organelles. *Mass Spectrom Rev*, 28: 844–867
- Bucciaglia PA, Smith AG** (1994) Cloning and characterization of *Tag1*, a tobacco anther β -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution. *Plant Mol Biol*, 24:903–914
- Buchel AS, Linthorst HJM** (1999) PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. En: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Datta SK, Muthukrishnan S (ed). CRC Press LLC, Boca Ratón, Florida, USA, pp. 21-48
- Buchner P, Rochat C, Wuilleme S, Boutin JP** (2002) Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated β -1,3-glucanase gene in pea. *Plant Mol Biol*, 49:171–186
- Buffard D, Breda C, Van Huystee RB, Asemota O, Pierre M, Ha DB, Esnault R** (1990) Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidase from cultivated peanut cells. *Proc Nat Acad Sci USA*, 87:8874-8878
- Bush DS** (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. *Annu Rev Plant Phys*, 27:953–967
- Cai Z, Kastell A, Knorr D, Smetanska I** (2012) Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Rep* 31:461-477
- Calpe-Berdiel L, Blanco-Vaca F** (2009) New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*, 203:18-31
- Cameron S, Smith R** (2008) Seasonal changes in the concentration of major taxanes in the biomass of wild Canada yew (*Taxus canadensis* Marsh.). *Pharm Biol*, 46:35-40
- Carpita NC** (1996) Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47:445-476
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J*, 3:1-30
- Carter CJ, Thornburg RW** (2004) Tobacco nectarin V is a flavin-containing berberine bridge enzyme-like protein with glucose oxidase activity. *Plant Physiol*, 134:460-469
- Casado-Vela J** (2008) Proteomics. En: Toxicology. Capítulo 23. pp 839-867. Wiley & Sons
- Castañeda P, Perez LM** (1996) Calcium ions promote the response of citrus limon against fungal elicitors or wounding. *Phytochemistry*, 42:595-598
- Chau MD, Croteau R** (2004a) Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2 α -hydroxylase involved in Taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 427:48-57

- Chau MD, Jennewein S, Walker K, Croteau R** (2004b) Taxol Biosynthesis: Molecular Cloning and Characterization of a Cytochrome P450 Taxoid 7-Hydroxylase. *Chem Biol*, 11:663-672
- Cheng AX, Lou YG, Mao YB, Lu S, Wang LJ, Chen XY** (2007) Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *J Integra Plant Biol* 49:179-186
- Cheng FY, Zamski E, Guo WW, Pharr DM, Williamson JD** (2009) Salicylic acid stimulates secretion of the normally symplastic enzyme mannitol dehydrogenase: a possible defense against mannitol-secreting fungal pathogens. *Planta*, 230:1093–1103
- Chivasa S, Hamilton JM, Pringle RS, Ndimba BK, Simon WJ, Lindsey K, Slabas AR** (2006) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures. *J Exp Bot*, 57:1553-1562
- Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Robertson D, Yu X-L, Knox JP, Bolwell P, Slabas AR** (2002) Proteomics analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis*, 23:1754–1765
- Choi HK, Kim SI, Son JS, Hong SS, Lee HS, Chung IS, Lee HJ** (2000) Intermittent maltose feeding enhances paclitaxel production in suspension culture of *Taxus chinensis* cells. *Biotechnol Lett* 22:1793-1796
- Christensen B, Cho B, Naesby M, Grebersen P, Brant J, Madriz-Ordeñana K, Collinge D, Thordal-Christensen H** (2002) The molecular characterization of two bacterial proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol Plant Pathology*, 3:135-144
- Clarke SM, Cristescu SM, Miersch O, Harren FJ, Wasternack C, Mur LA** (2009) Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 182:175-187
- Cockell CS, Knowland J** (1999) Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol Rev*, 74:311-345
- Cohen-Kupiec R, Chet I** (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotech*, 9:270-277
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K** (1993) Plant chitinases. *Plant J*, 3:31-40
- Cope EA** (1998) Taxaceae: The genera and cultivated species. *Bot Rev*, 64:291-322.
- Cormack RS, Eulgem T, Rushton PJ, Köchner P, Hahlbrock K, Somssich IE** (2002) Leucine Zipper containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochem Biophys Acta*, 1576: 92-100
- Cosgrove DJ** (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol Biochem* 38:109-124
- Creelman RA, Mullet JE** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48:335-381
- Crofts AJ, Leborgne-Castel N, Hillmer S, Robinson DG, Phillipson B, Carlsson LE, Ashford DA, Denecke J** (1999) Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde Bulk Flow. *Plant Cell*, 11:2233-2247
- Croteau R, Ketchum REB, Long RM, Kaspera R, Wildung MR** (2006) Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem Rev*, 5:75-97
- Curry J, Aluru M, Mendoza M, Nevarez J, Melendrez M, O'Connell MA** (1999) Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum spp.* *Plant Science*, 148:47-57
- Cusidó RM, Palazón J, Navia-Osorio A, Mallol A, Bonfill M, Morales C, Piñol MT** (1999) Production of taxol® and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Sci*, 146:101-107

- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT** (2002) Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus x media*. *Biotechnol Progr*, 18:418-423
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Expósito O, Moyano E, Piñol MT** (2007) Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*. *Biochem Eng J*, 33:159-167
- Custers JHHV, Harrison SJ, Sela-Buurlage MB, van Deventer E, Lageweg W, Howe PW, van der Meijs J, Ponstein AS, Simons BH, Melchers LS, Stuiver MH** (2004) Isolation and characterization of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *Plant J*, 39:147-160
- Dangl J, Jones J** (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411:826-833
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D and Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci*, 57:779-795
- Datta K, Muthukrishnan S** (1999) Expression and function of PR-protein genes in transgenic plant. En: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Datta SK, Muthukrishnan S (ed). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA, pp.261-277
- Day TA, Neale PJ** (2002) Effects of UV-B radiation on terrestrial and aquatic primary producers. *Annu Rev Ecol Syst*, 371-396
- De Marino S, Borbone N, Gala F, Zollo F, Fico G, Pagiotti R, Iorizzi** (2006) New constituents of sweet *Capsicum annuum* L. Fruits and evaluation of their biological activity. *J Agric Food Chem*, 54:7508-7516
- Delgado-Zamarreño MM, Bustamante-Rangel M, Martínez-Pelarda D, Carabías-Martínez R** (2009) Analysis of β -sitosterol in seeds and nuts using pressurized liquid extraction and liquid chromatography. *Analytical Science*, 25:765-768
- Delledonne M, Murgia I, Ederle D, Sbicego PF, Biondani A, Polverari A, Lamb** (2002) Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signalling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiol Biochem*, 40:605-610
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394:585-588
- Demole E, Lederer E, Mercier D** (1962) Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv Chim Acta*, 45:675-685
- Devarenne TP, Ghosh A, Chappell J** (2002) Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco. *Plant Physiol*, 129:1095-1106
- DiCosmo F, Misawa M** (1995) Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnol Adv*, 13:425-453
- Di Matteo A, Federici L, Mattei B, Salvi G, Johnson KA, Savino C, De Lorenzo G, Tsernoglou D, Cervone F** (2003) The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 100:10124-10128
- Dietrich A, Mayer JE, Hahlbrock K** (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J Biol Chem*, 265:6360-6368
- Ding C-K, Wang CY, Gross KC, Smith DL** (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*, 214:895-901
- Ding Y, Wang J, Stierhof YD, Robinson DG, Jiang L** (2012) Unconventional protein secretion. *Trends Plant Sci* 17:606-615

- Ditt RF, Nester EW, Comai L** (2001) Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 98:10954-10959
- Dittrich H, Kutchan TM** (1991) Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 88:9969-9973
- Dixon RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411:843-847
- Do HM, Hong JK, Jung HW, Kim SH, Ham JH, Hwang BK** (2003) Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Mol Plant Microbe In*, 16:196-205
- Dóblin MS, DeMelis L, Newbiggin E, Bacic A, Read SM** (2001) Pollen tubes of *Nicotiana glauca* express two genes from different β -glucan synthase families. *Plant Physiol*, 125:2040-2052
- Drakakaki G, Dandekar A** (2013) Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci*, 203:74-78
- Droillard MJ, Thibivillers S, Cazalé AC, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2000) Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP-kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett*, 474:217-222
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J** (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 102:933-938
- Duncan DR, Widholm JM** (1990) Measurements of viability suitable for plant tissue cultures. En: *Plant cell and tissue culture*. Humana Press (pp 29-37)
- Dupree P** (1999) The golgi bypassed. *Trends Cell Biol*, 9:130
- Eisenreich W, Mewnhard B, Hylands PJ, Zenk MH, Bacher A** (1996) Studies on the biosynthesis of taxol: The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 93:6431-6436
- Ellis JG, Dodds PN, Lawrence GJ** (2007) The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powdery mildew and smut fungi. *Curr Opin Microbiol*, 10:326-331
- Elvira MI, Galdeano MM, Gilardi P, Garcia-Luque I, Serra MT** (2008) Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *J Exp Bot*, 59:1253-1265
- Enjuto M, Lumbreras V, Marín C, Boronat A** (1995) Expression of the Arabidopsis HMG2 gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell*, 7:517-527
- Enkerli J, Gisi U, Moesinger E** (1993) Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis related proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, 43:161-171
- Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili MH, Cusidó RM, Palazón J** (2009a) Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 9:109-121
- Expósito O, Bonfill M, Onrubia M, Jané A, Moyano E, Cusidó RM, Palazón J, Piñol MT** (2009b) Effect of taxol feeding on taxol and related taxane production in *Taxus baccata* suspension cultures. *New Biotechnol*, 25:252-259

Expósito O, Syklovska-Baranek K, Moyano E, Onrubia M, Bonfill M, Palazón J, Cusidó R M (2010) Metabolic responses of *Taxus media* transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate. *Biotechnol Progr*, 26:1145-1153

Facchini PJ, Chappell J (1992) Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 89:11088-11092

Farmer EE, Johnson RR, Ryan CA (1992) Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol*, 98:995-1002

Farmer EE, Ryan CA (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*, 4:129-134

Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Boller T (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plan cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 88:8831-8834

Fett-Neto AG, DiCosmo F, Reynolds WF, Sakata K (1992) Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Nat Biotechnol*, 10:1572-1575

Flores T, Todd CD, Tovar-Mendez A, Dhanoa PK, Correa-Aragunde N, Hoyos ME, Brownfield DM, Mullen RT, Lamattina L, Polacco JC (2008) Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol*, 147:1936-1946

Floss HG, Mocek U (1995) Biosynthesis of taxol. En: Suffness M, (ed). *Taxol: Science and applications*. Boca Raton (USA): CRC Press, pp. 191-208

Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J (2001) *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J*, 23:817-824

Frenkel M, Külheim C, Jänkänpää H, Skogström O, Dall'Osto L, Ågren J, Bassi R, Moritz T, Moen J, Jansson S (2009) Improper excess light energy dissipation in *Arabidopsis* results in a metabolic reprogramming. *BMC Plant Biol*, 9:12

Frömring KH, Szejtli J (1994) *Cyclodextrins in pharmacy*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Fry SC (1995) Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu Rev Plant Biol*, 46:497-520

Fry SC (2004) Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol*, 161:641-675

Fu HW, Zhang L, Yi T, Tian JK (2009) A new sesquiterpene from the fruits of *Daucus carota* L. *Molecules* 14:2862-2867

Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*, 9:436-442

Fukuda Y, Shinshi H (1994) Characterization of a novel *cis*-acting element that is responsive to a fungal elicitor in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol Biol*, 24:485-493

Furmanowa M, Oledzka H, Syklovska-Baranek K, Józefowicz J, Gieracka S (2000) Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidata* and *Taxus x media* by some elicitors and precursors. *Biotechnol Lett*, 22:1449-1452

Gadea J, Mayda ME, Conejero V, Vera P (1996) Characterization of defence-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Mol Plant Microbe In*, 9:409-415

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 50:151-158

- Garcês H, Durzan D, Pedroso MC** (2001) Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, 87:567–574
- García-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe In*, 19:711-724
- García-Llatas G, Rodríguez-Estrada MT** (2011) Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chem Phys Lipids*, 164:607-624
- Gelli A, Higgins VJ, Blumwald E** (1997) Activation of plant plasma membrane calcium-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol*, 113:269-279
- Gfeller A, Liechti R, Farmer EE** (2010) Arabidopsis jasmonate signaling pathway. *Sci Signal*, 3(109), cm4.
- Gibson DM, Ketchum REB, Vance NC, Christen AA** (1993) Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific yew). *Plant Cell Rep*, 12:479-482
- Gläßgen WE, Rose A, Madlung J, Koch W, Gleitz J, Seitz HU** (1998) Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta*, 204:490-498
- Godfrey D, Able AJ, Dry IB** (2007) Induction of a grapevine germin-like protein VvGLP3 gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection. A possible role in defense? *Mol Plant Microbe In*, 20:1112–1125
- Goormachtig S, Lievens S, Van de Velde W, Van Montagu M, Holsters M** (1998) Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *Plan Cell*, 10:905-915
- Grandmougin-Ferjani A, Schuler-Muller I, Hartmann MA** (1997) Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol*, 113:163-174
- Griebel T, Zeier J** (2010) A role for β -sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant J*, 63:254-268
- Griffith DW, Bender ML** (1973) Cycloamilases as catalyts. *Advan Catal Related Subjs*, 23:309-361
- Guillén MD, Manzanos MJ** (1998) Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. *Food Chem*, 63:373-383
- Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 89:2389-2393
- Guo BH, Wang YC, Zhou XW, Hu K, Tan F, Miao ZQ, Tang KX** (2006) An endophytic Taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Afr J Biotechnol*, 5:875-877
- Guo FQ, M Okamoto, Crawford NM** (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase involved in hormonal signaling. *Science*, 302:100–103
- Guo ZJ, Nakagawara S, Sumitani K, Ohta Y** (1993) Effect of intracellular glutathione level on the production of 6-methoxymellein in cultured carrot (*Daucus carota*) cells. *Plant Physiol*, 102:45-51
- Gurbuz I, Erdemoglu N, Yesilada E, Sener B** (2004) Anti-ulcerogenic lignans from *Taxus baccata* L. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A. J Bioscience*, 59:233-236
- Hamel F, Bellemare G** (1995) Characterisation of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochim Biophys Acta*, 1263:212-220

- Hao G, Du X, Shi R** (2008) Nitric oxide accelerate the suspension cell growth and flavonoids production of *Ginkgo biloba* L. *Acta Bot Boreali-Occidentalia Sin*, 27:272–279
- Hao G, Du X, Shi R, Wang J, Feng L** (2009) Involvement of nitric oxide in ultraviolet B-induced activation of phenylalanine ammoniumlyase and stimulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* leaves. *Aust J Bot*, 57:56–64
- Hasler CM** (1998) Functional foods: their role in disease prevention and health. *Food Technol*, 52:63-69
- Hefner J, Ketchum REB, Croteau R** (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphatesynthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production. *Arch Biochem Biophys*, 360:62-74
- Hefner J, Rubenstein SM, Ketchum REB, Gibson DM, Williams RM, Croteau R** (1996) Cytochrome p450-catalyzed hydroxylation of taxa-4(5),11(12)-dien to taxa-4(20),11(12)-dien-alpha-ol. The first oxygenation step in taxol biosynthesis. *Chem Biol*, 3:479-489
- Heitz T, Geoffroy P, Friting B, Legrand M** (1999) The PR-6 family: proteinase inhibitors in plant-microbe and plant-insect interactions. En: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Datta SK, Muthukrishnan S (ed). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA pp.131-156
- Helleboid S, Chapman A, Hendriks T, Inzé D, Vasseur J, Hilbert JL** (2000) Cloning of β -1,3-glucanases expressed during *Cichorium* somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 42:377–386
- Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ** (2012) A *raison d'être* for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog Lipid Res*, 51:95-148
- Herchi W, Harrabi S, Sebei K, Rochut S, Boukhchina S, Pepe C, Kallel H** (2009) Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L. *Plant Physiol Biochem*, 47:880-885
- Hezari M, Lewis NG, Croteau R** (1995) Purification and chracterization of taxa-4(5), 11(12)-diene synthase from pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 322:437-444
- Hezari M, Ketchum REB, Gibson DM, Croteau R** (1997) Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus Canadensis* cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys*, 337:185-190
- Hiraga S, Ito H, Yamakawa H, Ohtsubo N, Seo S, Mitsuhashi I, Matsui H, Honma M, Ohashi Y** (2000) An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. *Mol Plant Microbe Int*, 13:210-216
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H** (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*, 42:462-468
- Hirner AA, Veit S, Seitz HU** (2001) Regulation of anthocyanin biosynthesis in UV-A-irradiated cell cultures of carrot and in organs of intact carrot plants. *Plant Sci*, 161:315-322
- Hollósy F** (2002) Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33:179-197
- Holton RA, Biediger RJ, Boatman PD** (1995) Semisynthesis of Taxol and taxotere. En: Suffness M (ed). Taxol: Science and applications. Boca Raton (USA): CRC Press, 97-121
- Hong JK, Yun BW, Kang JG, Raja MU, Kwon E, Sorhagen K, Chu C, Wang Y, Loake GJ** (2008) Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J Exp Bot*, 59:147–154

- Howard LR, Talcott ST, Brenes CH, Villalon B** (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J Agric Food Chem*, 48:1713-1720
- Hrmova M, Fincher GB** (2001) Structure-function relationships of β -D-glucan endo- and exohydrolases from higher plants. In *Plant Cell Walls*. Springer Netherlands (pp. 73-91)
- Hu X, Neill S, Cai W** (2003) Nitric oxide mediates elicitor-induced saponin synthesis in cell cultures of *Panax ginseng*. *Funct Plant Biol*, 30:901-907
- Huang X, von Rad U, Durner J** (2002a). Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta*, 215:914-23
- Hurkman AJ, Tanaka CK** (1996) Effect of salt stress on germin gene expression in barley roots. *Plant Physiol*, 110:971-977
- Hwang BK, Sunwoo JY, Kim YJ, Kim BS** (1997) Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in DL- β -amino-*n*-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 51:305-322
- Itai A, Ishihara K, Derek Bewley J** (2003) Characterization of expression, and cloning, of β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *J Exp Bot*, 393:2615-2622
- Ivashikina N, Becker D, Ache P, Meyerhoff O, Felle HH, Hedrich R** (2001) K⁺ channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS Lett*, 508:463-469
- Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF** (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci*, 11:33-39
- Jansen MA** (2002) Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiol Plant*, 116:423-429
- Jason Yoder B** (2005) Isolation and structure elucidation of cytotoxic natural product from the rainforests of Madagascar and suciname. Tesis doctoral
- Jeang CL, Lin DG, Hsieh SH** (2005) Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase of the same gene expressed from *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 53:6301-6304
- Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau R** (2001) Taxol biosynthesis: Taxane 13 β -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 98:13595-13600
- Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau R** (2003) Taxol metabolism: Taxoid 14 β -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Arch Biochem Biophys*, 413:262-270
- Jennewein S, Long RM, Williams RM, Croteau R** (2004) Cytochrome P450 taxadiene 5 α -hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of Taxol biosynthesis. *Chem Biol*, 11:379-387
- Jones DA, Jones JDG** (1997) The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Adv Bot Res*, 24:89-167
- Juge N** (2006) Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends Plant Sci*, 11:359-367.
- Jung EH, Jung HW, Lee SC, Han SW, Heu S, Hwang BK** (2004) Identification of a novel pathogen-induced gene encoding a leucine-rich repeat protein expressed in phloem cells of *Capsicum annuum*. *BBA-Gene Struct Expr*, 1676:211-222

- Jung HW, Hwang BK** (2007) The leucine-rich repeat (LRR) protein, CaLRR1, interacts with the hypersensitive induced reaction (HIR) protein, CaHIR1, and suppresses cell death induced by the CaHIR1 protein. *Mol Plant Pathol*, 8:503-514
- Jung YC, Lee HJ, Yum SS, Soh WY, Cho DY, Auh CK, Lee TK, Soh HC, Kim YS, Lee SC** (2005) Drought-inducible—but ABA-independent—thaumatin-like protein from carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep*, 24:366-373
- Jung YH, Agrawal GK, Rakwal R, Jwa NS** (2008) Secretome: toward deciphering the secretory pathways and beyond. En: Agrawal GK, Rakwal R (ed), *Plant Proteomics: Technologies, Strategies, and Applications*, Wiley, Hoboken, NJ, pp. 83–90.
- Kagale S, Links MG, Rozwadowski K** (2010) Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 152:1109-1134
- Kajava AV** (1998) Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol*, 277:519-527
- Kärkönen A, Koutaniemi S** (2010) Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures. *J Integr Plant Biol*, 52:176-185
- Kasprzewska A** (2003) Plant chitinases-regulation and function. *Cell Mol Biol Lett*, 8:809-824
- Katz V, Fuchs A, Conrath U** (2002) Pretreatment with salicylic acid primes parsley cells for enhanced ion transport following elicitation. *FEBS Lett*, 520:53-57
- Kauss H, Jeblick W, Domard A** (1989) The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 178:385-392
- Kelly WK, Esser JE, Schroeder JI** (1995) Effects of cytosolic calcium and limited, possible dual, effects of G protein modulators on guard cell inward potassium channels. *The Plant J*, 8:479-489
- Keskin N, Kunter B** (2010) Production of trans-resveratrol in callus tissue of Öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) in response to ultraviolet-C irradiation. *J Anim Plant Sci*, 20:197-200
- Kessler A, Baldwin IT** (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol*, 53:299-328
- Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML** (1999) The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol Bioeng*, 62:97-105
- Ketchum REB, Croteau RB** (2006) The *Taxus* metabolome and the elucidation of the Taxol[®] biosynthetic pathway in cell suspension cultures. En *Plant Metabolomics*, Springer Berlin Heidelberg 291-309
- Khosroushahi AY, Valizadeh M, Ghasempour A, Khosrowshahli M, Naghdibadi H, Dadpour MR, Omid Y** (2006) Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biol Int*, 30:262-269
- Kierszniowska S, Seiwert B, Schulze WX** (2009) Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl- β -cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 8:612-623
- Kim BJ, Gibson DM, Shuler ML** (2005) Relationship of viability and apoptosis to taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures elicited with methyl jasmonate. *Biotechnol Prog*, 21:700-707
- Kim JK, Hwang BK** (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiol Plant*, 108:51-60

- Kim T, Gondre-Lewis MC, Arnautova I, Loh YP** (2006) Densecore secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)*, 21:124–133
- Kim YS, Park JY, Kim KS, Ko MK, Cheong SJ, Oh BJ** (2002) A thaumatin-like gene in nonclimateric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Mol Biol*, 49:125-135
- Kiselev KV, Dubrovina AS, Veselova MV, Bulgakov VP, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN** (2007) The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *J Biotechnol*, 128:681-692
- Knight VI, Wang H, Lincoln JE, Lulai EC, Gilchrist DG, Bostock RM** (2001) Hydroperoxides of Fatty Acids Induce Programmed Cell Death in Tomato Protoplasts. *Physiol Mol Plant Pathol*, 59:277-286
- Koeppe AE, Hezari M, Zajicek J, Stofer VB, LaFever RE, Lewis NG, Croteau RB** (1995) Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to taxa-4(5),11(12)-diene is the committed step of Taxol biosynthesis in Pacific yew. *J Biol Chem*, 270:8686-8690
- Kolewe ME, Gaurav V, Roberts SC** (2008) Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol Pharmaceutics*, 5:243-256
- Krause C, Richter S, Knöll C, Jürgens G** (2013) Plant secretome—from cellular process to biological activity. *BBA-Proteins and Proteomics*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.03.024>
- Krisa S, Larronde F, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Mérillon JM** (1999) Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: methyl jasmonate induction and ¹³C biolabelling. *J Nat Prod*, 62:1688-1690
- Krishnaveni S, Liang GH, Muthukrishnan S, Manickam A** (1999) Purification and partial characterisation of chitinases from sorghum seeds. *Plant Sci*, 144:1-7
- Kritchevsky D, Chen SC** (2005) Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review. *Nutr Res*, 25:413-428
- Küpeli E, Erdemoglu N, Yesilada E, Sener B** (2003) Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. *J Ethnopharmacol*, 89:265-270
- Kusumawati L, Imin N, Djordjevic A** (2008) Characterization of the secretome of suspension cultures of Medicago species reveals proteins important for defense and development. *J Proteome Res*, 7:4508-4520
- Kwak SH, Lee SH** (1997) The requirements for Ca²⁺, protein phosphorylation, and dephosphorylation for ethylene signal transduction in *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol*, 38:1142–1149
- Lagaert S, Beliën T, Volckaert G** (2009) Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. En: *Seminars in cell & developmental biology* (20:1064-1073) Academic Press
- Lagarda MJ, García-Llatas G, Farré R** (2006) Analysis of phytosterols in foods. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 41:1486-1496
- Laloi M, Perret AM, Chatre L, Melser S, Cantrel C, Vaultier MN, Zachowski A, Bathany K, Schmitter JM, Vallet M, Lessire R, Hartmann M, Moreau P** (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol*, 143:461-472
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G** (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol*, 54:109–136
- Lan WZ, Yu LJ, Li MY, Qin WM** (2003) Cell death unlikely contributes to taxol production in fungal elicitor-induced cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol Lett*, 25:47-49

- Lansing A, Haertel M, Gordon M, Floss HG** (1991) Biosynthetic studies on taxol. *Planta Med*, 57:83
- Larronde F, Gaudillère JP, Krisa S, Decendit A, Deffieux G, Mérillon JM** (2003) Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *Am J Enol Viti*, 54:63-66
- Lebrun-García A, Ouaked F, Chiltz A, Pugin A** (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J*, 15:773-781
- Lebrun-García A, Bourque S, Binet MN, Ouaked F, Wendehenne D, Chiltz A, Schaffner A, Pugin A** (1999) Involvement of plasma membrane proteins in plant defense response. Analysis of cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie*, 81:663-668
- Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A** (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*, 14:2627-2641
- Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, Wendehenne D, Mazars C, Ranjeva R, Pugin A** (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium*, 38:527-538
- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol*, 171:249-269
- Lecourieux-Ouaked F, Pugin A and Lebrun-García A** (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor on defense reactions in tobacco. *Mol Plant Microbe In*, 13:821-829
- Lee SC, Kim YJ Hwang BK** (2001) A pathogen-induced chitin-binding protein gene from pepper, its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethefon, methyl jasmonate or wounding. *Plant Cell Physiol*, 42:1321-1330
- Lee YK, Hwang BK** (1996) Differential induction and accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in the extracellular space and leaf tissues of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* infection. *J Phytopathol*, 144:79-87
- Leivar P, González VM, Castel S, Trelease RN, López-Iglesias C, Arró M, Boronat A, Campos N, Ferrer A, Fernández-Busquets X** (2005) Subcellular localization of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiol*, 137:57-69
- Leubner-Metzger G, Meins F** (1999) Function and regulation of plant β -1,3-glucanase (PR-2). En: *Pathogenesis-related proteins in plant*. Datta S, Muthukrishnan S (ed). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA, pp. 49-47
- Leubner-Metzger G** (2003) Functions and regulation of beta-1, 3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci Res*, 13:17-34
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79:583-593
- Lewington A, Parker E** (1999) *Ancient trees: trees that live for 1000 years*. London: Collins & Brown
- Li YC, Tao WY** (2009) Paclitaxel-producing fungal endophyte stimulate the accumulation of taxoids in suspension cultures of *Taxus cuspidate*. *Sci Horti*, 121:97-102
- Ligterink W, Kroj T, Zur Nieden U, Hirt H, Scheel D** (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*, 276:2054-2057
- Lijavetzky D, Almagro L, Belchí-Navarro S, Martínez-Zapater JM, Bru R, Pedreño MA** (2008) Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Res Notes*, 1:132-140

- Ling WH, Jones PJH** (1995) Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci*, 57:195-206
- Linthorst HJM, Melchers LS, Mayer A, van Roekel JSC, Cornelissen BJC, Bol JF** (1990) Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 87:8756-8760
- Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AK** (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep*, 29:419-436
- Liu L, White MJ, MacRae TH** (1999) Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem*, 262:247-257
- Llamos BRH, Morejón AF, Bolaños CP, Morales ST, Quiñones YB, Rodríguez MP** (2008) Fitosteroles. Parte 2: Fuentes de obtención, formas de uso y posición actual en el mercado. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39
- Long RM, Croteau RB** (2005) Preliminary assessment of the C13-side Chain 2'hydroxylase involved in Taxol biosynthesis. *Biochem Bioph Res Co*, 338:410-417
- Long RM, Lagisetti C, Coates RM, Croteau R** (2008) Specificity of the N-benzoyl transferase responsible for the last step of Taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 477:384-389
- López-Nicolás JM, Bru R, Sánchez Ferrer A, García Carmona F** (1995) Use of soluble lipids for biochemical processes: Linoleic acid cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solutions. *Biochem J*, 308:151-154
- Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA** (2001) Nitrogen assimilation in grapevine. In *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*. Springer Netherlands (pp 59-85)
- Lowe FC, Ku JC** (1996) Phytotherapy in treatment of benign prostatic hyperplasia: a critical review. *Urology*, 48:12-20
- Lu YP, Liu SY, Sun H, Wu XM, Li JJ, Zhu L** (2010) Neuroprotective effect of astaxanthin on H₂O₂-induced neurotoxicity in vitro and on focal cerebral ischemia in vivo. *Brain Res*, 1360:40-48
- Luan S** (1998) Protein phosphatases and plant signaling cascades. *Trends Plant Sci*, 3:271-275
- Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, Khan I, Netzer W, Xu H, Butko P** (2002) Inhibition of amyloid- β aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 99:12197-12202
- Ma CJ** (2008) Cellulase elicitor induced accumulation of capsidiol in *Capsicum annum* L. suspension cultures. *Biotechnol Lett*, 30:961-965
- Ma ZY, Yuan YJ, Wu JC, Zeng AP** (2002) Apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Biotechnol Lett*, 24:573-577
- Mahady GB, Liu C, Beecher CWW** (1998) Involvement of protein kinase and G proteins in the signal transduction of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 48:93-102
- Martín del Valle EM** (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*, 39:1033-1046
- Martínez-Esteso MJ, Sellés-Marchart S, Vera-Urbina JC, Pedreño MA, Bru R** (2011) DIGE analysis of proteome changes accompanying large resveratrol production by grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to methyl- β -cyclodextrin and methyl jasmonate elicitors. *J Proteomics*, 74:1421-1436

- Mathieu Y, Kurkdjian A, Xia H, Guern J, Koller A, Spiro MD, Spiro M, Neill MO, Albersheim P, Darvill A** (1991) Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J*, 1:333-343
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T** (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinases and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol*, 88:936-942
- Mazourek M, Pujar A, Borovsky Y, Paran I, Mueller L, Jahn MM** (2009) A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiol*, 150:1806-1821
- McCann SE, Freudenheim JL, Marshall JR, Graham S** (2003) Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and foods groups. *J Nutr*, 133:1937-1942
- McDonald KA, Jackman AP** (1989) Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Rep*, 8:455-458
- Meikle PJ, Bonig I, Hoogenraad NJ, Clarke AE, Stone BA** (1991) The location of (1,3)- β -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1,3)- β -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta*, 185:1-8
- Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW** (2001) ORC Anization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci*, 6:212-219
- Men SZ, Boutté Y, Ikeda Y, Li XG, Palme K, Stierhof YD, Hartmann MA, Moritz T, Grebe M** (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol*, 10:237-244
- Mercier J, Roussel D, Charles MT, Arul J** (2000) Systemic and local responses associated with UV-induced and pathogen induced resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrot. *Phytopathology*, 90:981-986
- Meywald T, Scherthan H, Nagl W** (1996) Increased specificity of colloidal silver staining by means of chemical attenuation. *Hereditas*, 124:63-70
- Mirjalili N, Linden JC** (1996) Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: Ethylene interaction and induction models. *Biotechnol Progr*, 12:110-118
- Mithofer A, Fliegmann J, Daxberger A, Ebel C, Neuhaus-Url G, Bhagwat AA, Keister DL, Ebel J** (2001) Induction of H₂O₂ synthesis by β -glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS Lett*, 508:191-195
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann M, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ** (2004) Lipid rafts in higher plant cells purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem*, 279:36277-36286
- Monteiro S, Barakat M, Piçarra-Pereira MA, Teixeira AR, Ferreira RB** (2003) Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology*, 93:1505-1512
- Morales M, Bru R, García Carmona F, Ros-Barceló A, Pedreño MA** (1998) Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with shape *Xylophilus ampelinus*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 53:179-87
- Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB** (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health promoting uses. *Prog Lipid Res*, 41:457-500
- Moreira IC, Lago JHG, Young MCM, Roque NF** (2003) Antifungal aromadendrane sesquiterpenoids from the leaves of *Xylopiopsis brasiliensis*. *J Braz Chem Soc*, 14:828-831
- Morel G, Wetmore RM** (1951) Fern callus tissue culture. *Am J Bot*, 38:141-43

- Moreno PRH, Poulsen C, van der Heijden R, Verpoorte R** (1996) Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* L. Don, G. cell suspension cultures. *Enzyme Microb Technol*, 18:99-107
- Morris P** (2001) MAP kinase signal transduction pathways on plants. *New Phytol*, 151:67-89
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15:473-497
- Murgia I, de Pinto MC, Delledonne M, Soave C, De Gara L** (2004) Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *J Plant Physiol*, 161:777-783
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A, Harberd NP and Jones JD** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol*, 18:650-655
- Neelakandan AK, Chamala S, Valliyodan B, Nes WD, Nguyen HT** (2012) Metabolic engineering of soybean affords improved phytosterol seed traits. *Plant Biotechnol J*, 10:12-19
- Negrel J, Javelle F** (1995) Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase or protease-elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiol Plantarum*, 95:569-574
- Neuhaus J** (1999) Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). En: *Pathogenesis-related proteins in plant*. Datta S, Muthukrishnan S (ed). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA, pp. 77-106
- Nickel W, Seedorf M** (2008) Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24:287-308
- Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK, Claiborne CF, Renaud J, Couladouros EA, Paulvannan K, Sorensen EJ** (1994) Total synthesis of taxol. *Nature*, 367:630-634
- Nimchuk Z, Euglem T, Holt B, Daugl J** (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annu Rev Genet*, 37:579-609
- Nims E, Dubois CP, Roberts SC, Walker EL** (2006) Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metab Eng*, 8:385-394
- Nisar M, Khan I, Ahmad B, Ali I, Ahmad W, Choudhary MI** (2008) Antifungal and antibacterial activities of *Taxus wallichiana* zucc. *J Enzym Inhib Med Chem*, 23:256-260
- Novo Uzal E, Gómez-Ros LV, Hernández JA, Pedreño MA, Cuello J, Ros Barceló A** (2009) Analysis of the soluble cell wall proteome of gymnosperms. *J Plant Physiol*, 166:831-843
- Nühse TS, Boller T and Peck SC** (2003) A plasma membrane syntaxin is phosphorylated in response to the bacterial elicitor flagellin. *J Biol Chem*, 278:45248-45254
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L** (2004) Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*, 198:249-266
- Nürnberg T, Scheel D** (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*, 6:372-379
- Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR** (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 105:361-363

- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H** (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells, identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol*, 42:479-488
- Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M** (2007) Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Meth*, 4:709-712
- Onrubia Ibáñez M** (2012) A molecular approach to taxol biosynthesis. Tesis doctoral
- Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Expósito O, Palazón J, Cusidó RM** (2010a) An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: The role of txs and bap1 gene expression. *Biochem Eng J*, 53:104-111
- Onrubia M, Expósito O, Benítez-García I, Mangas S, Cusidó RM, Palazón J** (2010b) *Taxus* sp. source of anticancer agent taxol. En: Awaad AS; Govil JN, Singh VK (ed) *Drug plants I*, 161-184
- Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Cusidó RM, Goossens A, Palazón J** (2013a) Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *J Plant Physiol*, 170:211-219
- Onrubia M, Cusidó RM, Ramirez K, Hernández-Vázquez L, Moyano E, Bonfill M, Palazón J** (2013b) Bioprocessing of plant in vitro systems for the mass production of pharmaceutically important metabolites: paclitaxel and its derivatives. *Curr Med Chem*, 20:880-891
- Ori N, Sessa G, Lotan T, Himmelhoch S, Fluhr R** (1990) A major stylar matrix polypeptide (Sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO J*, 9:3429-3436
- Ostlund RE** (2006) Regulation of cholesterol absorption by phytosterols. *Curr Atheroscler Rep*, 8:487-491
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H** (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J*, 22:1282-1288
- Palavan-Unsal N, Arisan D** (2009) Nitric oxide signalling in plants. *Bot Rev*, 75:203-229
- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Uría MA, Fraile B, Anadón R, Sáez FJ, de Miguel MP** (1997) Citología e histología vegetal y animal. Ed McGraw-Hill Interamericana
- Pant B, Manandhar S** (2007) *In vitro* propagation of carrot (*Daucus carota*) L. *Scientific world*, 5: 51-53
- Pant S, Samant SS** (2008) Population ecology of the endangered Himalayan yew in Khokhan wildlife sanctuary of north western Himalaya for conservation management. *J Mountain Sci* 3:257-264
- Park CJ, An JM, Shin YC, Kim KJ, Lee BJ, Paek KH** (2004) Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta*, 219:797-806
- Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, Yoo TH, Paek KH** (2001) A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Mol Cell*, 11:122-127
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C** (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep*, 24:255-265
- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C** (2004a). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65:1879-1893
- Passardi F, Penel C, Dunand C** (2004b) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci*, 9:534-540

- Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV** (2000) Chitinolytic enzymes: An exploration. *Enzyme Microb Technol*, 26:473-483
- Pauwels L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inze D, Goossens A** (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 105:1380-1385
- Pearson WR** (1990) Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Method Enzymol*, 183:63-98
- Peck SC, Nühse TS, Hess D, Iglesias A, Meins F, Boller T** (2001) Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell*, 13:1467-1475
- Pedras MSC, Nycholat CM, Montaut S, Xu Y, Khan AQ** (2002) Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. *Phytochemistry*, 59:611-625
- Perrone ST, McDonald KL, Sutherland MW, Guest DI** (2003) Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp. *Physiol Mol Plant Pathol*, 62:127-135
- Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L** (2007) Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int J Pharm*, 338:35-42
- Piel J, Atzorn R, Gäbler R, Kühnemann F, Boland W** (1997) Cellulysin from the plan parasitic fungus *Trichoderma viride* elicits volatile biosynthesis in higher plants via the octadecanoid signaling cascade. *FEBS Lett*, 416:143-148
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM** (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 80:939-966
- Posé D, Castanedo I, Borsani O, Nieto B, Rosado A, Taconnat L, Ferrer A, Dolan L, Valpuesta V, Botella MA** (2009) Identification of the *Arabidopsis* dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant J* 59:63-76
- Poutrain P, Mazars C, Thiersault M, Rideau M, Pichon O** (2009) Two distinct intracellular Ca²⁺-release components act in opposite ways in the regulation of the auxin-dependent MIA biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *J Exp Bot*, 60:1387-1398
- Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, Guern J** (1997) Early events induced by elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of plasma membrane NADPH-oxidase and activation of glycolysis and pentose phosphate pathway. *Plant Cell*, 9:2077-2091
- Qi Q, Mokhtar MN, Zimmermann W** (2007) Effect of ethanol on the synthesis of large-ring cyclodextrins by cyclodextrin glucanotransferases. *J Incl Phenom Macro Chem*, 57:95-99
- Qiao JJ, Yuan YJ, Zhao H, Wu JC, Zeng AP** (2003) Apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidata* co-treated with salicylic acid and hydrogen peroxide. *Biotechnol Lett*, 25:387-390
- Qu JG, Yu XJ, Zhang W, Jin MF** (2006) Significant improved anthocyanins biosynthesis in suspension cultures of *Vitis vinifera* by process intensification. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 22:299-305
- Quesada AR, Muñoz-Chápuli R, Medina MA** (2006) Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Med Res Rev*, 26:483-530

- Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T** (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Bioc*, 37:91-102
- Ralston L, Kwon ST, Schoenbeck M, Ralston J, Schenk DJ, Coates RM, Chappell J** (2001) Cloning, Heterologous Expression, and Functional Characterization of 5-epi-Aristolochene-1, 3-Dihydroxylase from Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Arch Biochem Biophys*, 393:222–235
- Ramachandra RS, Ravishankar, GA** (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 20:101-153
- Ramakrishna A, Ravishankar GA** (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behav*, 6:1720-1731
- Ramani S, Jayabaskaran C** (2008) Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *J Mol Signal*, 3:9
- Rapoport TA** (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*, 258:931-936
- Rasbery JM, Shan H, LeClair RJ, Norman M, Matsuda SP, Bartel B** (2007) *Arabidopsis thaliana* squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. *J Biol Chem*, 282:17002-17013
- Reddy ASN** (2001) Calcium: silver bullet in signalling. *Plant Sci*, 160:381–404
- Regalado AP, Pinheiro C, Vidal S, Chaves I, Ricardo CPP, Rodrigues-Pousada C** (2000) The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, *IF3*, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. *Planta*, 210:543-550
- Rehder A** (1925) New species, varieties and binations from the herbarium and the collections of the Arnold Arboretum. *J Arnold Arboretum*, 6:201-208
- Reinbothe C, Springer A, Samol I, Reinbothe S** (2009) Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J*, 276:4666-4681
- Repka V, Fischerová I, Silhárová K** (2004) Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defence responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biol Plant*, 48:273-283
- Ribera AE, Zuñiga G** (2012) Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: a review. *J Soil Sci Plant Nutr*, 12:893-911
- Rinne PLH, Kaikuranta PM, van der Schoot C** (2001) The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant J*, 26:249–264
- Roberts SC, Naill M, Gibson DM, Schuler ML** (2003) A simple method for enhancing paclitaxel release from *Taxus canadensis* cell suspension cultures utilizing cell wall digesting enzymes. *Plant Cell Rep*, 21:1217-1220
- Robinson SP, Jacobs AK, Dry IB** (1997) A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol*, 114:771-778
- Roche Y, Gerbeau-Pissot P, Buhot B, Thomas D, Bonneau L, Gresti J, Mongrand S, Perrier-Cornet JM, Simon-Plas F** (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J*, 22:3980-3991
- Rodríguez-Concepción M** (2006) Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem Rev*, 5:1-15
- Romeis T** (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Curr Opin Plant Biol*, 4:407-414
- Roos W, Dordschbal B, Steighardt J, Hieke M, Weiss D, Saalbach G** (1999) A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is

involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochem Biophys Acta*, 1448:390-402

Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn MM, Subramanian Saravanan R (2004) Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J*, 39:715–733

Rossi PG, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert JM, Costa J, Casanova J, Bolla JM, Berti L (2007) (E)-methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *J Agric Food Chem* 5:7332–7336

Rudd JJ, Franklin-Tong VE (2001) Unravelling response-specificity in Ca²⁺ signalling pathways in plant cells. *New Phytol*, 151:733–749

Sabater-Jara AB, Almagro L, Belchí-Navarro S, Ferrer MA, Ros Barceló A, Pedreño MA (2010) Induction of sesquiterpenes, phytoosterols and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited cell cultures of *Capsicum annuum*. *J Plant Physiol*, 167:1273-1281

Sabater-Jara AB, Almagro L, Belchí-Navarro S, Ros Barceló A, Pedreño MA (2011). Methyl jasmonate induces extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Capsicum chinense*. *Plant Signaling & Behav*, 6: 440-442

Saenger W (1980) Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew Chem Int Ed*, 19:344-362

Sakaldas M, Kaynas K (2010) Biochemical and quality parameters changes of green sweet bell peppers as affected by different postharvest treatments. *Afr J Biotech*, 9:8174-8181

Sakurai N (1998) Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *J Plant Res*, 111:133-148

Sánchez-Sampedro MA, Fernández-Tárrago J, Corchete P (2005) Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaernt. *J Biotechnol*, 119: 60-69

Sánchez-Sampedro MA (2006) Producción de silimarina en cultivos celulares de *Silibum marianum* (L.) Gaernt. Tesis Doctoral.

Sánchez-Sampedro MA, Fernández-Tárrago J, Corchete P (2008) Some common signal transduction events are not necessary for the elicitor-induced accumulation of silymarin in cell cultures of *Silybum marianum*. *J Plant Physiol*, 165:1466-1473

Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, Del Rio LA (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot*, 52:2115-2126

Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell*, 11:691–706

Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF (2002) Calcium at the crossroads of signalling. *Plant Cell*, 14:S401–S417

Sapir-Mir M, Mett A, Belausov E, Tal-Meshulam S, Frydman A, Gidoni D, Eyal Y (2008) Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiol*, 148:1219-1228

Saqan Naqvi SM, Harper A, Carter C, Ren Gan, Guirgis Adel, York WS, Thornburg RW (2005) Nectarin IV, a potent endoglucanase inhibitor secreted into the nectar of ornamental tobacco plants. Isolation, cloning, and characterization. *Plant Physiol*, 139:1389-1400

Sasaki K, Iwai T, Hiraga S, Kuroda K, Seo S, Mitsuhashi I, Miyasaka A, Iwano M, Ito H, Matsui H, Ohashi Y (2004) Ten rice peroxidases redundantly respond to

multiple stresses including infection with rice blast fungus. *Plant Cell Physiol*, 45:1442-1452

Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura K, Choi KB, Morishige T, Fujimoto H, Yamada Y (2001) Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 98:367-72

Satoh S, Nojiri T, Gotoh Y (1995) An extracellular insoluble protein in cultures and seeds of carrot. *Plant Cell Physiol*, 36:313-320

Schaller A, Stintzi A (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis—structure, function, regulation. *Phytochemistry*, 70:1532-1538

Schaller H (2003) The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res*, 42:163-175

Scheler C, Lamer S, Pan Z, Li XP, Salnikow J, Jungblut P (1998) Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). *Electrophoresis*, 19:918-927

Scherer NM, Thompson CE, Freitas LB, Bonatto SL, Salzano FM (2005) Patterns of molecular evolution in pathogenesis-related proteins. *Genet Mol Biol*, 28:645-653

Scherp P, Grotha R, Kutschera U (2001) Occurrence and phylogenetic significance of cytokinesis-related callose in green algae, bryophytes, ferns and seed plants. *Plant Cell Rep*, 20:143-149

Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68:850-858

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature*, 277:665-667

Schillmiller AL, Howe GA (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol*, 8:369-377

Schnitzler JP, Madlung J, Rose A, Seitz HU (1992) Biosynthesis of *p*-hydroxybenzoic acid in elicitor-treated carrot cell cultures. *Planta*, 188:594-600

Schoendorf A, Rithner CD, Williams RM, Croteau RB (2001) Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 98:1501-1506

Scholthof HB, Alvarado VY, Vega-Arreguin JC, Ciomperlik J, Odokonyero D, Brosseau C, Jaubert M, Zamora A, Moffett P (2011) Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol*, 156:1548-1555

Schröder M, Hahlbrock K, Kombrink E (1992) Temporal and spatial patterns of β -1,3-glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Plant J*, 2:161-172

Schulze B, Spiteller D (2009) Capsaicin: Tailored chemical defence against unwanted “frugivores”. *Chem Bio Chem*, 10:428-429

Schwender J, Müller C, Zeidler J, Lichtenthaler HK (1999) Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 455:140-144

Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Hwang I, Lee JS, Do Choi Y (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 98:4788-4793

Shang C, Sassa H, Hirano H (2005) The role of glycosylation in the function of a 48-kDa glycoprotein from carrot. *Biochem Biophys Res Co*, 328:144-149

- Shang GM, Wu JC, Yuan YJ** (2004) Improved cell growth and taxol production of suspension-cultured *Taxus chinensis* var. *mairei* in alternating and direct current magnetic fields. *Biotechnol Lett*, 26:875-878
- Shetty NP, Lyngs Jørgensen HJ, Jensen JD, Collinge DB, Shekar Shetty H** (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol*, 121:267-280
- Shinya T, Hanai K, Gális I, Suzuki K, Matsuoka K, Matsuoka H, Saito M** (2007) Characterization of *NtChiIV*, a class IV chitinase induced by β -1,3-, 1,6-glucan elicitor from *Alternaria alternata* 102. Antagonistic effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the induction of *NtChiIV*. *Biochem Biophys Res Commun*, 353:311-317
- Simkin AJ, Guirimand G, Papon N, Courdavault V, Thabet I, Ginis O, Bouzid S, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M** (2011) Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta*, 234:903-914
- Simmons CR** (1994) The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -D-glucanases and 1,3;1,4- β -D-glucanases. *Crit Rev Plant Sci*, 13:325-387
- Simon-Plas F, Elmayer T, Blein JP** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J*, 31:137-147
- Singh G, Gavrielli J, Oakey JS, Curtis WR** (1998) Interaction of methyl jasmonate, wounding, and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. *Plant Cell Rep*, 17:391-395
- Sivakumar G, Paek KY** (2005) Methyl jasmonate induce enhanced production of soluble biophenols in *Panax ginseng* adventitious roots from commercial scale bioreactors. *Chem Nat Compd*, 41:669-671
- Slabas AR, Ndimba B, Simon WJ, Chivasa S** (2004) Proteomic analysis of the Arabidopsis cell wall reveals unexpected proteins with new cellular locations. *Biochem Soc Trans*, 32:524-528
- Souter M, Topping J, Pullen M, Friml J, Palme K, Hackett R, Grierson D, Lindsey K** (2002) Hydra mutants of Arabidopsis are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell*, 14:1017-1031
- Souter MA, Pullen ML, Topping JF, Zhang X, Lindsey K** (2004) Rescue of defective auxin-mediated gene expression and root meristem function by inhibition of ethylene signalling in sterol biosynthesis mutants of Arabidopsis. *Planta*, 219:773-783
- Spjut RW** (2007) Taxonomy and nomenclature of *Taxus* (Taxaceae). *J Bot Res Inst Texas*, 23:203-289
- Srinivasan V, Ciddi V, Bringi V, Shuler ML** (1996) Metabolic inhibitors, elicitors and precursors as tools for probing yield limitation in taxane production by *Taxus chinensis* cell cultures. *Biotechnol Progr*, 12:457-465
- Steward N, Martín R, Engasser JM, Goergen JL** (1999) A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Rep*, 19:171-176
- Stinzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kaufmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B** (1993) Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75:687-706
- Stohs SJ** (2004) Taxol in cancer treatment and chemoprevention. En: Bagchi D y Preuss HG (ed), *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention*. Boca Raton (USA): CRC Press, pp. 519-540.
- Stubberfield LCF, Shaw PJA** (1990) A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measurements of microbial activity. *J Microb Met*, 12:151-162

- Sun T, Simon PW, Tanumihardjo SA** (2009) Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota* L.) of various colors. *J Agric Food Chem*, 57:4142-4147
- Suzuki G, Ohta H, Kato T, Igarashi T, Sakai F, Shibata D, Takano A, Masuda T, Shioi Y, Takamiya KI** (1996) Induction of a novel cytochrome P450 (CYP93 family) by methyl jasmonate in soybean suspension-cultured cells. *FEBS Lett*, 383:83-86
- Suzuki N, Mittler R** (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol Plantarum*, 126:45-51.
- Szabo E, Thelen A, Petersen M** (1999) Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep*, 18:485-489
- Szejtli J** (1997) Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *J Mater Chem*, 7:575-587
- Taiz L, Zeiger E** (2006) Secondary metabolites and plant defense. En: *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.
- Tassoni A, Fornalé S, Franceschetti M, Musiani F, Micheal AJ, Perry B, Bagni N** (2005) Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* L. cv. Barbera cell cultures. *New Phytol*, 166:895-905
- Tavares AC, Goncalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro LR** (2008) Essential oil of *Daucus carota* subsp. halophilus: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *J Ethnopharmacol*, 119:129-134
- Teutsch HG, Hasenfratz MP, Lesot A, Stoltz C, Garnier JM, Jeltsch JM, Durst F, Werck-Reichhart D** (1993) Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 90:4102-4106
- Thorpe TA** (1980) Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. *Int Rev Cytol Suppl*, 11:71-112
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P** (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 288:129-138
- Toguri T, Umemoto N, Kobayashi O, Ohtani T** (1993) Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA. *Plant Mol Biol*, 23:933-946
- Tomás-Barberán FA, Espin JC** (2001) Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric*, 81:853-876
- Tornero P, Mayda E, Gómez MD, Cañas L, Conejero V, Vera P** (1996) Characterization of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. *Plant J*, 10:315-330
- Tugizimana F, Steenkamp PA, Piater LA, Dubery IA** (2012) Ergosterol-Induced Sesquiterpenoid Synthesis in Tobacco Cells. *Molecules*, 17:1698-1715
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell Suppl*, 14:S153-S164
- Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK** (2004) Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *J Biomed Biotech*, 4:227-237
- Uegaki R, Fujimori T, Kubo S, Kato K** (1981) Sesquiterpenoid stress compounds from *Nicotiana* species. *Phytochemistry*, 20:1567-1568
- Van Engelen FA, de Jong AJ, Meijer EA, Kuil CW, Meyboom JK, Dirkse WG, Booij H, Hartog MV, Vandekerckhove J, de Vries SC, van Kammen A** (1995)

- Purification, immunological characterization and cDNA cloning of a 47 kDa glycoprotein secreted by carrot suspension cells. *Plant Mol Biol*, 27:901-910
- van Hengel AJ, Guzzo F, de Vries SC** (1998) Expression Pattern of the Carrot EP3 Endochitinase Genes in Suspension Cultures and in Developing Seeds. *Plant Physiol*, 117:43-53
- van Loon L** (1999) Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. *Pathogenesis related proteins in plant*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA, pp 1-19
- van Loon L, van Strien E** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, 55:85-97
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44:135-162
- van Loon, van Kammen** (1970) A polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun an Samsun NN II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40:199-211
- Vandelle E, Poinssot B, Wendehenne D, Bentéjac M and Pugin A** (2006) Integrated signalling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated PK in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol Plant Microbe In*, 19:429-440
- Varady KA, Houweling AH, Jones PJ** (2007) Effect of plant sterols and exercise training on cholesterol absorption and synthesis in previously sedentary hypercholesterolemic subjects. *Transl Res*, 149:22-30
- Vasconsuelo A, Boland R** (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci*, 172:861-875
- Vera P, Conejero V** (1988) Pathogenesis-related proteins of tomato P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiol*, 87:58-63
- Vera P, Tornero P, Conejero V** (1993) Cloning and expression analysis of a viroid-induced peroxidase from tomato plants. *Mol Plant Microbe Int*, 6:790-794
- Vitale A, Denecke J** (1999) The endoplasmic reticulum—gateway of the secretory pathway. *Plant Cell*, 11:615-628
- Vögeli U, Chappell J** (1988) Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol*, 88:1291-1296
- Vogeli V, Meins F y Boller T** (1988) Co-ordinated regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Planta*, 174:364-372
- von Heijne G** (1990) The signal peptide. *J Membr Biol*, 115:195-201
- von Malek B, van der Graaff E, Schneitz K, Keller B** (2002) The Arabidopsis male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta*, 216:187-192
- Vongpaseuth K, Roberts SC** (2007) Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture. *Curr Pharm Biotechnol*, 8:219-236
- Vranová E, Coman D, Gruissem W** (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol* 64:1-36
- Wagley LM, Galdfelter HJ, Phillips GC** (1987) De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* in vitro. Macro and micro-photographic evidence of de novo regeneration. *Plant Cell Rep*, 6:167-171
- Wahyuni Y, Ballester AR, Tikunov Y, de Vos RC, Pelgrom KT, Maharijaya A, Sudarmonowati E, Bovy AG** (2013a) Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. *Metabolomics*, 9:130-144

- Wahyuni Y, Ballester AR, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG** (2013b) Secondary Metabolites of Capsicum Species and Their Importance in the Human Diet. *J Nat Prod* dx.doi.org/10.1021/np300898z
- Walker K, Croteau R** (2000a) Molecular cloning of a 10-deacetylbaocatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 97:583-587
- Walker K, Croteau R** (2000b) Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA:taxane 2a-O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 97:13591-13596
- Walker K, Klettke K, Akiyama T, Croteau R** (2004) Cloning, Heterologous Expression, and Characterization of a Phenylalanine Aminomutase Involved in Taxol Biosynthesis. *J Biol Chem*, 279:53947-53954
- Walker K, Schoendorf A, Croteau R** (2000c) Molecular cloning of taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol-O-acetyl-transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, 374:371-380
- Walker K, Long R, Croteau R** (2002a) Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 99:12715-12720
- Walker K, Long R, Croteau R** (2002b) The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 99:9166-9171
- Wang C, Wu J, Mei X** (2001) Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding. *Biotechnol Progr*, 17:89-94
- Wang H, Nagegowda DA, Rawat R, Bouvier-Navé P, Guo D, Bach TJ, Chye ML** (2012) Overexpression of *Brassica juncea* wild-type and mutant HMG-CoA synthase 1 in *Arabidopsis* up-regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance. *Plant Biotechnol J*, 10:31-42
- Wang JW, Zheng LP, Wu JY, Tan RX** (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, 15:351-358
- Wang Y, Wu JC, Yuan YJ** (2007). Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Cell Biol Int*, 31:1179-1183
- Wang Y, Yuan YJ, Wu JC** (2003) Translocation of isopentenyl pyrophosphate for taxol biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 74:283-288
- Wani M, Taylor H, Wall M, Coggon P, McPhail A** (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 93:2325-2327
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot*, 100:681-697
- Watson BS, Lei Z, Dixon RA, Sumner LW** (2004) Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry*, 65:1709-1720
- Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgård IV, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM, Duroux L** (2002) Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, 269:6063-6081
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defense responses. *Curr Opin Plant Biol*, 7:449-455

- Wheeler AL, Long RM, Ketchum REB, Rithner CD, Williams RM, Croteau R** (2001) Taxol biosynthesis: differential transformations of taxadien-5 α -ol and its acetate ester by cytochrome P450 hydroxylases from *Taxus* suspension cells. *Arch Biochem Biophys*, 390:265-278
- White PJ, Broadley MR** (2003) Calcium in plants. *Ann Bot (London)*, 92:487–511
- Whitehead IM, Threlfall DR, Ewing DF** (1989) 5-epi-aristolochene is a common precursor of the sesquiterpenoid phytoalexins capsidiol and debneyol. *Phytochemistry*, 28:775-779
- Wickremesinhe ERM, Arteca RN** (1993) *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 35:181-193
- Wildung MR, Croteau R** (1996) A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem*, 271:9201-9204
- Willemsen V, Friml J, Grebe M, van den Toorn A, Palme K, Scheres B** (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in Arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell*, 15:612-625
- Wilson CR, Sauer JM, Hooser SB** (2001) Taxines: a review of mechanism and toxicity of yew (*Taxus spp.*) alkaloids. *Toxicol*, 39:175-185
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT** (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ*, 31:622–631
- Winkler A, Puhl M, Weber H, Kutchan TM, Gruber K, Macheroux P** (2009) Berberine bridge enzyme catalyzes the six electron oxidation of (S)-reticuline to dehydroscoulerine. *Phytochemistry*, 70:1092-1097
- Worrall D, Hird DL, Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R** (1992) Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 4:759–771
- Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJH** (2009) Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr*, 63:813-820
- Wu CT, Bradford KJ** (2003) Class I chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellins in tomato seeds and leaves. *Plant Physiol*, 133:263-273
- Wu CT, Leubner-Metzger G, Meins FJr, Bradford KJ** (2001) Class I β -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol*, 126:1299-1313.
- Wu J, Ge X** (2004) Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. *Biotechnol Bioeng*, 85:714-720
- Wu J, Wang C, Mei X** (2001a) Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus sp.* cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *J Biotechnol*, 85:67-73
- Wu S, Qi J, Zhang W, Liu S, Xiao F, Zhang M, Xu G, Zhao W, Shi M, Pang Y, Shen H, Yang Y** (2009) Nitric oxide regulates shikonin formation in suspension-cultured *Onosma paniculatum* cells. *Plant Cell Physiol*, 50:118–128
- Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen R-F** (2006) Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel or LC-MALDITOF/TOF. *J Prot Res*, 5:651–658
- Xu M, Dong J** (2005) Elicitor-induced nitric oxide burst is essential for triggering catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67:40–44

Xu M, Dong JF (2007) Involvement of nitric oxide signaling in mammalian Bax-induced terpenoid indole alkaloid production of *Catharanthus roseus* cells. *Sci China Ser C Life Sci*, 50:799–807

Yamagami A, Nakazawa M, Matsui M, Tujimoto M, Sakuta M, Asami T, Nakano T (2009) Chemical genetics reveal the novel *trans*-membrane protein BIL4, which mediates plant cell elongation in brassinosteroid signalling. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73:415-421

Yang RL, Yan ZH, Lu Y (2008) Cytotoxic Phenylpropanoids from Carrot. *J Agric Food Chem*, 56:3024-3027

Yang Y, Shah J, Klessig DF (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev*, 11:1621-1639

Yannarelli GG, Noriega GO, Batlle A, Tomaro ML (2006) Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta*, 224:1154-1162

Yin J, Tezuka Y, Shi SL, Nobukawa M, Nobukawa T, Kadota S (2006) *In vivo* anti-osteoporotic activity of isotaxiresinol, a lignan from wood of *Taxus yunnanensis*. *Phytomedicine*, 13:37-42

Yoshizawa T, Shimizu T, Hirano H, Sato M, Hashimoto H (2011) Purification, crystallization and X-ray diffraction study of extracellular dermal glycoprotein from carrot and the inhibition complex that it forms with an endo-glucanase from *Aspergillus aculeatus*. *Acta Crystallogr F*, 67:830-832

Young SA, Guo A, Guikema JA, White FF, Leach JE (1995) Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Physiol*, 107:1333-1341

Yu KW, Gao W, Hahn EJ, Paek KY (2002) Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Biochem Eng J*, 11:211-215

Yu LJ, Lan WZ, Qin WM, Xu HB (2001) Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Prog Biochem* 37:477-482

Yuan YJ, Ma ZY, Wu JC, Zeng AP (2002b) Taxol-induced apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Lett*, 24:615–618

Yuan YJ, Wei ZJ, Miao ZQ, Wu JC (2002a) Acting paths of elicitors on taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect. *Biochem Eng J*, 10:77-83

Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y (1996) Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol*, 14:1129-1132

Zamboni A, Gatto P, Cestaro A, Pilati S, Viola R, Mattivi F, Moser C, Velasco R (2009) Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. *BMC Genomics*, 10:363-376

Zamboni A, Vrhovsek U, Kassemeyer HH, Mattivi F, Velasco R (2006) Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). *Vitis*, 45:63-68

Zamir LO, Nedeia ME, Belair S, Sauriol F, Mamer O, Jacquain E, Jean FI, Garneau FX (1992) Biosynthetic building blocks of *Taxus canadensis* taxanes. *Tetrahedron Lett*, 33:5235-5236

Zhang B, Zheng LP, Wang JW (2012) Nitric oxide elicitation for secondary metabolite production in cultured plant cells. *Appl Microbiol Biot*, 93:455-466

- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R** (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 23:283-333
- Zhao J, Hu Q, Guo YQ, Zhu WH** (2001) Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca^{2+} -influx and the oxidative burst. *Plant Sci*, 161:423–431
- Zhao J, Sakai K** (2003) Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor induced β -thujaplicin accumulation in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *J Exp Bot*, 54:647-656
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q, He XW** (2000) Improved alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnol Lett*, 22:1221-1226
- Zhao Y, Schenk DJ, Takahashi S, Chappell J, Coates RM** (2004) Eremophilane sesquiterpenes from capsidiol. *J Org Chem*, 69:7428-7435
- Zhen Dong T, Jun L, Cong Hua X** (2003) Cloning of a pathogenesis-related protein gene cDNA of potato using RACE methods combined with cDNA library. *Acta Genet Sin*, 30:996-1002.
- Zheng LP, Guo YT, Wang JW, Tan RX** (2008) Nitric oxide potentiates oligosaccharide- induced artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *J Integr Plant Biol*, 50:49–55
- Zhong JJ** (2002) Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *J Biosci Bioeng*, 94:591-599
- Zhu J, Chen S, Alvarez S, AsirvathamVS, Schachtman DP, Wu Y, Sharp RE** (2006) Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. *Plant Physiol*, 140:311–325
- Zidovetzki R, Levitan I** (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta*, 1768:1311-1324
- Zu Y, Pang HH, Yu JH, Li DW, Wei XX, Gao YX, Tong L** (2011) Responses in the morphology, physiology and biochemistry of *Taxus chinensis* var. *mairei* grown under supplementary UV-B radiation. *J Photoch Photobio B*, 98:152–158

