UNIVERSITAT DE BARCELONA

Regulación de la producción de taxanos y otros metabolitos secundarios en cultivos de células y órganos vegetales

Heriberto Rafael Vidal Limón

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) i a través del Dipòsit Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) y a través del Repositorio Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TAXANOS Y OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS Y ÓRGANOS VEGETALES.

HERIBERTO RAFAEL VIDAL LIMÓN

2017

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

DOCTORAT EN BIOTECNOLOGÍA

REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TAXANOS Y OTROS METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS Y ÓRGANOS VEGETALES.

Memòria presentada per Heriberto Rafael Vidal Limón per optar al títol de doctor per la universitat de Barcelona

Dra. Rosa M. Cusidó Vidal
Directora

Dr. Javier Palazón Barandela
Director

Heriberto Rafael Vidal Limón
Doctorando

Dra. Rosa M. Cusidó Vidal
Tutora

Heriberto Rafael Vidal Limón 2017

A.L.G.D.G.A.D.U.

A Karla, por brindarme inspiración para seguir luchando por el futuro:
- eres mi equilibrio, paz y amor -

A mi familia en México, por ser los grandes pilares en mi vida.

Padres y hermanos; sobrinos y cuñados.

“Una característica maravillosa de la ciencia es que aprende de sus errores”

Ruy Pérez Tamayo

Agradecimientos

En primer lugar al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), por hacer posible la realización de este trabajo de investigación científica.

A la Universidad de Barcelona, en particular al grupo de Fisiología Vegetal de la Facultat de Farmacia. Un reconocimiento enorme a mis directores de tesis Dra. Rosa Mª Cusidó y Dr. Javier Palazón por todo el apoyo, guía, motivación y esfuerzo académico para la realización de ésta tesis, su dirección me a hecho aprender y mejorar mis habilidades científicas. Más allá de lo profesional, les agradezco todo el apoyo personal; su valía como profesores solo es superada por su calidez humana que los hace las buenas personas que son.

Por la gran ayuda a la Dra. Mercedes Bonfill y Elizabeth Moyano quienes siempre tuvieron la mejor disposición para las muchas consultas que surguieron a lo largo del trabajo. A todos los profesores del departamento, gracias por su apoyo en los momento requeridos.

Al grupo de investigación de la Universitat de Lleida, dirigido por los Drs. Paul Christou y Teresa Capell, por su apoyo incondicional en la realización experimental de ésta tesis. Igualmente agradezco a Ludo, Changfu, Evangelie, Gemma, Uxue, Judith, Edu, Ravi, Raziel, Helga, y Paula por el apoyo y la convivencia.

Al grupo de investigación de la Universidad de Murcia a cargo de la Dra. Mª Ángeles Pedreño, quienes me brindaron ayuda en todo momento para obtener mis datos experimentales. A las Dras: Lorena, Ana Belén y Sarai, mil gracias por todo.

A mis compañeros y amigos del departamento, quienes se convirtieron en mi familia durante éste periódo. A los esenciales del “Lab” con los viví muchos años: Ana, Lili, Diego, Raúl, Virginie; muchísimas cosas pasamos juntos y todo lo que me ayudaron se queda indeleble en mi, siempre podrán contar conmigo.

A todos los amigos que han pasado por el departamento en éstos años (¡me pasé un poco ;) Más del lab: Miriam, Oscar, Lucie, Kristina, Mohamad, Maryam, Suellen, Ana Luisa, David Nes, Said, Xavi-Victor, Marta, Ali, Farnoosh, Adrián, Andrea, David C, Carmen, Waqas, Ozçag, Antonia, Mahsa, Selene, Ozlam, Claudia, Luisa, Mariana, Alicia, Stefania, Marco, Marziyeh, Nicolas, Abbas, Irene, Jon.

Los “vecinos”: Nati, Jean, Laura, Carle, Ying, Caro, Patri, Fred, Luciana, Javier, Carmelina, Yaiza, Xavi, Miren, Kosta, Chang Xi, Ambra, Nazanin. Gracias por todas la alegría, pláticas importantes y sin sentido además de las reflexiones a la hora de comer, no se olvidaran.

A los buenos amigos ajenos al departamento, pero allí presentes: Dani, Quentin, Alex, Sandra, Izhias, David M, Cris, Albert, Alejandro, Naty, Jorge; un gustazo el haberlos conocido y compartir buenos momentos de recreo y reflexión, los llevo conmigo.

Un agradcimiento especial a mis suegros Magda y Carlos quienes siempre han tenido un comentario acertado para levantar el ánimo y a pesar de la distancia siempre los hemos sentido cerca. También a mi cuñado Alán por ser sincero conmigo.

Sin lugar a dudas, le agradezco A.G.A.D.U. la dicha de haber crecido en un hogar lleno de amor, con una familia cariñosa que me enseñó a trabajar para conseguir lo que me proponga. A mi padre por ser mi

héroe, ejemplo, guía y sobre todas las cosas, por ser mi amigo. A mí madre, por dividirse en dos, por que a pesar de trabajar mucho siempre tuvo una sonrisa y un beso para nosotros al ir a dormir. A mi hermano por ser mi amigo, confidente, consejero y brindarme apoyo incondicional para lo que venga; por que nunca se queda quieto y lucha por lo que cree correcto. A mi hermanita por escucharme cuando lo necesité, por ser honesta en su actuar y pensar, por demostrarme que los buenos se levantan ante la adversidad. Al futuro (mis sobrinos Luci, Xavi, Santi) ustedes son la razón por la que todos luchamos por un mundo mejor. También a mis cuñados, por entrar en mi loca familia y créanme, su presencia es vital para el buen engranaje del todo.

A mi gran y basta familia, son demasidos para nombrarlos a todos pero cada uno me aportó algo: escuché a los mayores, aprendí de los primos y jugué con los peques. Se les quiere mucho.

Al final, pero siendo la más importante, le agradezco a mi esposa, amiga y novia perpetua Karla, quien ha sabido quererme y aguantarme –cosa nada fácil- en las buenas y peores de ésta travesía. Por compartir su alegría e inspirarme a diario para dar lo mejor. Eres la luna que contemplo por las noches con la promesa de un futuro mejor…Te amo.

Palabras clave:

- Taxol
- Cultivos celulares elicitados
- *Taxus media*
- *Taxus baccata*
- Taximin
- Coronatina
- Ciclodextrinas
- Perfluorodecalinas
- Hexenol
- Transformación genética
- Biolística

Resumen

Los cultivos celulares en suspensión representan un excelente herramienta biotecnológica para la producción de compuestos bioactivos empleados en la industria farmacéutica, cosmética y química. Entre éstos, los metabolitos secundarios de origen vegetal son de los más valiosos, aunque su producción en cultivos celulares es en bajas cantidades. Mediante la aplicación estratégica de elicitores ha sido factible incrementar la producción de dichos metabolitos y mediante la ingeniería genetica se ha logrado manipular genes claves en las rutas metabólicas que generan compuestos de interés. Un ejemplo exitoso en la producción biotecnológica de un compuesto con alto valor comercial mediada por la adicción de elicitores es la producción de taxol y taxanos relacionados, empleando como plataforma cultivos celulares del género *Taxus spp.*

En éste trabajo optamos por el uso de los elicitores coronatina, β-ciclodextrinas, perfluorodecalinas, hexenol en cultivos celulares de *Vitis y Taxus*, además de probar el efecto elicitor del Taximin (péptido identificado por nuestro grupo), consiguiendo aumentar la producción de taxanos considerablemente en los cultivos en suspensión, incrementar la producción de biomasa del cultivo, ésto correlacionando los efectos analizados con los niveles de expresión de los genes implicados en la ruta metabólica. Paralelamente, se estandarizó un protocolo de transformación por biolística para células de *T. media*, consigiendo observar la expresion estable del gen reportero utilizado, el cual fue co-transformado con un gen clave flujo limitante de la ruta de taxanos.

Abstract

Cell suspension cultures constitute an excellent biotechnological tool for the production of bioactive compounds useful for the pharmaceutical, cosmetic, chemical etc. industries. Among them, plant secondary metabolites with therapeutic properties are the most valuables, although it's productivity in cell cultures are generally in low quantities. Using the elicitation strategy is possible increase the production of these important compounds, and genetic engineering has managed manipulated key genes in metabolic pathways that generate compounds of interest.

Taxol, a very known and effective anticancer compound, as well as related taxanes production is a successful example of biotechnological production of high added-value compounds mediated by elicitors using as platform *Taxus spp* cell cultures.

In this work we added coronatine, β-cyclodextrins, perfluorodecalins and hexenol, as elicitiors, to cell suspension culture of *Vitis* and *Taxus*. Additionally the elicitor effect of Taximin (peptide identified by our group) was tested. Have achieved improve taxanes production, increase cell growing biomass in cultures correlating with the increment in gene expression levels of taxanes metabolic pathway.

We standardized a biolostics transformation protocol for *T. media* cells. We were able to observed the stable expression of the reporter gene, which was co.transfomed with a key gene from taxane pathway.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN …….. .. 1

1.1. Biofactorías Celulares Vegetales …… 4

1.2. Mejora de la producción biotecnológica de taxanos en cultivos celulares de Taxus spp., mediante aproximaciones de tipo empírico …… 13

1.3. Biosíntesis de taxanos ……..... 20

1.4. Aproximaciones de tipo racional para un mejor conocimiento de la biosíntesis de taxanos ……..… 22

1.5. Estudios ómicos ……..……..……..…… 24

1.6. Análisis funcional de genes candidatos a la biosíntesis de taxanos …..……..... 29

1.7. Utilización de las técnicas de ingeniería metabólica en la mejora de la producción de taxanos ……..…. 34

1.8. Perspectivas de futuro ……..……..…….. 36

2. OBJETIVOS …… 39

3. MATERIALES Y MÉTODOS ..…… 43

3.1. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Taxus* sp …… 45

3.2. Crecimiento y viabilidad de cultivos en suspensión 47

3.3. Elicitación de suspensiones celulares con nuevos compuestos ……..……..… 48

3.4. Extracción y cuantificación por UPLC de taxanos …… 51

3.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) ……. 53

3.6. Transformación de *Taxus media* por biolística ……. 55

3.6.1. Material vegetal utilizado …….. 55

3.6.2. Clonación del gen *BAPT* …….. 55

3.6.3. Clonación del gen BAPT bajo el control del doble promotor CaMV35S (Pd35S) ……... 57

3.6.4. Preparación de las partículas de oro cubiertas con DNA y bombardeo del material vegetal ……. 62

4. RESULTADOS Y SU DISCUSIÓN ……....……. 67

4.1. Efecto de las perfluorodecalinas y el hexenol en la producción biotecnológica de taxanos ……... 69

4.1.1. Estudio del crecimiento de los cultivos celulares de *T. media* …….…….…….…….…….. 73

4.1.2. Estudio de la producción de taxanos de los cultivos celulares de *T. media* …….……... 80

4.1.3. Efecto de las perfluorodecalinas y el hexenol sobre el perfil de transcritos de algunos genes implicados en la biosíntesis del taxol ……..…… 93

4.2. Efecto de las perfluorodecalinas y el hexenol en la producción biotecnológica de estilbenos ……... 105

4.2.1. Estudio del crecimiento de los cultivos celulares de *V. vinífera* ……..……..……..…….. 108

4.2.2. Estudio de la producción de resveratrol de los cultivos celulares de *V. vinífera* ……..……..……. 112

4.2.3. Estudio del perfil transcriptómico de los cultivos celulares de *V. vinífera* ……..…….. 114

4.3. Acción del taximin en cultivos celulares de *Taxus baccata* ……..……..……..… 122

4.3.1. Crecimiento y viabilidad de las suspensiones celulares …….. 128

4.3.2. Producción de taxanos ……. 133

4.4 Transformaciones por biolística ……..... 140

5. CONCLUSIONES ……..……... 163

BIBLIOGRAFIA ……..……..……... 169

ABREVIATURAS

2,4-D, 2,4-diclorofenoxiacético

35S, promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV

4CL, cumaroil CoA ligasa

ABA, ácido abscísico

Amp, ampicilina

ATC, Anatomical Therapeutic Chemical

BIII , bacatina III

B5, medio de cultivo de Gamborg

BAP, bencilaminopurina

BAPT, bacatina III 13-O-(3-amino-3-fenilpropanoil) transferasa

BAPT$_{X\text{-}N}$, gen *BAPT* más los adaptadores Xbal – NotI

β-CDs, ciclodextrinas

C4H, ácido cinámico-4-hidroxilasa

Cc, células quimio-competente DH5a *E. coli*

cDNA-AFLP, cDNA-amplified fragment length polymorphism

CEF, cefalomanina

CNT, control

Coro, Coronatina

CoA, Coenzima A

CRPs ,péptidos ricos en cisteína

DAB, 10-deacetilbacatina III

DAD, detector “photodiode array”

DAF, diacetato de fluoresceina

DBTA, 10-deacetilbaccatina III-10-O-acetyiltransferasa

DBTNBT, Debenzoil taxol-N-benzoil transferasa.

DMSO, dimetil sulfóxido

DT, deacetiltaxol

EtOH, Etanol

FDA, Food and Drug Administration

FRAP, recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueado

GA3, ácido giberélico

GFP, Proteína verde fluorescente

GGPP, difosfato de geranilgeranilo

Gm, gentamicina

gusA, gen reportero ß-glucuronidasa

Hex, (Z)-3-hexenol

HPLC, cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-MS/MS, cromatografía liquida acoplada a espectrometría de masas

Hyg*,* gen *hptII* de resistencia a Higromicina

IP, yoduro de propido

IPTG, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido

JAs, Jasminatos

JA-Ile, isoleucina de ácido jasmónico

JERE, respuesta a jasmonato y elicitor

KIN, kinetina

LB, medio líquido Luria Bertani

Medio osmótico, MCC suplementado con manitol 0,4 M

MeJa, Jasmonato de Metilo

MCC, medio óptimo para producción de biomasa, Gambor B5

MCP, medio óptimo para producción de taxanos, Gambor B5

MIC, medio óptimo de inducción, Gambor B5

MRM, Molecular Reaction Monitoring

MS, Murashige-Skoog

NAA, ácido naftalenacético

ND, No detectado

nptII, gen de resistencia a kanamicina

O_2, Oxigeno

OGM, Organismos Genéticamente Modificados

O/N, toda la noche

PAL, fenilalanina amonio liasa

PAM, fenilalanina aminomutasa

PCCL, gen que codifica para enzima β-fenilalanina CoA ligasa

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

Pd35S, doble promotor 35S

PEP, péptidos elicitores

PF, peso fresco

PFD, Perfluorodecalina

PFDgas, perfluorodecalina en forma gasificada

PFDdegas, perfluorodecalina en forma desgasificada

PIC, picloram

PS, peso seco

qRT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SAES, solución antioxidante estéril

SE, error standart

SIDA, Sindrome de Inmunodefisiencia Adquirida

Sm/SpR, gen de resistencia a estreptomicina/espectinomicina

Spec, espectinomicina

STS, estilbeno sintasa

T1bOH, Taxano-1b-hidroxilasa

T10bOH, Taxano-10b-hidroxilasa

T13aOH, Taxano-13a-hidroxilasa

T2'aOH, Taxano-2'a-hydroxylasa

T5aOH, Taxano-5a-hidroxilasa

T9aOH, Taxano-9a-hidroxilasa

Tags, etiquetas de genes

TAT, Taxadieno-5a-ol-O-acetil transferasa

TbTAX-Taximin, gen Tb595

TBPCCL, β-fenilalanina CoA ligasa

TBT, Taxano-2a-O-benzoil transferasa

TF, factores de transcripción

t-R, *t*-Resveratrol

TX, taxol

TXS, Taxadieno sintasa

US, baño ultrasonidos

V-$C_{6,}$ Compuestos volátiles C6

VOCs, compuestos orgánicos volátiles

VoGES, *Valeriana officialis*

WPM, Woody Plant Medium

X-Gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

X-Gluc, ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-ß-D-glucoronico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de una biofactoría y algunas de sus ventajas en relación con los cultivos convencionales …… 6

Figura. 2. Fundamentos de una biofactoría vegetal, incluyendo ejemplos de aceleradores de procesos así como los ralentizadores que dificultan su implementación a nivel industrial …… 7

Figura 3. Enfoques empíricos vs racionales para un mejor conocimiento de los cambios a nivel celular/molecular en los cultivos celulares durante los procesos de optimización …….. 10

Figura. 4. Estructura del taxol (placlitaxel) y sus derivados semisintéticos utilizados actualmente en la lucha contra el cáncer …… 11

Figura. 5. Fuentes actuales de taxol y sus análogos ...…… 12

Figura 6. Establecimiento de los cultivos en dos fases basados en aproximaciones de tipo empírico …...……. 15

Figura. 7. Biosíntesis de taxanos a partir del difosfato de geranilgeranilo (GGPP). TS, Taxadieno sintasa; T5αOH, Taxano-5α-hidroxilasa; TAT, Taxadieno-5α-ol-O-acetil transferasa; T13αOH, Taxano-13α-hidroxilasa; T10βOH, Taxano-10β-hidroxilasa; T1βOH, Taxano-1β-hidroxilasa; T9αOH, Taxano-9α-hidroxilasa; TBT, Taxano-2α-O-benzoil transferasa; DBTA, 10-deacetilbaccatina III-10-O-acetyiltransferasa; BAPT, baccatina III-3-amino,13-fenilpropanoil-CoA transferasa; T2'αOH, Taxano-2'α-hydroxylasa; DBTNBT, Debenzoil taxol-N-benzoil transferasa 21

Figura 8. Efecto de los elicitores sobre la expresión de genes relacionados con la ruta de taxanos en cultivos celulares de *Taxus* spp ..…….. 24

Figura. 9. Relación media de la agrupación jerárquica del transcriptoma de las etiquetas de genes seleccionados inducidos por MeJa en cultivos celulares de *T. baccata*. Los puntos de tiempo para el análisis de agrupamiento se indican en la parte superior: 12 d en medio de crecimiento (GM), y 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 1d, 2d, 4d en medio de producción (PM) en condiciones de control y elicitadas con MeJa. Los cuadros rojo y verde reflejan la activación transcripcional y la represión, respectivamente, en relación con el nivel de expresión promedio en las células de control. Las casillas grises corresponden a puntos de tiempo perdidos. El dendrograma en el lado izquierdo del transcriptoma indica los grupos de genes activados y reprimidos. A la derecha, etiquetas secuenciales clasificadas en categorías funcionales según clasificación FunCat …..……. 27

Figura 10. Phyre2 modelo de la proteína TB768 (rojo) y el 3A9U PDB archivo de 4-coumarate-CoA ligase (verde). (B) Predicción de los dominios catalíticos para β-fenilalanina-CoA ligasa. Sitio activo coloreado en verde, unión de AMP en rojo, sitio de unión CoA en naranja y el sitio activador de acilo en azul…… 31

Figura 11. Análisis por MRM del ácido 4-cumárico y actividad de la β-fenilalanina-CoA ligasa. Las flechas indican el pico al tiempo de retención correspondiente de los dos fragmentos de iones específicos analizados para cada molécula utilizada para confirmar su identidad (914.3 / 407.3 y 914.3 / 428.2 para 4-cumarato-CoA con RT: 3.87; 916.2 / 409.3 y 916.2 / 307,3 con una RT: 3,89 para β-fenilalanina-CoA) ..…… 32

Figura 12. (A) Captura de la pantalla del péptido de señal que muestra que no hay péptido señal en la proteína Tb768. (B) Recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP) de TB768-YPF y GFP en hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes de fluorescencia se registraron antes, inmediatamente después, y 57 segundos después del fotoblanqueo en la región de interés indicada (ROI: círculo blanco). El color de TB768-YFP en las fotos microscópicas confocales se ha cambiado a verde para una mejor visualización ..…….. 33

Figura 13. Etapas de la inducción de callo y del establecimiento de las suspensiones celulares. A) Explantos. B) Inducción de callos. C) Cultivo de callo. D) Cultivo de la suspensión celular ..…… 46

Figura 14. *Tinción diferencial del DAF:IP. (A) en verde células vivas. (B) en rojo células muertas*…… *48*

Figura 15. Sistema de desgasificación de la perfluorodecalina 50

Figura 16. Representación esquemática del plásmido pK7WG2_BAPT …….. 56

Figura 17. Representación esquemática del plásmido pIV2B2.1_VoGES …… 58

Figura 18. Esquema del diseño experimental para generar la construcción pIV2B2.1_BAPT. A: Ligación en el plásmido intermedio pGEM-T Easy. B: Extracción del gen *BAPT* para clonarlo en vector pIV2B2.1, obteniendo el plásmido final ….. 59

Figura 19. Esquema de amplificación del gen *BAPT* con los cebadores de tabla 4 …….. 62

Figura 20. Curso del crecimiento medido como peso fresco (PF) de los cultivos celulares de *T. media* durante un periodo de 24 días, en el medio optimizado para la producción de taxanos. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas ± SE …….. 75

Figura 21. Curso del crecimiento medido como peso seco (PS) de los cultivos celulares de *T. media* durante un periodo de 24 días, en el medio optimizado para la producción de taxanos. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas ± SE …….…… 78

Figura 22. Viabilidad (expresada en porcentaje de células vivas respecto al total) de los cultivos celulares de *T. media* durante un periodo de 24 días, en el medio optimizado para la producción de taxanos. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas ± SE ……. 79

Figura 23. Producción total de taxanos (expresada en mg/L) de la línea celular de *T. media* durante un período de cultivo de 24 días, en un medio de producción optimizado para la síntesis de taxanos. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones biológicas±SE. MCC: medio de crecimiento celular; CNT: control; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β−ciclodextrinas (50 nM); PDFgas+ Coro+β-CDs; PDFdegas + Coro+β-CDs; Hex + Coro+β-CDs.. 82

Figura 24. Taxanos totales acumulados enel interior de las células, medio de cultivo y fase de PFD, a lo largo de 24 días de cultivo, en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+ Coro+β-CDs; PDFdegas + Coro+β-CDs; Hex + Coro+β-CDs.. 85

Figura 25. Producción de taxanos individuales en cultivos celulares de *T. media* mantenidos en las condiciones experimentales descritas, durante 24 días. Cada valor es promedio de 3 repeticiones biológicas±SE. MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+Coro+β-CDs; PDFdegas+Coro+β-CDs; Hex+Coro+β-CDs …….. 88

Figura 26. Expresión relativa del gen *T13αOH* en cultivos celulares de *T. media* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas + Coro+β-CDs; PDFdegas + Coro+β-CDs; Hex + Coro+β-CDs. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE …… 95

Figura 27. Expresion relativa del gen baccatin III-3-amino, 13-pfenilpropanoiltransferasa (*BAPT*) en cultivos celulares de *T. media* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+Coro+β-CDs; PDFdegas + Coro+β-CDs; Hex + Coro+β-CDs. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE …….. 97

Figura 28. Expresion relativa del gen debenzoil taxol N-benzoil transferase (*DBTNBT*) en cultivos celulares de *T. media* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas + Coro+β-CDs; PDFdegas+Coro+β-CDs; Hex+Coro+β-CDs. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE 98

Figura 29. Expresion relativa del gen b-fenilalanina-CoA ligasa (*PCCL*) en cultivos celulares de *T. media* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas + Coro+β-CDs; PDFdegas + Coro+β-CDs; Hex + Coro+β-CDs. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE 100

Figura 30. Biosíntesis de resveratrol a partir de fenilalanina. PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, ácido cinámico-4-hidroxilasa; 4CL, cumaroil CoA ligasa, STS, estilbeno sintasa 108

Figura 31. Curso del crecimiento medido como peso fresco (PF) de los cultivos celulares de *V. vinifera* durante un periodo de 168h, en condiciones control y en las de elicitación estudiadas en este ensayo. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas ± SE 110

Figura 32. Producción de *t*-R en cultivos celulares de *V. vinifera* mantenidos en las condiciones experimentales descritas, durante 72h. MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas + MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE ……. 113

Figura 33. Expresion relativa del gen *PAL* (codifca fenilalanina amonio liasa) en cultivos celulares de *V. vinifera* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas + MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE ……. 116

Figura 34. Expresion relativa del gen *C4H* (codifica cinamato 4 hidroxilasa) en cultivos celulares de *V. vinifera* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas + MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE …….. 117

Figura 35. Expresion relativa del gen *4CL* (codifica 4-cumaroil CoA ligasa) en cultivos celulares de *V. vinifera* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas + MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE 118

Figura 36. Expresion relativa del gen *STS* (codifica para el complejo enzimático estilbeno sintasa) en cultivos celulares de *V. vinifera* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas+ MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE 120

Figura 37- Producción de biomasa (expresada como g PF/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (DMSO-EtOH) o elicitados con HyproTaximin (1μM y 10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJa-Txi), a lo largo de 21 días de cultivo 130

Figura 38 - Producción de biomasa (expresada como g PS/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (DMSO-EtOH) o elicitados con HyproTaximin (1μM y 10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJaTxi), a lo largo de 21 días de cultivo …… 131

Figura 39. Viabilidad (expresada en porcentaje de células vivas respecto al total) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (DMSO-EtOH) o elicitados con HyproTaximin (1 μM y 10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJaTxi), a lo largo de 21 días de cultivo …… 132

Figura 40. Niveles de Taxol (expresados en μg/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (Cnt) o elicitados con HyproTaximin (10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJa + Txi), a lo largo de 21 días de cultivo …… 135

Figura 41. Niveles de DABIII (expresados en μg/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (Cnt) o elicitados con HyproTaximin (10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJa + Txi), a lo largo de 21 días de cultivo …….. 136

Figura 42. Niveles de BIII (expresados en μg/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (Cnt) o elicitados con HyproTaximin (10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJa+Txi), a lo largo de 21 días de cultivo …… 137

Figura 43. Confirmación de la integridad de los plásmidos seleccionados. **A**: (Izq) Colonias de *E. Coli* DH5α transformadas con plásmido pK7WG2_*BAPT* crecidas en medio de selección; (Der) PCR amplificando gen *BAPT*. **B**: (Izq) Digestión del plásmido pIV2B2.1_*VoGES* con EcoRV (1), XbaI (2), NotI (3) y XbaI-NotI conjugado; (Der) Esquema de digestión a pIV2B2.1_*VoGES* …… 142

Figura 44. **Izq**: Escrutinio y aislamiento de colonias de *E. Coli* transformadas con gen *BAPT* más adaptadores en el vector pGEM®-T Easy. **Der**: Digestión del plásmido pGEM_*BAPT* con EcoRI …… 143

Figura 45a. Alineamiento entre la secuencia del gen BAPT más el sitio de restricción de XbaI y el resultado de secuenciación con T7 para el clon 15P. En rojo la secuencia del sitio de corte. En cuadro rojo marca un cambio en la secuencia de la muestra analizada …….. 144

Figura 45b. Alineamiento entre la secuencia del gen BAPT más el sitio de restricción de NotI y el resultado de secuenciación con SP6 para el clon 15P. En rojo la secuencia del sitio de corte. En cuadro rojo marca un cambio en la secuencia de la muestra analizada …….. 145

Figura 46. Comprobación de la sustitución de aminoácido. Traducción y alineamiento de gen *BAPT* y la secuencia de la clona 15P pGEM_$BAPT_{X\text{-}N}$. Enmarcado en rojo la proteína resultante de la sustitución …… 146

Figura 47. Digestión de plásmidos. **A**: Banda de 1,3 Kb correspondiente al gen *BAPT*$_{X-N}$ producto de la digestión de la construcción pGEM_*BAPT*$_{X-N}$; **B**: Banda de 5,2 Kb correspondiente al vector pIV2B2.1 producto de la digestión de la construcción pIV2B2.1_*VoGES* …… 147

Figura 48. Confirmación de la ligación entre vector pIV2B2.1 y el inserto *BAPT*$_{X-N}$. **A**: PCR para amplificar gen *BAPT* de la clona 19c; **B**: Digestión con XbaI y NotI de la clona 19c y pIV2B2.1_VoGES como control (+) …….... 148

Figura 49. Alineamiento de la clona 19c con la construcción pIV2B2.1_*BAPT*. **Arriba**: enmarcada la secuencia del sitio de restricción para XbaI e inicio del gen *BAPT*; **Abajo**: enmarcada la secuencia del sitio de restricción para NotI y final del gen *BAPT* (+). **En rojo** la secuencia diseñada de la construcción ……... 148

Figura 50. Ensayo de sensibilidad a Higromicina en callos de *Taxus media* …….. 150

Figura 51. Expresión transitoria de gen *gusA.* **Der**: Promedio de células que expresan GUS en callos de *Taxus media* bombardeadas por biolística, luego de tratamientos de 4, 1 y 0 (cnt) horas en medio osmótico. **Izq**: Células con expresión de GUS. Células sin transformar como control negativo *C*; plásmido pWRG15G15 como control positivo +. (Barra = 250 µm) …… 152

Figura 52. Expresión estable de gen *gusA.* Promedio de células de *Taxus media* que expresan GUS en callos en medio de selección, tras 3 meses del bombardeo por biolística, variando en el tiempo de pre-tratamiento en osmótico ……. 154

Figura 53. Expresión estable de gen *gusA.* **Izq**: Promedio de células de *Taxus media* que expresan GUS en suspensiones con Hyg, tras 24 meses del bombardeo por biolística, variando en el tiempo de pre-tratamiento en osmótico. **Der**: Células con expresión de GUS en los distintos pre-tratamientos osmóticos (A: Barra = 1 mm; B: Barra = 250 µm) 155

Figura 54. Crecimiento de células transformadas por biolística. Eficiencia de transformación en callos de *Taxus media* tras bombardeo con nanopartículas cubiertas con los plasmidos pIV2B2.1_BAPT y pWRG15G15 luego de 2 años . 160

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de la composición de medios de cultivo optimizados para la producción de biomasa y taxanos en diferentes especies de *Taxus* …….. 14

Tabla 2. Estudio comparativo del efecto del MeJa y los nuevos elicitores (Coro)/agentes permeabilizantes (CDs) sobre la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus* spp ……..…… 18

Tabla 3. Características de cebadores seleccionados para análisis por qRT-PCR ……..……..…….. 54

Tabla 4. Secuencia de los cebadores usados para secuenciar gen *BAPT* de la ligación pIV2B2.1 : $BAPT_{X\text{-}N}$ ……. 62

Tabla 5. Contenido de taxanos individuales, expresados como el porcentaje del total producido, en los cultivos celulares de *T. media*, durante 24 días, en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE. ND: no detectado …….. 84

Tabla 6. Contenido de taxanos individuales detectados en la fase PFD, expresados como el porcentaje del total producido, en los cultivos celulares de *T. media*, durante 24 días. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE. ND: no detectado ……..…….…… 90

Tabla 7. Porcentajes del escrutinio por selección sobre los callos de *Taxus media* transformados por biolística 90 días después del bombardeo ……. 152

1. INTRODUCCIÓN

La producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico en plataformas biotecnológicas basadas en los cultivos de células y órganos vegetales proporciona una alternativa al cultivo agronómico de plantas medicinales. El sistema se está aplicando con éxito para producir compuestos bioactivos vegetales escasos en la naturaleza, incluyendo taxol y sus análogos, que son agentes quimioterapéuticos. Además, los cultivos de células vegetales son una potente herramienta para profundizar en el conocimiento de la biosíntesis de fitofármacos y su control. Numerosos estudios con cultivos celulares de *Taxus* spp., centrados en el aumento de la producción de taxanos, han incrementado considerablemente el conocimiento a nivel de comprensión molecular del metabolismo de estos compuestos en las plantas, de especial incidencia ha sido la aplicación de las herramientas ómicas. En este capítulo se resume el estado actual de la producción biotecnológica de taxol y taxanos relacionados, utilizados para la semisíntesis de las nuevas generaciones de taxanos. Se hace especial hincapié en la aplicación de tecnologías de vanguardia que han permitido profundizar en el conocimiento de los cambios moleculares que tienen lugar en las células vegetales cuando son cultivadas en condiciones óptimas para la biosíntesis y acumulación de taxanos.

1.1. Biofactorías Celulares Vegetales

La demanda actual de productos naturales está creciendo fundamentalmente en los campos farmacéutico y cosmético o en la industria alimentaria para su uso como aromatizantes y conservantes, etc. Mientras que el consumo de estos productos mayoritariamente de origen vegetal está aumentando, el número de hectáreas cultivadas de plantas per cápita en el mundo ha disminuido significativamente, debido al crecimiento de la población, a los problemas de desertificación relacionados con el cambio climático y a que muchas hectáreas de terreno que eran dedicadas al cultivo especies de uso en alimentación o medicinales hoy se dedican al cultivo de plantas para la producción de biodiesel (FAO. 2011). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de encontrar medios alternativos para la producción de compuestos vegetales bioactivos.

Cuando la demanda del mercado para un fitofármaco ya no puede ser alcanzada por sus fuentes naturales que pueden haberse deteriorado por la sobreexplotación o degradación del hábitat de origen de las especies vegetales productoras, una posible solución es la domesticación de la especie para el cultivo extensivo. Sin embargo, cuando esto no es posible, el desarrollo de las biofactorias basadas en cultivos de células vegetales puede proporcionar un sistema de producción alternativo al cultivo de la planta en el campo (Choi *et al.,* 2008). Las ventajas de un sistema biotecnológico sobre el cultivo convencional de plantas incluyen (Gaosheng y Jingming, 2012):

a) La producción de los compuestos bioactivos requiere sólo la utilización de un bajo número de plantas.

b) Evita problemas geopolíticos y relacionados con el cambio climático.
c) Potencia la conservación de especies vegetales amenazadas, ayudando a garantizar su disponibilidad para futuras generaciones.
d) Garantiza un material vegetal no contaminado, ya que los cultivos *in vitro* están libres de microorganismos, herbicidas, pesticidas y fungicidas.
e) Los sistemas agrícolas no son necesarios, liberando así el terrano para la producción de plantas de uso alimentario.
f) Representan una drástica reducción en el uso de agua y disolventes orgánicos debido a que los procesos de extracción están simplificados.
g) En el caso de los OGM, no hay riesgo de diseminación del transgén.

En general, las biofactorias vegetales podrían considerarse como procesos bio-sostenibles y altamente ecológicos (Fig. 1).

Sin embargo, a pesar de estas ventajas, hasta ahora son pocos los procesos de producción basados en las biofactories vegetales que se han desarrollado a nivel industrial. Entre ellos destaca la producción de siconina por Mitsui Chemicals Inc., desde 1984, otro hito se alcanzó en el año 2002 con la producción de taxol (Paclitaxel API) por Phyton Biotech Ltd, y más recientemente de Docetaxel API. En el año 2012, la primera proteína recombinante, la glucocerebrosidasa, ha sido producida en cultivos celulares de zanahoria por Protalix BioTherapeutics en Israel (Paek *et al.,* 2005; Xu y Zhang, 2014). Resulta sorprendente que los avances más importantes en este campo a nivel de investigación se hayan producido recientemente,

pero que hasta la fecha, esto no se ha traducido en la comercialización de muchos más compuestos.

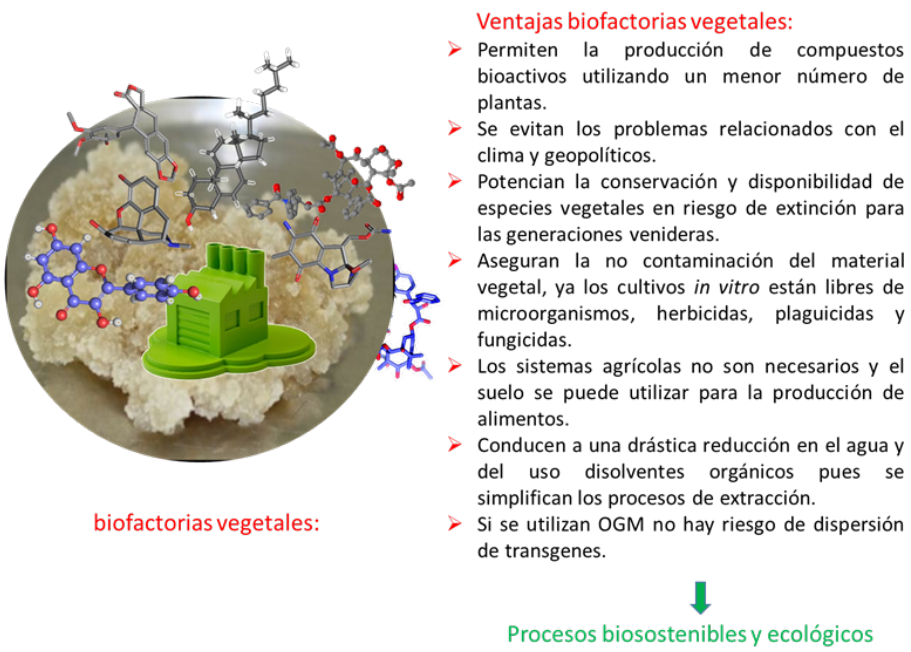

Figura 1. Representación esquemática de una biofactoría y algunas de sus ventajas en relación con los cultivos convencionales.

Cuando se necesita aumentar la producción de compuestos bioactivos vegetales o producir proteínas recombinantes, los cultivos *in vitro* y las técnicas de ingeniería genética forman parte esencial del proceso (Fig. 2). Se pueden utilizar los cultivos celulares, raíces transformadas u otros cultivos de órganos para la producción de compuestos secundarios y proteínas terapéuticas a nivel de biorreactor, pero generalmente se requiere de una etapa previa de optimización desarrollada a pequeña escala. Los principales aceleradores de los procesos de optimización incluyen las técnicas de elicitación y la aplicación de técnicas avanzadas como la ingeniería metabólica que pueden promover el flujo de precursores a la

formación de compuestos deseados (Capell y Christou, 2004; Sharma *et al.,* 2014).

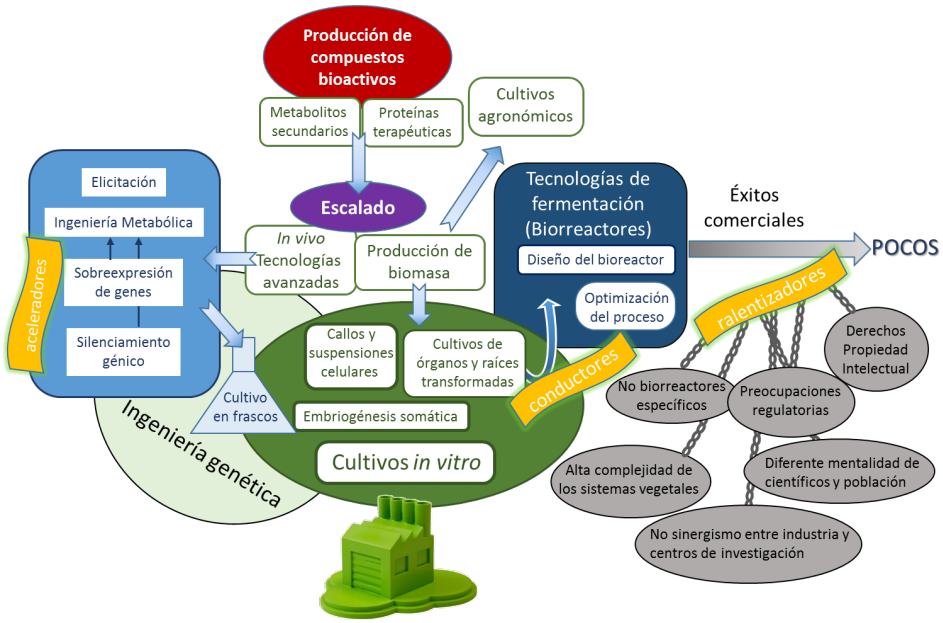

Figura. 2. Fundamentos de una biofactoría vegetal, incluyendo ejemplos de aceleradores de procesos así como los ralentizadores que dificultan su implementación a nivel industrial (modificado de Sharma *et al*, 2014).

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la producción de fitofármacos en biofactorias vegetales ha tenido escaso éxito comercial hasta el momento, debido a factores ralentizantes, muchos de los cuales tienen poco que ver con las tecnologías en uso. Incluyen otros factores como la preocupación empresarial por la reglamentación actual de las biofactorías, los derechos de propiedad intelectual, las actitudes contradictorias hacia las nuevas tecnologías entre investigadores y el público en general, así como la escasa sinergia entre la investigación académica y la industria, en la mayoría de los países (Sharma *et al.,* 2014).

En el proceso de optimización previo al establecimiento de la producción fitoquímica en una biofactoría vegetal, se consideran factores empíricos, como son la selección de líneas celulares altamente productivas, variaciones en las condiciones y medios de cultivo, o el uso de elicitores para mejorar el rendimiento del sistema. Sin embargo, este tipo de aproximaciones no proporciona en general, información sobre los cambios que se producen en las células vegetales a nivel molecular (Zhang *et al.,* 2004).

Por el contrario, un enfoque racional estudiará cómo los factores de entrada afectan a la fisiología de las células, por ejemplo, si los perfiles transcriptómicos y proteómicos se alteran, y cómo estas variaciones afectan al metaboloma. Todo ello, conduce a una mejor comprensión global de las vías metabólicas secundarias y su control (Cusidó *et al.,* 2014). De esta forma, las aproximaciones racionales han demostrado que las biofactorias vegetales son también una poderosa herramienta para el estudio del metabolismo de las plantas y su regulación (Fig. 3).

Actualmente, el taxol es un importante fitofármaco a nivel comercial, su estructura corresponde a un complejo alcaloide diterpénico escasamente producido en la naturaleza, ya que se acumula principalmente en la corteza de tejo en concentraciones por debajo del 0.02%. El uso de taxol para el tratamiento del cáncer fue aprobado por la FDA en 1992 y junto con sus derivados, se incluye en el ATC (Anatomical Therapeutic Chemical) código L01CD. Hoy en día, el taxol sigue siendo un fármaco de elección para muchos tipos de cánceres, tales como tumores de pulmón de células no pequeñas, carcinoma metastásico del ovario, cáncer de mama metastásico y tumores del colon, piel, riñones, cerebro y próstata, sarcoma de

Kaposi asociado al SIDA y algunas leucemias. También se está estudiando actualmente el uso del taxol para el tratamiento de enfermedades no relacionadas con el cáncer que requieren la estabilización de los microtúbulos, así como, la prevención de la proliferación celular y la angiogénesis, por ejemplo en la psoriasis y el Alzheimer (Malik *et al.,* 2011). Algunos de los inconvenientes de la administración y uso del taxol, tales como una baja solubilidad y sus efectos secundarios, se han resuelto parcialmente con la comercialización de sus derivados semisintéticos (Fig. 4). El mercado de los taxanos sigue creciendo y se necesitan nuevas fuentes de taxanos, o bien, la mejora de los sistemas de producción ya existentes (Onrubia *et al.,* 2013).

Aunque se han descrito varios sistemas para la síntesis química total de taxol, los bajos rendimientos obtenidos impiden su aplicación a nivel industrial (Guo *et al.,* 2006). Sin embargo, se ha logrado un éxito comercial con la semisíntesis de derivados de taxol a partir de bacatina III u otros precursores extraídos de las acículas de *Taxus baccata*. Los cultivos agronómicos de *T. chinensis* también se han desarrollado en la provincia de Yunnan en China, pero con un coste ambiental muy grande. Por lo tanto, la principal fuente actual de taxol y sus precursores es la producción biotecnológica utilizando diferentes especies de *Taxus* por Phyton Biotech o Abraxis (Fig. 5) (Cusidó *et al.,* 2014).

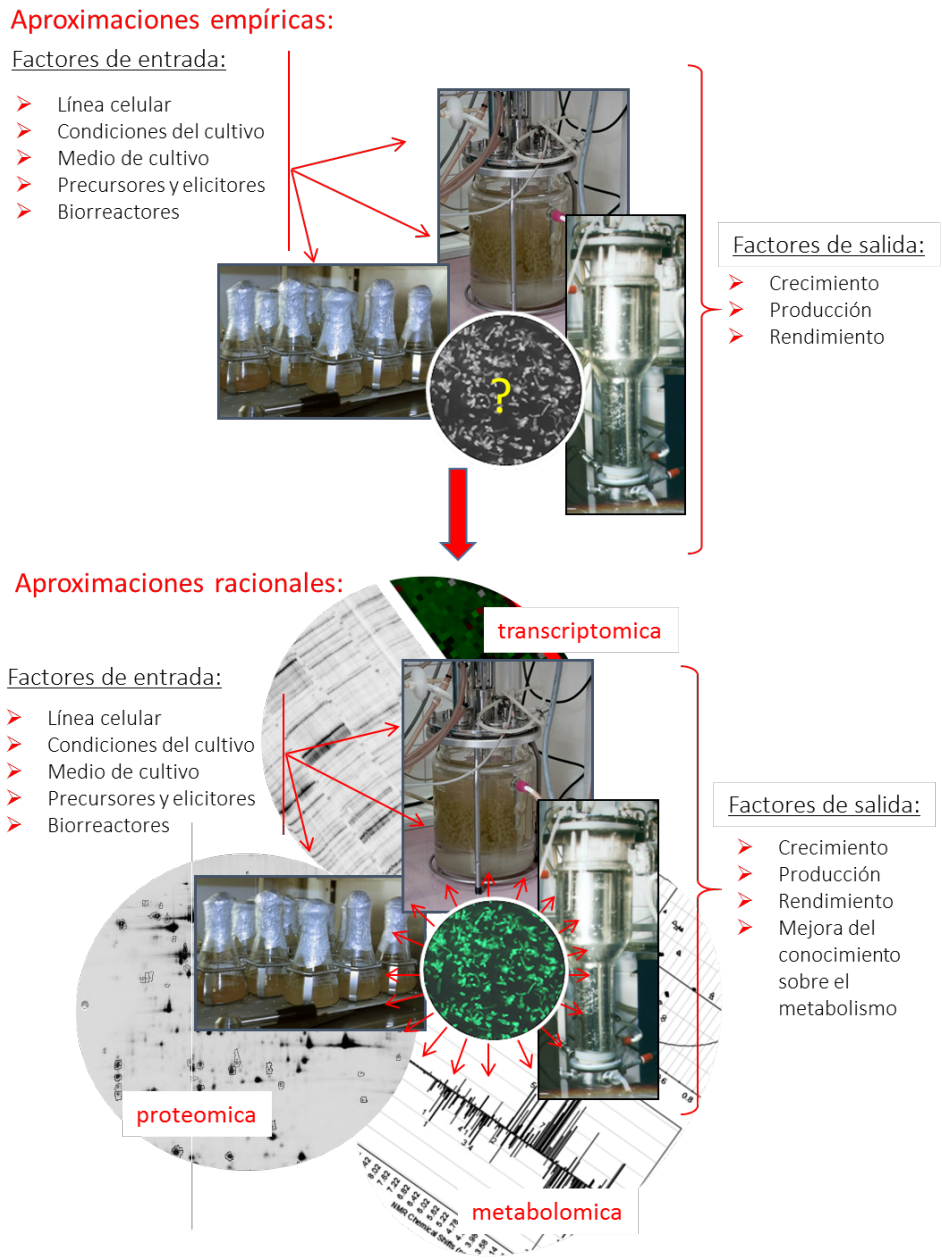

Figura 3. Enfoques empíricos vs racionales para un mejor conocimiento de los cambios a nivel celular/molecular en los cultivos celulares durante los procesos de optimización.

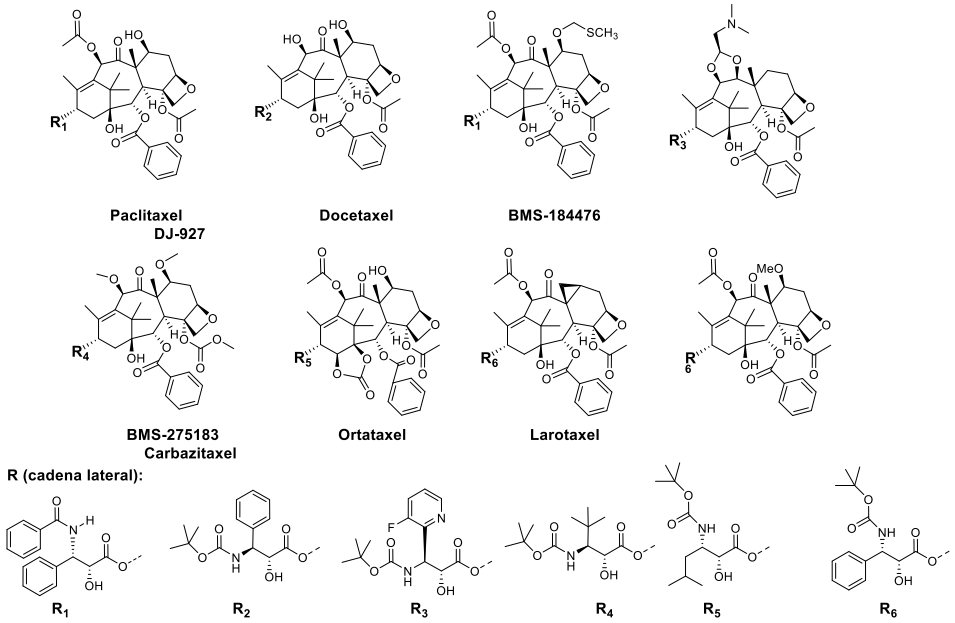

Figura. 4. Estructura del taxol (placlitaxel) y sus derivados semisintéticos utilizados actualmente en la lucha contra el cáncer.

La importancia económica de los taxanos ha llevado recientemente a el estudio bibliométrico de la investigación científica global sobre *Taxus*, que busca identificar patrones y tendencias en los artículos relacionados con *Taxus* en los últimos 20 años (Hao *et al.,* 2012).

Entre los recientes "temas candentes" identificados mediante un análisis bibliométrico de los títulos de los artículos, los resúmenes y las palabras clave, se encuentran la producción sostenible de taxanos por biofactorías vegetales y la semisíntesis de análogos de taxanos a partir de la bacatina III y la 10-desacetilbacatina. Los principales focos de la investigación relacionada con *Taxus* en el siglo XXI son la aplicación de los taxanos en cardiología clínica, farmacología y oncología y el estudio del metabolismo, citología y microbiología de *Taxus*.

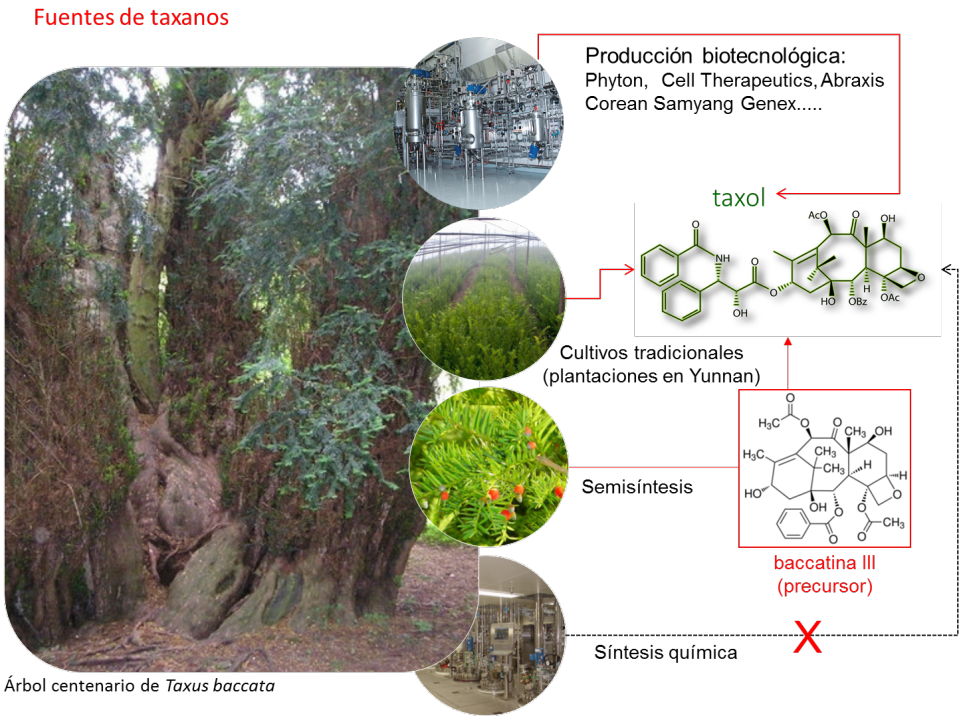

Figura. 5. Fuentes actuales de taxol y sus análogos.

El análisis bibliométrico también reveló que el conocimiento de la genómica, transcriptómica, metabolómica y bioinformática aplicado a la biosíntesis de taxanos es todavía limitado, y muy poco se sabe sobre los mecanismos epigenéticos que regulan este proceso. Después de proporcionar una visión general de la producción de taxanos en cultivos celulares vegetales, este capítulo tiene como objetivo resumir y destacar las cuestiones clave de la investigación relacionada con *Taxus* en el siglo XXI, con especial énfasis en el uso de herramientas ómicas y la ingeniería metabólica para mejorar la producción de taxanos utilizando las biofactorias vegetales. Especial atención merecen también las nuevas fuentes de taxanos como los hongos endofíticos de los cultivos celulares de *Taxus* y *Corylus*

avellana, que son plataformas biológicas prometedoras para la producción biotecnológica de taxanos en el futuro (Miele *et al.,* 2012).

1.2. Mejora de la producción biotecnológica de taxanos en cultivos celulares de *Taxus* spp., mediante aproximaciones de tipo empírico

Como ya se ha mencionado, para mejorar la producción de taxanos en plataformas biotecnológicas basadas en cultivos celulares de *Taxus*, puede ser útil el desarrollo de aproximaciones de tipo empírico y racional (Fig. 3). En las primeras se consideran como factores de entrada, la selección de líneas celulares altamente productivas, la composición de los medios nutritivos básicos, los suplementos de azúcares, las combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal o la adición de precursores de taxanos y elicitores al medio de cultivo, y como factores de salida, la producción la biomasa y la productividad de taxanos (Malik *et al.,* 2011). Por el contrario, un enfoque racional se centra en el estudio de los cambios celulares en el transcriptoma, proteoma y metaboloma que condicionan la mejora de la producción de taxanos. Estos estudios se han aplicado con éxito para mejorar el conocimiento que se tiene de las vías metabólicas primarias y secundarias, así como su regulación, incluyendo el metabolismo de los taxanos (Liu *et al.,* 2002).

Durante las dos últimas décadas, el grupo de investigación de Biotecnologia Vegetal: Producción de Fitofármacos (2014-SGR-215), así como otros grupos de numerosos centros de investigación internacionales, han desarrollado diferentes cultivos celulares de especies de *Taxus*, incluyendo *T. baccata*, *T. wallichiana* o *T. media* y

más recientemente el tejo mexicano (*T. globosa*), escalando los sistemas biológicos desde frascos agitados a diferentes tipos de biorreactores. Los procesos de producción se optimizaron mediante la utilización de diferentes medios de cultivo (por ejemplo, WPM, B5, MS) adicionados de proporciones variables de diferentes reguladores de crecimiento, de precursores y elicitores, entre otros factores. Los resultados obtenidos en estos experimentos confirmaron que la producción de taxanos no depende del crecimiento celular y que se acumulan principalmente durante la fase estacionaria del cultivo (Cusidó *et al.,* 1999., Fett-Neto y DiCosmo F, 1997). También se ha demostrado que los medios de cultivo optimizados para la producción de biomasa difieren de los medios óptimos para la biosíntesis y acumulación de taxanos, y cada una de las especies de *Taxus* estudiadas, tienen diferentes requerimientos nutricionales y de cultivo para alcanzar un crecimiento y una producción optimizada (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de la composición de medios de cultivo optimizados para la producción de biomasa y taxanos en diferentes especies de *Taxus*.

Especie vegetal	Medio optimizado	Nutrición basal	Auxinas	Citoquininas	Referencia
T. baccata	Crecimiento*	WPM	2 mg/L ANA	0.1mg/L BAP	Cusidó et al., 2002
	Producción*	B5	2 mg/L Pic	0.1 mg/L KIN	
T. media	Crecimiento*	B5	2 mg/l Pic	0.1 mg/L KIN	Palazón et al., 2003
	Producción*	B5	2 mg/l 2,4-D	0.1 mg/L BAP	
T. globosa	Crecimiento	WPM	2 mg/L Pic	KIN 0.1 mg/L	Osuna et al., 2015
	Producción*	B5	2 mg/l 2,4-D	0.1 mg/L BAP	

* Todos los medios fueron suplementados también con 0,1 mg/L de ácido giberélico. WPM, woody plant medium; B5, Gamborg's medium; ANA, ácido naftalenacético; Pic, picloram; 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP, bencilaminopurina; KIN, kinetina.

El desarrollo de estos estudios de tipo empírico llevó al establecimiento de cultivos celulares en dos fases, como el sistema idóneo para la producción de biomasa y taxanos. En una primera etapa, las células vegetales se cultivan en un medio de crecimiento óptimo y se transfieren posteriormente a un medio optimizado para la de producción de taxanos (Fig. 6). El sistema tiene como ventaja el permitir la adición de precursores biosintéticos y elicitores cuando la producción de taxanos es máxima, y el mayor rendimiento en la producción de taxol se logra normalmente con los tratamientos de elicitación (Cusidó *et al.,* 2002; Palazón *et al.,* 2003).

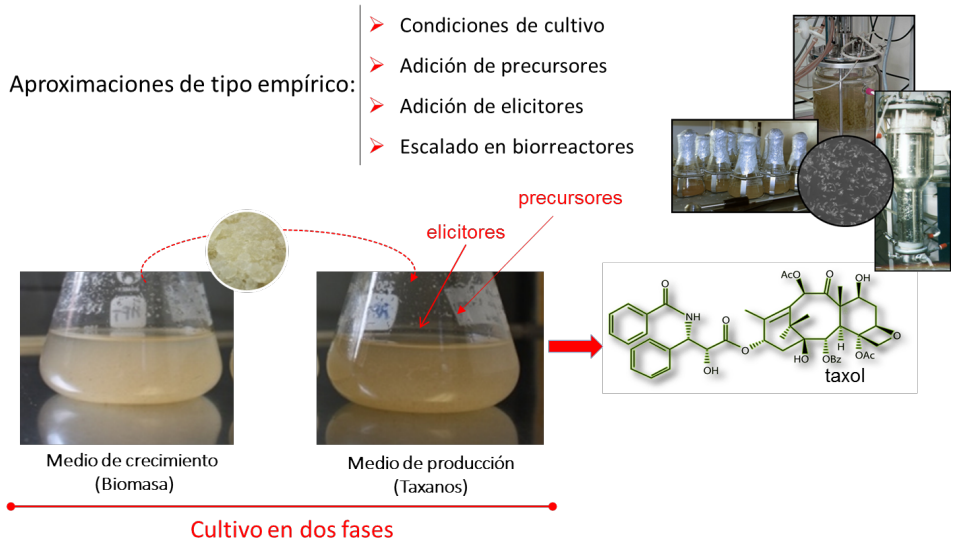

Figura 6. Establecimiento de los cultivos en dos fases basados en aproximaciones de tipo empírico.

Los elicitores son compuestos que estimulan los sistemas de defensa de las plantas, promoviendo el metabolismo secundario para proteger a las células y la planta entera, pero que en las biofactorías vegetales se utilizan comúnmente para inducir la producción de metabolitos

secundarios de interés (Ramírez-Estrada *et al.,* 2016). Numerosos tratamientos de elicitación se han utilizado para aumentar la producción de taxanos en cultivos de celulares de *Taxus* spp. (ver detalles en las revisiones de (Malik *et al.,* 2011; Onrubia *et al.,* 2013). Con este fin, uno de los elicitores más utilizados ha sido el jasmonato de metilo (MeJa). Los jasmonatos (JAs) son moléculas específicas de señalización capaces de activar importantes procesos fisiológicos y del desarrollo vegetal (Farmer *et al.,* 2003). La biosíntesis de estas hormonas es inducida por el ataque de un patógeno o una herida, y desencadena una respuestas de defensa, tanto local como sistémica. El MeJa en particular desempeña un importante papel en los procesos de transducción de señales mediante la regulación de varios genes de defensa de la planta (Farmer y Ryan, 1990). El tratamiento de los cultivos celulares de *Taxus* con MeJa es una de las estrategias más eficaces para potenciar la producción de taxanos (Onrubia *et al.,* 2013) aunque puede limitar la formación de biomasa. De hecho, los cultivos celulares de *Taxus* fueron uno de los primeros sistemas *in vitro* desarrollados que dieron resultados positivos después de la adición de MeJa al medio de cultivo (Yukimune *et al.,* 1996).

La coronatina (Coro) es una toxina patógena producida por *Pseudomonas syringae* que ha sido probada en cultivos de células vegetales de *T. media* y *T. globosa* (Onrubia *et al.,* 2013; Ramírez-Estrada *et al.,* 2015). Actúa como un simulador molecular de la forma conjugada con isoleucina de ácido jasmónico (JA-Ile) (Katsir *et al.,* 2008), pero es más estable y por lo tanto, tiene un mecanismo de acción similar el elicitor MeJa (Onrubia *et al.,* 2013). La adición de Coro a cultivos celulares de *T. media* y *T. globosa*, resultó más eficaz que MeJa para aumentar la producción de taxanos, incluso cuando se

usaba a concentraciones mucho más bajas. Los rendimientos en la producción taxanos alcanzados en cultivos celulares *Taxus* spp., tratados con este elicitor han sido hasta 5.3 veces superiores a los obtenidos con MeJa (Onrubia *et al.,* 2013; Ramírez-Estrada *et al.,* 2015).

Otra estrategia recientemente utilizada con éxito en cultivos celulares de *Taxus* es el tratamiento con agentes permeabilizantes que promueven la liberación de taxanos al medio de cultivo. Este hecho, podría desbloquear, en una vía metabólica, pasos controlados por mecanismos de retroalimentación, lo que conduciría a una mayor producción de taxanos (Malik *et al.,* 2011). En este contexto, las ciclodextrinas (β-CDs), que son oligosacáridos cíclicos, se han utilizado recientemente como agentes inductores/permeabilizantes en cultivos celulares de *T. globosa* y *T. media* (Ramírez-Estrada *et al.,* 2015; Sabater-Jara *et al.,* 2014). Los resultados obtenidos demostraron que la β-metilciclodextrina no tenía un fuerte efecto elicitor sobre la producción de taxanos, pero actuaba como un agente permeabilizante eficaz, aumentando la liberación de taxanos al medio de cultivo (Tabla 2). Sin embargo, cuando se combinaba su tratamiento con otros elicitores, tales como MeJa o Coro, se producía un efecto elicitor sinérgico logrando aumentos muy significativos de taxol y otros taxanos.

Tabla 2. Estudio comparativo del efecto del MeJa y los nuevos elicitores (Coro)/agentes permeabilizantes (CDs) sobre la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus* spp.

Especie	Elicitor	Incremento en la producción	Liberación al medio de cultivo	Referencia
T. media	MeJa	x10	45%	Onrubia, 2013
T. media	Coro	x20	52%	
T. baccata	MeJa	x9	40%	Onrubia, 2014
T. media	CDs	x6	90%	Sabater-Jara,
T. media	MeJa+CDs	x83	90%	2014
T. media	Coro+CDs	x18	90%	Ramírez-Estrada,
T. globosa	Coro+CDs	x40	100%	2015

MeJa, jasmonato de metilo; Coro, coronatina; CDs, ciclodextrinas.

La búsqueda de sistemas optimizados para mejorar la producción y extracción de taxanos ha llevado al uso nuevos elicitores que a la vez pueden generar 2 fases en el cultivo y favorecer la extracción de compuestos lipófilos como son los taxanos. La Perfluorodecalina (PFD) ($C_{10}F_{18}$) es un fluorocarbono, en el que los átomos de hidrógeno están reemplazados por átomos de flúor. Este líquido denso puede disolver grandes volúmenes de gases no polares tales como O_2 (35-44 mmol L^{-1}) y al ser añadido a un medio líquido, facilitando la formación de una segunda fase por debajo de la fase acuosa debido a no es soluble en agua (Lowe, 2002). Se ha demostrado que la adición de PFD saturada con aire a cultivos celulares de tabaco incrementó la biomasa celular más de tres veces en relación en las mismas condiciones pero en ausencia de ésta. Por el contrario, PFD saturada con oxígeno tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento celular. Sin embargo, este hecho también depende de la sensibilidad de las células a altas concentraciones de oxígeno (Pilarek y Szewczyk, 2008).

En los cultivos de raíces transformadas de *Taxus* se ha demostrado que la adición al medio de cultivo de PFD saturada de aire (gasificada) y desgasificado, aumentó la producción de taxol especialmente al suplementarse junto con otros elicitores. En la fase de PDFs en los cultivos de raíces se detectó la presencia "en parte" de taxanos, lo cual puede representar una buena estrategia para extracciones *in situ* de estos compuestos a partir del medio de cultivo acuoso (Skylowska-Baranek *et al.,* 2015).

Mientras que el papel de MeJa como inductor del mecanismo de defensa vegetal se ha estudiado ampliamente, la función de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) es menos conocida (Farmer 2001). Los compuestos volátiles C6 (V-C_6) son liberados por los tejidos vegetales ante el ataque por herbívoros o lesiones de tipo mecánico. Estos compuestos so producidos por una ramificación de la ruta de oxilipinas, las cuales se ha propuesto que inducen respuesta química de defensa (Hatanaka *et al.,* 1987; Engelberth *et al.,* 2004). Estudios moleculares han demostrado que V-C_6 son capaces de inducir la transcripción de genes relacionados con sistemas de defensa como *lox* y *pal* en *Arabidopsis* y haba (Bate y Rothstein 1998; *Arimura et al.,* 2001), asi como, en ensayos con tomate también desencadenaron le emisión de VOCs, siendo el (Z)-3-hexenol el compuesto más potente (Farag y Paré, 2002).

El (Z)-3-hexenol es un compuesto orgánico volátil de tipo C6 que tampoco es miscible en agua, cuando se adiciona a los medio de cultivo, produce una segunda fase que se ha utilizado para separar los compuestos secundarios no hidrófilos del medio, aumentando consecuentemente su producción.

La aplicación exógena en aerosol de (Z)-3-hexenol en plantas de maíz activó la síntesis de mRNA de los genes *lox*, *pal*, y *mpi*, como también la acumulación de (Z)-3-hexenil acetato, linalol y salicilato de metilo que son metabolitos relacionados; demostrando que este compuesto induce mecanismos de defensa en maíz (Farag *et al.,* 2005).

1.3. Biosíntesis de taxanos

La ruta biosintética del taxol no ha sido elucidada completamente, aunque se plantea la hipótesis de que están implicadas 19 enzimas, para las cuales se conocen 13 genes y las proteínas correspondientes, y se han postulado 6 pasos según los productos intermedios conocidos y las posiciones modificadas en la molécula de taxol. De forma resumida, la biosíntesis comienza en los plastos vegetales por la acción de la enzima taxadieno sintasa, que produce la estructura tricíclica del taxadieno a partir del difosfato de geranilgeranilo (GGPP). Después de varias etapas de hidroxilación, benzoilación y transacilación, se forma la bacatina III, y tras la unión de una cadena de fenilisoserina derivada de β-fenilalanina, y de otras dos etapas, se obtiene taxol (Croteau *et al.,* 2006; Vongpaseuth y Roberts, 2007) (Fig. 7).

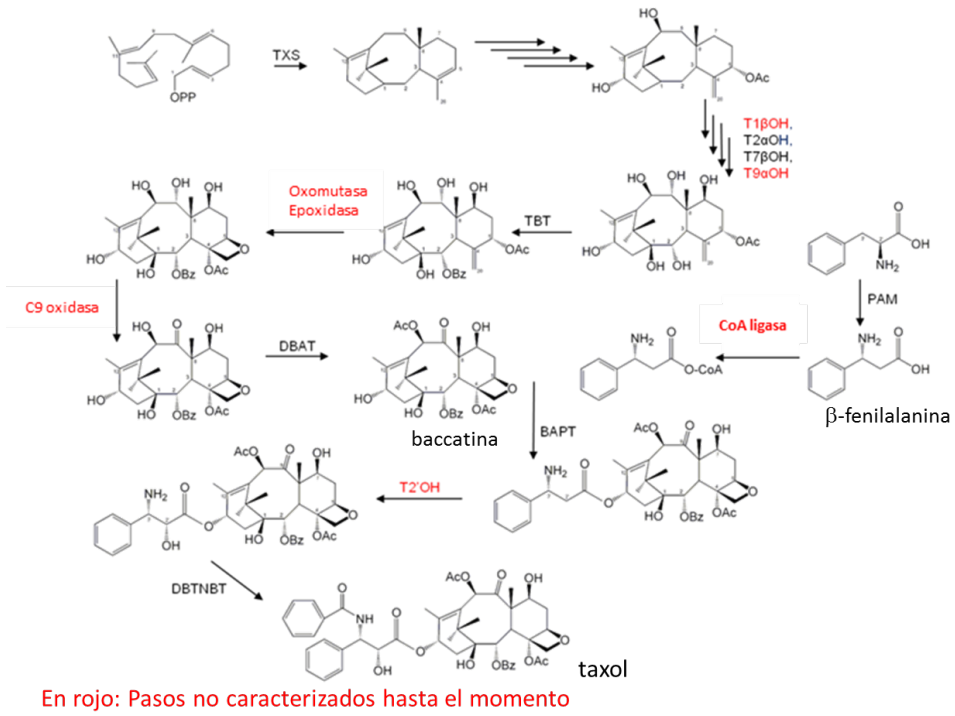

Figura. 7. Biosíntesis de taxanos a partir del difosfato de geranilgeranilo (GGPP). TXS, Taxadieno sintasa; T5αOH, Taxano-5α-hidroxilasa; TAT, Taxadieno-5α-ol-O-acetil transferasa; T13αOH, Taxano-13α-hidroxilasa; T10βOH, Taxano-10β-hidroxilasa; T1βOH, Taxano-1β-hidroxilasa; T9αOH, Taxano-9α-hidroxilasa; TBT, Taxano-2α-O-benzoil transferasa; DBTA, 10-deacetilbaccatina III-10-O-acetyiltransferasa; BAPT, baccatina III-3-amino,13-fenilpropanoil-CoA transferasa; T2'αOH, Taxano-2'α-hydroxylasa; DBTNBT, Debenzoil taxol-N-benzoil transferasa. (Modificado de Onrubia et al. 2013).

La mayor parte de la investigación desarrollada para elucidar la ruta biosintética de taxanos se ha llevado a cabo en cultivos celulares de *Taxus* spp. Una vez que GGPP ha sido ciclizado en taxadieno, este intermedio es hidroxilado en C5. En pasos posteriores que llevan a la formación de la 10-deacetil bacatina III, el orden y algunas de las enzimas implicadas no se conoce completamente pero se ha postulado lo siguiente (Croteau *et al.,* 2006). La primera bifurcación de la vía se produce con la hidroxilación de C13 o la acetilación de

C5. Después de la acetilación de C5, hay una hidroxilación de C10, seguida de la actuación de taxano-14β-hidroxilasa, que da lugar a una vía alternativa. Una vez que se obtiene el acetato de taxano-5,10,13-ol, este se hidroxila en C1, C2, C7 y C9, y posteriormente se adicionan los grupos acetilo/benzoilo en C2 y C4, formandose un anillo oxetano (anillo D) y finalmente, hay una oxidación C9. Un grupo acetilo se enlaza entonces a C10 de la 10-deacetil bacatina III, produciendo la bacatina III. Los pasos restantes para llegar al taxol son la adición de la cadena lateral. La β-fenilalanina-CoA se unirá el C13 del núcleo del taxano, y el compuesto formado es hidroxilado en C2 y N-benzoilado en C3 (Fig. 7). Recientemente, se ha clonado una ligasa CoA de *T. baccata* y se ha demostrado su funcionalidad en la biosíntesis de taxol (ver apartado 1.6) (Ramírez-Estrada *et al.,* 2016).

1.4. Aproximaciones de tipo racional para un mejor conocimiento de la biosíntesis de taxanos.

Como se ha mencionado anteriormente, los enfoques de tipo racionales (Fig. 3), especialmente reforzados por el uso de tecnologías ómicas, han permitido una mayor comprensión del metabolismo secundario vegetal, frecuentemente muy complejo, como en el caso de los taxanos. En cultivos celulares *Taxus* spp. tratados con los elicitores MeJa, Coro y β-CDs, se ha determinado el nivel de expresión diferentes genes implicados en la formación de taxanos como, el gen *TXS*; genes que codifican diferentes hidroxilasas implicadas en la hidroxilación del anillo de taxano, el gen de fenilalanina aminomutasa (PAM), que controla la conversión de α-L-fenilalanina en β-fenilalanina; el gen de 10-desacetilbacatina III-10β-

O-acetiltransferasa (DBAT), responsable de la formación de bacatina III; el gen de la bacatina III 13-O-(3-amino-3-fenilpropanoil) transferasa (BAPT), implicado en la unión de la cadena lateral a la bacatina III, y finalmente el 3'-N-debenzoil-2'- desoxitaxol-N-benzoiltransferasa (DBTNBT), que codifica la última benzoil transferasa que conduce a la formación de taxol (Fig. 7) (Wildung y Croteau. 1996; Jennewein *et al*., 2004a; Walker *et al.,* 2004; Walker y Croteau. 2000; Walker *et al.,* 2002a; Walker et al., 2002b). Estos estudios revelaron que los elicitores aumentan el nivel de expresión de los genes implicados en la biosíntesis de taxanos, particularmente aquellos que actúan en los primeros pasos de la vía (sobre todo las hidroxilasas), mientras que los involucrados en los últimos pasos estaban menos inducidos (DBAT, BAPT y DBTNBT) (Fig. 8). Por lo tanto, en términos de elicitación, se puede inferir que el flujo de carbono hacia la formación de taxol está limitado en sus últimos pasos y los genes/enzimas involucrados en las últimas etapas de la biosíntesis de taxanos podrían constituir excelentes dianas para desarrollar estudios de ingeniería metabólica, con el fin intentar su sobreexpresión en líneas celulares transgénicas de *Taxus* spp. (Fig. 8).

Los estudios comentados, también revelaron que las β-CDs activan la expresión de un transportador de tipo ABC cuyo efecto podría ser parcialmente responsable de los altos niveles de taxol extracelular encontrados en los cultivos tratados con el elicitor (Sabater-Jara *et al.,* 2014). En conjunto, estos resultados confirmaron que los cultivos celulares de *Taxus* no sólo constituyen una plataforma biotecnología para la producción de taxanos, sino que también pueden utilizarse

como una poderosa herramienta para la elucidación de la ruta de biosíntesis de taxanos y su control.

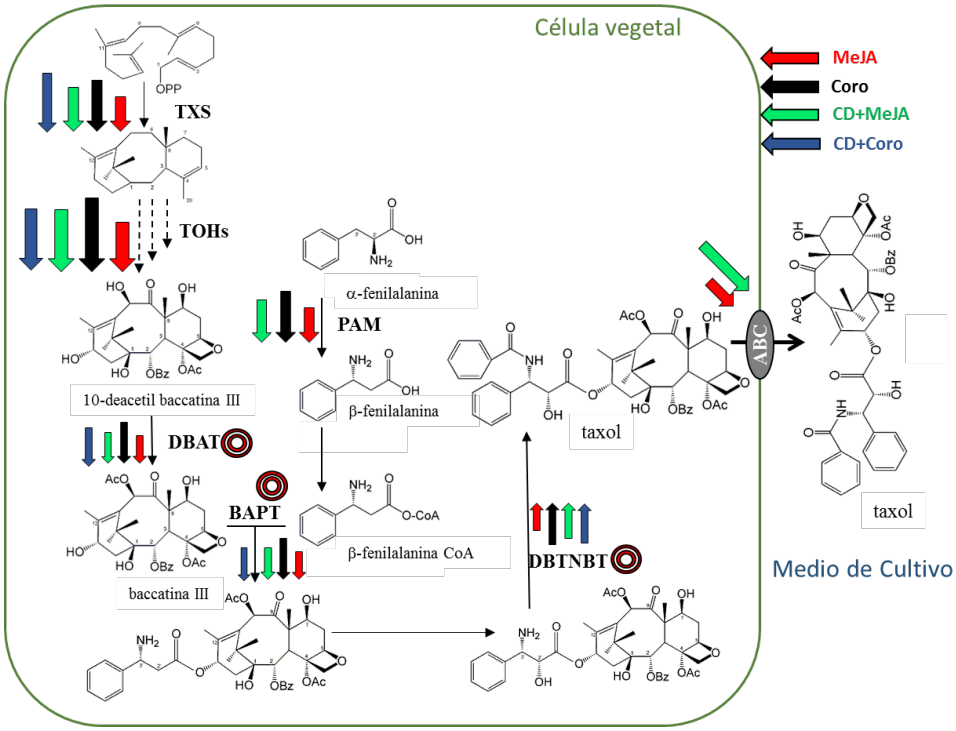

Figura 8. Efecto de los elicitores sobre la expresión de genes relacionados con la ruta de taxanos en cultivos celulares de *Taxus* spp.

1.5. Estudios ómicos

Hasta el momento, se han desarrollado diversos estudios transcriptómicos para comprobar si los cambios metabólicos inducidos por los elicitores se correlacionan con la expresión diferencial de los genes implicados en el metabolismo de las células vegetales (Pauwels *et al.,* 2009), algunos de ellos, han sido llevados a cabo en cultivos celulares de *Taxus*, con el fin de estudiar el metabolismo de taxanos y los efectos de los elicitores a nivel molecular. Estos estudios se han realizado con células elicitadas con

MeJa de diferentes especies de *Taxus* como *T. chinensis* (Li *et al.,* 2012a; Jennewein *et al.,* 2004b), *T. cuspidata* (Lenka *et al.,* 2012) y *T. media* (Sun *et al.,* 2013). Los métodos utilizados han sido la "secuenciación profunda Illumina" (Li *et al.,* 2012a; Qiu *et al.,* 2009; Sun *et al.,* 2013), la secuenciación "aleatoria de Sanger de una biblioteca de cDNA" (Jennewein *et al.,* 2004b), y la secuenciación "Sanger de una biblioteca de hibridación sustractiva" (Lenka *et al.,* 2012). En estos estudios, se confirmó una reprogramación transcripcional de las células de *Taxus* inducida por la elicitación con MeJa y se identificaron numerosos transcritos correspondientes a genes implicados en la biosíntesis de taxanos, aunque sin conducir al descubrimiento de nuevos genes de la ruta.

En este escenario, el uso de la tecnología de cDNA-amplified fragment length polymorphism technology (cDNA-AFLP) reveló que la elicitación con MeJa de cultivos celulares de *T. baccata* también daba como resultado una reprogramación completa del transcriptoma celular (Onrubia *et al.,* 2014; Ramírez-Estrada *et al.,* 2016). El estudio comparativo del transcriptoma de células elicitadas con MeJa y cultivos celulares no elicitados (condiciones control) permitió la identificación y secuenciación de más de 650 etiquetas (tags) correspondientes a genes cuya expresión fue modulada por el elicitor. Posteriormente, se demostró mediante la búsqueda de homologías en bases de datos, que el 27% de estos tags estaban involucrados en el metabolismo vegetal, incluyendo varios genes que se sabe participan en la biosíntesis de taxanos, junto con otros tags que pueden corresponder a genes candidatos potenciales que podría codificar para enzimas que participarían en pasos desconocidos de la biosíntesis de taxanos (Fig. 9).

Posteriormente, se obtuvieron las secuencias completas de los posibles genes candidatos y se realizaron estudios *in silico* de sus secuencias de aminoácidos para encontrar aquellos que más probablemente correspondieran a genes implicados en los pasos desconocidos de la biosíntesis de taxanos. Esta aproximación, se basó en determinar solamente las posiciones de las enzimas candidatas que podrían estar directamente implicadas en la acción enzimática y evaluar la similitud entre los genes candidatos y proteínas conocidas con la misma función que actúan sobre el mismo o sustratos similares. Para el estudio *in silico* se utilizaron varias herramientas, incluyendo bases de datos de proteínas (MACiE, CSA, PDB, Uniprot), T-Coffee, software de alineación de secuencias múltiples y PyMOL, un recurso gráfico.

Entre los posibles15 genes candidatos de la biosíntesis de taxanos, se incluían, hidroxilasas (para las posiciones C1 y C9 del núcleo de taxano y C2 de la cadena lateral), la oxidasa de la posición C9, la epoxidasa y la oxomutasa de la formación del anillo oxetano (anillo D), y también una CoA ligasa (Fig. 7), de ellos destacaron 3 candidatos con mayores probabilidades para estar involucrados en la biosíntesis de taxol: una hidroxilasa, una epoxidasa y la CoA ligasa (Ramírez-Estrada *et al.,* 2016).

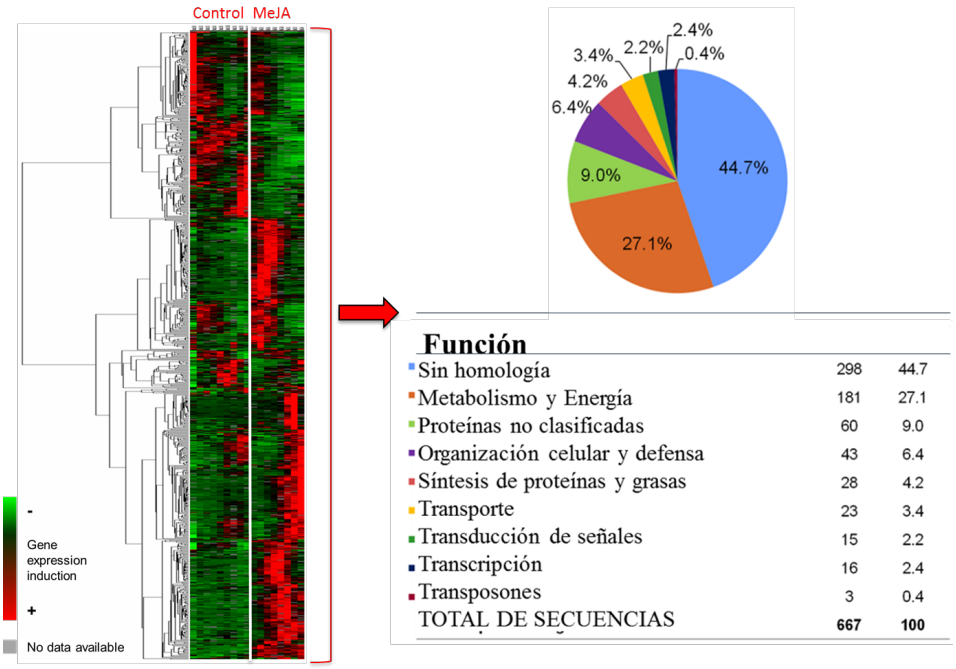

Figura. 9. Relación media de la agrupación jerárquica del transcriptoma de las etiquetas de genes seleccionados inducidos por MeJa en cultivos celulares de *T. baccata*. Los puntos de tiempo para el análisis de agrupamiento se indican en la parte superior: 12 d en medio de crecimiento (GM), y 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 1d, 2d, 4d en medio de producción (PM) en condiciones de control y elicitadas con MeJa. Los cuadros rojo y verde reflejan la activación transcripcional y la represión, respectivamente, en relación con el nivel de expresión promedio en las células de control. Las casillas grises corresponden a puntos de tiempo perdidos. El dendrograma en el lado izquierdo del transcriptoma indica los grupos de genes activados y reprimidos. A la derecha, etiquetas secuenciales clasificadas en categorías funcionales según clasificación FunCat (modificado Onrubia et al., 2014).

Poco se conoce en cuanto al control de la producción de taxanos. En general, un punto de control importante lo ejercen los factores de transcripción que activan la expresión de genes de la vía metabólica secundaria y están codificados por genes que responden elicitores como el jasmonato, así como otras proteínas reguladoras (De Geyter *et al.,* 2012). Como a los genes que codifican para enzimas directamente relacionadas con la ruta metabólica, los genes que

codifican para estos reguladores representan un objetivo principal de los programas de descubrimiento de nuevos genes basados en el estudio del transcriptoma, con la esperanza de detectar "reguladores maestros" capaces de activar la expresión de todos los genes que codifican para las enzimas involucradas en un camino metabólico particular. Estos estudios han demostrado ser eficientes para conocer mejor el control de las rutas metabólicas secundarias de diferentes especies vegetales y han permitido la identificación de numerosos factores de transcripción que regulan directamente la expresión de genes de la vía metabólica (De Geyter *et al.,* 2012), pero también de E3 ubiquitina ligasas que controlan la actividad de enzimas flujo-limitantes (Pollier *et al.,* 2013) o puntos de interferencia entre la vía de los jasmonates y otras vías hormonales (Häkkinen *et al.,* 2007; Lackman *et al.,* 2011).

Hasta la fecha, sólo se han caracterizado funcionalmente dos factores de transcripción de *Taxus*. El primero, TcWRKY1 aislado de *T. chinensis*, interactuó con un elemento de W-box en el promotor del gen que codifica DBAT y se demostró que era un regulador positivo de este gen (Li *et al.,* 2012a). El segundo, TcAP2 de *T. cuspidata*, interactuó con un elemento de respuesta a jasmonato y elicitor (JERE) encontrado en los promotores de los genes de *C. roseus* que participan en la ruta de los alcaloides indol-terpénicos (Dai *et al.,* 2009). El papel de TcAP2 en la regulación de la síntesis de taxol aún no ha sido investigado. Es importante destacar que ambos factores fueron inducidos en respuesta a jasmonatos, reforzando la expectativa de que el análisis de transcriptomas de cultivos celulares de *Taxus* inducidos por jasmonato o con altas producciones de taxol representan un sistema de elección, para estudiar la regulación de la

ruta biosíntetica. En este contexto, también se han detectado por cDNA-AFLP, en cultivos celulares de *T. baccata*, diferentes tags con una posible función reguladora en la biosíntesis de taxanos, incluyendo algunos factores de transcripción e hipotéticas proteínas con funciones desconocidas. La búsqueda de homologías en bases de datos reveló que concretamente el gen Tb595 codifica un pequeño péptido de 73 aminoácidos, altamente conservado en el reino vegetal, pero con función desconocida. Por lo tanto, este gen fue seleccionado para un análisis funcional posterior (Onrubia *et al.,* 2014) (ver apartado 4.3).

1.6. Análisis funcional de genes candidatos a la biosíntesis de taxanos

Además de los genes reguladores y la mayoría de los genes conocidos que codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis de taxanos, los estudios de cDNA-AFLP revelaron ciertas etiquetas de genes cuya expresión también estaba modulada por MeJa y podrían estar implicadas en pasos de biosíntesis sin genes/enzimas asignados (Onrubia et al., 2014) (Fig. 7). Un exhaustivo estudio bioinformático identificó un total de 15 genes que potencialmente podrían participar en la ruta (Ramírez-Estrada *et al.,* 2016). A partir de ellos, el gen Tb768 se seleccionó como potencialmente implicado en la formación de la cadena lateral de taxol y un candidato probable para estudios funcionales. Este gen tiene una alta homología con otros genes de la familia de las CoA ligasas y podría actuar sobre β-fenilalanina, transformándola en su correspondiente éster de

coenzima para su incorporación en el núcleo de taxano, dando lugar a la cadena lateral en la molécula de taxol (Fig. 7).

La proteína codificada por Tb768 tiene una estructura 3D hipotética muy similar a la de otras CoA ligasas como la proteína 3a9v, una ligasa CoA de *Populus tomentosa* (Hu *et al.,* 2010) (Fig. 10), con una región altamente conservada que corresponde al dominio catalítico con sitios de unión ATP y CoA y el sitio activador de acilo CoA ligasa (Ramírez-Estrada *et al.,* 2016).

Para confirmar la actividad *in vitro* de CoA ligasa, se añadió la proteína purificada Tb768 a una mezcla de reacción que contenía β-fenilalanina y CoA como sustratos, y el producto de reacción se detectó por HPLC-espectrometría de masas (MS/MS). El éster de CoA formado se identificó comparando su tiempo de retención y el patrón de fragmentación de su molécula con patrones puros. Sin embargo, al igual que otras ligasas de CoA, esta enzima no resultó específica de β-fenilalanina, pudiendo bioconvertir otros sustratos como el ácido 4-cumárico (Fig. 11). En general, los resultados obtenidos demostraron que el gen Tb768 codifica una proteína capaz de formar ésteres CoA con β-fenilalanina y 4-cumarato, esta proteína ha sido denominada β-fenilalanina-CoA ligasa (TBPCCL) y es la primera acil-CoA ligasa caracterizada por *Taxus* spp. (Fig. 11).

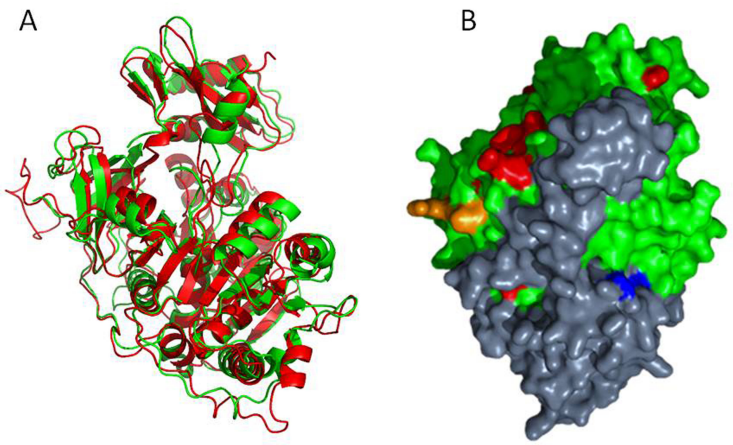

Figura 10. Phyre2 modelo de la proteína TB768 (rojo) y el 3A9U PDB archivo de 4-coumarate-CoA ligase (verde). (B) Predicción de los dominios catalíticos para β-fenilalanina-CoA ligasa. Sitio activo coloreado en verde, unión de AMP en rojo, sitio de unión CoA en naranja y el sitio activador de acilo en azul.

Al igual que otras vías metabólicas secundarias, la formación de taxanos está compartimentada a nivel subcelular y pueden participar en ella diferentes orgánulos. Hasta el momento, se sabe que los primeros pasos de la vía tienen lugar en los plastos y conduce a la formación del núcleo taxadieno de GGPP (Palazón *et al.,* 2003); las etapas de hidroxilación están catalizadas por enzimas del grupo P450 asociadas al el retículo endoplásmico, y los estudios bioinformáticos que se han llevado a cabo parecen indicar que los últimos pasos hacia la formación de taxol son catalizados por enzimas citosólicas libres (Davis y Croteau, 2000).

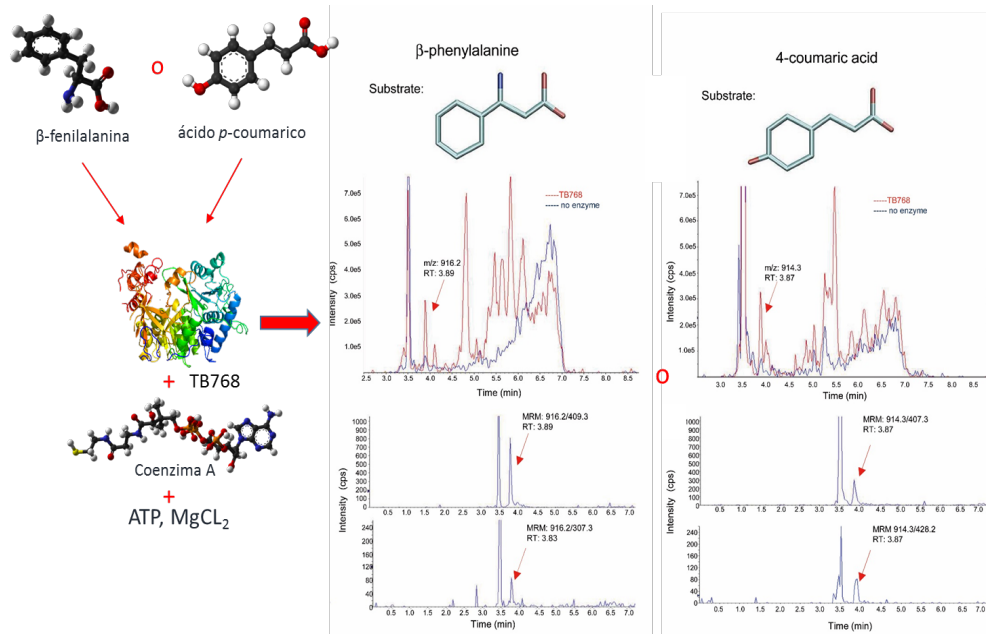

Figura 11. Análisis por MRM del ácido 4-cumárico y actividad de la β-fenilalanina-CoA ligasa. Las flechas indican el pico al tiempo de retención correspondiente de los dos fragmentos de iones específicos analizados para cada molécula utilizada para confirmar su identidad (914.3 / 407.3 y 914.3 / 428.2 para 4-cumarato-CoA con RT: 3.87; 916.2 / 409.3 y 916.2 / 307,3 con una RT: 3,89 para β-fenilalanina-CoA).

Con respecto a la localización subcelular de la CoA ligasa, los análisis bioinformáticos predijeron que esta proteína carece de un péptido señal de localización (Fig. 12A), lo que sugiere que la enzima se encuentra en el citosol. Para confirmar experimentalmente estos resultados, el gen Tb768 se fusionó al extremo C de la proteína amarilla fluorescente (YFP) y el plásmido resultante se expresó transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*. El estudio microscópico mostró la señal TB768-YFP como una banda gruesa en la periferia de las células, lo que indica que CoA ligasa podría estar situado en la membrana plasmática y el citosol. Sin embargo, en este caso, el análisis FRAP mostró recuperación casi completa de la fluorescencia

después de unos pocos segundos, lo que confirma una ubicación citosólica de la enzima (Ramírez-Estrada *et al.,* 2016) (Fig. 12B].

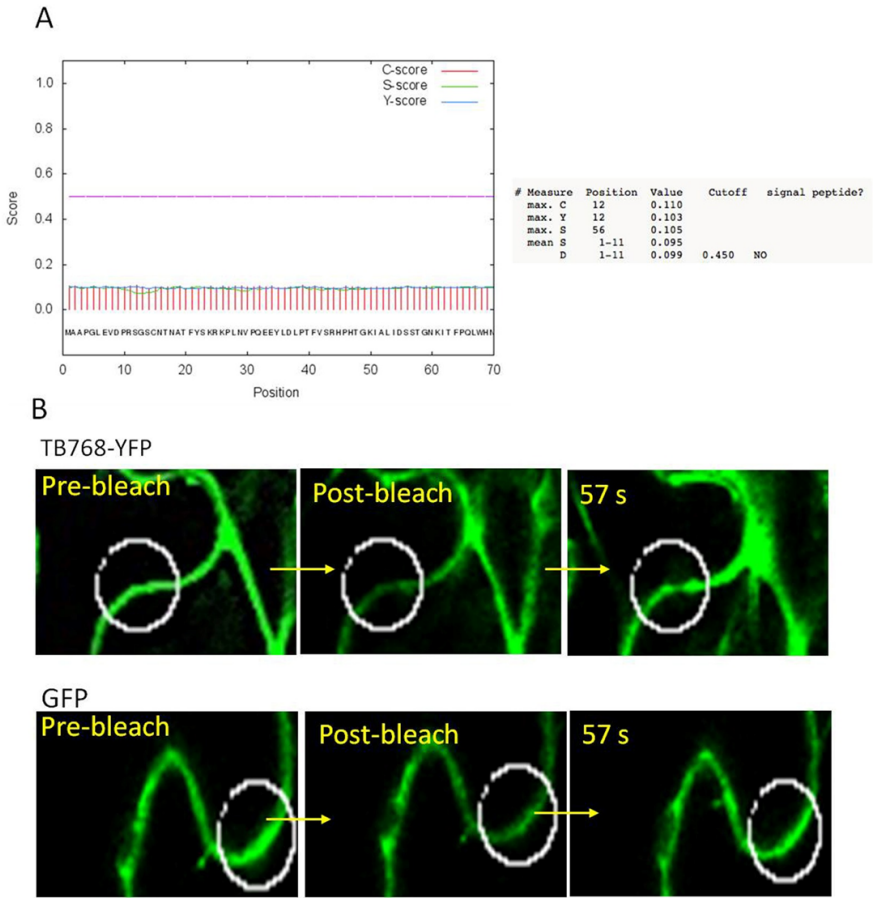

Figura 12. (A) Captura de la pantalla del péptido de señal que muestra que no hay péptido señal en la proteína Tb768. (B) Recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP) de TB768-YPF y GFP en hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes de fluorescencia se registraron antes, inmediatamente después, y 57 segundos después del fotoblanqueo en la región de interés indicada (ROI: círculo blanco). El color de TB768-YFP en las fotos microscópicas confocales se ha cambiado a verde para una mejor visualización.

1.7. Utilización de las técnicas de ingeniería metabólica en la mejora de la producción de taxanos

Aunque recientemente se ha publicado un método optimizado para para la transformación genética de cultivos de células *Taxus* basado en el sistema de *Agrobacterium* (Martínez-Márquez *et al.,* 2015), uno de los principales problemas en la aplicación de técnicas de ingeniería metabólica a los cultivos de células *Taxus* ha sido la dificultad de transformar genéticamente una planta gimnosperma, y la lenta capacidad de crecimiento del material vegetal transformado en condiciones *in vitro*. Sin embargo, *T. brevifolia y T. baccata* se transformaron genéticamente con éxito utilizando cepas silvestres de *Agrobacterium tumefaciens* (Han *et al.,* 1994) y posteriormente, se consiguió la expresión transitoria del gen GUS en embriones de *T. brevifolia* (Luan *et al.,* 1996). De la misma manera, se obtuvieron cultivos de raíces transformadas de *Taxus x media* utilizando *A. rhizogenes* (Furmanowa y Syklowska-Baranek, 2000a). El problema de estos sistemas es que aunque los cultivos de raíces transformadas pueden biosintetizar taxanos, su capacidad de crecimiento es muy lenta. Los mismos autores informaron que la adición de los precursores L-fenilalanina y ácido *p*-aminobenzoico al medio de cultivo aumentó significativamente la producción de taxanos de los cultivos (Syklowska-Baranek *et al.,* 2009). La baja capacidad de crecimiento de los cultivos de raíces transformadas de *Taxus* ha sido también confirmada por Kim *et al*. (2009).

Con la aplicación de herramientas de ingeniería metabólica para aumentar la producción biotecnológica de taxanos, se obtuvieron cultivos celulares transgénicos de *T. marei* que sobreexpresaban

constitutivamente el gen DBAT, pero la producción de taxanos incluso en las líneas de raíces transgénicas dependía de MeJa y sólo una línea celular alcanzó una producción elevada de taxol (Ho *et al.,* 2005). Más recientemente se obtuvieron cultivos de raíces transformadas de *T. media* que sobreexpresaban el gen TXS de *T. baccata*, un gen que codifica uno de los primeros pasos específicos en la biosíntesis de taxanos (Exposito *et al.,* 2010) (Fig. 7). Las líneas de raíces obtenidas presentaban una baja tasa de crecimiento y para superar este problema, se seleccionaron dos líneas de raíces, una de las cuales contenía sólo los genes rol de *A. rhizogenes* y la otra, los genes rol junto con el gen TXS, y se trataron con reguladores de crecimiento vegetales para desdiferenciar las raíces (Pavlova *et al.,* 2014). Los callos obtenidos se utilizaron para establecer cultivos de células en suspensión. Se desarrollaron tres líneas celulares: una línea de control sin transformar, la línea RolC (portadora de los genes rol) y la línea TXS (portadora de los genes rol junto con el gen TXS). Se estableció un sistema de cultivo en dos etapas con estas tres líneas celulares de *T. x media* (Fig. 6). En la primera etapa, las células se cultivaron en un medio de crecimiento optimizado para la producción de biomasa durante 12 días y luego se transfirieron a un medio de producción optimizado para la producción de taxanos, con o sin el elicitor MeJa, los cultivos se mantuvieron durante 28 días. Los resultados obtenidos demostraron que la producción de taxanos de la línea TXS, fue 2,64 veces mayor que la de la línea de control y 1,55 veces mayor que la línea rolC (Exposito *et al.,* 2010).

Otra estrategia metabólica utilizada en los cultivos celulares de *Taxus* ha sido bloquear los puntos de ramificación en la biosíntesis de taxol, mediante la supresión inducida por un antisentido del gen taxano-14-

hidroxilasa que cataliza la biosíntesis de los taxanos oxigenados en C14. Estos compuestos compiten con el taxol por los mismos precursores iniciales y el bloqueo de su formación condujo a una producción incrementada de taxol, en las líneas celulares transgénicas (Li *et al.,* 2011). Por otra parte, se sabe que el ozono induce la producción de taxanos en cultivos de células de *T. chinensis* y la respuesta es al menos parcialmente dependiente de la señalización del ácido abscísico (ABA) (Xu *et al.,* 2011). Aplicando esta estrategia, se obtuvieron líneas celulares transgénicas de *Taxus* que sobreexpresan una 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa, responsable de la escisión del 9-cis-epoxicarotenoide, un paso limitante de la la biosíntesis de ABA. Las líneas celulares transgénicas correspondientes aumentaron la producción de ABA y la acumulación de taxol (Li *et al.,* 2012b). En su conjunto, estos resultados confirmaron la eficacia de las aproximaciones basadas en la ingeniería metabólica para aumentar la producción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos celulares de *Taxus* spp.

1.8. Perspectivas de futuro

Aunque en el año 2002 se alcanzó el hito de la producción biotecnológica de taxol en biofactorías vegetales a nivel industrial, la comercialización de nuevos derivados de taxanos con mejores propiedades quimioterapéuticas ha incrementado la demanda de estos compuestos naturales para su uso en procesos semisintéticos. Para satisfacer esta creciente demanda se requiere una mayor comprensión de la biosíntesis de taxanos y de su control metabólico con el propósito de mejorar la producción biotecnológica.

Actualmente, varios laboratorios de todo el mundo están trabajando con cultivos celulares de *Taxus* para lograr este objetivo.

El progreso en este campo, previamente resumido confirma que los cultivos celulares *Taxus* spp. elicitados, constituyen una excelente plataforma biotecnológica para la producción de taxanos. Aunque probablemente se requiera, el desarrollo de más estudios racionales donde se investigue la actividad de nuevos tratamientos elicitores que podrían incrementar en mayor medida la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus*. Por otra parte, el uso de estos sistemas en investigación básica, con el apoyo de las tecnologías ómicas, y junto con estudios de bioinformática, ha conducido a un avance muy considerable del conocimiento, no sólo sobre la biosíntesis de taxanos, sino también sobre el metabolismo secundario vegetal, en general.

Con los nuevos enfoques holísticos, en lugar de manipular genes únicos de una vía metabólica, los investigadores están tratando de sobreexpresar factores de transcripción u otros reguladores maestros capaces de activar varios pasos biosintéticos, pero el insuficiente conocimiento del control biosintético de la ruta de taxanos requiere más investigaciones de tipo racional. El reciente descubrimiento del Taximin y su posible papel en el metabolismo de taxanos podría abrir una puerta para desarrollar nuevas aproximaciones holísticas, basadas en las técnicas de ingeniería metabólica, en cultivos celulares de *Taxus*, aunque es necesario confirmar la acción de este péptido.

Por otra parte, debido a la alta complejidad metabólica de los sistemas vegetales y la dificultad para obtener material transgénico de

Taxus spp., también haría necesario ensayar nuevas estrategias. El descubrimiento de hongos endofíticos de *Taxus* spp., supuestamente capaces de producir taxol fue un importante avance en su momento, aunque subsecuentes estudios más profundos parecen no corroborar los resultados previos (Ludwig-Müller, 2015). De confirmarse, la generación de cultivos celulares vegetales que alberguen hongos endófitos podría ser una posible alternativa, pero hasta ahora ha habido poco éxito con este tipo de experimentos. Sin embargo, la transferencia total o parcial del sistema de biosíntesis de plantas a otros organismos más simples que son más fáciles de manipular genéticamente podría ser una estrategia muy prometedora. De este modo, el establecimiento de cultivos de bacterias transgénicas o levaduras que expresen genes de la biosíntesis de taxanos puede tener varias ventajas sobre los cultivos de células vegetales transgénicas para la producción de taxanos. Ventajas tales como, un mayor índice de crecimiento o un escalado más fácil hasta biorreactores a nivel industrial. En este ámbito, recientemente se ha desarrollado un estudio pionero para sobreexpresar genes que codifican para los pasos iniciales en la biosíntesis de terpenos junto con los genes TXS y taxadieno-5-hidroxilasa en una cepa de *E. coli* modificada genéticamente que ha conducido a una producción de 1 g L^{-1} de taxadieno y 60 mg L^{-1} de taxadieno-5-ol (Ajikumar *et al.,* 2010). Ambos compuestos podrían ser utilizados en la semisíntesis de taxol o la nueva generación de sus derivados.

2. OBJETIVOS

Considerando los hechos precedentes y teniendo en cuenta como hipótesis básica de nuestro trabajo que los cultivos de células y órganos vegetales pueden constituir una plataforma biotecnológica para la producción de taxanos y otros compuestos vegetales bioactivos, pero que además constituyen una excelente herramienta para el estudio del metabolismo secundario vegetal, esta Tesis Doctoral tiene como objetivos específicos:

- En primer término, desarrollar nuevas aproximaciones empíricas, mediante el uso de potenciales elicitores como la perfluorodecalina y el ciclohexenol, para incrementar la producción de taxanos de los cultivos celulares de *Taxus* spp. y, demostrar su efectividad en otros sistemas biotecnológicos como son los cultivos celulares de *Vitis vinfera* productores de resveratrol. Con este estudio, también se pretende profundizar en el conocimiento del control de las rutas secundarias que llevan a la formación de taxanos y estilbenos, así como, en el mecanismo de acción de los elicitores.

- Por otro lado, conociendo el efecto potencial sobre el metabolismo secundario vegetal del péptido Taximin, recientemente descubierto por nuestro grupo de investigación, con el desarrollo de esta Tesis Doctoral, también pretendemos confirmar el papel de este péptido como un inductor de la producción de taxanos en los cultivos celulares de *Taxus* spp,

para realizar con él, posteriores estudios de ingeniería metabólica.

- Finalmente, y dado que las técnicas de ingeniería metabólica requieren de sistemas optimizados para la transformación genética del material vegetal, nuestro objetivo ha sido la puesta a punto de un sistema biolístico para transformar el material vegetal de *Taxus* spp. con el propósito, de diseñar líneas celulares transgénicas con capacidades mejoradas para la producción de taxanos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Taxus* sp.

El material vegetal con el que se han llevado a cabo los estudios comentados en esta Memoria de Tesis Doctoral proviene de dos especies de *Taxus: Taxus baccata* var. robusta *y Taxus x media* var. Hicksii. En trabajos anteriores ya se había demostrado que los explantos más idóneos para la formación de callo eran los tallos jóvenes poco lignificados de diámetros entre 0,15 y 0,4 cm que se situaron en un medio óptimo de inducción, basado en el medio de cultivo (MIC) de Gambor B5 (Gambor *et al.,* 1968) suplementado con doble concentración de vitaminas, sacarosa 30 g/L, añadiendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 4 mg/L, Kinetina (KIN) 1 mg/L y ácido giberélico (GA3) 0,5 mg/L como reguladores del crecimiento, con pH de 5,8±0,2 (Cusidó *et al.,* 1999). Después de autoclavar el MIC se adicionó una solución antioxidante estéril (SAES) al medio de cultivo (Kim *et al.,* 2005). A partir de este material, a las 3-4 semanas de cultivo, prácticamente un 100% de los explantos habían formado pequeñas masas de callo. Después de 4-6 semanas se separó el callo obtenido de los restos del explanto, y se colocó en placas de Petri con un medio óptimo para su crecimiento (Fig. 13).

Hay que indicar que mientras que el medio de inducción de callo era igual tanto para *T. baccata* como para *T. x media,* experimentos anteriores de nuestro grupo de investigación determinaron que el medio óptimo para el crecimiento (MCC) del callo era distinto para las dos especies estudiadas (Cusidó *et al.,* 2002). Por ello las piezas de callo se cultivaron en medio Gambor B5 suplementado con vitaminas B5, sacarosa 5 g/L, fructosa 5 g/L, mioinositol 0.1 g/L. Para *T. baccata*

se añadieron las hormonas ácido 1-naftalenacético (NAA) 2 mg/L, 6-benzilamino purina (BAP) 0.1 mg/L y GA3 0.5 mg/L. Al medio MCC de *T. media,* las hormonas añadidas fueron picloram (PIC) 2 mg/L, KIN 0.1 mg/L y GA3 0.5 mg/L. EL pH de ambos cultivos fue de 5,8±0,2. En ambos casos se adicionó SAES al medio de cultivo después de autoclavar. Una vez obtenida la suficiente biomasa de callo, ya se pasó a establecer los cultivos celulares en medio líquido.

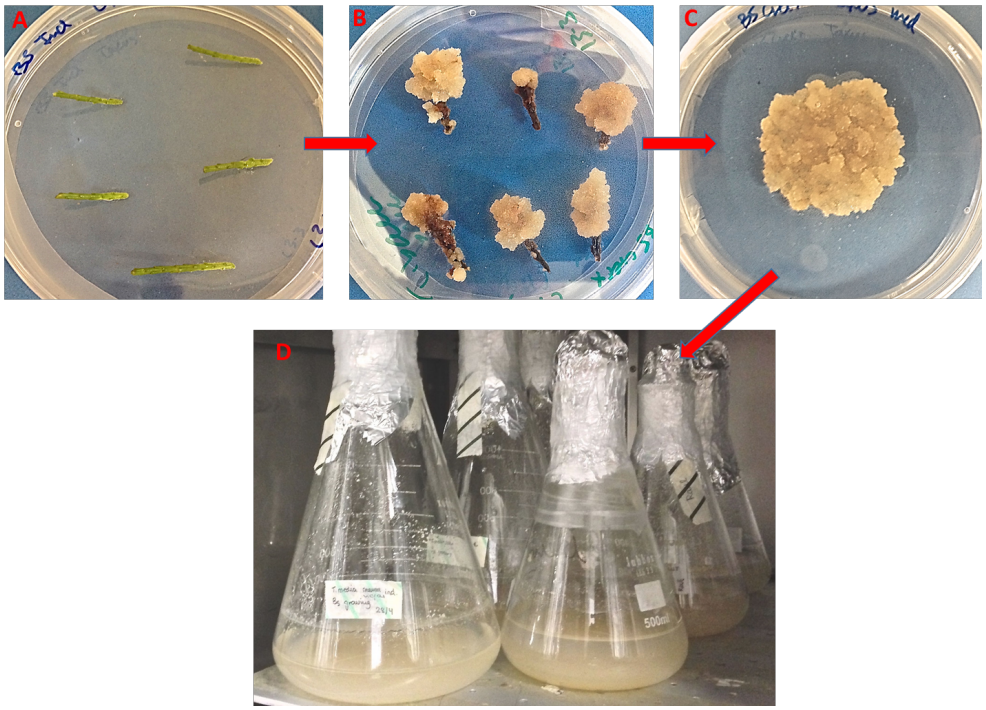

Figura 13. Etapas de la inducción de callo y del establecimiento de las suspensiones celulares. A) Explantos. B) Inducción de callos. C) Cultivo de callo. D) Cultivo de la suspensión celular.

Las suspensiones celulares se establecieron a partir de callos friables de ambas especies, derivados de explantos previamente esterilizados (Fornalè *et al.,* 2002). Las suspensiones celulares se subcultivaron cada 12 días en medio fresco de crecimiento, de la misma

composición a los descritos previamente, pero sin la adición de gelificante. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 100 rpm en oscuridad a 25±1 ºC, para incrementar la biomasa celular (Fig. 13).

3.2. Crecimiento y viabilidad de cultivos en suspensión.

A lo largo de los diferentes ensayos se determinó la viabilidad y el crecimiento de las líneas celulares para determinar la capacidad de formación de biomasa del sistema.

La viabilidad se determinó usando una pequeña alícuota de la suspensión celular, mezclándola con una solución marcadora de diacetato de fluoresceina (DAF), el cual es hidrolizado por esterasas de la membrana que poseen las células vivas produciendo fluoresceína verde al excitársele a una longitud de onda (λ) de 490 nm, emitiendo a λ = 520 nm. La proporción de células no viables se determina tratando la misma alícuota de la suspensión celular con solución de yoduro de propidio (IP), el cual se intercala en el DNA de las células muertas, dando una fluorescencia roja al excitarse con una λ = 530 nm emitiendo a 620 nm. Ambos reactivos se utilizan a la concentración de 0.01 % p/v (Duncan y Widholm, 1990). La preparación se observó en microscopio de fluorescencia (Leica, Suiza), equipado con lámpara de mercurio (Nikon, Japón). La viabilidad se expresada en porcentaje de células vivas en relación con el total de las células observadas (Fig. 14).

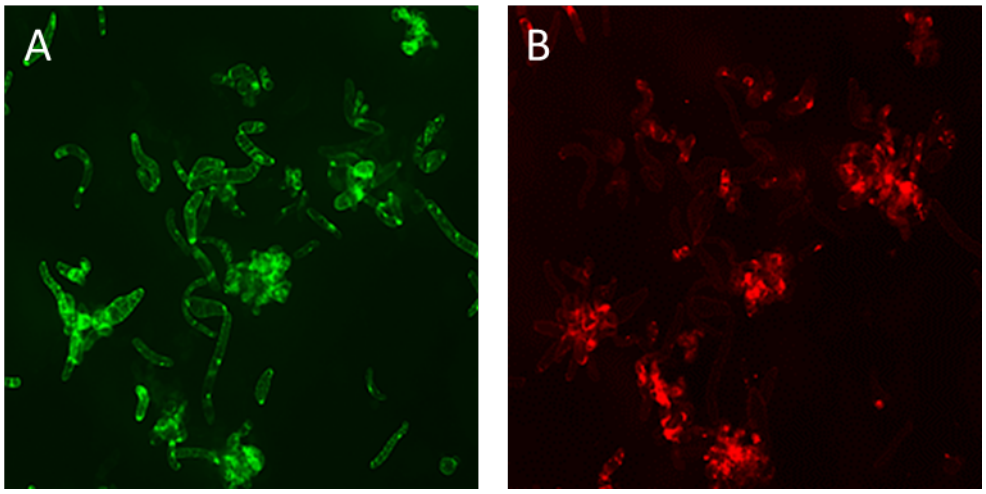

Figura 14. Tinción diferencial del DAF:IP. (A) en verde células vivas. (B) en rojo células muertas.

La capacidad de crecimiento de los cultivos de células en suspensión se determinó mediante la cuantificación de la biomasa medida como peso fresco (PF) y peso seco (PS). Para el PF se separaron las células del medio a través de un filtro de nylon de 80 µm de diámetro, en los tiempos correspondientes a cada muestreo de los ensayos realizados. Para medir el PS las células fueron liofilizadas a -56ºC y 50 mT durante 48 h en un liofilizador Flexi-Dry™ µP de FTS Systems (USA). Estas muestras se utilizaron para la determinación de los taxanos por UPLC.

3.3. Elicitación de suspensiones celulares con nuevos compuestos.

Los ensayos de elicitación se llevaron a cabo en un sistema de cultivo en dos fases (Cusidó *et al.,* 2002). Después de 12 días de crecimiento en el medio B5 óptimo para la producción de biomasa (MCC), los

cultivos se transfirieron a los correspondientes medio óptimos para la producción (Cusidó *et al.,* 2002; Palazón *et al.,* 2003), con una proporción de inóculo de 20 g de peso fresco/100 ml de medio de cultivo B5 de producción (MCP), suplementado con vitaminas B5, sacarosa 30 g/L, mioinositol 0.1 g/L a un pH de 5,8±0,2 más la solución antioxidante, indicada anteriormente. Para *T. baccata* se añadieron las hormonas quinetina (KIN; 0,1 mg/L), picloram (PIC; 2 mg/L) y GA_3 (0,5 mg/L), mientras que para *T. media*. se adicionó ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 2 mg/L) benciladenina (BA; 0,1 mg/L) y GA_3 (0.5 mg/L).

En el ensayo de elicitación para analizar el efecto de HyproTaximin en la producción de taxanos, dicho compuesto se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) previa su adición al MCP, en cambio el jasmonato de metilo (MeJa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se disolvió en etanol (EtOH) (Cusidó *et al.,* 2002). Ambos elicitores fueron esterilizados por filtración (filtros de PES de 0,22 µm; Millipore, Billerica, MA) y adicionados, separada o conjuntamente, al medio de cultivo después de autoclavar. Las concentraciones utilizadas de dichos compuestos fueron 1 y 10 µM para HyproTaximin y 100 µM para MeJa. Las suspensiones celulares de *T. baccata* fueron inmediatamente sonicadas en un baño ultrasonidos (US) para facilitar la entrada del HyproTaximin en las células vegetales usando una frecuencia baja de 40 kHz por 1 min en US (Branson B5200-4 baño ultrasónico, Branson Ultrasonics, L'Hospitalet de Llobregat, España). Los cultivos celulares se mantuvieron a 25ºC, en la oscuridad y en agitación (100 rpm) en un agitador orbital Khuner durante 21 días (Bonfill *et al.,* 2003), y se recogieron tres matraces de cada tratamiento para su análisis, en diferentes momentos después de la elicitación.

En el segundo ensayo de elicitación en cultivos celulares de *T. media* se empleó la perfluorodecalina (PFD) en forma gasificada y desgasificada (PFDgas y PFDdegas, respectivamente) (Fig. 15), así como hexenol (Hex). También se adicionó el tratamiento conjunto de coronatina-ciclodextrina (Coro + β-CDs) cuyo efecto sinérgico había sido demostrado previamente (Ramírez-Estrada *et al.,* 2015) y combinaciones de éstos tratamientos.

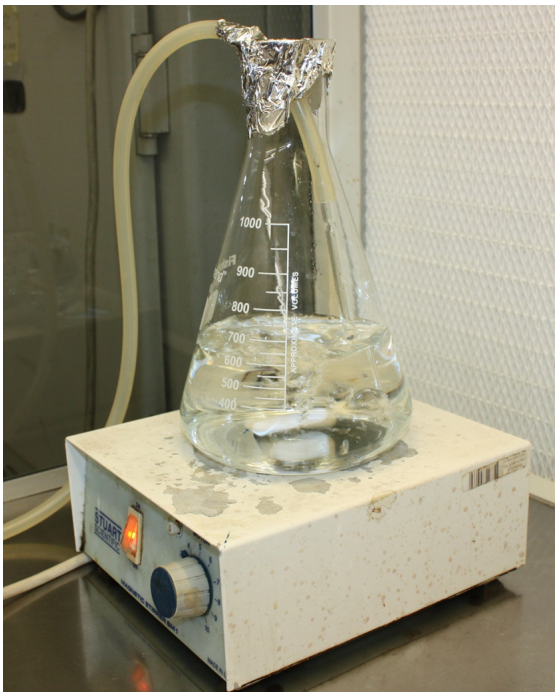

Figura 15. Sistema de desgasificación de la perfluorodecalina.

Las suspensiones celulares fueron filtrados con malla de nylon estéril con tamaño de poro de 80 µm, transfiriendo 4 g de células a 20 mL de MCP (Cusidó *et al.,* 2002) en frascos estériles de 200 mL adicionando los respectivos elicitores y cultivados en agitación a 100 rpm en la oscuridad a 25±1 ºC, como se ha indicado anteriormente. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Los tratamientos que se llevaron a cabo fueron:

- Control T0 (MCC): Células en MCC como control inicial para todo el ensayo.
- Control (CNT): para cada tratamiento en cada día de muestreo sin la adición de elicitores.
- PFDdegas: 575 ml/L PFD autoclavada 121ºC por 30 min.
- PFDgas: 575 ml/L PFD autoclavada haciéndole pasar una corriente estéril de aire 10L/min durante 15 min en condiciones de esterilidad.
- Hex: 40 µM del elicitor z(3)-hexenol.
- Coro + β-CDs: β-ciclodextrina 50 mM y Coronatina 1µM
- PFDgas + Coro + β-CDs
- PFDdegas + Coro + β-CDs
- Hex + Coro + β-CDs

Para la cuantificación de taxanos se tomaron muestras a los 0, 6, 12, 18 y 24 días de iniciado el ensayo. Para el análisis de la expresión relativa de genes se cogieron las muestras a 0, 4, 8, 12, 24 y 48 h.

3.4. Extracción y cuantificación por UPLC de taxanos.

La extracción de taxanos a partir de las células liofilizadas (intracelular) y del medio líquido (extracelular) se realizó siguiendo el protocolo establecido por nuestro grupo (Cusidó *et al.,* 1999) con modificaciones. Al medio de cultivo se le añadió 25% del volumen de diclorometano agitándose 2 min en vórtex, para posteriormente

sonicar las muestras 1 h. La fase orgánica fue separada y desecada a temperatura ambiente.

Para la extracción de taxanos intracelulares, previa homogenización de las células liofilizadas, se agregó 2 mL de la mezcla metanol:agua (9:1 v/v) por cada 50 mg de muestra, calentando la suspensión en un microondas a 80 Watts durante 8 min para luego filtrarla conservando el extracto metabólico; con el residuo se repitió el proceso. A 4 mL de extracto metanólico se agregaron 4 mL de hexano. La mezcla se centrifugó a 2500 g durante 20 min a 25º C. A la fase acuosa recuperada se añadieron 2 mL de diclorometano y 1 mL de agua destilada reservando la fase orgánica. Con la fase acuosa restante se repitió la adición de diclorometano para reunir ambas fases orgánicas obtenidas, que fueron secadas a temperatura ambiente. Los extractos secos se resuspendieron en 500 mL de metanol, filtrándolos a través de filtros PVDF de 0,22 μm (Millipore, Billerica, MA, EEUU) antes del análisis por UPLC.

Los taxanos se cuantificaron por cromatografía líquida-UPLC en base al método de HPLC descrito por Richheimer *et al* (1992). Los análisis UPLC se realizaron con un equipo Waters Acquity Ultra Performance LC system (Waters, Milford, MA., USA.). Para la separación de los taxanos se utilizó una columna Supelcosil LC-F 25 cm x 4,6 mm (SUPELCO, Bellefonte, PA., USA.) y como fase móvil una mezcla de agua (A) y acetonitrilo (B), con el siguiente programa de gradiente: tiempo (min)/% B, 0/25, 38/60, 40/100, 43/100, 45 / 25 y 55/25 con un flujo de 1 mL/min. Los criterios para la identificación de los picos fueron el tiempo de retención, los espectros UV y co-cromatografía con estándares, comprobando la homogeneidad de los picos en un detector “photodiode array” (DAD). La cuantificación de taxanos se

realizó integrando los picos correspondientes a cada taxano a partir de las muestras y su comparación con una curva de calibración estándar externa. Los estándares fueron proporcionados por ChromaDex (Irvine, CA, EEUU) determinándose 5 taxanos: 10-deacetilbacatina III (DAB) con tiempo de retención de 6.96 min; bacatina III (BIII) 11.09 min; deacetiltaxol (DT) 18.84 min; cefalomanina (CEF) 21.50 min y taxol (TX) 23.41 min.

3.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para el análisis de la expresión génica se aisló el RNA total a partir de 100 mg de células congeladas empleando el Kit SPIN REAL RNAzol (REAL, Valencia, España.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de cada muestra se determinó mediante NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Tecnologías de Wilmington, DE, EE.UU.). Para el análisis se seleccionaron las muestras con una relación de absorciones 260 nm/280 nm, entre 1.9 a 2.0, para proseguir con la eliminación del DNA empleando el Ambion ® TURBO DNA-*free*™ Kit. La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para luego utilizar 1 µg de RNA total de cada muestra para la síntesis de cDNA usando la RT SuperScript IV (Invitrogen, Carlsdab, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

El análisis de qRT-PCR se efectuó usando el iTAqTM universal SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) en el equipo Virtual LightCylcer 480 384 System II ® de ROCHE, en un sistema de plataforma de 384 pocillos (ABI Prism 7900HT Sistema de Detección de Secuencia, Applied Biosystems, Foster, CA, EE.UU.). Los cebadores específicos para los genes a evaluar fueron diseñados con

el software Primer3 versión 0.4.0 (Tabla 3). Las condiciones de reacción y la eficiencia de amplificación de los cebadores se habían comprobado en estudios previos (Sabater-Jara *et al.,* 2014; Ramírez-Estrada *et al.,* 2016). Los niveles de expresión relativa fueron cuantificados con el Software LightCycler® 480 versión 1.5.0.33, normalizando la expresión de cada gen con un gen de referencia, y los tratamientos de elicitación con la línea celular cultivada por 12 días en MCC.

Tabla 3. Características de cebadores seleccionados para análisis por qRT-PCR

Gen	Secuencia del cebador 5' – 3'	Amplicón (pb)
TBC41	Forward: CAA GAA GAA AGA GTC AGC AAA TGG Reverse: GGA ACG ACA TGA CAT TAT GAA TAG C	91
T13αOH	Forward: GCC CTT AAG CAA TTG GAA GT Reverse: CAG AGG AAT GGC GTT TAG AG	100
CoA ligasa	Forward: AGC AGA CAC TAT GGA ACA Reverse: GCC ACA ACT CTC CTC TAT	109
BAPT	Forward: TAA GCA CTC TAC AAC AAC AAT GG Reverse: GCA TGA ACA TTA GTA TCT TGA TTC C	111
DBTNBT	Forward: CGG GGG GTT TGT TGT GGG ATT A Reverse: TTA GCC TCT CCC CTC GCC ATC T	105

3.6. Transformación de *Taxus media* por biolística.

3.6.1 Material vegetal utilizado.

Con la finalidad de obtener material vegetal transformado de *Taxus,* y debido a las dificultades que presenta la transformación genética de dicha especie mediante el sistema *Agrobacterium,* en este estudió se puso a punto un sistema biolístico de transformación genética, puesto que es un proceso efectivo, independientemente de la especie vegetal que se desea transformar (Chirstou *et al.,* 1991; Capell y Christou 2004; Vongpaseuth *et al.,* 2007).

Para ello, se utilizaron callos friables de *Taxus media* crecidos durante 12 días en el medio B5 óptimo para la formación de biomasa (Cusidó *et al.,* 2002).

3.6.2. Clonación del gen *BAPT*

Previamente, nuestro grupo de investigación, utilizando la tecnología Gateway (InvitrogenTM) obtuvo el plásmido pK7WG2_BAPT al insertar el gen que codifica para la proteína bacatina III 13-O-(3-amino-3-fenilpropanoil) transferasa (BAPT) en el plásmido pK7WG2 (Karimi *et al*, 2002). En esta construcción, el gen *BAPT* se encuentra bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV 35S y también en su T-DNA se encuentra el gen *nptII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina a los cultivos transformados (Fig. 16).

El plásmido pK7WG2_BAPT fue clonado en células quimio-competente (Cc) de *E. coli* DH5α™ (Invitrogen™). A 100 µL de Cc se adicionaron 200 ng del plásmido, incubando durante 30 min a 4ºC

para después someter la mezcla a un choque térmico durante 2 min a 42ºC y dejarla a continuación durante 5 min a 4ºC, añadiendo después 1 mL de medio líquido Luria Bertani (LB). Las células junto con los plásmidos fueron mantenidos en agitación orbital durante 1 h a 37ºC para ser centrifugados posteriormente durante 3 min a 14.000 rpm.

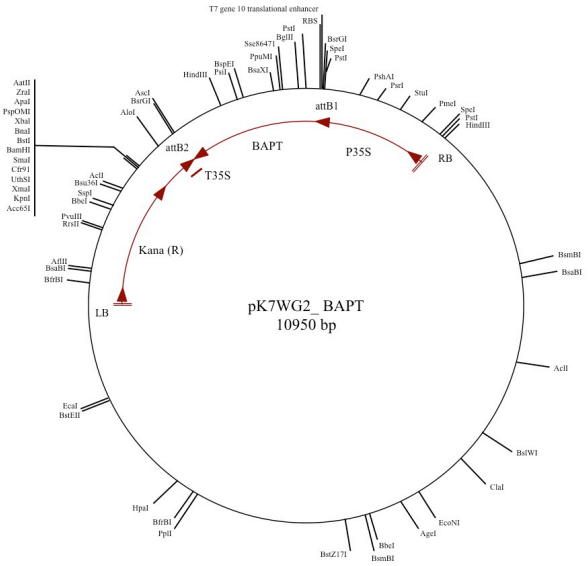

Figura 16. Representación esquemática del plásmido pK7WG2_BAPT

Descartamos 900 µL del sobrenadante, para resuspender el sedimento bacteriano en los 100 µL restantes. Se distribuyeron alícuotas en placas con medio LB adicionado con espectinomicina (Spec) 75 µg/mL, puesto que el indicado plásmido lleva fuera de su T-DNA el gen Sm/SpR que confiere resistencia a estreptomicina/espectinomicina a las células bacterianas que lo incorporan. Las placas, a continuación, se incubaron a 37ºC toda la noche (O/N).

De las colonias crecidas en el medio de selección, se confirmó la transformación mediante PCR, con los cebadores que amplifican el gen *BAPT*, siendo la secuencia del "forward": 5'-GGA ATA GAG AAC TGG TGA AG-3' y del "reverse": 5'-GAA GGT CAT GGA CAT TAT CC-3'. El producto de la PCR fue cargado en gel de agarosa TBE al 1% durante 30 min/70 V/400 mA.

Una colonia positiva para el gen *BAPT* fue inoculada en 10 mL de medio LB adicionado del mismo antibiótico, e incubada a 37ºC en agitación O/N. El DNA plasmídico se purificó empleando el GeneJET miniprep Kit (ThermoFisher) siguiendo las indicaciones del proveedor. La cuantificación se hizo usando un UV-Vis espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Nano-Drop Technologies, ThermoScientific), analizando a través del Software Nanodrop 2000®. Las muestras se conservaron a -20ºC.

3.6.3. Clonación del gen BAPT bajo el control del doble promotor CaMV35S (Pd35S)

El plásmido pIV2B2.1_VoGES, proporcionado por la Prof. Capell del laboratorio de Producción Vegetal y Ciencia Forestal, de la Universitat de Lleida, incluye el gen que codifica para la geraniol sintasa de *Valeriana officialis* (VoGES) y su expresión está bajo el control del doble promotor 35S (Pd35S) a la vez que también confiere resistencia a gentamicina (Gm) (Fig. 17).

La integridad del plásmido pIV2B2.1_VoGES se comprobó mediante digestiones con los enzimas de restricción XbaI, NotI y EcoRV de modo individual y la digestión conjugada de XbaI–NotI.

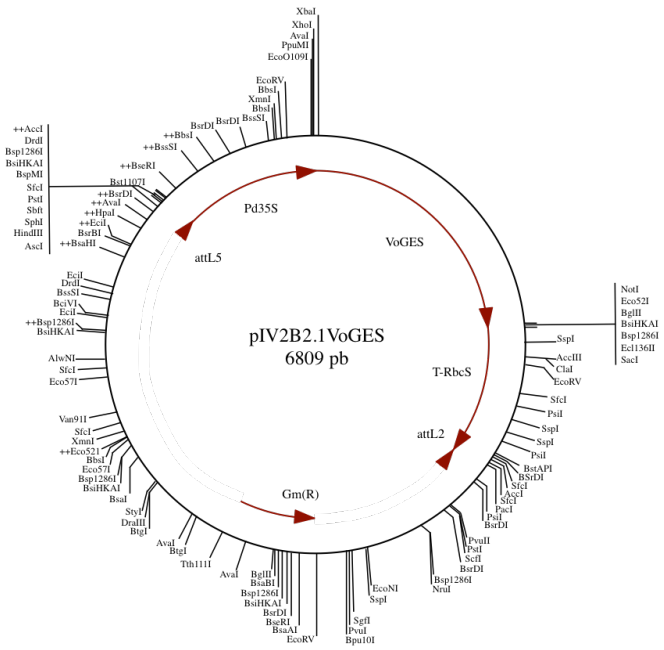

Figura 17. Representación esquemática del plásmido pIV2B2.1_VoGES

Nuestra estrategia consistió en emplear esta construcción sustituyendo el gen *VoGES* por el gen *BAPT*, adicionando adaptadores para enzimas de restricción específicos que permitiesen la ligación al vector pIV2B2, obteniendo así un plásmido capaz de expresar de modo constitutivo fuerte el gen de interés. Dicha construcción fue empleada en la transformación por biolística de los callos de *Taxus* de manera conjunto con el plásmido pWRG1515, que contiene el gen reportero ß-glucuronidasa (*gusA*), (Fig. 18).

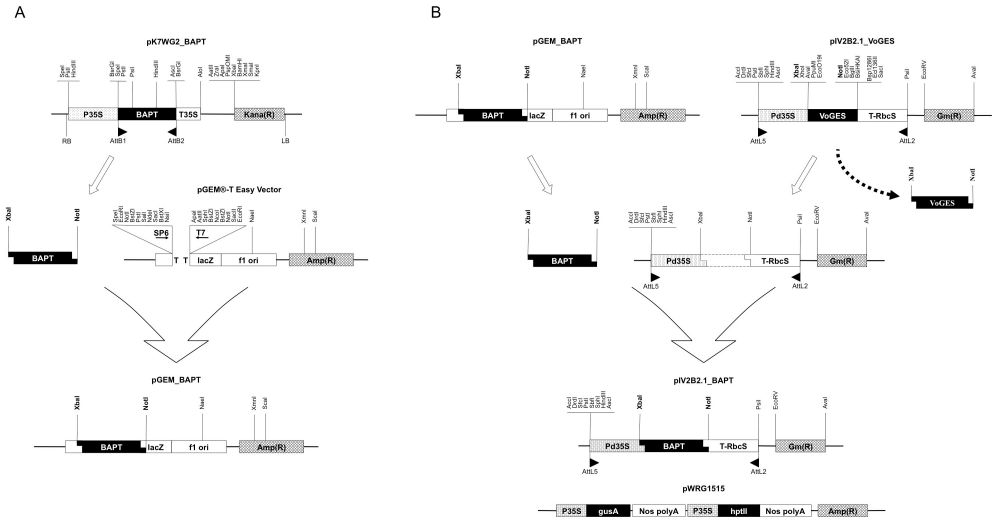

Figura 18. Esquema del diseño experimental para generar la construcción pIV2B2.1_BAPT. A: Ligación en el plásmido intermedio pGEM-T Easy. B: Extracción del gen *BAPT* para clonarlo en vector pIV2B2.1, obteniendo el plásmido final.

Éste plásmido también fue clonado en Cc *E. coli* DH5α. Para ello, se adicionaron 300 ng del plásmido pIV2B2.1_VoGES a las Cc y se incubaron 25 min a 4ºC seguido de un choque térmico de 1 min, también a 42ºC. A continuación, las células se incubaron durante 5 min con los plásmidos a 4ºC y se añadió 800 µL de medio LB dejando la mezcla en un agitador orbital durante 1h a 37ºC. Posteriormente se centrifugó la mezcla durante 5 min a 4000 rpm eliminando el sobrenadante por decantación. El medio que quedó remanente se utilizó para resuspender el sedimento bacteriano, que se distribuyó en placas de Petri con medio LB suplementado con Gm 10 mg/L (Gm10). Los cultivos se incubaron a 37ºC O/N. Después de seleccionar una colonia aislada, ésta se creció mediante cultivo en suspensión para la posterior purificación del plásmido usando el Wizard VS miniprep system kit® (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor.

Para asegurar la correcta adición de los adaptadores a la secuencia del gen *BAPT*, se realizó una primera ligación empleando el vector pGEM®-T Easy (Promega). El DNA purificado de la construcción pK7WG2_BAPT, se amplificó con los cebadores, "forward": 5'-GCT CTA GAA TGA AGA AGA CA-3' (FW1_XbaI) y "reverse": 5'-ATT TGC GGC CGC TCA TAA CTT TGA CG-3' (RV2_NotI).

Éstos se diseñaron para adicionar en los extremos del gen los sitios de restricción de los enzimas XbaI y NotI. El producto de PCR fue cortado del gel de agarosa para ser purificado empleando GENECLEAN® II kit (MPbio). La ligación en éste vector se realizó con el tampón 2X Rapid Ligation, siguiendo indicaciones del proveedor, incubando posteriormente durante 1 h a temperatura ambiente, 1 h a 15ºC, para dejarlo a 4ºC durante una noche.

Las células Cc de *E. coli* DH5α se transformaron añadiendo 8 μL de la reacción de ligación anterior, prosiguiendo como se ha descrito anteriormente. Se sembraron alícuotas de 300 μL en placas con en medio de selección LB adicionado con ampicilina 100 μg/mL (Amp100), isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido 0,1 M (IPTG) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido 50 mg/mL (X-Gal), e incubando a 37ºC O/N.

Las colonias crecidas fueron aisladas. La confirmación de la presencia del gen *BAPT* más los adaptadores (*BAPT*$_{X\text{-}N}$) en estas colonias se realizó por PCR. De las colonias positivas se purificó el DNA por miniprep para comprobar, mediante digestión con el enzima EcoRI durante 3,5 h a 37ºC, la ligación en ésta construcción intermedia en el vector pGEM®-T Easy más *BAPT*$_{X\text{-}N}$.

A fin de confirmar que el gen *BAPT* insertado en la construcción pGEM_BAPT presentaba la secuencia correcta, se enviaron 20 μL (100 ng/μL) del producto de miniprep de las colonias candidatas con resultados positivos en selección, amplificación y digestión a los Servicios de Secuenciación STAB VIDA (Oeiras, Portugal).

Tras confirmar por secuenciación la correcta ligación, se creció la colonia y purificó el DNA mediante miniprep. Este plásmido fue digerido con los enzimas XbaI y NotI durante 3,5 h a 37ºC para escindir el gen $BAPT_{X\text{-}N}$. Todas las muestras fueron cargadas en un gel de TBE al 1% en las condiciones anteriormente descritas. Mediante el empleo de un trans-iluminador UV, se cortó la banda del gen correspondiente, para purificarla con el kit GENECLEAN® II, siguiendo las indicaciones del proveedor. Se repitió el procedimiento con el plásmido pIV2B2.1_VoGES, para eliminar el gen *VoGES* y emplear la construcción como vector destino, poseedora del Pd35S.

La ligación fue realizada empleando la T4 DNA ligasa (InvitrogenTM) según las indicaciones del proveedor, con una proporción 1:3 del Vector:Inserto (pIV2B2.1:$BAPT_{X\text{-}N}$), incubando durante 1h a Tº ambiente, después otra hora a 15ºC, para dejarlo finalmente a 4ºC O/N.

El producto de la ligación anterior se clonó en Cc de *E. coli* DH5α, incubando a 37ºC O/N. Se sembraron alícuotas en placas con medio de selección LB+Gm10, incubando de nuevo a 37ºC O/N. Las colonias crecidas fueron aisladas y comprobadas por PCR para el gen *BAPT*, obteniéndose una colonia positiva, la cual fue digerida con XbaI y NotI para comprobar la integridad de los adaptadores. La colonia positiva fue enviada a servicio de secuenciación STAB VIDA

con cebadores diseñados para amplificar pares de bases antes de los sitios de corte agregados (Tabla 4, Fig. 19).

Tabla 4. Secuencia de los cebadores usados para secuenciar gen *BAPT* de la ligación pIV2B2.1 : $BAPT_{X\text{-}N}$

ID	Secuencia 5'– 3'
FW2	GGA CCT CCA TCT CTT GAT TGT T
FW3	TTA CAC AAA GAA CTC AAC TCA
FWext	TGA CGC ACA ATC CCA CTA TC
RV2	GCC ATA GTA TCC ATG TGG AAG AG
RV3	ATAAACCAGCACCTTGGAGAG
RVext	CTTAGTAGCCATCGGGCTTATG

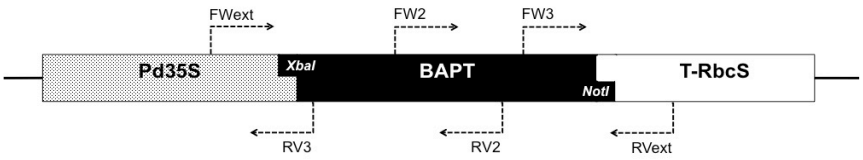

Figura 19. Esquema de amplificación del gen *BAPT* con los cebadores de tabla 4.

3.6.4.Preparación de las partículas de oro cubiertas con DNA y bombardeo del material vegetal.

Confirmada la construcción pIV2B2.1_BAPT mediante alineamiento de los resultados de secuenciación del clon candidato, procedimos a preparar el material necesario para realizar la transformación biolística. Una colonia de la cepa de *E. coli* portadora del plásmido con nuestra construcción pIV2B2.1_BAPT fue inoculada en 10 mL de medio LB+Gm10 a 37ºC en agitación O/N. El cultivo bacteriano fue crecido en 200 mL del medio de selección durante 6 h a 37ºC, en agitación, para posteriormente purificar el DNA plásmidico mediante

la metodología Maxiprep con el Kit NucleoBond® PC 500 (Macherey-Nagel), según las indicaciones del proveedor.

El DNA, producto de la Maxiprep fue comprobado por PCR y digerido con los enzimas correspondientes, para corroborar que el gen *BAPT* estaba íntegro y se encontraba bajo el control del promotor Pd35S.

Debido a que el plásmido utilizado pIV2B2.1_BAPT no poseía gen reportero, se llevó a cabo una co-transformación utilizando también, el plásmido pWRG1515 que contenía el gen ß-glucuronidasa (*gusA)* y el gen *hptII* bajo el control del promotor CaMV35S que confiere resistencia a higromicina (Hyg) al material vegetal transformado. Éste plásmido, que fue proporcionado por el laboratorio de Producción Vegetal y Ciencia Forestal, Lleida, fue clonado en Cc de *E. coli* DH5α y purificado mediante Maxiprep. En paralelo, realizamos un ensayo de sensibilidad a Hyg en células de *Taxus media*, comprobando la viabilidad de éstas a distintas concentraciones del antibiótico, con la finalidad de escoger la concentración adecuada a emplear para la selección de las células transformadas por biolística.

La preparación de partículas de oro para el bombardeo se prosiguió según un protocolo previamente establecido (Christou *et al*., 1991). A 10 mg de oro se añadieron 20 µL de la solución mezcla de los plásmidos pIV2B2.1_BAPT y pWRG1515 en proporción 3:1 respectivamente. Se adicionaron 100 µL de buffer XHO (30 µL NaCl 5M, 5 µLTris 2M pH:8, 965 µL H_2O) agitando ligeramente para luego agregar 100 µL de espermidina 0,1 M y 100 µL de PEG al 25% (MW 1300-1600). En agitación, se añadió por goteo 100 µL de $CaCl_2$ 2,5 M, manteniendo por 10 min a Tº ambiente. La mezcla se centrifugó 30 s, desechando del sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en 1

mL de EtOH al 100%. La muestra fue sonicada brevemente para transferirla a un vial de cristal llevándola a un volumen final de 10 mL con EtOH del 100%, sonicando de nuevo. Las muestras así preparadas, se guardaron el viales a -20ºC.

Con una suspensión de las partículas cubiertas de DNA se prepararon láminas mylar de 1 x 1 cm aplicando por goteo 163 µL de ésta. Después de 3 min, se eliminó el exceso de la suspensión por decantación, dejando las láminas en posición vertical en placas Petri para completar el secado.

Como se ha comentado en el apartado 1.5.1, para la transformación genética de *Taxus* spp. mediante biolística se utilizaron callos friables de *T. baccata* cultivados durante 12 días en el medio de óptimo crecimiento (MCC). A continuación, dichos callos fueron transferidos a medio fresco suplementado con manitol 0,4 M (medio osmótico) durante 4 y 1 h. Como tratamiento control se utilizaron callos de la misma línea, sin mantener en el medio osmótico utilizado previamente al bombardeo. Todos los callos se colocaron a continuación sobre papel de filtro estéril de 1 x 1 cm en placas de Petri de 5 cm diámetro para su bombardeo.

Los callos fueron bombardeados una sola vez, usando el sistema BioRad Helium PDS-1000/He con 900 psi a una distancia de 9 cm. El bombardeo se llevó a cabo utilizando 40 µg de las partículas de oro recubiertas con dos tipos de plásmidos: uno portador del gen de interés pIV2B2.1_BAPT y el portador del gen de selección pWRG1515. Después del bombardeo, el material vegetal se mantuvo 24 h en el medio osmótico para después ser transferido a medio B5 de crecimiento durante 48 h. Pasado este tiempo, se llevó a cabo la

prueba histoquímica para demostrar la presencia del gen *gusA*, incubando a 37ºC el material posiblemente transformado con X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-ß-D-glucoronico) durante una noche. La expresión transitoria del gen reportero se verificó empleando un estereoscopio Leica MZ16FA.

4. RESULTADOS Y SU DISCUSIÓN

4.1. Efecto de las perfluorodecalinas y el hexenol en la producción biotecnológica de taxanos

Como ya se ha comentado en el capítulo de Introdución, los cultivos de células vegetales constituyen una excelente herramienta biotecnológica para la producción de compuestos bioactivos útiles para las industrias farmacéutica, cosmética y química. En el caso de los metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas, la productividad del cultivo celular generalmente no es muy alta, aunque puede mejorarse mediante la elicitación (Zhao *et al.,* 2005; Ramírez-Estrada *et al*, 2016). Uno de los ejemplos más exitosos de producción biotecnológica de compuestos de alto valor añadido es el taxol un potente agente anticancerígeno, así como otros taxanos que son utilizados como precursores semisintéticos de taxol y sus análogos. Numerosos estudios han demostrado la efectividad de suplementar los cultivos celulares de *Taxus* spp con elicitores, ya sean bióticos o abióticos, así como la acción de factores físicos específicos, para mejorar la acumulación de taxanos (Expósito et al. 2009; Onrubia et al., 2013b; Ramírez-Estrada *et al.,* 2016). En la actualidad, varias empresas como Phyton, Cell Therapeutics, Abraxis y Corean Samyang Genex están produciendo actualmente estos compuestos en cultivos celulares de *Taxus* spp., a nivel industrial (Malik *et al.,* 2011).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que el MeJa (100 μM), cuando se adiciona a los cultivos de *Taxus* spp., durante la fase de producción, actúa como un elicitor muy efectivo incrementando la producción de taxanos (Cusidó *et al.,* 2002), pero los mejores resultados han sido obtenidos con otros

elicitores, como la coronatina (1 µM) y las β-ciclodextrinas (50 mM). La coronatina (Coro), una fitotoxina producida por diferentes variedades patógenas de *Pseudomonas syringae* (Bender *et al.,* 1999), actúa como un análogo natural de la forma activa de jasmonato, el JA-Ile. En cultivos de celulares de *T. media* (Onrubia et al., 2013a), la inducción con Coro (1 µM) incrementó más de tres veces la producción de taxanos totales que el MeJA (100 µM).

Las β-ciclodextrinas (β-CDs) son oligosacáridos cíclicos formados por unidades de 7 α-D-glucopiranosa producidas a partir de la degradación enzimática del almidón por la ciclodextrina glicosil-transferasa bacteriana (Szejtli, 1997, Qi *et al.,* 2007). Utilizando la misma línea celular de *T. media*, el tratamiento con MeJa y β-CDs condujo a un drástico aumento en la producción de taxol, muy por encima de la de otros taxanos, y cerca de un 90% de los taxanos producidos se acumularon en el medio de cultivo (Sabater- Jara *et al.,* 2014). Adicionalmente, estudios transcriptómicos determinaron los pasos biosintéticos que limitan el flujo de precursores en la biosíntesis de taxanos y la activación de posibles genes implicados en la excreción de taxol al medio de cultivo. En otra línea celular de *T. media*, la adición simultánea de β-CDs y Coro aumentó significativamente la producción de taxanos, particularmente taxol y bacatina III (Ramírez-Estrada *et al.,* 2015). En los cultivos celulares de *Vitis vinifera* elicitados com MeJa se encontró una clara acción inductora también de β-CDs, donde su presencia en el medio indujo un aumento muy elevado de resveratrol, así como facilitó su excreción de las células productoras al medio de cultivo (Lijavetzky *et al.,* 2008).

A pesar de los numerosos estudios de elicitación realizados para mejorar la producción de compuestos secundarios, los rendimientos de taxol y taxanos relacionados, asi como de resveratrol siguen siendo bajos. Y por ello, sigue siendo necesario estudiar los efectos de nuevos elicitores y comprender sus mecanismos de acción.

Como ya se ha comentado, la perfluorodecalina (PFD) ($C_{10}F_{18}$) es un fluorocarburo en el que todos los átomos de hidrógeno están sustituidos por átomos de flúor. Su textura es de un líquido denso y cuando se añade a un medio líquido, facilita la formación de una segunda fase por debajo de la fase acuosa (Lowe, 2002). Al ser añadida a suspensiones celulares vegetales, puede generar una fase apolar que favorezca la extracción de compuestos lipófilos formados por las propias células vegetales y que son liberados al medio de cultivo. Las PFDs pueden ser adiconadas en dos formas, saturadas de aire o O_2 o no aireadas. En estudios previos, se ha podido demostrar un efecto elicitor de las PFDs en cultivos de raíces transformadas de *Taxus*, la adición al medio de cultivo de PFD saturada de aire (PFDgas) o no aireada (PFDdegas) aumentó la producción de taxol, especialmente cuando se suministró junto con otros elicitores. Además, algunos de los taxanos se encontraron en la fase PDF, por los que la presencia de PDFs en los cultivos podría constituir una estrategia eficaz para la extracción *in situ* de taxanos del medio de cultivo acuoso (Syklowska-Baranek *et al.,* 2015).

El ataque de herbívoros pueden inducir mecanismos de defensa en las plantas que implican la acumulación de enzimas, tales como polifenol oxidasas e inhibidores de proteasas, y la liberación de compuestos orgánicos volátiles (VOC). (Z)-3-hexenol (Hex) es un VOC natural formado en tejidos verdes lesionados que interviene en

interacciones de defensa planta-planta. La adición externa de este compuesto también puede desencadenar algunos de estos mecanismos protectores. Xin et al. (2016) demostraron que plantas de té tratadas con Hex tenían niveles incrementados de ácido jasmónico y etileno, así como una mayor expresión de varios genes relacionados con los sistemas de defensa vegetales. Dada la relación entre la formación de jasmonatos y la activación del metabolismo secundarios en los organismos vegetales, es fácil suponer que la aplicación de hexenol a cultivos celulares podría tener un efecto directo o indirecto (via jasmonatos) en la producción de compuestos secundarios de interés como los taxanos.

Considerando los hechos precedentes, nos hemos propuesto estudiar la producción de taxanos en cultivos celulares de *T. media* tras suplementar medios de cultivo, previamente optimizados para la producción de los compuestos de interés (MCP) (Cusidó *et al.,* 2002), con los nuevos elicitores, perfluorodecalinas (PFDs) o hexenol (Hex). Para ello, se han añadido PFDs y Hex a los medios que contenían los elicitores, β-CDs (50 mM) y Coro (1 μM). Después de mantener los cultivos celulares con PFDs y Hex durante 24 y 7 días, respectivamente, se determinó su actividad como elicitores o agentes capaces de separar los metabolitos de interés del medio de cultivo. También se ha estudiado su efecto sobre el crecimiento y la expresión de varios genes directamente implicados en la biosíntesis de taxanos.

4.1.1. Estudio del crecimiento de los cultivos celulares de *T. media*.

Las suspensiones celulares de *T. media* se cultivaron en un sistema en dos etapas, descrito anteriormente por Cusidó *et al.,* (2002). Brevemente, las células se cultivaron primero en el medio óptimo para la formación de biomasa (MCC), y luego se transfirieron al medio óptimo para la producción de taxanos (MCP), donde fueron añadidos los elicitores Coro (1 µM) y β-CDs (50 mg/L). Con el objetivo de estudiar por primera vez el efecto de las PFDs y el Hex sobre el crecimiento y la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus*, se suministraron a los cultivos elicitados, 575 ml/L de PFD saturada de aire y no aireada o Hex (40 µM). Previamente, se había comprobado que los elicitores utilizados en este estudio (Coro+β-CDs) eran más eficaces para inducir la producción de taxanos cuando se aplicaban conjuntamente (Sabater-Jara et al., 2014). Así, las condiciones estudiadas fueron: MCP suplementado con 575 ml/L de PFD saturada de aire (PFDgas); MCP suplementado con 575 ml/L de PFD no aireada (PFDdegas); MCP suplementado con PFDgas + 1 µM Coro y 50 mM β-CDs; MCP suplementado con PFDdegas + 1 µM Coro y 50 mM β-CDs, MCP suplementado con 40 µM Hex y MCP suplementado con Hex + 1 µM Coro y 50 mM β-CDs. Los resultados se compararon con los obtenidos en cultivos de control (sin elicitar).

La capacidad de producción de biomasa de los cultivos celulares de *T. media*, medida como peso fresco y seco (g/L) se determinó durante 24 días., Aunque los cultivos celulares se mantuvieron en un medio que promovía el metabolismo secundario en detrimento de la formación de biomasa, su capacidad de crecimiento dependía de las

condiciones experimentales, excepto en los primeros 8-10 días, cuando los cultivos celulares estaban en fase de retardo (Fig. 20). Las células crecidas en condiciones control mostraron un crecimiento constante hasta el final del experimento, logrando una biomasa final 1,5 veces mayor que la del inóculo. La presencia de PFD en el cultivo no tuvo un efecto marcado en la capacidad de crecimiento de las células, y la biomasa de estos cultivos aumentó sólo ligeramente, especialmente en los cultivos tratados con PFDgas y al final del experimento. Este limitado efecto positivo de las PFD sobre el crecimiento podría explicarse por la tendencia de las células de *Taxus* a formar grupos de 10 o más, lo que impediría que el aire suministrado por las PFDs llegue a todas las células. En los cultivos celulares tratados con Coro+β–CDs conjuntamente con PFD (tanto saturada de aire como no aireada), el crecimiento fue siempre aproximadamente 30% menor que el control (Fig. 20). El efecto negativo de los elicitores sobre la capacidad de crecimiento de las suspensiones celulares de *Taxus* es bien conocido (Furmanowa *et al.,* 2000b, Onrubia *et al.,* 2013a, Sabater-Jara *et al.,* 2014). Nuestro grupo de investigación (Ramírez-Estrada *et al.,* 2015) también ha demostrado previamente que la adición de Coro+β-CDs a otra línea celular de *T. media* redujo la capacidad de crecimiento en un 14% en relación con el control no elicitado.

Por el contrario, en estudios anteriores se había observado un efecto positivo de la PFDgas sobre el crecimiento de cultivos celulares de tabaco BY-2, que mostraron una fase de crecimiento exponencial más larga cuando el PFDgas representaba el 60% del medio de cultivo (Pilarek y Szewczyk, 2008). Los cultivos de protoplastos de *Petunia* hybrida aumentaron su capacidad para producir colonias

multicelulares en un 37% cuando se trataron durante varios días en un medio suplementado con PFD saturada con oxígeno. Collins-Pavao et al. (1996) sugirieron que una segunda fase, como la tricaprilina en cultivos celulares de *T. cuspidata*, separa el taxol del medio de cultivo y puede eliminar subproductos de desecho celular, lo que probablemente permite un mayor crecimiento celular.

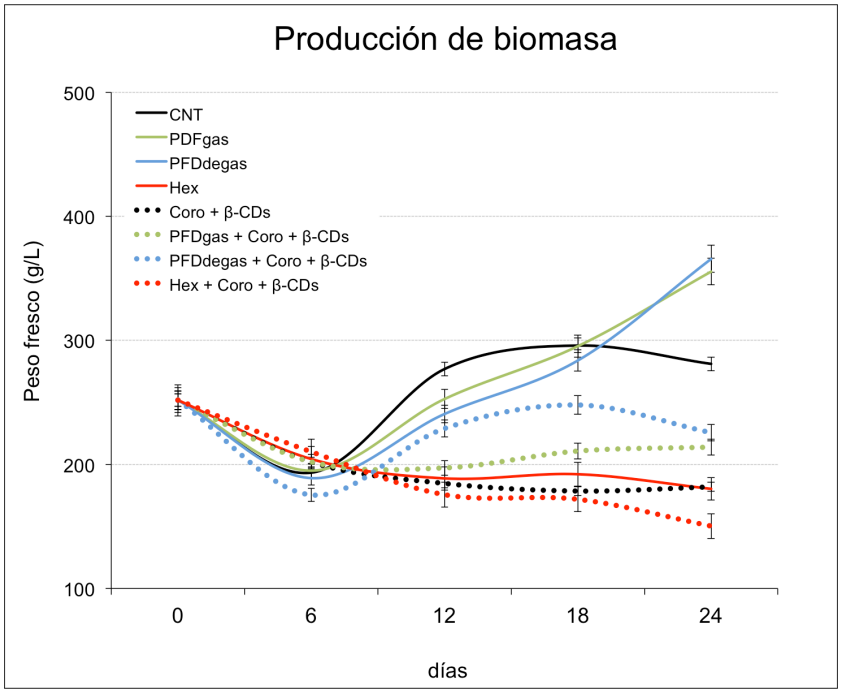

Figura 20. Curso del crecimiento medido como peso fresco (PF) de los cultivos celulares de *T. media* durante un periodo de 24 días, en el medio optimizado para la producción de taxanos. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas ± SE.

Sin embargo, Syklowska-Baranek *et al.*, (2015) observaron que la adición de PFD a los cultivos de raíces transformadas de *T. media* no aumentaba el crecimiento y cuando estaba saturada de aire era incluso perjudicial para la producción de biomasa. Sin embargo, cuando el medio fue suplementado con MeJa o Coro, el efecto

negativo de estos dos elicitores sobre el crecimiento fue parcialmente revertido por la presencia de PFDdegas.

A partir de estos resultados, se puede deducir que cada sistema de cultivo puede responder de manera diferente a la adición de PFD, y el efecto probablemente depende de los requerimientos de oxígeno celular y la resistencia de las raíces o grupos de células a la transferencia de gases del medio. Sin embargo, en nuestros cultivos de células de *T. media*, no está claro si un suministro de oxígeno más alto fue positivo ni incluso necesario, ya que los mejores resultados de crecimiento se obtuvieron con PFDdegas. Los cultivos celulares tratados con Hex presentaron un curso de crecimiento muy similar al del control, aunque cuando la producción de biomasa estaba en su máximo, el peso fresco representaba el 90% del valor alcanzado por los cultivos control. En uno de los pocos estudios sobre el efecto de Hex en cultivos celulares, Almagro et al. (2016) no observaron efectos negativos sobre el crecimiento de *Linum usitatissimum*.

La adición de Coro+β-CDs indujo una clara reducción de la formación de biomasa en relación con el control, ya que después de 6 días de crecimiento, la biomasa no incrementó significativamente durante el resto del experimento y al día 18 fue 30% menor que la obtenida en los cultivos control. El efecto negativo de Coro sobre el crecimiento de las suspensiones celulares de *Taxus* ya había sido demostrado previamente por nuestro grupo (Onrubia *et al.,* 2013a, y Ramírez-Estrada *et al.,* 2015a). Por el contrario, la adición de β-CDs no interfirió con el crecimiento de cultivos de *Taxus* (Sabater-Jara *et al.,* 2014) o *Vitis vinifera* (Belchí-Navarro *et al.,* 2013). El efecto negativo sobre el crecimiento de Hex y particularmente de Coro explica la baja

biomasa obtenida en los cultivos tratados con Hex y Coro+β-CDs, que fue sólo el 62% de la biomasa alcanzada en condiciones control, al final del experimento.

El curso del crecimiento medido como peso seco alcanzados de los cultivos celulares mantenidos en las condiciones experimentales (Fig. 21) fue muy similar al del peso fresco. Los valores de peso seco aumentaron menos después del tratamiento con Coro+β-CDs que solo con PFDs o en condiciones de control. La biomasa máxima de los cultivos tratados con Hex expresada como g PS/L fue también menor que la del control, aunque la presencia de Hex en el medio de cultivo no fue particularmente perjudicial para el crecimiento, excepto al final del experimento. La elicitación conjunta con Coro+β-CDs, con o sin Hex, tuvo un efecto significativamente negativo sobre la producción de biomasa.

La viabilidad celular en el ensayo de elicitación con PFDs y Hex demostró que, los tratamientos con las primeras, mantienen una media similar al control pero a partir del día 18 y hasta el final del cultivo fue superior a éste, siendo ligeramente mayor para el caso de PFDdegas con 79% en comparación con PFDgas de 76% contrastado con el 70% de cultivo sin elicitar. Los cultivos añadidos con Hex decrecieron desde el inicio de ensayo hasta un 60% al día 24.

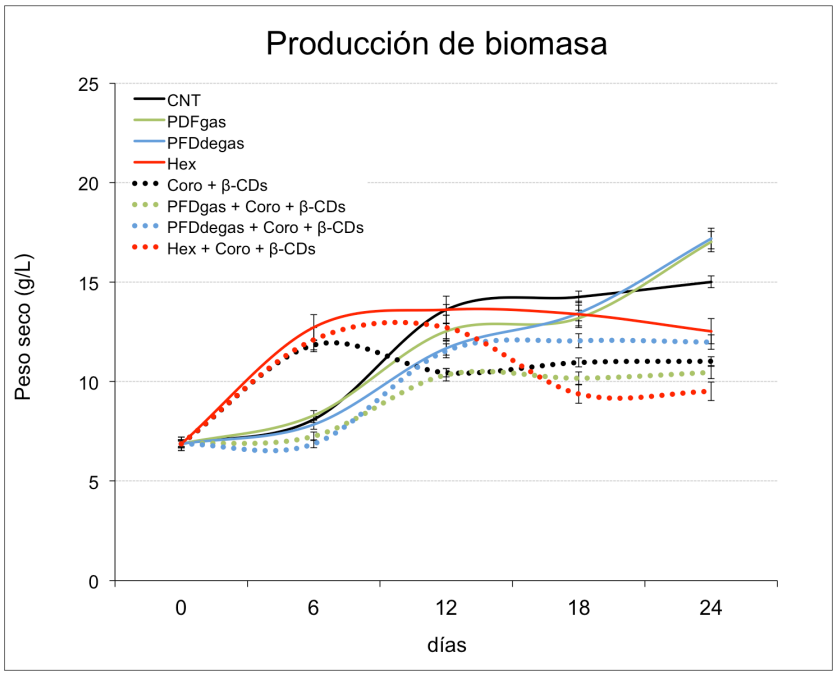

Figura 21. Curso del crecimiento medido como peso seco (PS) de los cultivos celulares de *T. media* durante un periodo de 24 días, en el medio optimizado para la producción de taxanos. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas ± SE.

En los tratamiento con elicitores conjugados fue clara la disminución en el porcentaje de viabilidad, correlacionándose con los resultados en la producción de biomasa en PF y PS. La presencia de Coro+β-CDs ocasionan un descenso en la viabilidad de las células respeto al control desde el día 6 para todos los tratamientos. A pesar de ésta tendencia a la baja en el porcentaje de viabilidad, en los cultivos con PFDs el descenso fue menos drástico en los días 12 y 18, siendo de 54 y 57 %, para PFDgas y PFDdegas respectivamente, comparados con los valores en Coro+β-CDs de de 51%. El tratamiento Hex + Coro+β-CDs registro los menores valores de todo el ensayo con un porcentaje de 38% a los 24 días (Fig. 22).

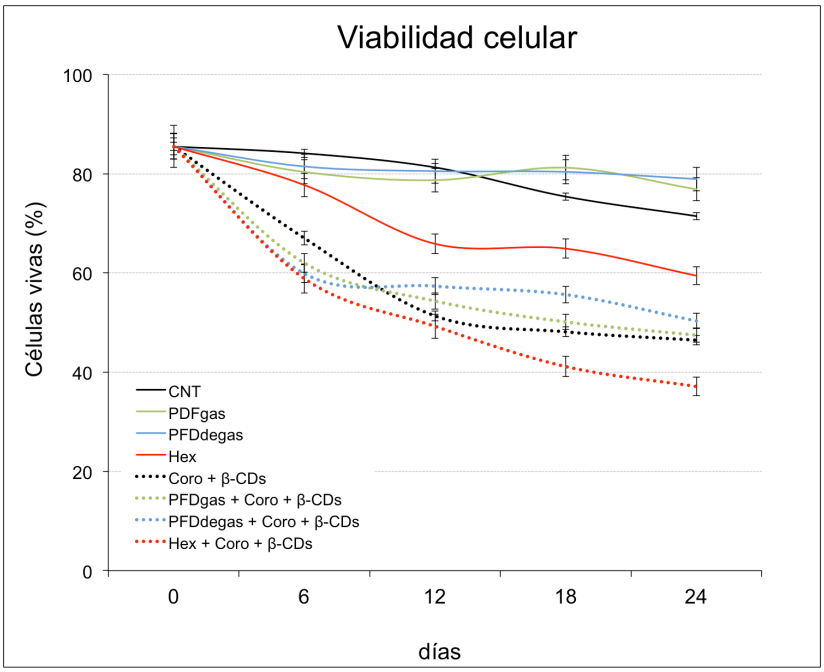

Figura 22. Viabilidad (expresada en porcentaje de células vivas respecto al total) de los cultivos celulares de *T. media* durante un periodo de 24 días, en el medio optimizado para la producción de taxanos. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas ± SE.

Anteriormente se ha reportado que la adición de Coro a cultivos en suspensión de *Taxus*, disminuía el número de células viables y por ende la producción de biomasa, mientras que la combinación con β-CDs aminora los efectos negativos de Coro en el crecimiento celular (Onrubia *et al.,* 2013a; Sabater-Jara *et al*., 2014; Ramirez-Estrada *et al.,* 2015a). La adición de PFDs al medio de cultivo en líneas celulares de *Nicotiana tabacum* y *Arnebia eucroma*, obtuvieron los mejores resultados en el incremento de biomasa al utilizar los tratamientos saturados de aire (Pilarek y Szewczyk, 2008; Syklowska-Baranek et al., 2014), se relaciona con nuestros resultados debido a que su presencia en el cultivo reduce el impacto negativo de los otros elicitores empleados.

4.1.2. Estudio de la producción de taxanos de los cultivos celulares de *T. media*

La producción total e individual de taxanos se determinó mediante HPLC tanto en las células como en el medio de cultivo. También se estudió la acumulación de taxanos en la PFD, un compuesto inmiscible con el medio de cultivo y que genera una segunda fase. Los taxanos estudiados fueron bacatina III (BIII), 10-deacetilbacatina III (DABIII), deacetiltaxol (DAT), taxol (TX) y cefalomanina (CEF), y como contenido total de taxanos se consideró la suma de estos cinco compuestos.

En condiciones de control, la producción total de taxanos en la línea celular de *T. media* estudiada aumentó constantemente durante los 24 días del experimento (Fig. 23), un comportamiento habitual en los cultivos celulares de *Taxus* spp. Previamente se había demostrado, que las suspensiones celulares no elicitadas de diferentes especies de *Taxus*, los niveles de taxanos alcanzan su máximo después de al menos dos semanas de cultivo (Cusidó *et al*., 2002; Bentebibel *et al*., 2005; Onrubia *et al.,* 2010). Por otro lado, los cultivos tratados con Coro+β-CDs presentaron unos niveles de taxanos totales muy elevados, alcanzando un máximo a los días 12 y nuevamente al día 24 después de la elicitación, cuando los contenidos eran 3,2 y 2,7 veces superiores, respectivamente, a los de los respectivos controles. Previamente, ya se había observado un efecto significativamente positivo de la elicitación conjunta de Coro+β-CDs en otras líneas celulares de *Taxus* (Onrubia *et al*., 2013a, Ramírez-Estrada *et al*., 2015a). Por otro lado, el descenso de la producción en el día 18, entre los dos puntos de máxima producción, también coincide con

observaciones anteriores (Onrubia *et al*., 2013a, Palazón et al., 2003, Bonfill *et al*., 2003) e indica que el taxol y el taxanos relacionados, no son productos finales, si no, que pueden ser metabolizados a otros compuestos de estructuras químicas similares (Moon *et al.,* 1998, Seki *et al.,* 1995).

La producción total de taxanos en los cultivos celulares suplementados con Coro+β-CDs y PFDdegas fue mucho mayor que en los cultivos celulares tratados sólo con PFDs y control (Fig. 23). El aumento fue notable después de 12 días de la elicitación, y superior todavía al final del experimento, alcanzándose los niveles más elevados al día 24. En estas condiciones, a los días 12, 18 y 24, los niveles totales de taxanos fueron más de tres veces superiores a los de los cultivos control. La adición de PFDs (tanto saturada de aire como no aireada) a cultivos no elicitados aumentó la acumulación total de taxanos durante el período de tiempo estudiado, aunque sólo ligeramente. Estos resultados sugieren que la presencia de PFDs en el medio potenció el efecto elicitor de Coro+β-CDs sobre la producción de taxanos, probablemente de forma sinérgica.

En los cultivos tratados con Hex, la producción total de taxanos también alcanzó su máximo a los 12 y 24 días después de la elicitación, con niveles 3,2 y 2,1 veces superiores, respectivamente, que en los controles correspondientes. Excepto en el día 18, la producción de taxanos fue significativamente más alta (más del doble) en los cultivos tratados con Hex que en aquellos tratados con sólo PFDs, tanto saturada de aire como, no aireada.

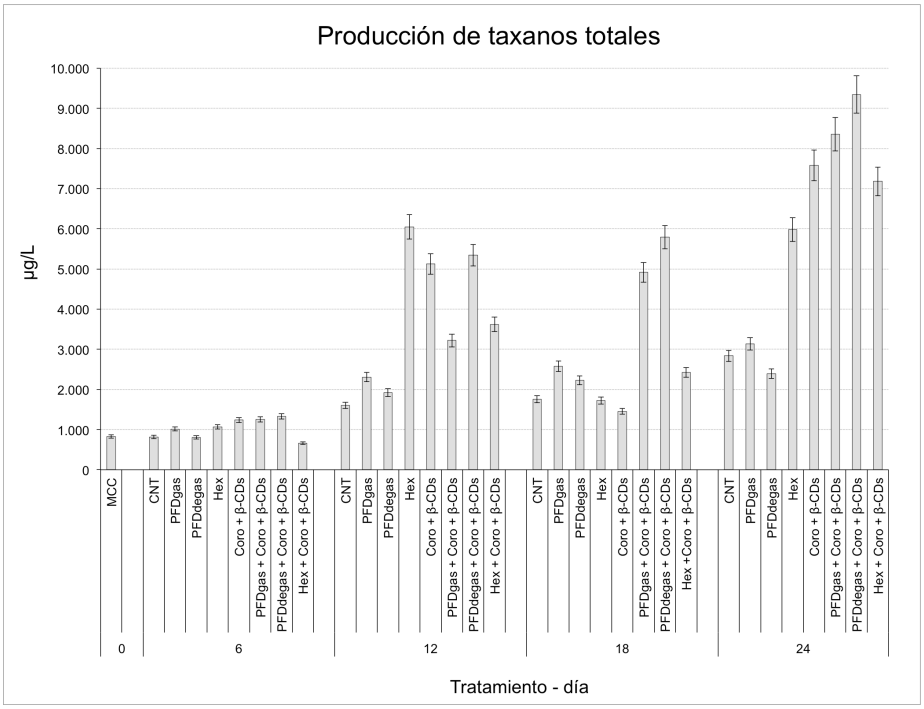

Figura 23. Producción total de taxanos (expresada en mg/L) de la línea celular de *T. media* durante un período de cultivo de 24 días, en un medio de producción optimizado para la síntesis de taxanos. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones biológicas±SE. MCC: medio de crecimiento celular; CNT: control; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β−ciclodextrinas (50 nM); PDFgas+Coro+β-CDs; PDFdegas+Coro+β-CDs; Hex+Coro+β-CDs.

Cuando se suministró Hex junto con Coro+β-CDs, la producción total de taxanos fue siempre inferior a la suma de las producciones obtenidas por separado. En los días 12 y 18 después de la elicitación, el contenido de taxanos totales en el tratamiento mixto de Hex con Coro+β-CDs fue mayor que en los cultivos tratados con estos elicitores por separado. Sin embargo, al día 24 la producción en los cultivos tratados con Coro+β-CDs se redujo con la adición de Hex, lo que sugiere que estos elicitores podrían interferir en sus respectivos

mecanismos de acción, aunque se necesitan estudios adicionales sobre sus receptores y las vías de transducción de señales para conocer mejor este efecto. En las mejores condiciones de producción, cuando los niveles totales de taxanos estaban en su máximo, los taxanos se acumularon principalmente en el medio de cultivo, en lugar de en las células o en la fase de PFD (Fig. 24) (Tabla 5).

En condiciones control (sin elicitores), más del 80% de los taxanos formados se acumularon en el interior de las células productoras, a lo largo de todo el experimento. Su liberación aumentó sólo ligeramente cuando se añadieron PFDs (tanto saturada de aire como no aireada) (Fig. 24) (Tabla 5). Las posibles etapas limitantes de la liberación de taxol (Collins-Pavao *et al*., 1996) pueden ser revertidas por elicitores, ya que después del tratamiento con Coro+β-CDs, la excreción de taxanos de las células al medio se incrementó significativamente y casi la mitad de los taxanos producidos se encontraron en el medio de cultivo. El mismo efecto se demostró después del tratamiento con PFDs junto con Coro+β-CD. La fase de PFD no acumuló más del 25% del total de los taxanos producidos, excepto después de 12-18 días de cultivo, cuando el porcentaje aumentó a aproximadamente un 40%.

En particular, cuando la producción de taxanos era máxima (al día 24 en presencia de los tres elicitores), la mayor parte de los taxanos producidos se excretaron y se acumularon en el medio de cultivo (Tabla 5). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Syklowska-Baranek *et al.,* (2015), quienes encontraron que la mayoría de los taxanos producidos en cultivos de raíces transformadas de *T. media* se acumularon en el interior de las células

de las raíces, y sólo después de la adición de PFDdegas y Coro fue posible encontrar un 50% del taxol total producido, en la fase de PFD.

Tabla 5. Contenido de taxanos individuales, expresados como el porcentaje del total producido, en los cultivos celulares de *T. media*, durante 24 días, en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE. ND: no detectado.

% individual de taxanos en relación al total producido.

Días	Tratamiento	DABIII	BIII	Taxol	DAT	CEF
0	MCC	ND	ND	ND	99,5±	0,5±
6	Control	0.3±	9,2±	3,1±	84±	3,4±
	PFDgas	0,4±	8,9±	1,9±	88,5±	0,3±
	PFDdegas	0,5±	8,4±	5,4±	85,1±	0,6±
	PFDgas+Coro+β-CDs	ND	4,8±	33,9±	59,9±	1,4±
	PFDdegas+Coro+β-CDs	ND	14,7±	34,4±	48±	3±
12	Control	ND	ND	4,6±	93,3±	2,1±
	PFDgas	ND	4,8±	4,1±	71,2±	12±
	PFDdegas	22,1±	1,5±	5,1±	69,1±	2,2±
	PFDgas+Coro+β-CDs	ND	15±	16,8±	56,9±	11,4 ±
	PFDdegas+Coro+β-CDs	ND	12,1±	13,1±	68±	10±
18	Control	11±	1,2±	12,6±	80,5±	1,8±
	PFDgas	ND	18,9±	10,2±	83,8±	5,6±
	PFDdegas	ND	0,1±	27,1±	69,3±	3,6±
	PFDgas+Coro+β-CDs	ND	27,5±	15,6±	54,6±	2,3±
	PFDdegas+Coro+β-CDs	ND	23,1±	16,5±	55,7±	4,7±
24	Control	6,1±	0,5±	6,6±	83,9±	2,8±
	PFDgas	ND	7,2±	4,5±	82,8±	5,6±
	PFDdegas	ND	8,1±	5,4±	81,7±	4,8±
	PFDgas+Coro+β-CDs	ND	26,8±	39,7±	43,8±	4±
	PFDdegas+Coro+β-CDs	ND	25,2±	49,5±	24,2±	3,3±

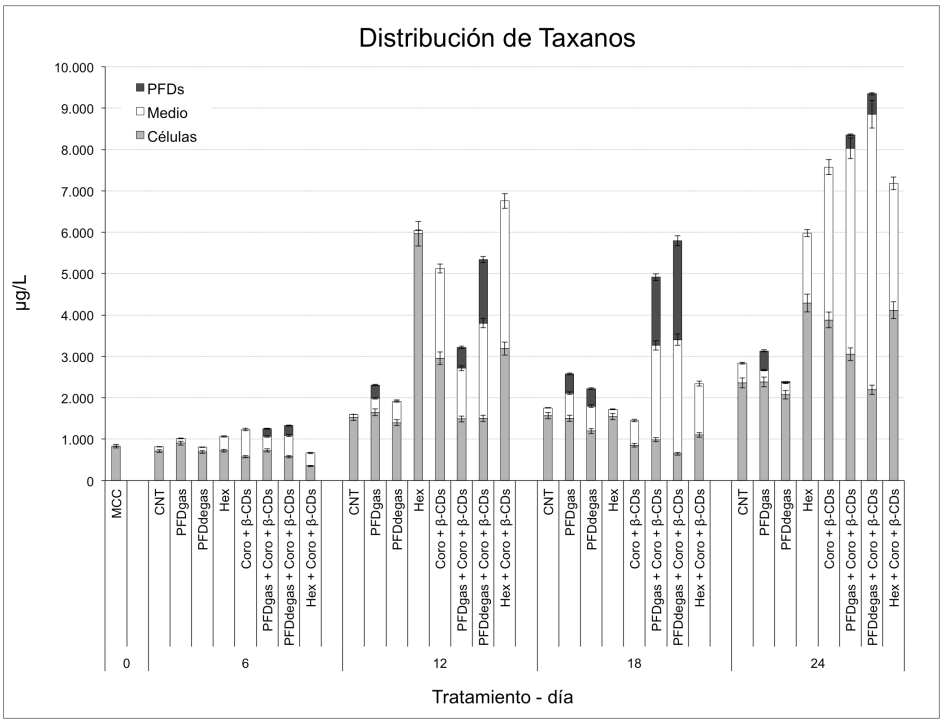

Figura 24. Taxanos totales acumulados enel interior de las células, medio de cultivo y fase de PFD, a lo largo de 24 días de cultivo, en las diferentes condiciones experimentales estudiadas. MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+Coro+β-CDs; PDFdegas+Coro+β-CDs; Hex+Coro+β-CDs.

En las dos primeras muestras (6 y 12 días después de la elicitación) de los cultivos tratados con Hex, los taxanos excretados al medio de cultivo no representaron más del 30-40% del total de taxanos producidos, aumentando al 60% a los días 18 y 24. Sin embargo, cuando el Hex fue agregado junto con Coro+β-CDs, los taxanos liberados siempre representaron más del 70% del total de los producidos. Las condiciones que indujeron la liberación más alta de taxanos al medio de cultivo fueron la elicitación conjunta de Coro+β-CDs, con o sin PFDs o Hex. Dado que la excreción de taxanos en el

tratamiento con PFDs fue muy baja y sólo aumentó drásticamente después de la inducción de Coro+β-CDs, este aumento podría deberse a la presencia de estos últimos elicitores o una interacción entre ellos, especialmente en el momento de máxima producción. Previamente, se había observado que en cultivos celulares de *T. media* elicitados con Coro+β-CDs, los taxanos se encontraron principalmente en el medio de cultivo, lo que redujo los efectos de retroinhibición y toxicidad de los taxanos en las células productoras, mejorando de forma significativamente la producción total de estos compuestos (Sabater-Jara *et al.,* 2014; Ramiez-Estrada *et al*., 2015a). En base en estos resultados, podríamos deducir que la alta liberación de taxanos inducida en el presente estudio, no se debió a la adición de PFDs sino a la presencia de β-CDs en el medio, mientras que las PFDs podrían haber actuado como un sumidero para los taxanos producidos en los cultivos de *T. media*, principalmente cuando el medio se suplementó con Coro+β-CDs.

La capacidad de los cultivos celulares de *Taxus* spp. para liberar taxanos depende de varios factores, y usualmente cambia durante el período de cultivo (Seki *et al*., 1995, Kim *et al*., 2004). Además de depender de las especies vegetales y las condiciones de cultivo, el comportamiento de excreción de cultivos puede variar de una línea celular a otra. Esto está apoyado en resultados previos obtenidos con otra línea celular de *T. media* donde se demostró que la adición de β-CDs junto con MeJa o Coro al medio de cultivo indujo una excreción de más del 80% y 90%, respectivamente, del total de taxanos producidos (Sabater-Jara *et al*., 2014, Ramírez-Estrada *et al*., 2015a). También, Fett-Neto *et al.,* (2010) informaron de una liberación máxima de taxol del 66% con *T. cuspidata*, y Pestchanker et al.

(1996) de una excreción de 90% de taxol en una línea celular de *T. baccata*. Por el contrario, la excreción lograda en cultivos celulares de *T. media* por Wickremesinhe y Arteca (1993) fue sólo el 10% del total del taxol producido por las células.

Cuando se consideraron individualmente los niveles de los taxanos estudiados (Fig. 25) en las suspensiones celulares de *T. media* mantenidas en el medio de producción optimizado, suplementado como se ha descrito con PFDs (saturada de aire y no aireada), Coro+β-CDs y Hex, en la mayoría de los casos, el taxano mayoritario a lo largo de los 24 días del estudio fue 10-deacetiltaxol (DAT) (Fig. 25). Este, no es un resultado habitual en los cultivos celulares de *Taxus*, aunque si se había observado previamente DAT como el principal taxano asociado a células en una línea de *T. globosa* (Ramírez-Estrada *et al*., 2016), mientras que el taxano mayoritario en el medio de cultivo fue la CEF. Es un hecho conocido que el comportamiento metabólico de las líneas celulares *Taxus* spp. puede variar según las características genéticas y los factores ambientales asociados con los cultivos, lo que puede conducir a deferentes patrones de acumulación de taxanos.

DAT es un importante taxano extraído de *T. cuspidata* (Zhang *et al.,* 2010) y *T. wallichiana* (McLaughlin *et al*., 1981) y, como se mencionó anteriormente, también se ha encontrado en suspensiones celulares de *T. baccata* (Mroczek *et al.,* 2000, Onrubia *et al*., 2010, Palazón et al., 2003) y *T. media* (Cusidó *et al*., 2002; Exposito *et al.,* 2010), así como, en cultivos celulares de avellano. DAT y su 7-xilosil- derivado actualmente son considerados como precursores idóneos para la semisíntesis de taxol, porque se encuentran en cantidades mayores que el taxol en la corteza de los árboles de tejo. El 7-xilosil-10-

deacetiltaxol ha sido bioconvertido en DAT con una eficacia muy alta, en cultivos de levadura que expresaban una glicosido hidroxilasa de Lentinula edodes (Liu y Zhu, 2015). Además, el DAT se puede acetilar con facilidad en la posición C10 para convertirse en taxol.

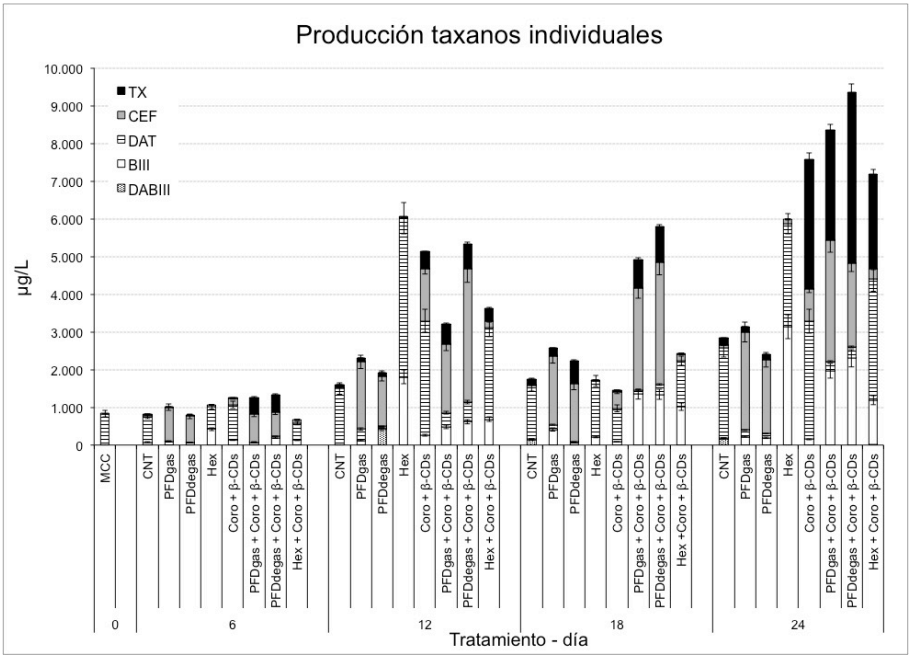

Figura 25. Producción de taxanos individuales en cultivos celulares de *T. media* mantenidos en las condiciones experimentales descritas, durante 24 días. Cada valor es promedio de 3 repeticiones biológicas±SE. MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+Coro+β-CDs; PDFdegas+Coro+β-CDs; Hex+Coro+β-CDs.

En los cultivos de control, los niveles de DAT alcanzaron valores hasta de 2,4 mg/L al día 24, cuando los niveles de DABIII (0,18 mg/L), BIII (0,02 mg/L), taxol (0,2 mg/L) y CEF (0,08 mg/L) también fueron bajos. Como se ha comentado anteriormente, los cultivos celulares suplementados sólo con PFDs (saturada de aire o no), presentaron

unos contenidos de taxanos generalmente mayores que los cultivos de control. Sin embargo, mientras que los niveles de DABIII, BIII, taxol y CEF representaron como máximo el 25% de los taxanos totales producidos a lo largo del experimento, la producción de DAT de los cultivos fue siempre superior al 70% (Tabla 6).

Al adicionar Coro+β–CD al medio de cultivo, casi el 95% de los taxanos totales producidos presentaban cadena lateral (en los días 12 y 24, los niveles relativos de taxanos eran DAT: 60% y 40%, taxol: 9% y 45%, CEF: 27% y 11%, respectivamente). En estudios previos realizados con otra línea celular de *T. media* tratada con MeJa+β-CD, el taxol representó el 46% del total de taxanos producidos (Sabater-Jara *et al*., 2014) y el 60% bajo tratamiento con Coro (Onrubia *et al*., 2013a), en ambos casos, después de 24 días de la elicitación.

En los cultivos celulares suplementados con Coro+β-CDs junto con PFDs (saturadas de aire o no), aunque DAT fue el taxano mayoritario al día 18, al final del experimento, el taxol representaba el 40% y el 50%, respectivamente, del total taxanos producidos, en comparación con el 40% y el 20% para DAT. Los niveles de BIII aumentaron con el tiempo, alcanzando aproximadamente el 25% de la producción total de taxanos en ambos tratamientos después de 18 días de cultivo. Los contenidos de CEF y DABIII no superaron el 15% del total de taxanos, en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas.

Tabla 6. Contenido de taxanos individuales detectados en la fase PFD, expresados como el porcentaje del total producido, en los cultivos celulares de *T. media*, durante 24 días. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE. ND: no detectado.

% individual de taxanos en la fase PFD, en relación al total producido

Días	Tratamiento	DABIII	BIII	taxol	DAT	CEF
0	MCC	ND	ND	ND	ND	ND
6	Control	ND	ND	ND	ND	ND
	PFDgas	ND	ND	ND	ND	ND
	PFDdegas	ND	ND	ND	ND	ND
	PFDgas+Coro+β-CDs	ND	ND	45,3±	ND	43.5±
	PFDdegas+Coro+β-CDs	ND	ND	47,6±	ND	51
12	Control	ND	ND	ND	ND	ND
	PFDgas	ND	ND	42,9±	10,2	31,2±
	PFDdegas	ND	ND	ND	ND	ND
	PFDgas+Coro+β-CDs	ND	ND	55,7±	ND	55,7±
	PFDdegas+Coro+β-CDs	ND	ND	27,2±	30,1	56,7±
18	Control	ND	ND	ND	ND	ND
	PFDgas	ND	ND	ND	25,4	ND
	PFDdegas	ND	ND	ND	27,6,	ND
	PFDgas+Coro+β-CDs	ND	ND	52,8±	44,4	45±
	PFDdegas+Coro+β-CDs	ND	ND	25.12±	61.43	61±
24	Control	ND	ND	ND	ND	ND
	PFDgas	ND	ND	ND	17,3	11±
	PFDdegas	ND	ND	ND	ND	34,2±
	PFDgas+Coro+β-CDs	ND	ND	8,9±	ND	27,2±
	PFDdegas+Coro+β-CDs	ND	ND	8,1±	ND	41,9±

En los cultivos tratados con Hex, el taxano acumulado mayoritariamente también fue DAT, aunque en este caso BIII representó el 30% y el 52% del total, en los tiempos de máxima producción (12 y 24 días después de la elicitación). Un aspecto a destacar es la no detección de taxol en los cultivos celulares tratados con Hex. Dado que la BIII se producía en gran cantidad, cualquier limitación biosintética en la vía del taxol estaría entre la producción de este compuesto y taxol. Además, como DAT era el taxano predominante, el paso limitante no podía ser la adición de la cadena lateral. Otra explicación podría ser una metabolización muy rápida del taxol a otros taxanos, como lo sugiere Moon *et al.,* (1998).

El tratamiento con Coro+β–CDs, con y sin Hex, no aumentó significativamente el contenido de taxol en los tiempos de baja producción de taxanos (días 6 y 18). Sin embargo, a los días 12 y 24, la adición de Coro+β-CD indujo una alta producción de taxol, que no se vio modificada por la adición de Hex.

En general, la producción de taxanos individuales en los cultivos celulares de *T. media*, en las condiciones mencionadas, indica que los pasos metabólicos que conducen a la formación de taxanos, con la cadena lateral unida al C13 del núcleo del taxano, no son limitantes. Esto podría explicar por qué, los niveles de BIII y DABIII no fueron tan elevados como en otras líneas celulares, donde el paso biosintético catalizado por la enzima BAPT (Fig. 7) era limitante del flujo de carbono para la producción de taxol (Onrubia *et al.,* 2013b; Sabater-Jara *et al*., 2014; Nims *et al*., 2006). En nuestro caso, los bajos niveles de BIII y DABIII observados, junto con los elevados contenidos de DAT y taxol de los mismos cultivos, sugieren que la

unión de la cadena lateral de fenilisoserina a DABIII o BIII no limita la producción de DAT y TX. Sin embargo, son necesarios más estudios sobre la biosíntesis de DAT, ya que no está claro si se forma a partir del primer taxano que lleva esta cadena lateral o es un producto de transformación de taxol.

Al determinar los taxanos individuales en la fase de PFDs, no se encontraron taxanos sin cadena lateral durante todo el experimento, y en ninguna de las condiciones ensayadas (Tabla 6). Sin embargo, en los cultivos tratados con Coro+β-CD junto con PFDs, el taxol se acumuló en la fase PDF, representando aproximadamente el 50% del taxol producido en los cultivos suplementados con PFDgas y el 25% en los tratados con PFDdegas, en los días 6 y 18 de cultivo. También se encontró DAT en la fase PDF, a los 12 y 18 días de cultivo, principalmente en los cultivos también tratados con Coro+β-CD, llegando a acumular hasta el 50% del DAT producido, independientemente de si las PFDs estaban o no saturadas de aire. Resultados similares también se obtuvieron con los niveles de CEF, que llego a acumularse hasta en un 60% en la fase de PFDdegas, en los cultivos elicitados con Coro+β-CDs. La acumulación de taxanos en la fase de PFD podría mejorar la biosíntesis de estos compuestos, al separar los taxanos del medio de cultivo, que de otro modo, podrían ejercer un efecto negativo, no sólo sobre el crecimiento, sino también sobre la producción de taxol y otros taxanos relacionados. Esto explicaría por qué los niveles máximos de taxanos se produjeron después de 18 días de cultivo.

Un hecho a destacar, es que sólo se encontraron en los cultivos tratados con PFDs, los taxanos con cadena lateral, especialmente

cuando se elicitaron con Coro+β-CD. Este hecho podría deberse a la naturaleza química de estos compuestos, que son más solubles en la fase PFD que en el medio de cultivo, o bien únicamente, a que se produjeron en mayor cantidad. Ya que en general y de acuerdo con nuestros resultados, cuanto más taxanos se producen, mayor es su acumulación en la fase PDF.

4.1.3. Efecto de las perfluorodecalinas y el hexenol sobre el perfil de transcritos de algunos genes implicados en la biosíntesis del taxol.

Con el fin de estudiar la interrelación entre la expresión genètica y el patron de taxanos producidos, se han determinado los niveles de expresión de algunos genes que codifican para enzimas involucrados en la biosíntesis del taxol mediante qRT-PCR. Los genes que se han condiderado han sido: *T13αOH* que codifica la taxadieno 13-hidroxilasa, enzima implicada en los primeros pasos de la ruta biosintética del taxol; *BAPT* que codifica para la baccatina III-3-amino-13-fenilpropanoiltransferasa, enzyma que controla la unión de la cadena lateral de β-fenilalanina a bacatina III; *DBTNBT* que codifica para 3'N-benzoiltransferasa, que esta involucrada en el último paso de la biosíntesis del taxol; *PCCL* que codifica para la enzima *β*-fenilalanina CoA ligasa que activa la β–fenilalanina para su unión al grupo OH del C13 de la bacatina III (Fig.7).

La expresion de dichos genes se determinó desde 1h hasta 2 días después de la elicitación ya que previamente se había observado que los máximos niveles de expresión se alcanzaban durante dicho

temprano período (Onrubia *et al*., 2013; Expósito et al., 2010; Onrubia *et al*., 2010). Resultados similares fueron también obtenidos por otros grupos de investigación (Hu *et al.,* 2010; Nims *et al*., 2006). Para cada gen, los niveles de expression se han indicado en relación a aquellos obtenidos por las suspensiones celulares el dia 14 de su cultivo en el medio óptimo de crecimiento (valor de referencia = 1), como esta comentado en la sección de Materiales y Métodos.

Los productos de PCR correspondientes al gen *T13αOH* que se acumularon en los cultivos control, incrementaron paulatinamente hasta las 24h de elicitación, disminuyendo a continuación. En los cultivos elicitados con Coro+β-CDs, la inducción del mRNA del gen *T13αOH* empezó 4h después del comienzo del tratamiento alcanzando los máximos niveles 48h mas tarde (1297 veces el valor de referencia). Contrariamente, cuando los cultivos celulares se suplementaron con PFDs, except en el caso de PFDgas 12h y 24h después de elicitor, la expresión de este gen fue generalmente mas baja que la observada para los cultivos control. Es muy notable la acumulación de mRNA correspondiente al gen *T13αOH* cuando los cultivos celulares se trataron conjuntamente con Coro+β-CDs y PDFgas. Los niveles más altos se alcanzaron entre las 4h y 12h de elicitación, disminuyendo claramente a partir de entonces. Cuando la expresión de este gen estaba en su nivel más alto, los niveles obtenidos fueron 11 y 16 veces mayores que los obtenidos en cultivos tratados con Coro+β-CDs y control, respectivamente. En este caso, se observó una acción sinérgica entre Coro+β-CDs y PDFgas. Al contrario, la presencia de Hex en los cultivos fue negativa para la expresión de dicho gen ya que cuando se añadió solo, la acumulación

de transcritos fue similar o más baja que el control y el aumento de la expresión del gen ocasionado por la presencia de Coro+β-CDs ya indicado, se vio contrarrestado por la adición conjunta de Coro+β-CDs y Hex (Fig. 26).

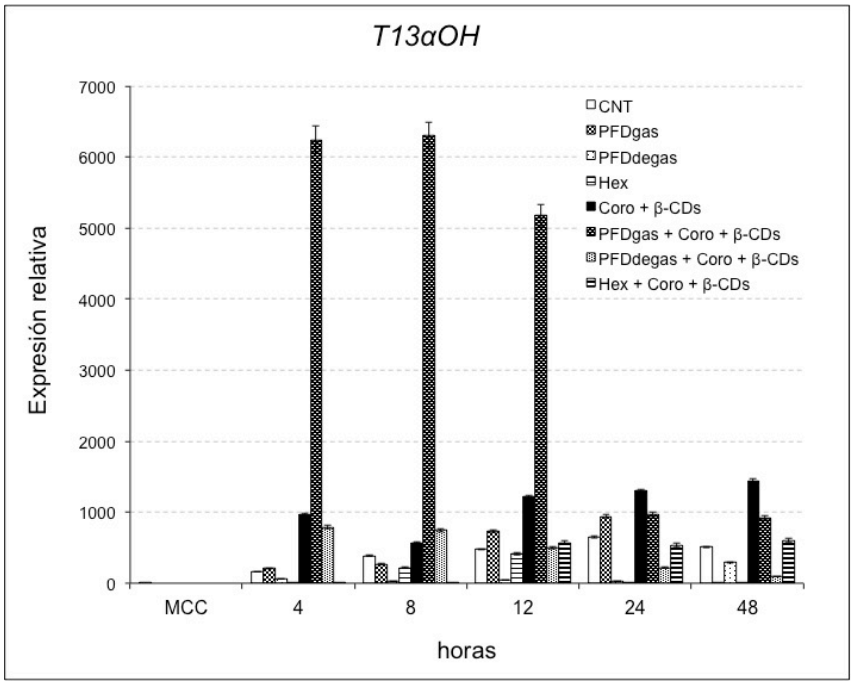

Figura 26. Expresión relativa del gen *T13αOH* en cultivos celulares de *T. media* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+Coro+β-CDs; PDFdegas+Coro+β-CDs; Hex+Coro+β-CDs. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE.

La niveles de expresión de los genes *BAPT* y *DBTNBT,* en general, resultaron menores que los observados para el gen *T13αOH*, hecho que ya se había destacado en otros experimentos y con cultivos celulares de diferentes especies de *Taxus* en los que se habia

observado que la inducción causada por diferentes elicitores sobre los genes que codifican la mayor parte de hidroxilasas era siempre mucho mayor que la inducción causada sobre los genes que codifican para las últimas transferasas implicadas en la ruta de biosíntesis de taxol (Onrubia *et al*., 2013, Sabater-Jara *et al*., 2014, Ramírez-Estrada *et al*., 2015).

La adición de Coro+β-CDs en los cultivos claramente aumentó la expresión del gen *BAPT* obteniendo la acumulación de mRNA más alta a las 48 h de elicitación (15 veces mayor que la observada en las células control). Aunque la presencia de PFDs en el medio no ejerció una clara activación de la expresión de este gen, cuando la PFD fue suplementada junto con Coro+β-CDs, la acumulación de transcritos aumentó claramente hasta las 12h, especialmente en los cultivos tratados con PFDgas (2 y 14,5 veces superior a la alcanzada en cultivos tratados con ambos elicitores y cultivos control, respectivamente) mostrando también en este caso una acción sinérgica de estos tratamientos sobre la expresión en el gen *BAPT*. Contrariamente, la adición de hexenol junto con Coro+β-CDs disminuyó la acumulación de mRNA obtenida cuando Coro+β-CDs fue suplementado como único tratamiento. La expresión de este gen se aumentó 7 y 5,3 veces en relación con el control en los cultivos celulares tratados sólo con Hex, 4h y 8h después de la adición del elicitor (Fig. 27).

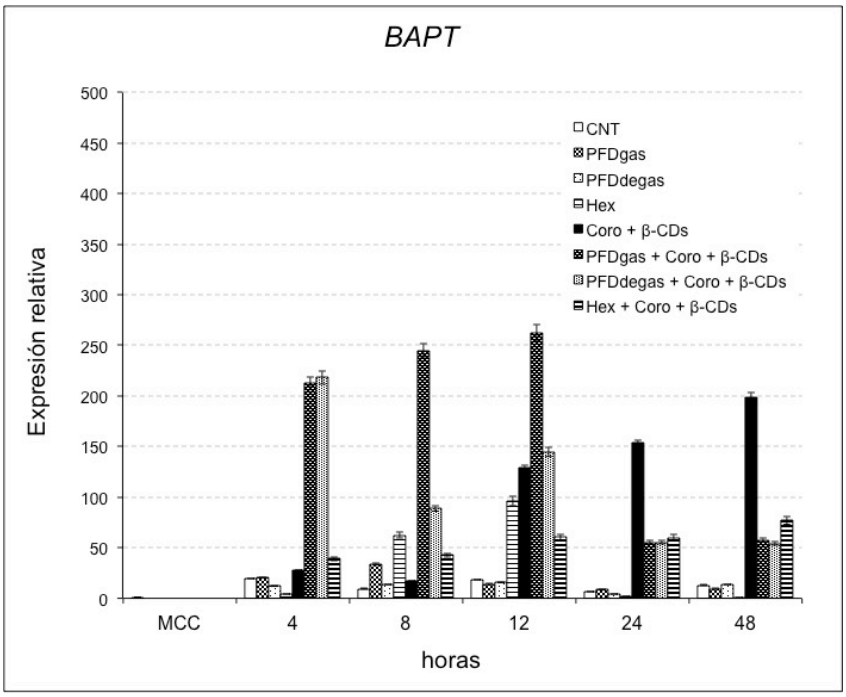

Figura 27. Expresion relativa del gen baccatin III-3-amino, 13-pfenilpropanoiltransferasa (*BAPT*) en cultivos celulares de *T. media* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+Coro+β-CDs; PDFdegas+Coro+β-CDs; Hex+Coro+β-CDs. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE.

La expresión del último gen implicado en la biosíntesis de taxol, el gen *DBTNBT*, fue baja en todas las condiciones estudiadas, excepto en los cultivos tratados conjuntamente con Coro+β-CDs y PFDgas, alcanzando un pico a las 4 h de elicitación (254,5 veces el valor de referencia), para disminuir a continuación hasta los 2 días, momento en que se observó otra subida, aunque mucho menor (48,4 el valor de referencia) (Fig. 27). Cuando los cultivos celulares se suplementaron con Coro+β-CDs y PFDdegas conjuntamente, la

expresión del gen *DBTNBT* también se indujo, pero el nivel de expresión fue 4 veces menor que cuando con PFDgas. La elicitación con sólo Coro+β-CDs no causó un efecto positivo en el nivel de expresión de este gen. Resultados similares fueron obtenidos por Nims et al (2006) en cultivos celulares de *T. cuspidata* elicitados con jasmonato de metilo (Fig. 28).

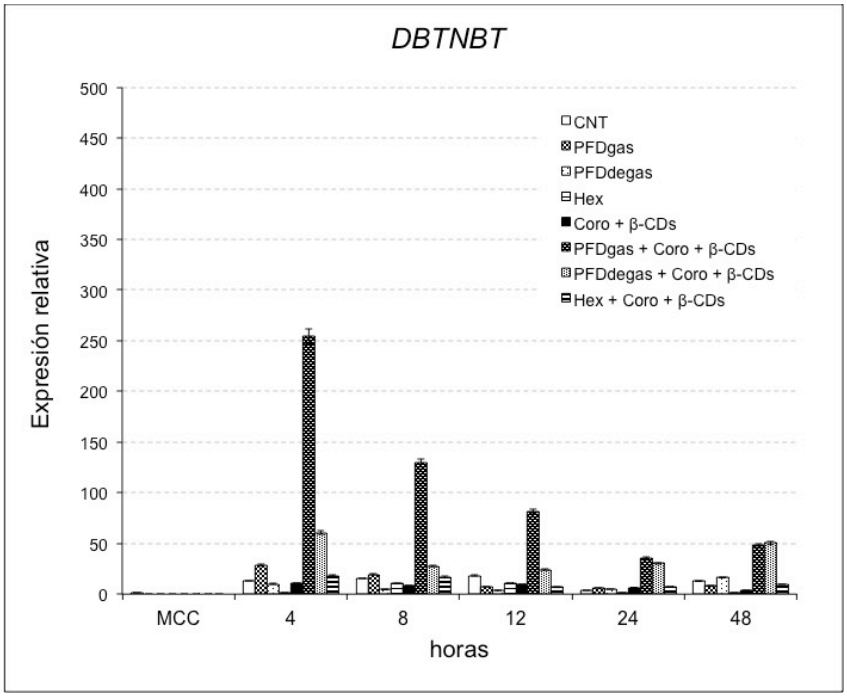

Figura 28. Expresion relativa del gen debenzoil taxol N-benzoil transferase (*DBTNBT*) en cultivos celulares de *T. media* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas + Coro+β-CDs; PDFdegas+Coro+β-CDs; Hex+Coro+β-CDs. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE.

El último gen cuya expresión, en las diferentes condiciones experimentales estudiadas, ha sido determinado, ha sido el gen de la b-fenilalanina CoA ligasa (PCCL). Este gen codifica una acil-CoA ligasa capaz de convertir la b-fenilalanina en su respectivo CoA éster. Como se ha indicado en la Introducción, nuestro grupo de investigación ha identificado, secuenciado y clonado este gen tras el estudio del transcriptoma completo, mediante la técnica de cDNA-AFLP, de cultivos celulares de *T. baccata* elicitados con MeJa. Después de un análisis in silico, que permitió determinar una alta homología con otras acil-CoA ligasas, se confirmó la funcionalidad y localización subcelular de dicho enzima PCCL (Ramírez-Estrada *et al*., 2016). Debido a la novedad de este gen, su nivel de expresión en diferentes condiciones experimentales, hasta el momento, tan sólo ha sido estudiado en dos líneas celulares establecidas por nuestro grupo de investigación (Ramírez-Estarada *et al.,* 2015a).

El nivel de expresión del gen *PCCL* en condiciones control aumentó de manera constante hasta 12 h de cultivo (431,3 veces el valor de referencia) disminuyendo después hasta las 48 h consideradas. La adición de PFDgas y PDFdegas no indujo ningún aumento significativo de la acumulación de transcritos de este gen. Contrariamente la presencia de Coro+β-CDs en el medio causó una alta inducción de dicho gen alcanzando el nivel más alto después de 4h de elicitación para disminuir hasta las 48h. En este momento (4h), la acumulación de transcritos fue 12 veces superior mayor a la observada en el control (Fig. 29).

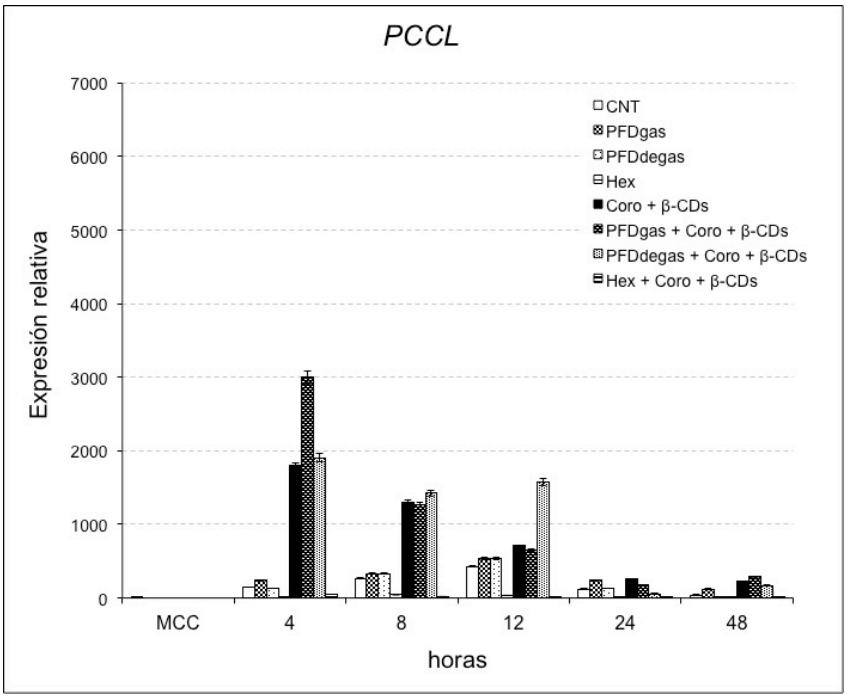

Figura 29. Expresion relativa del gen b-fenilalanina-CoA ligasa (*PCCL*) en cultivos celulares de *T. media* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); Hex: hexenol (40 μM); Coro+β-CDs: Coronatina (1 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+Coro+β-CDs; PDFdegas+Coro+β-CDs; Hex+Coro+β-CDs. Cada valor es la media de 3 determinaciones ± SE.

Sin embargo, la mayor inducción de este gen se obtuvo 4 horas después de la adición de PDFgas junto con Coro+β-CDs a los cultivos. En estas condiciones los niveles de expresión fueron 20 veces superiores a los correspondientes para el cultivo control. Además, la adición de PFDdegas y Coro+β-CDs también indujo, aunque en menor medida, la acumulación de mRNA del gen indicado. El nivel alto duró hasta 12h de elicitación disminuyendo drásticamente después de 24h. La adición de Hex al medio, con o sin Coro+β-CDs limitó la expresión del gen ya que la acumulación de transcritos para

dicho gen fue siempre menor que la encontrada en los cultivos de control.

Considerando la ruta biosintética del taxol, la expresión del gen *T13αOH* es básica para la formación de todos los taxanos estudiados en este experimento ya que todos ellos o bien tienen el C13 hidroxilado (DABIII y BIII) o este OH 13C está esterificado con una cadena lateral (DAT, Taxol o CEF). Aunque la elicitación conjunta con PDFgas + Coro+β-CDs y, en menor medida la adición de tan solo éstos últimos, indujeron una elevada expresión de este gen. La baja expresión que se pudo observar en los otros tratamientos, al menos en algunos de los tiempos estudiados, resultó ser suficiente para la formación de la enzima necesaria para la biosíntesis del esqueleto de taxano polihidroxilado, precursor de todos los taxanos estudiados. Anteriormente pudimos demostrar (Onrubia *et al.,* 2013a), en cultivos celulares de *T. baccata* elicitados con MeJa, que la ruta de biosíntesis del taxol procedía principalmente a través de la etapa catalizada por la enzima T13OH en lugar de la controlada por la enzima TAT (taxadieno-5α-ol-O- Acetil transferasa), ya que el producto del gen *TAT* no aumentó realmente bajo elicitación. Nims et al. (2006) encontraron también resultados similares en cultivos celulares de *T. cuspidata* y sugirieron una preferencia del camino catalizado por el enzima T13OH que del controlado por el gen *TAT* (Fig. 7). En consecuencia, parece ser que la etapa controlada por el gen *T13αOH* no es limitante en la ruta de biosíntesis de taxol.

El gen *BAPT* está implicado en la formación de taxanos con cadena lateral tales como taxol, CEF y probablemente DAT, aunque los pasos biosintéticos que conducen a ésta última no son todavía bien

conocidos. Como se indicó anteriormente, la expresión del gen *BAPT* incrementó claramente mediante la adición de PDF (principalmente PDFgas) en conjunto con Coro+β-CDs y también en el tratamiento solo con éstas 2 en el cultivo. La respuesta positiva de este gen podría justificar la alta producción de taxol, en estas condiciones, especialmente al final del experimento. Repetidamente hemos podido observar que la expresión de este gen, así como la expresión de todos los otros genes estudiados implicados en la biosíntesis del taxol, alcanzaba su máximo unas pocas horas después de la elicitación, mientras que la acumulación de taxanos más elevada tenía lugar varios días después. Este hecho puede deberse a que algunos pasos biosintéticos intermedios podrían ser relativamente lentos o también a la persistencia de la actividad enzimática mucho tiempo después de que los mRNA correspondientes ya no se encontrasen en las células, como también sugieren Nims *et al.,* (2006), Exposito et al, (2010) y Onrubia *et al.,* (2013).

La alta expresión de este gen en las condiciones indicadas anteriormente también podría explicar la también alta producción de cefalomanina. Sin embargo, mientras que el taxol alcanzó el nivel de producción más alto 24 días después de la elicitación, los contenidos más altos de CEF se encontraron desde el dia 12 hasta el día 24. La única diferencia entre la formación de taxol y de CEF es la última etapa metabólica que en el caso del taxol es una beozoilacion, mientras que en el caso de CEF es una tigloilación, aunque el sustrato en ambos casos es el 3'-N-desbenzoil taxol (Exposito *et al.,* 2010). Teniendo en cuenta estos resultados, se podría sugerir que la enzima que controla la tigloilación es activa antes que la enzima

DBTNBT, aunque el gen que codifica que controla la tigloilaciíon aún no se conoce.

La relevancia del gen *DBTNBT* en la formación de taxol es destacada ya que nuestros resultados muestran que la adición de Hex al cultivo no activa la expresión de este gen y no se encuentra taxol en los cultivos, sin embargo, cuando los cultivos fueron suplementados con este elicitor más Coro+β-CDs, probablemente debido a la acción de éstos, se observó una inducción de la expresión de este gen y también un aumento en la producción de taxol al final del experimento. Todo ello lleva a corroborar el hecho de que el paso catalizado por el enzima DBTNBT es muy limitante en la biosíntesis del taxol.

Puesto que la α-fenilalanina es un aminoácido frecuente en las células, y el gen *PAM* ha resultado marcadamente inducido en todas las condiciones de elicitación y en todos los cultivos celulares de *Taxus* estudiados, (Nims *et al.,* 2006; Onrubia *et al.,* 2013b; Sabater-Jara *et al.,* 2014), se supone que la formación de la cadena lateral no es un paso limitante en la ruta biosintética del taxol. La acción de la CoA ligasa (PCCL) es necesaria para la activación de β-fenilalanina antes de su fijación a BIII. Las condiciones que mejoraron en mayor grado la expresión del gen que codifica ésta enzima fueron Coro+β-CDs y la doble inducción con Coro+β-CDs y PFD (gas y desgasificado). Estos resultados podrían explicar los altos contenidos de taxol y CEF producidos en estas condiciones. Sin embargo, los contenidos elevados de DAT obtenidos en los cultivos elicitados con Coro+β-CDs o con Hex+Coro+β-CDs conjuntamente no podrían ser

una consecuencia de la expresión del gen de CoA ligasa ya que en estas condiciones este gen no estaba sobreexpresado.

En su conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los elicitores estudiados indujeron una reprogramación de la expresión génica en los cultivos celulares de *Taxus media* utilizados, lo que probablemente explica los diferentes niveles de acumulación de los taxanos estudiados, dependiendo del elicitor utilizado. Mientras que Coro+β-CDs y PFD indujeron la expresión de los mismos genes en mayor o menor grado y los taxanos con una producción mejorada fueron los mismos, Hex aumentó sólo la producción de DAT, indicando que los elicitores ensayados pueden tener mecanismos de acción diferentes y pueden actuar sinérgica o antagónicamente.

Entre los elicitores ensayados en este experimento, la adición conjunta de Coro+β-CDs y PFD (gas y desgasificación) constituyó el mejor tratamiento para inducir una producción de taxanos alta. Aunque la formación de biomasa estaba limitada en aproximadamente un 20%, la producción total de taxanos aumentó, respectivamente, en un 195% y un 230%, aproximadamente en relación con los cultivos de control.

Aunque la relación entre la expresión de los diferentes genes implicados en la biosíntesis de taxol y los contenidos de los diversos taxanos estudiados se ha hecho patente también en este estudio, no se puede olvidar que hay otros factores que también contribuyen en el control de los niveles de taxanos, como son los procesos post-transcripcionales y aquellos post-traduccionales que regulan la actividad de las enzimas implicadas en esta ruta metabólica.

4.2. Efecto de las perfluorodecalinas y el hexenol en la producción biotecnológica de estilbenos

t-Resveratrol (t-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), es un polifenol miembro de la familia de los estilbenos que ha sido objeto de numerosos estudios en medicina y fisiología vegetal. Además de actuar como una fitoalexina sintetizada en respuesta al estrés, ya sea producido por heridas o por el ataque de patógenos (Langcake y Pryce, 1976), este compuesto es conocido por sus actividades cardioprotectoras, antitumorales, neuroprotectoras y antioxidantes (Adrian y Jeandet, 2006). Trabajos adicionales también han demostrado que el *t*-resveratrol (*t*-R) aumenta la longevidad en organismos inferiores y superiores, a través de la activación de proteínas de la familia sirtuina (Donnez *et al.,* 2009). Con la creciente demanda de *t*-R para usos nutracéuticos, cosméticos y farmaceuticos, se han desarrollado numerosos trabajos de investigación para mejorar la producción de resveratrol en plantas y cultivos celulares mediante técnicas de elicitación (Donnez *et al.,* 2009; Kiselev, 2011; Voung *et al.,* 2014).

La biosíntesis de estilbenos se inicia a partir de la fenilalanina vía 4-coumaroil CoA (Fig. 30). La estilbeno sintasa (STS) es la enzima que cataliza el punto de ramificación de la vía fenil-propanoide en la biosíntesis estilbenos. Su acción consiste en la condensación del 4-cumaroilCoA con tres unidades C2 de malonilCoA para producir *t*-R (Giovinazzo *et al.,* 2012). Las fuentes de resveratrol incluyen su extracción de materias primas vegetales, la síntesis química y la producción biotecnológica, teniendo esta última una serie de ventajas que combinan su rentabilidad con su biosostenibilidad. La bioproducción de *t*-R (revisado en Donnez *et al.,* 2009) en cultivos

celulares de vid elicitados con β-CDs y MeJa ha demostrado ser la plataforma biotecnológica más eficiente, hasta el momento, para la producción de *t*-R, llegando a alcanzar una conversión global del 30% del azúcar del medio de cultivo en resveratrol (Almagro *et al.,* 2013).

El uso como elicitores de las β-CDs (oligosacáridos cíclicos) solas (Morales *et al.,* 2006) o en combinación con MeJa (Lijavetzky *et al.,* 2008), ha demostrado ser muy eficaz para estimular la producción de *t*-R y su secreción al medio, en cultivos celulares de *V. vinifera*, produciendo hasta 4000 mg/L. La combinación de dos importantes propiedades de las β-CDs, es decir, su función elicitora de las células vegetales y su capacidad para formar complejos de inclusión altamente solubles en agua con moléculas pequeñas, permite una acumulación extracelular *t*-R elevada, facilitando así la recuperación del producto del medio de cultivo, sin destruir la biomasa (Morales *et al.,* 1998; Morales *et al.,* 2006). Además, los niveles extracelulares de *t*-R, obtenidos fueron al menos 10 veces superiores a los obtenidos por otros métodos, tales como el cultivos de levaduras y bacterias transgénicas (Beekwilder *et al.,* 2006; Watts *et al.,* 2006) o en células de *V. amurensis* transformadas con el gen *rolB* de *Agrobacterium rhizogenes* (Kiselev *et al.,* 2007). Este tratamiento, no tiene efectos tóxicos para las células, incluso después de repetidos subcultivos (Vera-Urbina *et al.,* 2009). La acumulación de *t*-R inducida por β-CDs CDs solas o combinadas con MeJa se correlacionó con una mayor expresión de los genes de la ruta fenilpropanoide desde fenilalanina a *t*-R (Lijavetzky *et al.,* 2008). Por el contrario, en las células tratadas con MeJa sólo, a pesar del alto nivel de expresión génica, no se produjo acumulación extracelular *t*-R y los niveles intracelulares de este compuesto y piceido fueron bajos, lo que demuestra la existencia

de mecanismos de regulación post-transcripcionales en esta vía. Al mismo tiempo, los transcritos que codifican las enzimas que conducen a ramificaciones de la vía fenilpropanoide, tales como la cinamoil-CoA reductasa, no se detectaron o no se vieron afectados sus niveles, por los tratamientos elicitores. Sólo algunas líneas celulares de vid producen piceida intracelular de manera constitutiva, pero todas las líneas analizadas respondieron de manera similar a la elicitación con MeJa, β-CDs CDs o ambos (Belchí-Navarro *et al.,* 2011).

Considerando lo previamente comentado y los resultados obtenidos mediante los tratamientos con PFDs y Hex en los cultivos celulares de *T. media*, nos propusimos investigar el efecto de estos nuevos elicitores sobre la producción de *t*-R. Para ello, los cultivos celulares de *V. vinífera* elicitados con MeJa (100 μM) y β-CDs (50 mM), se adicionaron de PFDs y Hex (ver apartado 3.3) y fueron cultivados durante un periodo de 7 días, con el propósito de estudiar el efecto de los nuevos elicitores, sobre la producción de *t*-R y el nivel de expresión de algunas de las enzimas que participan en su biosíntesis. En estudios previos se había demostrado que tras la elicitación, los mayores niveles de producción de *t*-R se alcanzan transcurrida una semana de tratamiento (Lijavetzky *et al.,* 2008).

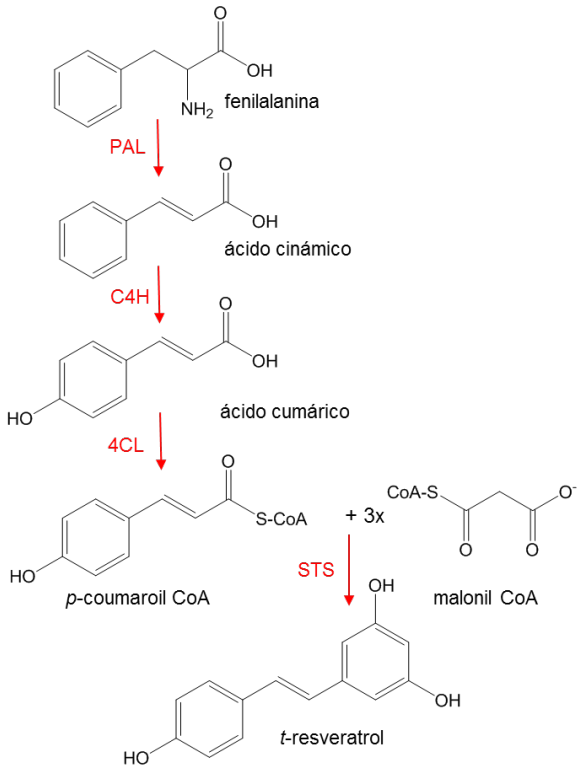

Figura 30. Biosíntesis de resveratrol a partir de fenilalanina. PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, ácido cinámico-4-hidroxilasa; 4CL, cumaroil CoA ligasa, STS, estilbeno sintasa.

4.2.1. Estudio del crecimiento de los cultivos celulares de *V. vinifera*.

Los cultivos celulares de *V. vinifera* cv Monastrell fueron establecidos y se mantuvieron como se describe en Calderon et al. (1993) y Belchí-Navarro et al. (2012). Las suspensiones celulares, 12-14 días después del subcultivo, se transfirieron a las condiciones experimentales de este estudio. En ensayos previos, se había comprobado que los elicitores MeJa y β-CDs eran muy eficaces para inducir la producción de *t*-R cuando se aplicaban conjuntamente

(Belchí-Navarro et al, 2012). Sin embargo, la acción elicitora de las PFDs y Hex sobre la producción de *t*-R en cultivos celulares de *V. vinifera* no se había estudiado anteriormente. El diseño experimental fue similar realizados con *Taxus*. Para ello, suspensiones celulares se mantuvieron durante 7 días, suplementadas con los compuestos para los distintos tratamientos:

- Control T0 (MCC): MCC para *V. vinifera* como control inicial del ensayo.
- Control (CNT): para cada tratamiento en cada día de muestreo sin la adición de elicitores.
- PFDdegas: 575 ml/L PFD no aireada.
- PFDgas: 575 ml/L PFD saturada de aire.
- Hex: 40 µM de (z)-3-hexenol.
- MeJa+β-CDs: 100 µM Jasmonato de metilo y 50 mM β-ciclodextrinas
- PFDgas + MeJa+β-CDs
- PFDdegas + MeJa+β-CDs
- Hex + MeJa+β-CDs

La capacidad de los cultivos celulares estudiados para formar biomasa (medida como peso fresco) se determinó a las 24 , 48 , 72 y 168 horas después de la elicitación. Como se muestra (Fig. 31), durante los primeros tres días, los cultivos mostraron una fase de adaptación en la que el aumento de biomasa fue muy limitado, sin embargo a partir de este momento, se inició una fase de crecimiento exponencial muy marcada en los cultivos control y en aquellos

suplementados con PFDs o Hex. Al final del estudio, el aumento de biomasa de las suspensiones celulares tratadas con PFDs o Hex resultó superior al del control ya que a las 168 h, los cultivos tratados con PFDgas y PFDdegas habían incrementado en más de 3 veces y los suplementados con Hex en 2,8 veces el valor del inóculo (200 g/L), mientras que el control incrementó en 2,7 su biomasa. Contrariamente, los cultivos tratados con MeJa+βCDs, conjuntamente con los elicitores indicados, o bien no aumentaron su biomasa con respecto al principio del ensayo o incluso, como en el caso de los cultivos tratados con Hex + MeJa+βCDs, la redujeron.

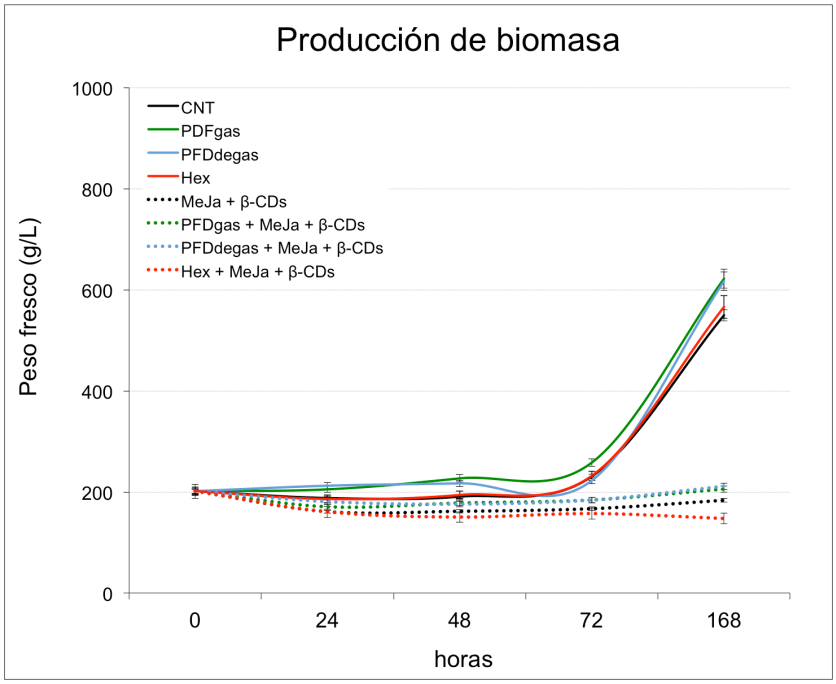

Figura 31. Curso del crecimiento medido como peso fresco (PF) de los cultivos celulares de *V. vinifera* durante un periodo de 168h, en condiciones control y en las de elicitación estudiadas en este ensayo. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas ± SE.

Como se ha indicado anteriormente, en los cultivos de *T. media* la adición de PFDs tanto aireadas como desgasificadas, tampoco afectó negativamente al crecimiento, aunque no tuvo lugar el efecto positivo tan claro como el observado en las suspensiones celulares de *V. vinífera*. Puesto que el efecto de la adición de PFDs a cultivos celulares ha sido muy poco estudiado, y como se ha comentado anteriormente (Pilarek y Szewczyk, 2008; Syklowska-Baranek *et al.,* 2015), se ha mostrado dependiente del sistema celular considerado, probablemente las células de *V. vinífera* se agrupan en menor número permitiendo un mayor contacto con las PFDs o bien presentan comportamientos o características diferenciales que favorecen esta respuesta positiva tan clara a la presencia de PFDs en el medio de cultivo. Con respecto al moderado incremento de la capacidad de crecimiento de los cultivos de *V. vinifera* debido a la adición de Hex al medio, también Almagro et al. (2016) destacaron que el Hex no provocaba efectos negativos sobre el crecimiento de suspensiones celulares de *Linum usitatissimum,* cuando eran tratadas con este elicitor.

Contrariamente, la adición conjunta de MeJa y β-CDs ya había mostrado efectos negativos sobre el crecimiento de suspensiones celulares de *V. vinifera*. Belchí-Navarro et al. (2012) observaron una reducción del 20-30% del peso seco en cultivos celulares de esta especie al ser tratados con ambos elicitores. Sin embargo, la adición de β–CDs a cultivos celulares de *Taxus* redujo muy claramente el efecto negativo que ocasiona la adición de MeJa, ya que al final del experimento la biomasa celular resultó prácticamente idéntica en los cultivos elicitados que en los control sin elicitar (Sabater-Jara et al, 2014).

4.2.2. Estudio de la producción de resveratrol de los cultivos celulares de *V. vinífera*

De los cultivos de *V. vinfera* tratados con los diferentes elicitores sólos o en combinación, únicamente aquellos que estaban adicionados con β-CDs presentaron producciones de *t*-R. Estos cultivos alcanzaron una producción de *t*-R próxima a los 500 mg/L, tampoco se pudo detectar *t*-R en los cultivos control (no tratados con elicitores). Los tratamientos conjuntos de β-CDs con MeJa, Hex y PFDs presentaron producciones de *t*-R incrementadas respecto aquellos cultivos únicamente tratados con β-CDs, siendo MeJa el elicitor mas efectivo, llegando estos cultivos a superar producciones de *t*-R de 1 g/L, mientras que los cultivos tratados Hex o PFDdegas únicamente alcanzaron niveles de 624 y 895 mg/L, respectivamente, y como se ha comentado, siempre en combinación con β-CDs (Fig. 32).

Los resultados obtenidos sugieren la necesidad del tratamiento con β-CDs para lograr la producción biotecnológica de *t*-R y confirman el papel elicitor del MeJa cuando es suministrado a los cultivos de *V. vinífera* en combinación con β-CDs. El efecto sinérgico de MeJa y β-CDs ya se había demostrado previamente en cultivos celulares de *V. vinifera* (Lijavetzky *et al.,* 2008), en cultivos de *T. baccata* productores de taxanos (Sabater-Jara *et al.,* 2014) y en cultivos de *Silybum marianum* productores de silimarina (Belchí-Navarro *et al.,* 2011). Por el contrario, los tratamientos combinados de MeJa con PFDdegas o Hex no indujeron la producción de *t*-R en los cultivos tratados (Fig. 31), confirmando el papel fundamental de la β-CDs para la producción de este compuesto en los cultivos celulares de *V. vinifera*.

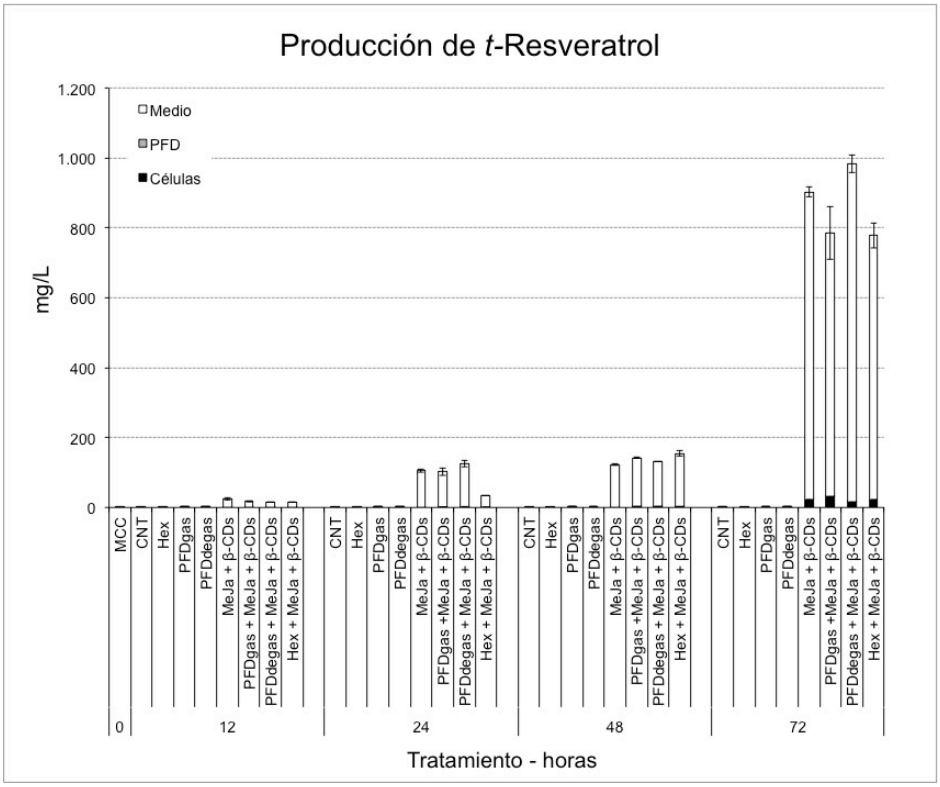

Figura 32. Producción de *t*-R en cultivos celulares de *V. vinifera* mantenidos en las condiciones experimentales descritas, durante 72h. MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas+ MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE.

Las máximas producciones de *t*-R se alcanzaron al añadir Hex o PFDdegas a los cultivos elicitados con β-CDs y MeJa, llegando a niveles de 1,2 g/L y 1,5 g/L respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran tal como sucedía en los cultivos celulares de *T. media* que Hex y PFDdegas pueden ser considerados también como efectivos elicitores para incrementar la producción de *t*-R en los cultivos celulares de *V. vinífera*, más si se tiene encuenta que ambos elicitores no afectaron a la viabilidad de los mismos. Pero y también

de igual manera como sucedía en *T. media*, estos elicitores sólo son efectivos en los tratamientos combinados.

4.2.3. Estudio del perfil transcriptómico de los cultivos celulares de *V. vinífera*

Con el fin de estudiar la interrelación entre la expresión genética y los niveles de *t*-R producidos, en este estudio también se ha determinado el nivel de expresión de algunos genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis del *t*-R mediante qRT-PCR. Los genes que se han condiderado han sido: *PAL* que codifica para la fenilalanina amonio liasa, enzima que desvia la fenilalanina desde su pool metabólico hacia el camino fenilpropanoide; *C4H*, que codifica para la enzima cinamato 4 hidroxilasa encargada de la hidroxilación del ácido cinámico; *4CL*, que codifica para 4-cumaroil CoA ligasa, enzima que activa al trans-cinamato; *STS*, que codifica para el complejo enzimático estilbeno sintasa, complejo responsable de la formación del *t*-R a partir del *p*-cumaroil CoA y tres unidades de malonil CoA.

La expresión de dichos genes se determinó desde 4 h hasta 48 h después de la elicitación ya que previamente los máxinos niveles de expresión se alcanzaban durante dicho temprano período (Pietrowska-Borek et al, 2015; Almagro *et al.,* 2015; Chu et al, 2017). Para cada gen, los niveles de expresión se han indicado en relación a aquellos obtenidos por las suspensiones celulares control (valor de referencia = 1), como esta comentado en la sección de Materiales y Métodos.

El gen que resultó mas fuertemente regulado por las condiciones del experimento fue el que codifica para el enzima PAL. El incremento de la expresión del gen *PAL* y de la actividad de la enzima que codifica ha sido reportado en muchas ocasiones cuando plantas o cultivos celulares han de responder a situaciones de estrés tanto biótico como abiótico (Yousefzadi et al, 2012; Pietrowska-Borek *et al.,* 2014; Almagro *et al.,* 2015).

Al igual que se destacó para la producción de *t*-R, las máximas expresiónes del gen *PAL* también tuvieron lugar en los tratamientos que incluían β-CDs y MeJa. A las 4 h de elicitación, en los cultivos suplementados con β-CDs+MeJa más PFDs o Hex, ya se encontraron niveles de transcritos para este gen 7 veces superiores a los correspondientes en el cultivo control. Sin embargo, dichos niveles fueron incrementando hasta las 48 h de cultivo, momento en que, en las condiciones estudiadas, se alcanzó la máxima expresión del gen *PAL*.

A las 48 h de elicitación, los niveles de mRNA para dicho gen, en los cultivos tratados con β-CDs+MeJa y además con PFDgas, PFDdegas o Hex resultaron ser, respectivamente, 18, 26, 19 y 25 veces superiores a los niveles del control sin elicitar. Considerando la expresión de dicho gen en los cultivos tratados con PFDgas, PFDdegas y Hex, en relación con aquellos que además de dichos elicitores, también estaban suplementados con β-CDs+MeJa, los niveles de transcritos aumentaron en 9, 20 y 28 veces. Estos resultados demuestran que los elicitores β-CDs+MeJa actuaron sinérgicamente con las PFDs y el Hex, en la inducción del gen *PAL* (Fig. 33).

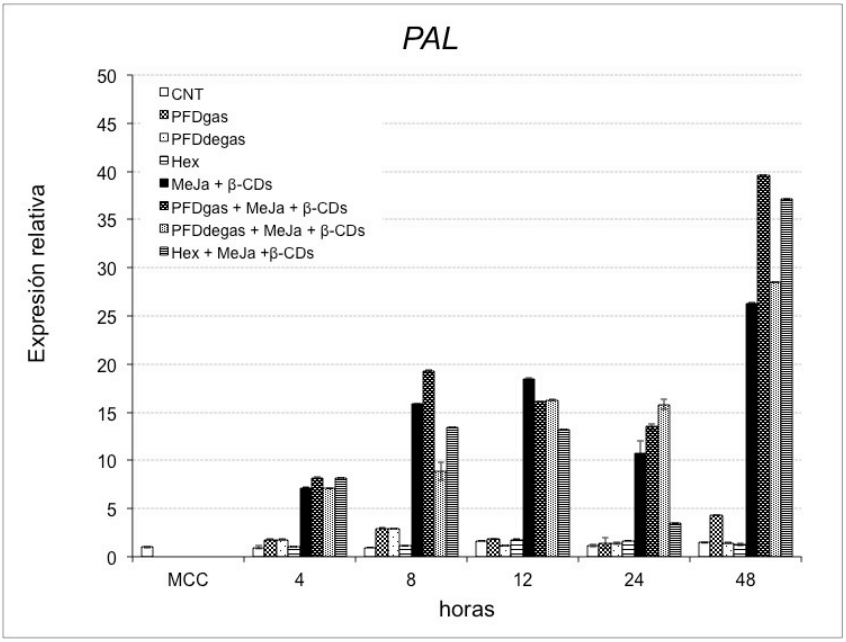

Figura 33. Expresion relativa del gen *PAL* (codifca fenilalanina amonio liasa) en cultivos celulares de *V. vinifera* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β−ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas+ MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE.

La expresión del gen *C4H*, al igual que la de los otros tres genes estudiados ya se hizo patente a partir de las primeras 4 h de elicitación. También en este caso, los máximos niveles se alcanzaron a las 48 h, en los cultivos tratados con β-CDs + MeJa más PFDs o Hex, en los que los niveles de expresión resultaron entre 10 y 18 veces superiores a los de los cultivos control sin elicitar. Puesto que la acumulación de transcritos para este gen en los cultivos tratados con β-CDs + MeJa y PFDs o Hex, a las 48 h de inducción, fueron superiores a la observada en las suspensiones celulares tratadas unicamente con β-CDs + MeJa, se puede inferir que la los elicitores

estudiados activaron de forma sinérgica la expresión de dicho gen (Fig. 34).

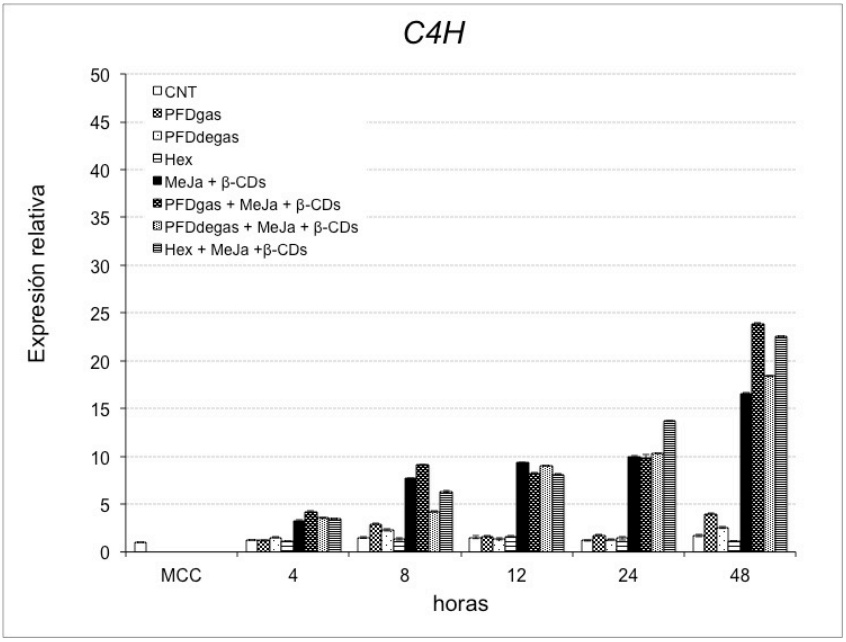

Figura 34. Expresion relativa del gen *C4H* (codifica cinamato 4 hidroxilasa) en cultivos celulares de *V. vinifera* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas+ MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE.

Contrariamente, el gen involucrado en la ruta fenilpropanoide, que en menor medida respondió a la elicitación fue el 4CL ya que presentó menores niveles de expresión que los demas estudiados, en las mismas condiciones experimentales. Resultados similares fueron obtenidos por Almagro et al. (2015), al tratar también suspensiones celulares de *V. vinifera* con β-CDs y coronatina. La expresión de este gen se vió significativamente incrementada por la adición de β-CDs + MeJa juntamente con PFDgas, especialmente a partir de las 24 h de

elicitación. También la adición de Hex a los cultivos elicitados con β-CDs+MeJa incrementó significativamente la acumulación de transcritos de este gen, especialmente a partir de las 24 h de tratamiento. No así ocurrió cuando las PFD estaban desgasificadas, ya que su adición a las suspensiones celulares inducidas con β-CDs + MeJa nunca ocasionó incrementos de transcripción superiores a los alcanzados en los cultivos suplementados con este mismo compuesto pero saturado de aire (Fig. 35).

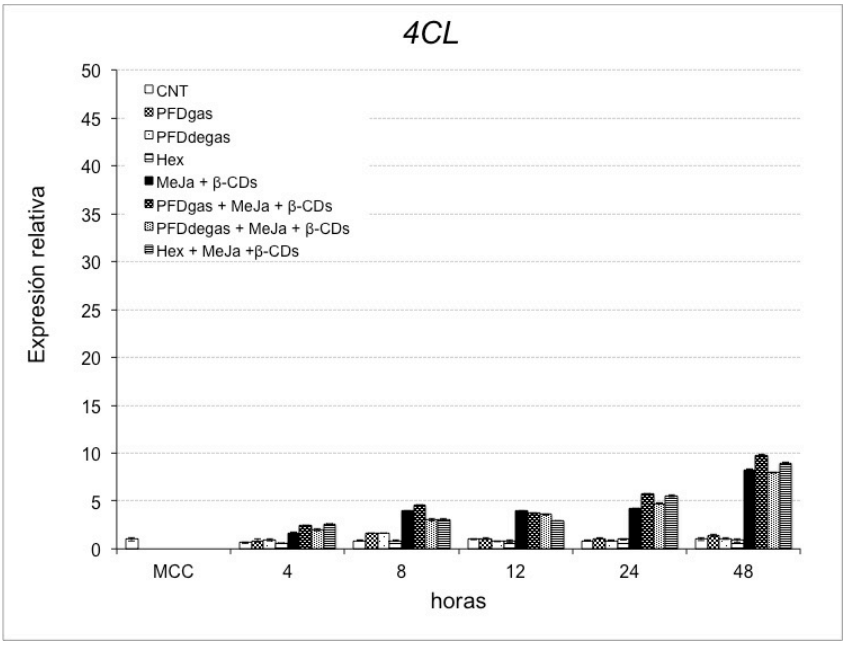

Figura 35. Expresion relativa del gen *4CL* (codifica 4-cumaroil CoA ligasa) en cultivos celulares de *V. vinifera* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas+ MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE.

Estilbeno sintasa (STS) es el complejo enzimático que controla directamente la formación del estilbeno a partir de *p*-cumaroilCoA y tres unidades de malonilCoA. En condiciones control, la expresión del gen que lo codifica es muy baja, al igual que la de los genes comentados anteriormente, así como en las suspensiones celulares suplementadas tan sólo con PFDs o Hex.

También en este caso la adición de β-CDs + MeJa resultó básica para incrementar la expresión del gen *STS*. A las 48 h de inducción, momento en que la acumulación de transcritos era máxima, los niveles de expresión de dicho gen en las suspensiones celulares suplementadas, además, con PFDgas. PFDdegas o Hex se incrementó en un 29%, 9% y 24%, respectivamente. Es decir, también en este caso, el tratamiento que dió lugar a una mayor acumulación de transcritos fue la adición de PFDgas, juntamente con β-CDs + MeJa (Fig. 36).

Al relacionar los niveles de *t*-R obtenidos en este estudio de elicitación se puede deducir que realmente los máximos niveles del estilbeno fueron obtenidos en aquellos cultivos en que la expresión de los genes involucrados en su biosíntesis era más alta. Sin embargo, al considerar individualmente los tratamientos se puede observar que aunque la expresión de los cuatro genes estudiados resultó superior en los cultivos tratados con β-CDs + MeJa y PFDgas, los máximos contenidos de *t*-R se alcanzaron en aquellos cultivos en que las PFDs estaban desgasificadas. A la vez, la presencia conjunta de Hex y β-CDs + MeJa, que dio lugar a niveles de expresión de los cuatro genes estudiados siempre superiores a los obtenidos en los cultivos únicamente inducidos por β-CDs + MeJa, condicionó una producción

de *t*-R que no superaba el 86% de la obtenida en esta última condición.

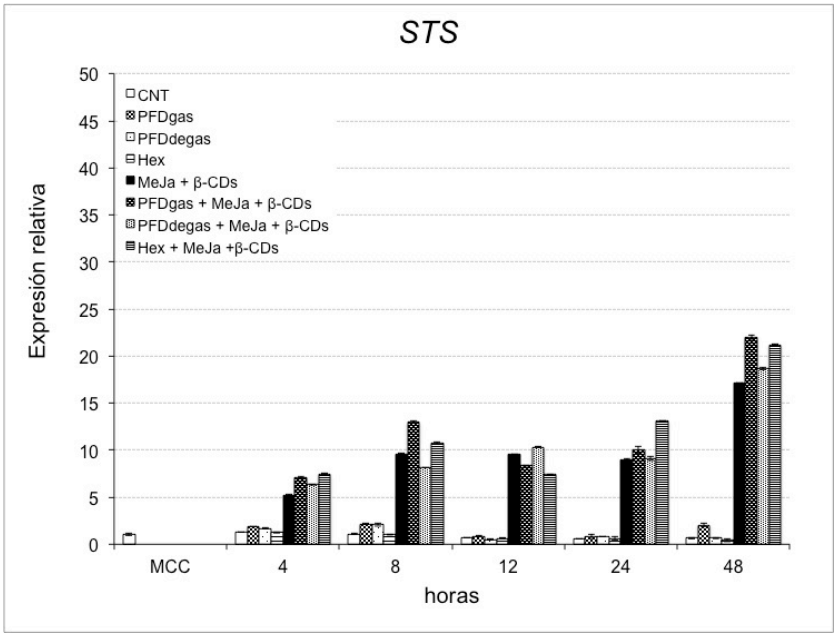

Figura 36. Expresion relativa del gen *STS* (codifica para el complejo enzimático estilbeno sintasa) en cultivos celulares de *V. vinifera* durante los dos primeros días de elicitación con: MCC: medio de crecimiento celular; CNT: cultivos control sin elicitar; Hex: hexenol (40 μM); PDFgas: perfluorodecalinas saturadas de aire (575 ml/L); PDFdegas: perfluorodecalinas no aireadas (575 ml/L); MeJa+β-CDs: Jasminato de metilo (100 μM) más β–ciclodextrinas (50 mM); PDFgas+MeJa+β-CDs; PDFdegas+ MeJa +β-CDs; Hex+ MeJa +β-CDs. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas ± SE.

La falta de una relación directa entre la expresión de los genes que participan en la biosíntesis de un compuesto y los niveles de producción del mismo es un hecho común en muchos estudios tanto con plantas como con cultivos celulares. Lijavetzky et al. (2008) mostraron que aunque el gen *STS* era fuertemente activado por MeJa, la producción de *t*-R era baja. De igual manera, Almagro et al (2015), en cultivos celulares de *V. vinifera* tratados con coronatina,

ciclodextrinas o con ambos elicitores a la vez, observaron que la máxima expresión de los genes *STS* y *PAL* tuvo lugar en presencia de tan sólo coronatina, sin embargo los máximos niveles de producción se alcanzaron en aquellos cultivos tratados simultáneamente con ambos elicitores. En otro sistema celular, Ramírez-Estrada et al. (2015) obseraron que, en cultivos celulares de *Taxus* elicitados con coronatina, β-ciclodextrinas o con ambos elicitores simultáneamente, también era la adición de ambos compuestos la que daba lugar a una mayor producción de taxanos, aunque la máxima expresión de algunos genes involucrados en la ruta biosintética del taxol se alcanzaba en los cultivos tratados únicamente con coronatina.

Como es sabido, existen otros factores, además de los niveles de transcripción, que también contribuyen en el control de los pasos biosintéticos que llevan a la formación de los compuestos de interés, como son los procesos post-transcripcionales y aquellos post-traduccionales que regulan la actividad de las enzimas implicadas en esta ruta metabólica. A la vez, excepto en el caso del enzima STS, los demás enzimas codificados por los genes estudiados no solo toman parte en biosíntesis de estilbenos, sino que sus productos pueden ser dirigidos hacia la biosíntesis de flavonoides, ligninas u otros compuestos de naturaleza fenólica.

4.3. Acción del taximin en cultivos celulares de *Taxus baccata*.

La expresión del metabolismo secundario vegetal involucra muchos procesos metabólicos que, en último término, son consecuencia de un proceso de expresión genética diferencial. En cultivos celulares de *Taxus* spp, se ha podido observar que la adición de elicitores al medio induce un incremento en la producción de taxanos (Ramírez-Estrada *et al.,* 2016). En estudios previos y con el fin de conocer si la presencia de los elicitores en las células productoras aumenta la expresión de genes que codifican para enzimas biosintéticas o para proteínas reguladoras, y si este incremento de la expresión podría ser la causa del aumento de producción, se han llevado a cabo estudios transcriptómicos y metabólicos en diversos sistemas celulares de *Taxus* tratados con varios elicitores (Onrubia *et al.,* 2013; Sabater-Jara *et al.,* 2014; Ramírez-Estrada *et al.,* 2015) Existen diferentes metodologías para determinar los cambios de expresión genética en condiciones inductivas, pero en el presente estudio se ha utilizado la técnica de cDNA-Amplified Fragment Lenght Polymorphism (cDNA-AFLP) para determinar los cambios transcriptómicos en suspensiones celulares de *Taxus baccata* mantenidas en un sistema en dos fases y con adición del elicitor MeJa al principio de la segunda fase del cultivo, es decir en el momento en que las células fueron transferidas desde el medio óptimo para el crecimiento, al medio óptimo para la producción. La ventaja de la aplicación de MeJa es que este compuesto activa diferentes caminos metabólicos secundarios en plantas gimnospermas y angiospermas (De Geyter *et al.,* 2012), induciendo cambios en la expresión de genes implicados en la

biosíntesis de muchos compuestos secundarios y/o de genes que codifican para proteínas reguladoras de las rutas biosintéticas.

La técnica de cDNA-AFLP es una metodología que permite conocer cambios en la expresión de todo el genoma (Goossens *et al.,* 2003; Rischer *et al.,* 2006; Vuylsteke *et al.,* 2007). Implica la síntesis de cDNAs a partir de los transcritos formados, seguido por una digestión con diferentes enzimas de restricción para generar fragmentos únicos. Estos fragmentos se someten a selectivas amplificaciones mediante PCR y los productos se separan en geles de alta resolución. Esta técnica tiene la ventaja de no requerir ninguna información anterior de las secuencias genéticas del organismo que se estudia. También permite la comparación entre diferentes tipos de tejidos o de estados de desarrollo y se puede utilizar en experimentos que impliquen estudios a diferentes tiempos.

Como se ha indicado en el capítulo de introducción, en las suspensiones celulares de *T. baccata* analizadas mediante la técnica de cDNA-AFLP, se pudieron determinar y analizar 8192 etiquetas "tags" de transcritos. Se consideraron de interés, aquellos tags que fueron inducidos o reprimidos en los cultivos elicitados con MeJa y por ello diferencialmente expresados en los cultivos control y elicitados. De las 858 tags diferencialmente expresados, 667 (77.7%) dieron secuencias de buena calidad mediante secuenciación directa de los productos de PCR, lo que indica que podrían representar genes únicos. De ellos, un 55.3 (369) fueron similares a genes conocidos (Onrubia *et al.,* 2014; Ramírez-Estrada, *et al.,* 2015).

De los diferentes tipos de genes agrupados según sus posibles funciones, la categoría metabolismo y energía resultó ser el grupo

principal, con tags homólogos a genes de metabolismo primario y secundario, seguido del grupo funcional relacionado con la organización celular y la defensa. Los tags homólogos a los genes de la biosíntesis de taxol presentaron dos patrones básicos: la mayoría solamente se sobreexpresaron en presencia de MeJa, mientras que otros pocos se expresaron diferencialmente durante el cultivo en medio óptimo para la producción, tanto en condiciones control como en condiciones de elicitación. Como ejemplo del primer grupo está el gen de la taxadieno sintasa, cuya expresión incrementó claramente a partir de las 12 h de elicitación alcanzando su máximo a las 24-48 h. Previos estudios de expresión de los genes implicados en la biosíntesis del taxol han sido llevado a cabo por nuestro grupo y otros grupos de investigación, en cultivos celulares de *Taxus* spp, bajo diferentes condiciones de elicitación (Exposito et al. 2010; Onrubia et al. 2013; Ramírez-Estrada et al. 2015b).

Además, numerosos genes nuevos, ya fuese con o sin homólogos existentes, y con o sin funciones conocidas, fueron identificados como genes que responden a los jasmonatos. También se estudiaron con mayor profundidad aquellos tags cuyo patrón de expresión resultó diferente o incrementó después de elicitación con MeJa y que presentaron homología con genes que codifican para factores de transcripción (TF) o proteínas reguladoras. Entre los posibles TF cabe destacar potenciales proteínas JAZ o hipotéticas proteínas con un dominio TIFY (TB797, TB414, TB203, TB608, TB219, TB552 y TB535), potenciales factores de transcripción bHLH (TB265 y TB449), una proteína BSD hipotética (TB537) y proteínas hipotéticas sin ningún tipo de dominios conocidos (TB510 y TB595). Algunos de los tags encontrados podrían corresponder a genes nuevos que

codificarían para reguladores metabólicos de origen proteico/peptídico. Concretamente, el tag TB595 con una única secuencia, que mostraba un incremento transitorio de su expresión después de la transferencia del cultivo desde el medio óptimo para el crecimiento al óptimo para la producción, pareció estar correlacionado con un incremento de la biosíntesis del taxol (Onrubia *et al.,* 2014). Análisis "cluster" indicaron que este gen era corregulado con posibles proteínas con un dominio jasmonato-ZIM (característico de las proteínas JAZ), o un dominio TIFY.

La cuantificación de la expresión del gen Tb595, obtenida mediante qRT-PCR indicó que dicho gen se sobreexpresaba durante las primeras dos horas de la transferencia del medio de crecimiento al de producción, y que esto ocurría tanto en los cultivos elicitados como en los no elicitados, aunque, la sobreexpresión se mantenía más tiempo en los cultivos elicitados. Varios tipos de tejidos de *T. baccata* también presentaron diferentes niveles de expresión del gen Tb595, observando la máxima expresión de este gen en la corteza joven y las ramas leñosas (resultados no publicados). La secuencia completa del tag Tb595 fue amplificada llegándose al conocimiento completo del gen Tb595 (TbTAX) y del péptido que codifica (Taximin). Para caracterizar mejor el péptido Taximin, se llevaron a cabo *análisis in silico*, con el fin de identificar mejor las propiedades de dicho péptido. Análisis mediante la utilización de SignalP 4.0 indicaron que Taximin tenía un péptido señal de 27 aminoácidos y que el péptido maduro estaba formado por 46 aminoácidos. A la vez, su extremo C-terminal incluía varias cisteínas y prolinas que estaban muy conservadas entre diferentes especies vegetales y que la secuencia de aminoácidos del Taximin era una secuencia altamente conservada en el reino vegetal

(Onrubia *et al.,* 2014). Sin embargo, debido a la ausencia de un dominio proteico conocido hasta el momento, este péptido no tenía ninguna función asignada.

Con el fin de conocer la localización subcelular del Taximin, se llevaron a cabo estudios de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 portador del gen Taximin que llevaba fusionado a su C-terminal la proteína amarillo-fluorescente Venus situado en el vector de expresión pK7WG2. También la bacteria llevaba el plásmido auxiliar pMP90. Tres días después de la agroinfiltración, se estudió el patrón de expresión del gen a nivel subcelular del tejido agroinfiltrado por microscopía confocal, observándose la señal de GFP en la periferia celular. Una tinción posterior con ioduro de propidio (IP), un colorante específico de la pared celular, demostró que la señal del IP y la del Taximin-proteína Venus se superponía, indicando su localización a nivel de plasmalema. A la vez, la lentitud con que se recuperó la fluorescencia después de "fotobleaching" corroboró la localización del péptido a nivel de membrana (Onrubia *et al.,* 2014).

Una vez conocida la naturaleza del péptido y del gen que lo codifica, el siguiente paso en el estudio de los genes desconocidos, candidatos a llevar a cabo una función a lo largo de la biosíntesis del taxol y su regulación, es demostrar su funcionalidad. La funcionalidad del péptido Taximin se ha investigado en diversos sistemas vegetales.

Estudios previos realizados por nuestro grupo, utilizando protoplastos transitoriamente transformados de tabaco BY-2 con un plásmido portador del gen Taximin bajo el control del promotor 35S CaMV y con un plásmido portador del gen que codifica para la luciferasa, bajo

el control de promotores de genes específicos del metabolismo secundario, demostraron la funcionalidad del péptido Taximin. Los promotores utilizados eran los correspondientes a los genes: TXS (taxadieno sintasa), T13OH (taxano-13-hidroxilasa), PMT (putrescina N-metiltransferasa), QPRT (ácido quinolínico fosforibosil transferasa y STR (estrictosidina sintasa). Al elicitar los cultivos de protoplastos con MeJa, se pudo observar que la presencia del Taximin en las células activaba los promotores propios del metabolismo secundario, obteniendo mayor actividad Luc que en los cultivos no transformados con el gen Taximin (Onrubia *et al.,* 2014).

También se pudo observar que en cultivos de raíces transformadas de tabaco, la expresión heteróloga del gen Taximin, incrementaba mucho más destacadamente la producción de nicotina en cultivos elicitados con MeJa, que en aquellos cultivos no portadores del mencionado transgén. Contrariamente, en raíces transformadas de Medicago truncatula, la expresión del gen Taximin no condicionó cambios destacados en la producción de metabolitos secundarios (saponinas triterpénicas y flavonoides), ni aun cuando el cultivo fue suplementado con MeJa, con respecto a la producción de las raíces transformadas no portadoras del transgén Taximin (Onrubia *et al.,* 2014).

Debido a la gran dificultad que presenta el estudio de la sobreexpresión del gen Taximin en cultivos celulares de *Taxus* por los problemas que conlleva la transformación genética de esta especie, en este trabajo se ha determinado el efecto de la adición exógena del péptido Taximin, a dos concentraciones distintas (1 y 10 μM), sobre el crecimiento y producción de taxanos en cultivos celulares de *T. baccata*.

Se intentó obtener el péptido Taximin, tanto por síntesis química como mediante la tecnología del DNA recombinante a través de la expresión heteróloga del transgén Taximin en *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisae*, *N. tabacum* y *Medicago truncatrula*, aunque sin éxito, probablemente debido a su naturaleza extremadamente hidrofóbica. Sin embargo sí que se logró la obtención de una versión modificada del Taximin, que se le llamó HyproTaximin, en la cual, los residuos de prolina fueron sustituidos por hidroxiprolinas. La hidroxilación de la prolina es una modificación post-translacional que ocurre con mucha frecuencia, en la naturaleza, con los péptidos de señalización (Matsubayashi, 2012).

Por todo ello, se ha estudiado el efecto de la adición exógena de HyproTaximin a dos concentraciones diferentes sobre el crecimiento y la producción de taxol, baccatina III y 10-deacetil baccatina III en cultivos celulares de T. baccata tanto elicitados con MeJa, como mantenidos en condiciones control. La adición del péptido HyproTaximin así como del elicitor MeJa se llevó a cabo al principio de la segunda fase del cultivo, es decir, cuando las células que crecían en el medio óptimo de crecimiento se transfirieron al medio óptimo para la producción de taxol y otros taxanos.

4.3.1. Crecimiento y viabilidad de las suspensiones celulares

El crecimiento de las suspensiones celulares mantenidas en las condiciones experimentales estudiadas se determinó a los 3, 7, 14 y 21 días después de la adición del HyproTaximin (1 μM o 10 μM) y/o el elicitor MeJa (100 μM). Como parámetros indicativos del crecimiento se utilizaron el peso fresco (PF) y el peso seco (PS), a la vez que

también se determinó la viabilidad de los cultivos. Puesto que el péptido HyproTaximin no era soluble en EtOH como el MeJa, se solubilizó con DMSO, por lo que en el cultivo control se adicionó el mismo volumen de DMSO y EtOH que se había utilizado para solubilizar el péptido y el elicitor, respectivamente y consecuentemente, en los cultivos suplementados con sólo HyproTaximin se adicionó EtOH y en aquellos suplementados con sólo MeJa, DMSO.

El estudio del curso de crecimiento medido como PF de los cultivos (Fig. 37) demostró que el péptido HyproTaximin no actuó positivamente sobre el crecimiento puesto que los valores de PF fueron muy similares a los alcanzados por los cultivos control, e incluso, en el caso de los cultivos tratados con 10 μM de HyproTaximin, al final del estudio resultaron ser casi un 30% inferiores al control. A lo largo de todo el estudio, los valores de PF de los cultivos tratados con MeJa fueron superiores a los control, incluso al final del ensayo en que la formación de biomasa disminuyó claramente. La adición conjunta de MeJa y HyproTaximin permitió también un crecimiento celular superior al observado en los cultivos control, aunque, al igual que en los cultivos no elicitados, la presencia del péptido en su máxima concentración provocó unas disminución del PF con respecto al alcanzado en las mismas condiciones, pero siendo 1 μM la concentración de HyproTaximin.

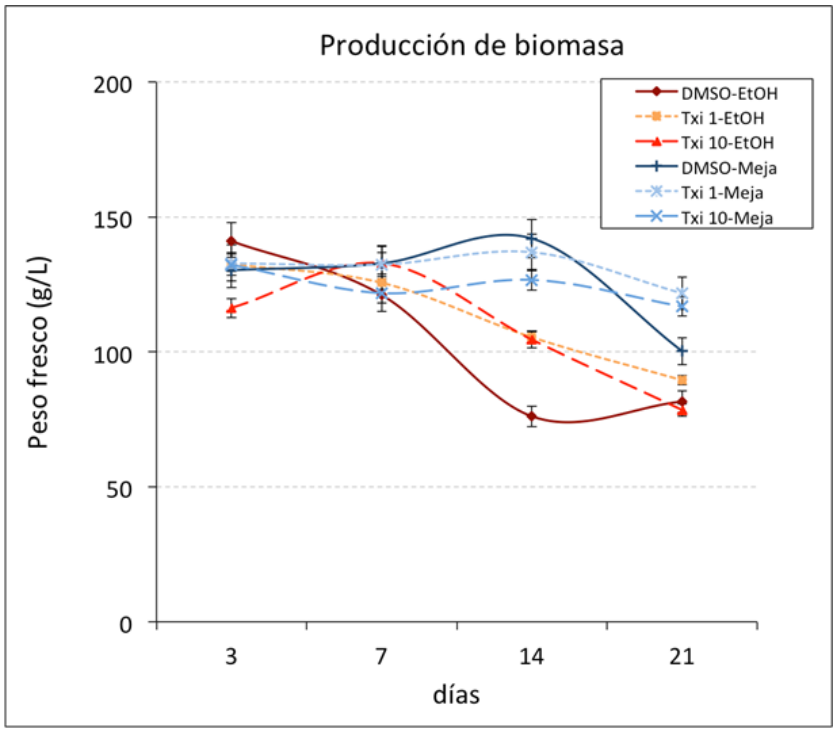

Figura 37- Producción de biomasa (expresada como g PF/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (DMSO-EtOH) o elicitados con HyproTaximin (1μM y 10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJa-Txi), a lo largo de 21 días de cultivo.

El curso del crecimiento de los cultivos medido como PS, fue muy similar al descrito previamente, si bien en este caso, el tratamiento con HyproTaximin provocó un descenso más significativo del crecimiento celular en relación al control, al final del experimento (día 21) y cuando el péptido se suministró a una mayor concentración (10 μM) (Fig. 38).

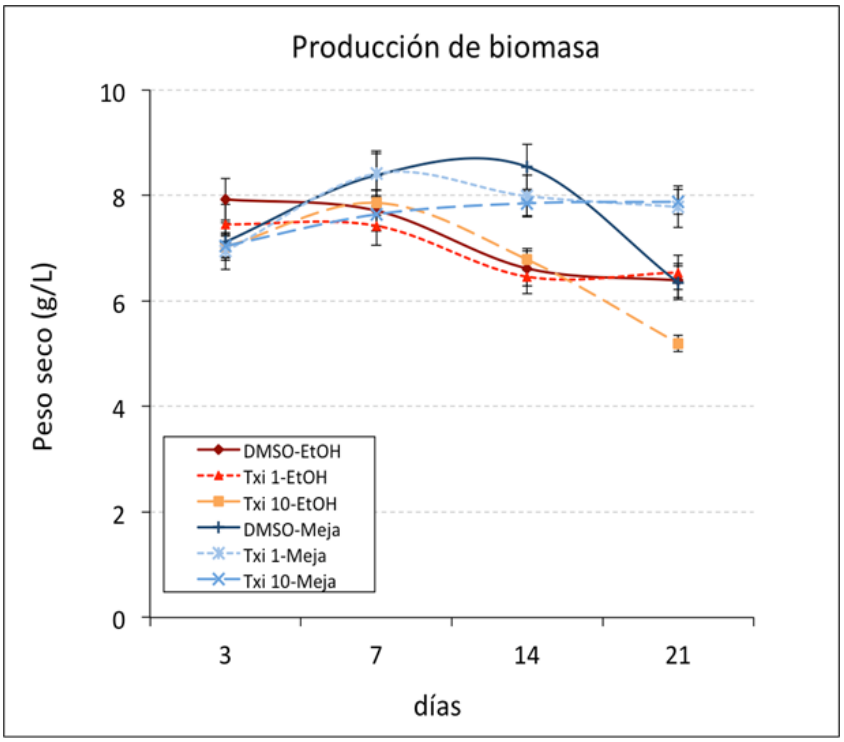

Figura 38 - Producción de biomasa (expresada como g PS/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (DMSO-EtOH) o elicitados con HyproTaximin (1μM y 10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJaTxi), a lo largo de 21 días de cultivo.

La viabilidad, determinada como porcentaje de células vivas en relación al total resultó muy alta en los cultivos elicitados con MeJa, especialmente aquellos que habían sido tratados también con HyproTaximin, que presentaron una viabilidad media superior al 90%. Los cultivos tratados sólo con MeJa también mostraron una alta viabilidad (87%), aunque al final del cultivo, al igual que ocurría con el PF y el PS, los valores de viabilidad disminuyeron claramente en estos cultivos. Los cultivos control y los tratados sólo con HyproTaximin, mostraron un curso de la viabilidad similar a los cultivos elicitados, aunque los valores de este parámetro fueron

significativamente inferiores (Fig. 39). El hecho de que los pesos frescos y secos siguieran el mismo patrón sugiere que los valores de PF inferiores, en los cultivos no elicitados, no se debieron a cambios osmóticos, sino a una disminución del número de células vivas de estos cultivos, un hecho corroborado por el estudio de viabilidad.

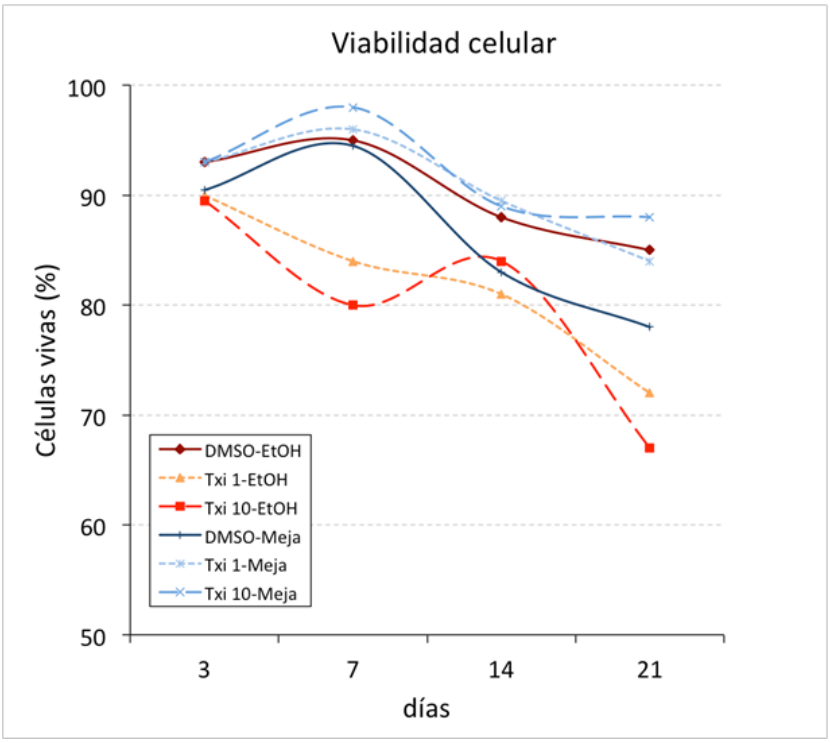

Figura 39. Viabilidad (expresada en porcentaje de células vivas respecto al total) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (DMSO-EtOH) o elicitados con HyproTaximin (1 μM y 10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJaTxi), a lo largo de 21 días de cultivo.

Diferentes autores han indicado que el MeJa disminuía el crecimiento en cultivos celulares (Furmanowa *et al.,* 2000b; Baebler *et al.,* 2005) y nuestro grupo también ha constatado este hecho en varias líneas celulares de *Taxus* (Onrubia *et al.,* 2013b; Sabater-Jara *et al.,* 2014),

mientras que otros autores no han encontrado diferencias entre el crecimiento de los cultivos control y aquellos tratados con este elicitor (Ketchum *et al.,* 1999; Bonfill *et al.,* 2006; Dong y Zhong, 2001). Estas diferencias en los resultados obtenidos, podrían explicarse, debido a que el efecto de los elicitores sobre los cultivos celulares depende no sólo de la naturaleza del propio elicitor, sino de múltiples factores como la especie vegetal en estudio, la línea celular, el estado de desarrollo del cultivo en el momento de la elicitación, la duración del tratamiento, etc. (Bonfill *et al.,* 2003).

4.3.2. Producción de taxanos

La producción de taxanos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los compuestos considerados fueron, 10-deacetilbacatina III (DABIII), bacatina III (BIII) y taxol (TX). Como se ha indicado anteriormente, el estudio se realizó en cultivos celulares de *T. baccata* tratados a lo largo de 21 días con HyproTaximin, el elicitor MeJa o simultáneamente con ambos compuestos. La acción positiva del elicitor MeJa sobre la producción de taxanos ya había sido demostrada repetidamente por varios grupos de investigación (Yukimune *et al.,* 1996; Kim *et al.,* 2004; Bentebibel *et al.,* 2005; Cusidó et al, 2007.; Onrubia *et al.,* 2010), sin embargo hasta el momento, no se habían estudiado los efectos de este péptido sobre la producción de taxanos. La adición de HyproTaximin, de MeJa o de ambos compuestos conjuntamente se llevó a cabo al transferir los cultivos desde el medio óptimo para el crecimiento al medio óptimo de producción, es decir al principio de la segunda fase del cultivo. En este momento, las suspensiones celulares se sonicaron durante unos

segundos en un baño de ultrasonidos con el fin de facilitar la entrada de los dos compuestos ensayados en las células.

En los cultivos elicitados con tan sólo MeJa o conjuntamente con HyproTaximin, la producción de los taxanos estudiados alcanzó su máximo a los 7 días, disminuyendo a continuación para llegar a valores prácticamente de la mitad, a los 14 días, y mantenerse en niveles muy similares hasta el final del cultivo a los 21 días (Fig. 40). La adición únicamente del péptido, aunque también incrementó los niveles de taxanos el día 7 de cultivo, en especial del taxol, no dio lugar a diferencias tan significativas con respecto al control. Con respecto al taxol, los niveles alcanzados de este taxano en los cultivos tratados con HyproTaximin y MeJa resultaron 6,6 veces superiores a los cultivos sin tratar mientras que los tratados solo con MeJa o con HyproTaximin incrementaron 4.7 y 2.0 veces, respectivamente.

A partir de los 7 días, ya no se observó ningún efecto positivo por parte de HyproTaximin sobre la producción de taxol, aunque las suspensiones celulares tratadas con MeJa, a los días 14 y 21 de cultivo, presentaron niveles de este taxano 2.5 y 3.0 veces superiores a los alcanzados por los cultivos control. En dichas muestras también se observó que la adición conjunta de ambos compuestos dio lugar a niveles de taxol siempre inferiores a los obtenidos en los cultivos tratados únicamente con MeJa. Previamente, Kim y colaboradores., habían observado que la máxima producción de taxol en cultivos elicitados con MeJa de *T. canadienses* y *T. cuspidata* tenía lugar a los 12-18 días después de la adición del elicitor, hecho que también habíamos constatado en estudios previos con cultivos celulares de *T. media* (Onrubia *et al.,* 2010). Sin embargo, como ya se ha comentado

anteriormente, la respuesta metabólica a un elicitor es dependiente de muchos factores, entre ellos la especie vegetal.

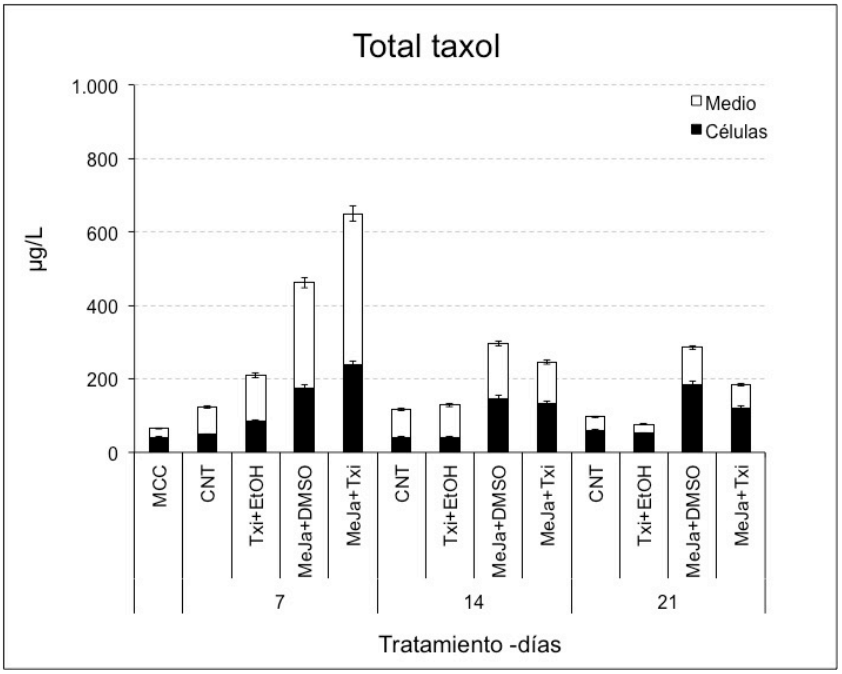

Figura 40. Niveles de Taxol (expresados en μg/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (Cnt) o elicitados con HyproTaximin (10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJa+Txi), a lo largo de 21 días de cultivo.

En relación con DABIII, los resultados de este estudio demostraron que, a los 7 días de cultivo, los incrementos con respecto al control fueron de 3,7, 3,6 y 1,3 veces en los cultivos tratados con ambos compuestos HyproTaximin y MeJa, con solo MeJa o únicamente con HyproTaximin, respectivamente (Fig. 41). Estos menores incrementos en la producción de DABIII con respecto a los indicados para taxol no respondieron a niveles inferiores de acumulación de dicho taxano, sino a una mayor producción del mismo en los cultivos control.

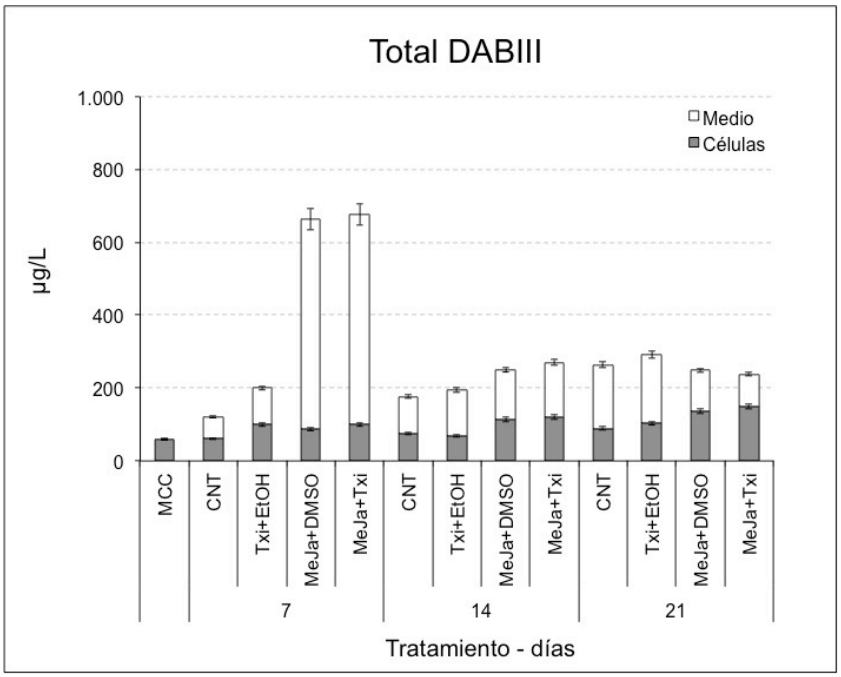

Figura 41. Niveles de DABIII (expresados en μg/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (Cnt) o elicitados con HyproTaximin (10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJa+Txi), a lo largo de 21 días de cultivo.

Estudios previos han demostrado que la DABIII es el taxano que se encuentra en mayor proporción los primeros días de cultivo y en condiciones de no elicitación (Nims *et al.,* 2006), mientras que la biosíntesis de bacatina III y especialmente la de los taxanos con cadena lateral, como el taxol, tiene lugar en momentos más tardíos del cultivo. A los 14 días del cultivo, la acción positiva del MeJa solo o asociado a HyproTaximin, disminuyó claramente con respecto al día 7, aunque todavía fue patente, mientras que al final del experimento, los contenidos de DABIII fueron superiores en los cultivos control que en los tratados con MeJa (Fig. 42).

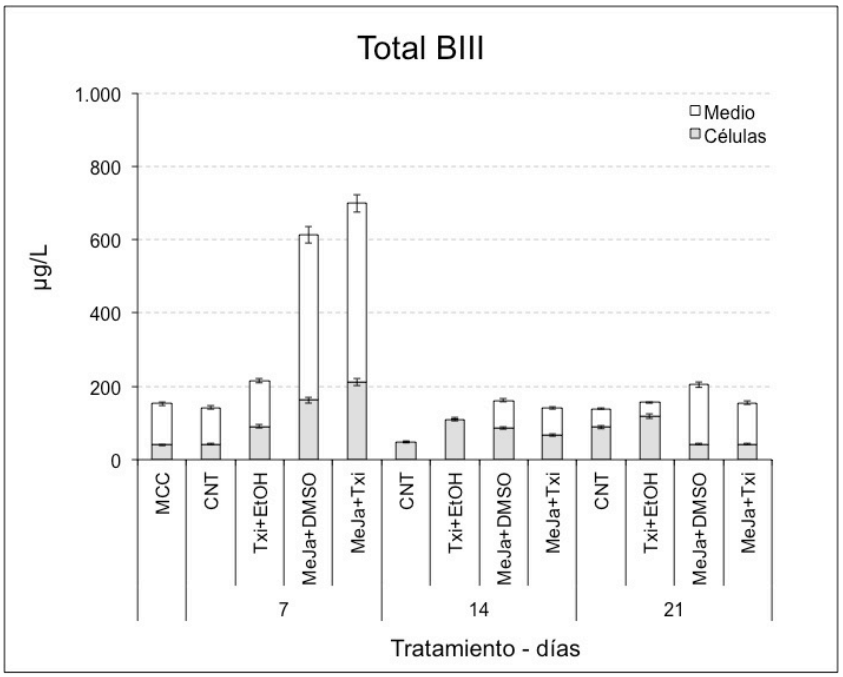

Figura 42. Niveles de BIII (expresados en μg/L) en cultivos celulares de *T. baccata* no tratados (Cnt) o elicitados con HyproTaximin (10 μM; Txi), jasmonato de metilo (100 μM; MeJa) o simultáneamente con ambos compuestos (MeJa+Txi), a lo largo de 21 días de cultivo.

Los incrementos de BIII en los cultivos tratados no fueron tan evidentes como en el caso del taxol, pero sí que resultaron superiores a los obtenidos para la DABIII. A los 7 días de elicitación, los niveles de BIII, en los cultivos doblemente tratados, los adicionados con MeJa y aquellos suplementados con HyproTaximin fueron 4.6, 4.0 y 1.4 veces superiores, respectivamente, a los alcanzados por los cultivos control. A partir de este momento, la acción de dichos elicitores sobre la producción de BIII disminuyó claramente, especialmente la observada a los 7 días para el HyproTaximin.

De los resultados comentados hasta el momento se puede deducir que HyproTaximin es un compuesto que, adicionado al medio de

cultivo no compromete significativamente el crecimiento ni la viabilidad celular, en cultivos celulares de *T. baccata*. Sin embargo el efecto más claro de la adición de este péptido al medio de cultivo se observó al determinar la acumulación de los taxanos DABIII, BIII y taxol. La presencia de HyproTaximin en el medio condicionó una incremento muy claro de los niveles de dichos taxanos que, en general, resultaron superiores en los cultivos suplementados conjuntamente con MeJa. Sin embargo, este aumento tan destacado sólo se hizo patente el día 7 de cultivo. Todo ello sugiere que HyproTaximin ejerció un efecto positivo, aunque transitorio sobre la producción de los taxanos estudiados y que su efecto fue aditivo con la acción del MeJa.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran también que DABIII o BIII, intermediarios clave de la biosíntesis del taxol, o el propio taxol no son productos finales de la ruta de formación de taxanos. El hecho de que estos compuestos alcancen su máximo a los 7 días, en presencia de elicitores, y que después sus niveles disminuyan drásticamente, aunque en condiciones control no se observe este pico de producción, indica que son compuestos metabólicamente activos y que una vez sintetizados pueden actuar como intermediarios metabólicos e incorporarse a caminos laterales que llevarían probablemente, a la formación de otros taxanos. El hecho de que el taxol una vez formado no se acumule como tal, sino que pueda sufrir cambios metabólicos que varíen su estructura y propiedades, incrementa las dificultades que presenta la utilización de los cultivos celulares para la obtención comercial del taxol, y confirma la necesidad de profundizar en el estudio de su metabolismo y de los factores que lo controlan.

Estudios previos realizados por De Geyter et al. (2012) parecen indicar que Taximin podría no actuar directamente como un regulador del metabolismo secundario vegetal, en contraste con la acción del elicitor MeJa. Por ello, es necesario llevar a cabo estudios funcionales más profundos para determinar si el Taximin actúa como un péptido endógeno que elicita el metabolismo secundario vegetal, tal como lo hacen los péptidos similares a la sistemina que se encuentran en las Solanaceae, o la familia de péptidos elicitores (PEP) que estaría involucrada en respuestas de defensa (Yamaguchi y Huffaker, 2011). Tampoco se debe descartar que el Taximin tenga una acción similar a hormonas peptídicas reguladoras del desarrollo vegetal, como son los péptidos ricos en cisteína (CRPs) (Yamaguchi y Huffaker, 2011; Colling *et al.,* 2015).

En su conjunto los resultados obtenidos revelan la acción del Taximin sobre el metabolismo de los taxanos pero que requieren más estudios, ya sea a nivel transcriptómico o metabolómico, para conocer con más profundidad su acción tanto sobre el crecimiento y desarrollo vegetal, como sobre el control del metabolismo secundario. La utilización de sistemas vegetales modelo como son *Arabidopsis thaliana* o *Medicago truncatula*, especies vegetales más fáciles de transformación podrían permitir un estudio de la acción de dicho péptido ya sea a través de la sobreexpresión o el silenciamiento del gen *TbTAX* de *T. baccata* o los homólogos que puedan tener estas plantas (Colling *et al*., 2016). A la vez, un estudio más profundo sobre los genomas de estas plantas modelo podría permitir reconocer al receptor del Taximin y las cadenas de traducción de sus señales.

A parte de la importancia que podrían tener estudios más profundos sobre las propiedades y acciones del péptido Taximin y su posible

utilización en programas biotecnológicos para la producción de compuestos vegetales de alto valor añadido, como es el caso del taxol, el gen *TbTAX*, al igual que algunos de sus homólogos de otras especies, podrían ser utilizados en estudios de biosíntesis combinatorial para generar nuevos metabolitos de interés farmacéutico. A la vez que su probable acción en respuestas a diferentes estreses, podrían dar lugar a plantas más resistentes, si son portadoras o sobreexpresan uno o varios genes que codifiquen para los péptidos análogos de Taximin.

4.4. Transformaciones por biolística

Como se ha comentado en el apartado Materiales y Métodos, el plásmido pK7WG2_BAPT, portador del gen que codifica para la enzima BAPT se clonó en células quimio-competentes (Cc) de E. coli DH5a. La incorporación de dicho plásmido en las células bacterianas proporcionó a las mismas capacidad de crecimiento en medio suplementado con espectinomicina y la presencia del gen *BAPT* se demostró en lisados celulares de las colonias crecidas en el medio de selección, mediante PCR para el gen *BAPT* (Fig. 43).

De entre las colonias bacterianas que dieron positivamente para la presencia del gen *BAPT* se seleccionó la colonia A1 para su posterior cultivo, con el fin de extraer el DNA plasmídico mediante la tecnología miniprep, obteniéndose el DNA plasmídico a una concentración de 189,9 ng/µL y con una ratio 260/280 de 1,79.

Por otra parte, se demostró la integridad de la construcción pIV2B2.1_VoGES portadora del doble promotor 35S del CaMV que controla la expresión del gen *VoGES* mediante digestiones con

enzimas de restricción. Empleando EcoRV el plásmido se fragmentó en los tres sitio esperados, con tamaños de banda de 3,2 ; 2 y 1,6 Kb coincidiendo el total con el tamaño de 6,81 Kb reportado para dicho plásmido, indicando que se encuentra completo. Las digestiones con XbaI y NotI linealizaron el plásmido, ya que los sitios de corte son únicos, confirmando el tamaño indicado. Éstos 2 enzimas fueron elegidos debido a que flanquean el gen *VoGES*, el cual se escindirá. La digestión conjugada con XbaI–NotI dió como resultado dos bandas: una de 5,2 Kb y otra de 1,6 Kb correspondiendo al tamaño del vector sin el gen *VoGES* y al tamaño del mismo respectivamente (Fig. 43).

El plásmido pIV2B2.1_VoGES también se clonó en Cc DH5α, aislando una de las colonias crecidas en medio de selección. Con dicha colonia se estableció un cultivo bacteriano en suspensión con el fin de extraer y purificar el plásmido clonado, mediante la tecnología miniprep, obteniendo una muestra a 225 ng/µL de concentración.

Una vez confirmada la integridad de los dos plásmidos a utilizar, se procedió a amplificar el gen BAPT con los cebadores FW1_XbaI y RV2_NotI, para poderlo incorporar al plásmido pIV2B2.1_VoGES, una vez eliminado la secuencia codificadora del gen GES, con el fin de poner el gen BAPT bajo el control del doble promotor 35S del CaMV. Todos los productos de PCR fueron concentrados en un gel para cortar la banda y purificar posteriormente el DNA empleando el kit Geneclean®. El producto de la reacción de la primera ligación se introdujo en el vector pGEM®-T Easy y se utilizó para transformar Cc DH5α siguiendo el protocolo ya indicado, con el fin de poder confirmar la correcta adición de los adaptadores.

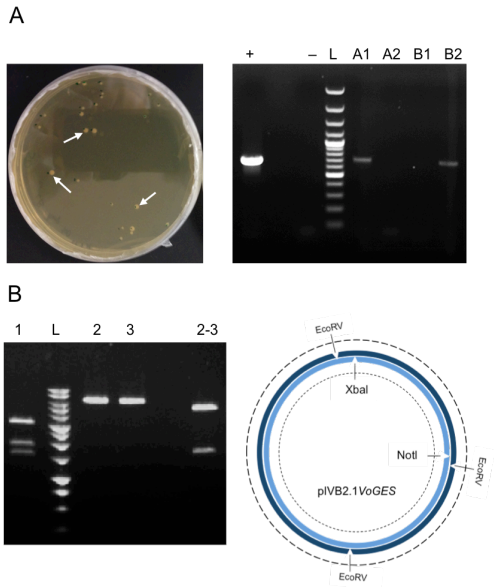

Figura 43. Confirmación de la integridad de los plásmidos seleccionados. **A**: (Izq) Colonias de *E. Coli* DH5α transformadas con plásmido pK7WG2_*BAPT* crecidas en medio de selección; (Der) PCR amplificando gen *BAPT*. **B**: (Izq) Digestión del plásmido pIV2B2.1_*VoGES* con EcoRV (1), XbaI (2), NotI (3) y XbaI-NotI conjugado; (Der) Esquema de digestión a pIV2B2.1_*VoGES.*

El cultivo bacteriano obtenido mediante el sistema pGEM®-T Easy fue distribuido por dispersión en placas conteniendo el medio LB Amp/IPTG/X-Gal, obteniéndose 20 clones positivos (blancos) los cuales fueron aislados y lisados en 20 µL de tampón TE para confirmar por PCR la ligación del gen $BAPT_{X\text{-}N}$, amplificando con los primers más adaptadores. Los clones 1A y 15P presentaron un tamaño de banda de 1,3 Kb el cual coincide con el gen insertado. Después de purificar el plásmido de dichas colonias, la digestión con EcoRI mostró un patrón de fraccionamiento con 2 bandas acorde a lo esperado. La mayor de éstas fue de aprox 3 kb que corresponde al tamaño del vector pGEM®-T Easy; siendo la banda de aprox 1,3 kb la correspondiente a nuestro inserto, lo que corroboró la ligación del gen *BAPT*. Éste plásmido fue nombrado pGEM_$BAPT_{X\text{-}N}$ (Fig. 44).

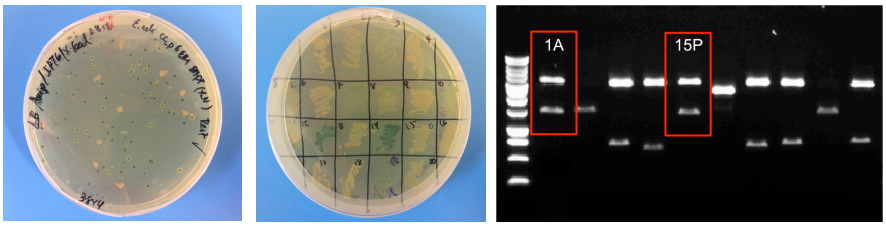

Figura 44. **Izq**: Escrutinio y aislamiento de colonias de *E. Coli* transformadas con gen *BAPT* más adaptadores en el vector pGEM®-T Easy. **Der**: Digestión del plásmido pGEM_*BAPT* con EcoRI.

Las muestras de los clones 1A y 15P fueron analizadas con los cebadores T7 y SP6, diseñados para amplificar en los vectores pGEM®.

Los resultados obtenidos del servicio de secuenciación fueron alineados empleando el programa ApE-A plasmid Editor v2.0.47. (Fig. 45: a-b).

El análisis demostró que la secuencia del clon 15P tiene un 99,925% de identidad con la secuencia del gen *BAPT* con los adaptadores. Los alineamientos de las secuencias con ambos cebadores coinciden en la sustitución de un aminoácido en la posición 1003 (enmarcada en rojo en ambos alineamientos) concretamente, de citosina por timina. Con el mismo software se realizó la traducción de secuencia para comprobar si éste cambio generaba una proteína diferente. El resultado demostró que la mutación detectada no era significativa ya que, al igual que la secuencia original de gen, la sustitución traduce para Leucina (Fig. 46). Con estos resultados se puede ratificar la correcta inserción del gen $BAPT_{X\text{-}N}$ al vector pGEM®.

Figura 45a. Alineamiento entre la secuencia del gen *BAPT* más el sitio de restricción de Xbal y el resultado de secuenciación con T7 para el clon 15P. En rojo la secuencia del sitio de corte. En cuadro rojo marca un cambio en la secuencia de la muestra analizada.

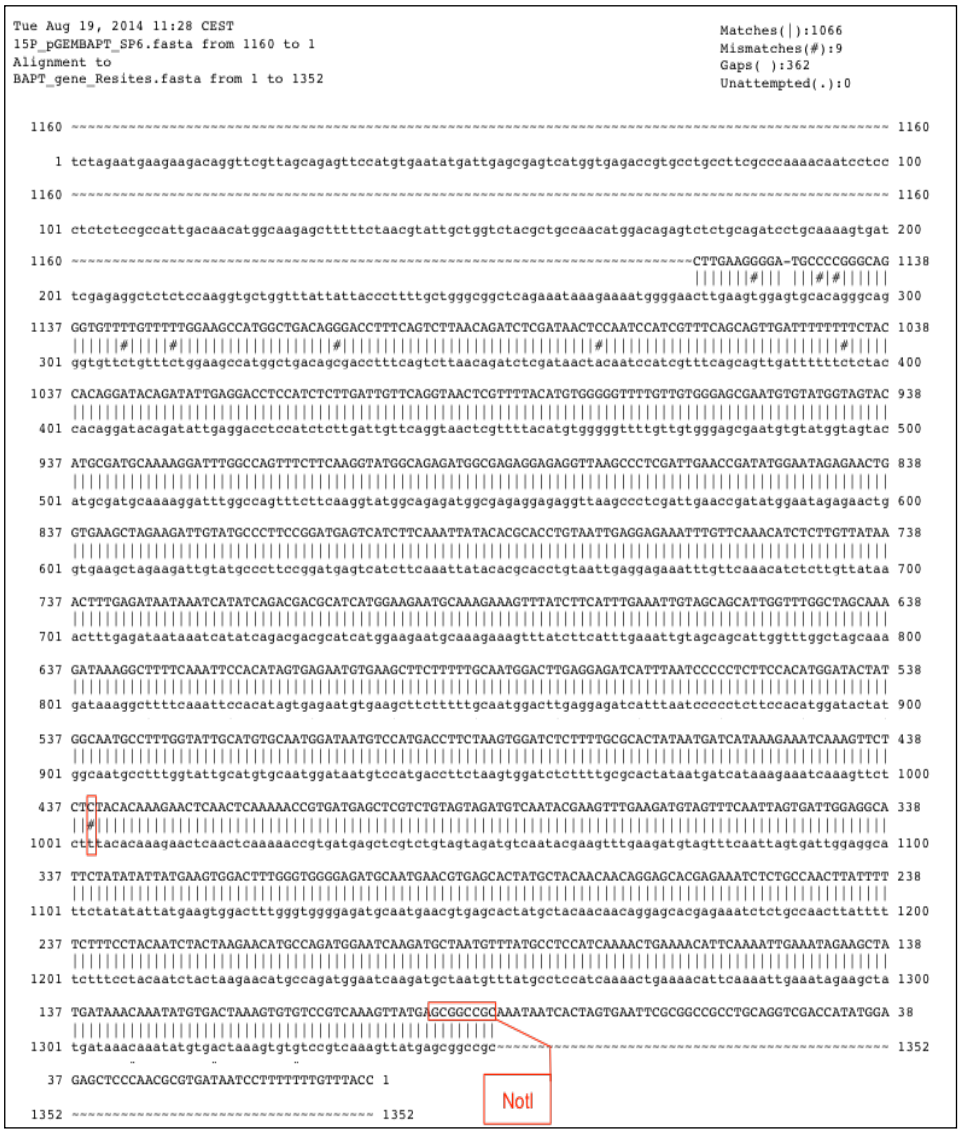

Figura 45b. Alineamiento entre la secuencia del gen BAPT más el sitio de restricción de NotI y el resultado de secuenciación con SP6 para el clon 15P. En rojo la secuencia del sitio de corte. En cuadro rojo marca un cambio en la secuencia de la muestra analizada.

Figura 46. Comprobación de la sustitución de aminoácido. Traducción y alineamiento de gen *BAPT* y la secuencia de la clona 15P pGEM_*BAPT*$_{X\text{-}N}$. Enmarcado en rojo la proteína resultante de la sustitución.

El paso subsiguiente fue crecer el clon 15P en medio LB+Amp100 para luego purificar el plásmido pGEM_*BAPT*$_{X\text{-}N}$ por miniprep, obteniendo el suficiente material para realizar las digestiones con los enzimas específicos. De igual manera se purificó el plásmido pIV2B2.1_VoGES para ser igualmente digerido. El resultado obtenido con cada construcción fue concentrado en gel para cortar las banda de interés y ser purificadas empleando el kit Geneclean®.

Para el primer caso se escindió la banda de aprox 1,3 Kb la cual corresponde al gen [inserto] *BAPT*$_{X\text{-}N}$, mientras que del segundo gel se cortó la banda de 5,2 Kb la cual concuerda con el tamaño del fragmento [vector] pIV2B2.1 el cual posee el Pd35S, como puede observarse en la (Fig. 47).

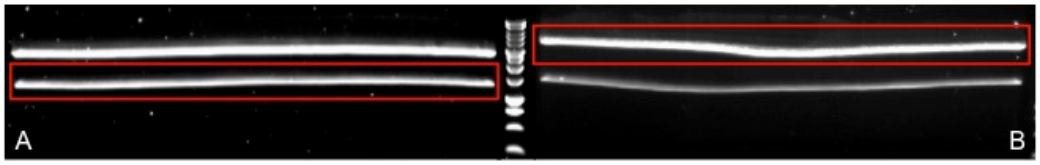

Figura 47. Digestión de plásmidos. **A**: Banda de 1,3 Kb correspondiente al gen *BAPT*$_{X\text{-}N}$ producto de la digestión de la construcción pGEM_*BAPT*$_{X\text{-}N}$; **B**: Banda de 5,2 Kb correspondiente al vector pIV2B2.1 producto de la digestión de la construcción pIV2B2.1_*VoGES*.

Una vez con los segmentos de DNA purificados se procedió a hacer la segunda ligación para generar el plásmido pIV2B2.1_BAPT. Conjugando 150 ng del vector más 468,6 ng del inserto (manteniendo la proporción 3:1 v/v) la ligación fue realizada según lo indicado en materiales y métodos. El producto de ligación fue clonado en Cc y distribuido en placas con medio de selección.

De las 51 colonias crecidas, sólo el clon 19c dio positivo en el escrutinio por PCR obteniendo banda de 1,3 Kb concordando con el tamaño del gen *BAPT*. La integridad de los sitios de restricción de este clon fueron corroborados mediante la digestión con los enzimas XbaI y NotI, observándose un patrón de fragmentación concordante con el tamaño del vector y del inserto, utilizados para generar el plásmido deseado (Fig. 48).

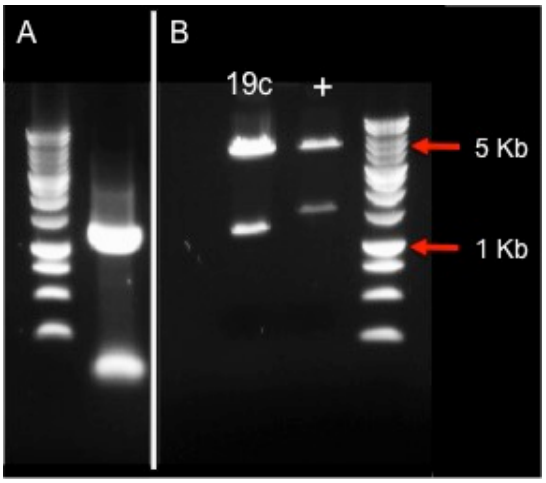

Figura 48. Confirmación de la ligación entre vector pIV2B2.1 y el inserto *BAPT*$_{X\text{-}N}$. **A**: PCR para amplificar gen *BAPT* de la clona 19c; **B**: Digestión con XbaI y NotI de la clona 19c y pIV2B2.1_VoGES como control (+).

El producto de miniprep de este clon fue enviada a secuenciación con los cebadores FW2, FW3, FWext y RV2, RV3, RVext con los cuales se comprobó la correcta inserción del gen *BAPT*. Los alineamientos, empleando ApE-A software, confirmaron que ambos sitios de restricción se encuentran inalterados después de la ligación así, como la secuencia del gen (Fig. 49).

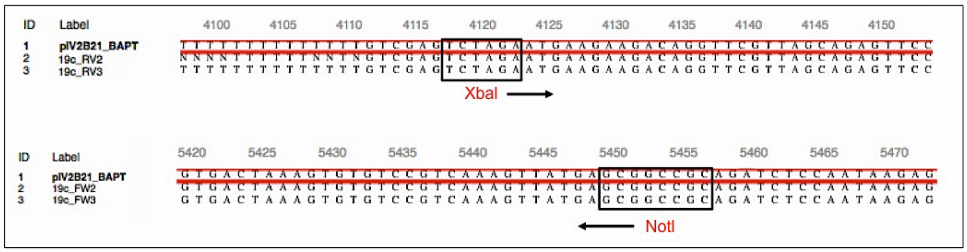

Figura 49. Alineamiento de la clona 19c con la construcción pIV2B2.1_*BAPT*. **Arriba**: enmarcada la secuencia del sitio de restricción para XbaI e inicio del gen *BAPT*; **Abajo**: enmarcada la secuencia del sitio de restricción para NotI y final del gen *BAPT* (+). **En rojo** la secuencia diseñada de la construcción.

Corroborada la integridad de los sitios de restricción y del gen, se estableció el cultivo bacteriano en suspensión en el medio LB+Gm10 líquido para conseguir una mayor cantidad del plásmido pIV2B2.1_BAPT. Mediante Maxiprep obtuvimos una concentración de 2,1 µg/µL de DNA plasmídico. Paralelamente, el plásmido pWRG15G15, con el gen reportero *gusA*, también fue clonado en Cc DH5α para después establecer un cultivo bacteriano en medio LB+Amp100 del cual, por Maxiprep, se obtuvo una concentración de 2,6 µg/µL de ésta construcción.

Con el suficiente DNA de ambos plásmidos a emplear, se realizó recubrimiento de las micropartículas de oro como se indica en materiales y métodos.

Para asegurar la eficiente selección de las células transformadas mediante el antibiótico de selección, primero se estudió cuál era la concentración del antibiótico que era capaz de inhibir el crecimiento y causar la muerte a las células no transformadas. Para ello se llevó a cabo un ensayo de sensibilidad a higromicina de los callos de *Taxus media*, utilizando concentraciones de 0, 10, 25, 50, 100, 125, 150 y 200 mg/L de higromicina. Los resultaron mostraron que la viabilidad celular ante éste antibiótico era dependiente de la concentración utilizada. El efecto negativo del antibiótico se hizo evidente sobre la supervivencia de los callos a partir de la concentración de 50 mg/L, inhibiendo el crecimiento celular en un 50%, mientras que a concentraciones mayores el daño causado llevó a un 70-95 % de muerte celular (Fig. 50). Estos resultados difieren de los obtenidos por Kim et al. (2000) y por Ketchum et al (2007), quienes encontraron que la concentración más efectiva de higromicina, como antibióticio de selección era de 10 mg/L y 2,5 mg/L, respectivamente. Sin embargo,

ambos autores utilizaron cultivos celulares de *T. cuspidata* en sus estudios y la concentración óptima del antibiótico para seleccionar un cultivo transformado es claramente dependiente no sólo de la especie vegetal, sino que también lo es de la línea celular utilizada.

En base a lo anterior, se escogió la concentración de 50 mg/L para seleccionar el material bombardeado, coincidiendo con ensayo previos realizados para éste género (Exposito *et al.,* 2010; Sykłowska *et al.,* 2015).

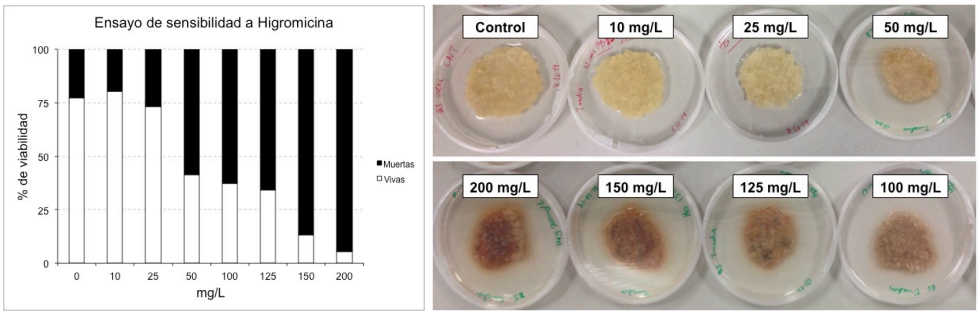

Figura 50. Ensayo de sensibilidad a Higromicina en callos de *Taxus media*.

Una vez ya recubiertas las nanopartículas de oro con las construcciones genéticas seleccionadas y establecida la concentración idónea del antibiótico de selección, se procedió a realizar los bombardeos a los callos de *Taxus media.*

Ensayo preliminares demostraron que someter a los callos a un segundo bombardeo no aumentaba la eficiencia de transformación sino que, al contrario, afectaba negativamente la capacidad de recuperación del material. Por ello se decidió efectuar sólo un "disparo" sobre los callos de *Taxus*. De igual manera y, pese a que un tratamiento osmótico de 24h previo al bombardeo se suele emplear para reducir el daño celular y mejorar la transformación, en nuestra

línea celular resulto ser perjudicial su exposición por tanto tiempo un medio suplementado con manitol. Por todo ello, se evaluaron 3 tiempos de exposición al medio osmótico: 4, 1 y 0 (control) horas.

Un total de 85 callos, por cada tratamiento osmótico, fueron bombardeados con nanopartículas cubiertas con los plásmidos pIV2B2.1_BAPT y pWRG15G15, con el fin de integrar el transgén BAPT para sobreexpresarlo y evaluar su influencia en la síntesis de taxol. Después de 48h en medio de recuperación (B5 crecimiento), 5 callos por tratamiento fueron inmersos en la solución X-Gluc O/N para observar la expresión transitoria del gen *gusA* (Fig. 51).

Los diferentes tiempos de exposición en el medio osmótico mostraron un promedio de 250 puntos azules por callo. Aunque en los tratamientos control y 1 h tuvieron valores mayores comparados al de 4h, las diferencias no fueron significativas entre los tiempos ensayados para la expresión transitoria de *gusA*.

El resto del material fue transferido a medio de selección con Hyg. Debido al tamaño reducido de los callos, se optó por reunir 2 de éstos, manteniendo los tratamientos por separado, para promover el crecimiento celular, lo cual redujo el número de 80 a 40 por tratamiento.

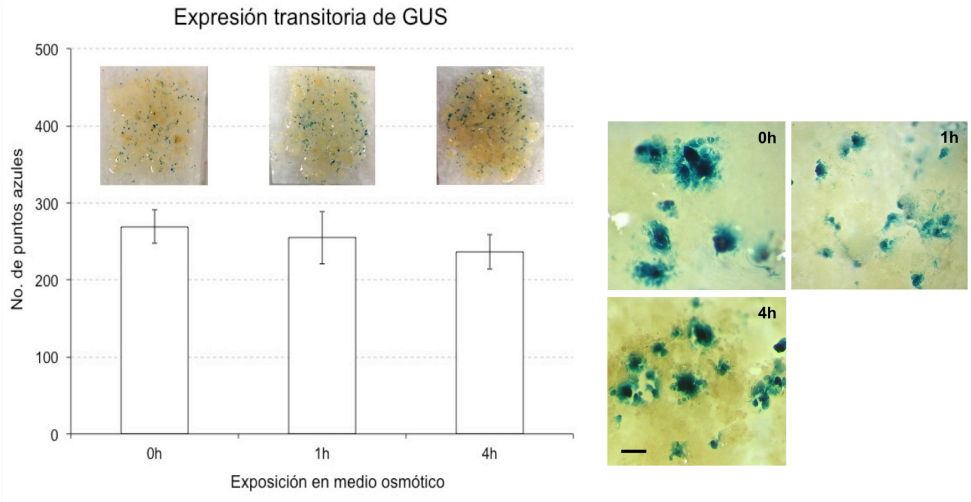

Figura 51. Expresión transitoria de gen *gusA*. **Der**: Promedio de células que expresan GUS en callos de *Taxus media* bombardeadas por biolística, luego de tratamientos de 4, 1 y 0 (cnt) horas en medio osmótico. **Izq**: Células con expresión de GUS. Células sin transformar como control negativo *C*; plásmido pWRG15G15 como control positivo +. (Barra = 250 µm).

Después de 3 meses de mantener los callos en medio sólido de selección, con subcultivo de 10 a 12 días, no se obtuvo un incremento notable de biomasa del material transformado; por el contrario, hubo un balance negativo debido a alta proporción de células que no presentaban el gen de resistencia al antibiótico reflejándose en una tasa de mortalidad (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes del escrutinio por selección sobre los callos de *Taxus media* transformados por biolística 90 días después del bombardeo.

Tratamiento osmótico previo	No. de callos bombardeados (2d)	No. de callos en medio + Hyg (90d)	% de material recuperado tras selección
0h (cnt)	40	10	25
1h	40	9	22,5
4h	40	6	15

Pese al poco material, muestras de los callos fueron inmersas en la solución X-Gluc para comprobar la expresión de gen *gusA* después de 3 meses en medio de selección con Hyg. A lo largo de este período la expresión del gen *gusA* fue disminuyendo. De un promedio de 250 células con expresión transitoria de GUS a los 2 días, se pasó, a los 3 meses, a un promedio de 7 células, aunque en este caso la expresión del gen reportero ya se considera estable. El promedio de células que expresaron el gen reportero en los callos que no fueron expuestos al medio con manitol (0h ó control) fue de 8, representando un 3% con respecto a la expresión transitoria registrada previa al bombardeo con las nanoparticulas cubiertas con nuestras construcciones. El resultado en el tratamiento de 1h en medio osmótico fue en promedio de 9,2 células fue similar con 3,5% de expresión de GUS. El menor porcentaje de células teñidas lo tuvo el pre-tratamiento osmótico de 4h con 1,7%. Solo el tratamiento de 4h presentó diferencias significativas con los de 0 y 1 h .(Fig. 52)

Aunque tan sólo un bajo número de células presentaron una transformación estable con el sistema de transferencia directa de DNA en nuestra línea celular de *Taxus media*, la inserción del transgén fue positiva. Con el fin de mejorar la formación de biomasa de las células transformadas, se establecieron cultivos en suspensión de las 3 condiciones ensayadas, partiendo de un inóculo de 2 g de células en 20 mL de medio B5 modificando la concentración del antibiótico Hyg a 2,5 mg/L (Ketchum *et al.,* 2007). Los cultivos se mantuvieron a 25ºC /100 rpm, subcultivando cada 10-12 días.

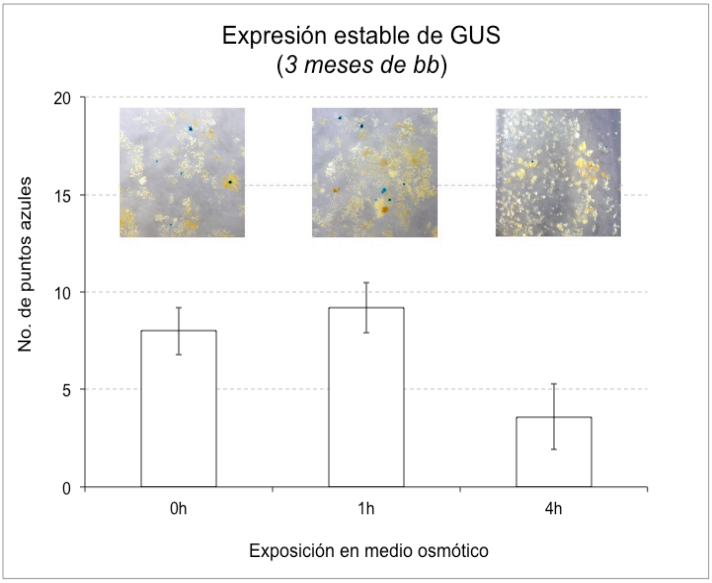

Figura 52. Expresión estable de gen *gusA*. Promedio de células de *Taxus media* que expresan GUS en callos en medio de selección, tras 3 meses del bombardeo por biolística, variando en el tiempo de pre-tratamiento en osmótico.

Después de 24 meses de establecidos los cultivos en suspensión para selección, se efectuó nuevamente el ensayo histoquímico para el egn *gusA*. La cuantificación de las células que expresaba GUS mostró un aumento en el material transformado con respecto a lo reportado tras 3 meses del bombardeo. El tratamiento control (0h) paso de 8 a 206 células con expresión de gen reportero, siendo 25 veces mayor. En el tratamiento de 1h el incremento fue 22 superior, pasando de 9 a 200 células teñidas. Para el caso del tratamiento de 4h en osmótico, se paso de 4 células promedio a 124 significando una diferencia 31 veces mejor a lo expresado en 3 meses de selección (Fig. 53). Aunque la mejor recuperación en la formación de biomasa de células transformadas se suscitó en el tratamiento de 4h en osmótico, éste fue el evento con menos células al cabo de 24 meses del bombardeo.

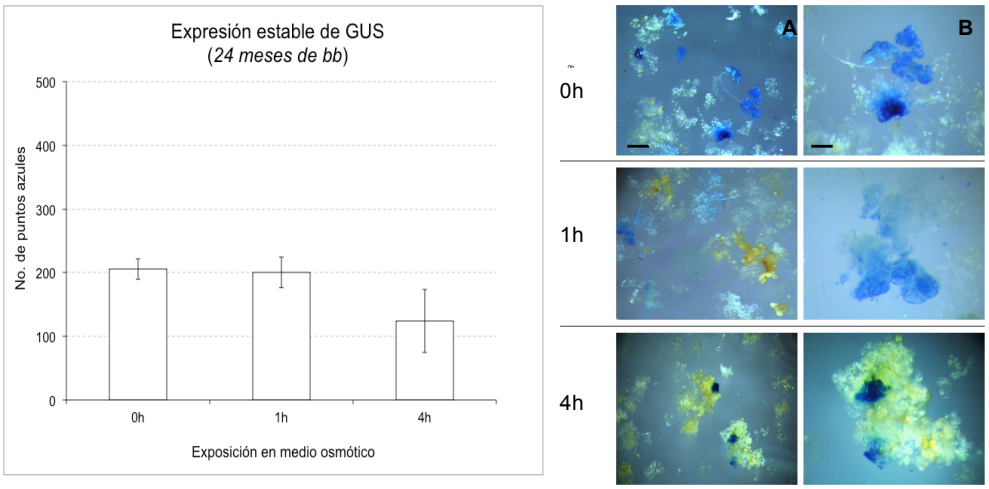

Figura 53. Expresión estable de gen *gusA*. **Izq**: Promedio de células de *Taxus media* que expresan GUS en suspensiones con Hyg, tras 24 meses del bombardeo por biolística, variando en el tiempo de pre-tratamiento en osmótico. **Der**: Células con expresión de GUS en los distintos pre-tratamientos osmóticos (A: Barra = 1 mm; B: Barra = 250 µm).

Si bien la recuperación en el número de las células con transformación estable, después de 24 meses, presenta una tendencia similar con lo observado en la expresión transitoria del gen gusA a los 2 días del bombardeo, éstas tuvieron un porcentaje inferior en la cantidad de células que expresan el gen reportero GUS, siendo de 24, 21 y 47 % en los tratamientos de 0, 1 y 4 h de exposición en el medio osmótico respectivamente.

A causa de la enorme demanda mundial de taxol y taxanos de interés para su utilización clínica frente a diversos procesos tumorales, se ha planteado también el empleo de estrategias de transformación genética para activar, mediante la aplicación de la ingeniería metabólica, los pasos claves de la ruta de síntesis de dichos compuestos, con el fin de incrementan su producción biotecnológica.

Debido a que, actualmente, la producción biotecnólogica de taxol y sus precursores biosintéticos esta basada en el establecimiento y cultivo de líneas celulares muy productivas, para la obtención de los taxanos de interés no es necesario regenerar planta. Por ello, la transformación genética de los cultivos de células en suspensión resulta un buen sistema, puesto que la optimización de la producción se puede llevar a cabo posteriormente ya que para ello existen estrategias muy conocidas y utilizadas. Sin embargo, muy pocos grupos de investigación han logrado la transformación genética de cultivos celulares de *Taxus sp*. (Ketchum *et al.,* 2007; Vongpaseuth *et al.,* 2007; Kim *et al.,* 2000; Exposito *et al.,* 2010).

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la posibilidad de regular la expresión de genes flujo-limitantes de la ruta de síntesis de taxanos mediante ingeniería metabólica. La sobreexpresión del gen que codifica para la enzima TXS, junto con la adición del elicitor metil jasmonato resultó en una notable mejora al incrementar los niveles de taxol producidos en un 265% respecto al control elicitado sin transformar (Exposito *et al.,* 2010). Otros pasos limitantes de la síntesis de taxol son aquellos que se encuentran al final de la ruta biosintética y que aun en presencia de elicitores, los genes que los controlan, no incrementan claramente su expresión genética. Entre ellos destaca el gen que codifica para la enzima baccatina III: 3-amino-3- fenilpropanoíl transferasa (BAPT), responsable de la esterificación del grupo hidroxilo C13 de bacatina III con la cadena lateral de β-fenilalanoil-CoA. Respecto a dicho gen se ha demostrado que sus niveles de expresión y la producción de taxol están totalmente relacionados (Nims *et al.,* 2006; Onrubia *et al.,* 2011; Onrubia 2012). Por todo ello, nuestro planteamiento fue diseñar una

construcción genética con el fin de obtener, mediante biolística, cultivos celulares de *Taxus* capaces de para sobreexpresar el gen *BAPT* bajo el control de un doble promotor 35S.

El sistema de transferencia directa de DNA por biolística con nanoparticulas de oro ha demostrado ser un sistema muy efectivo para la transformación genética de especies vegetales que se muestras recalcitrantes a la infección por *Agrobacterium*. A la vez, este sistema ofrece la posibilidad de transformar simultáneamente con diferentes construcciones genéticas un mismo material, pudiendo obtener cultivos celulares/plantas capaces de expresar a la vez diversos transgenes. Entre los éxitos más destacados logrados mediante esta metodología destacan la obtención de plantas de arroz biofortificadas para diferentes elementos minerales, plantas de maíz productoras de proteínas recombinantes con alta efectividad en medicina, plantas productoras de compuestos secundarios de interés, etc (Banakar *et al.,* 2017; Vamvaka *et al.,* 2016; Zanga *et al.,* 2016; Bai *et al.,* 2017).

Por la dificultad que presentan en general las plantas gimnospermas para ser transformadas mediante el sistema *Agrobacterium*, se ha ensayado con bastante éxito la transformación genética mediante biolística, especialmente en especies de *Pinus*, como por ejemplo *Pinus patyla* (Nigro *et al.,* 2004), *Pinus nigra,* (Salaj *et al.,* 2005), y *Pinus radiata*, (Lynette *et al.,* 2005; Wagner *et al.,* 2005). Con respecto a *Taxus*, existe muy poca información sobre la utilización de dicha tecnología en plantas o cultivos celulares, aunque existen algunos trabajos que apoyan su eficacia (Vongpaseuth *et al.,* 2007). Por ello en este trabajo se ha planteado la utilización de la biolística

para el establecimiento de cultivos celulares transformados de *Taxus media.*

Un punto clave para el éxito de la transformación genética mediante esta tecnología es la cantidad de veces que se debe bombardear el material biológico para lograr mayor porcentaje de transformación. Previamente, Vongpaseuth *et al.,* (2007) habían observado que el aumento de bombardeos daba lugar a un incremento de la eficiencia de transformación, medida como actividad luciferasa, aunque la respuesta en las dos líneas celulares que bombardeó no era la misma. En nuestro caso más de un "disparo" con las nanopartículas de oro resultó perjudicial para la recuperación de nuestra línea celular, razón por la cual se estandarizó a un solo evento de transformación por callo. Esto demuestra que para encontrar la máxima eficiencia de transformación mediante la técnica biolística se deben ensayar muchas variables ya que cada línea celular responde de diferente manera a un mismo tratamiento.

Respecto a la utilización de un gen reportero para poder determinar el éxito de la transformación hay que tener muy en cuenta si el material vegetal utilizado presenta respuesta positiva endógena. En nuestro caso se ha utilizado el gen reportero *gusA*. Ensayos anteriores realizados por Ketchum *et al.,* (2007) informaron sobre la posible respuesta positiva al ensayo GUS de las células de *Taxus cuspidata* sin transformar, sin embargo posteriormente se demostró que este resultado se debía a la presencia aun remanente de *Agrobacterium* portador del gen *gusA*. En nuestro caso ninguno de los controles, es decir cultivos no sometidos a biolística resultaron positivos para el ensayo GUS.

En nuestros ensayos de transformación, el número de células con expresión transitoria de *gusA* (48h) no presentó diferencias significativas entre los pre-tratamientos en medio osmótico de 4, 1 y 0 horas (Fig. 54). Tomando como base que la densidad de células en un gramo de peso fresco de éstas es de $1,9x10^6$ (Ketchum *et al.,* 2007) nuestra eficiencia de transformación a las 48h del bombardeo fue en promedio de 0,013%.

Después de 3 meses de selección, la expresión del reportero resultó menor en los callos sometidos a 4h de pretratamiento osmótico, con diferencia significativa, en el número de células con transformación estable, con una densidad de 0,0001% comparado con el 0,0004% de los otros 2 tratamientos. Después de 24 meses de la transformación y del mantenimiento de los cultivos en suspensión, el número de células que expresaron *gusA* fue de 0,010% en pre-tratamiento osmótico de 1 y 0 horas siendo similares a los obtenidos en la expresión transitoria, en tanto que para 4h fue de un 0,0065%. Esto datos reconfirman la gran dificultad que para conseguir y mantener células transformadas del *Taxus.*

Estos resultados demuestran la eficiencia de la biolística para la transformación estable de cultivos celulares de *Taxus media*. Aunque a los 3 meses de la transformación se observó una disminución muy clara en la actividad del gen *gusA,* lo cual demostró una baja proporción de células transformadas respecto al total, a los 2 años se ha observado un claro incremento de dicha actividad (Fig. 54).

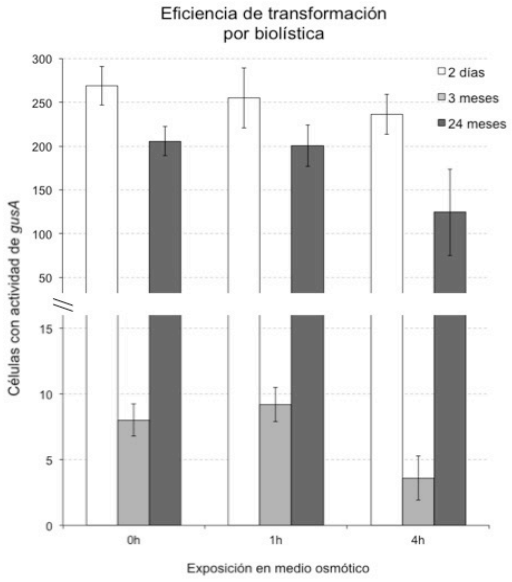

Figura 54. Crecimiento de células transformadas por biolística. Eficiencia de transformación en callos de *Taxus media* tras bombardeo con nanopartículas cubiertas con los plasmidos pIV2B2.1_BAPT y pWRG15G15 luego de 2 años.

Puesto que los cultivos se han mantenido en presencia del antibiótico de selección, las células no transformadas han ido desapareciendo con el tiempo y tan solo las transformadas han seguido su crecimiento, lo que demuestra que la transformación es estable. El problema que presentan los cultivos de *Taxus* es su lento crecimiento, y en el caso de los cultivos transformados este problema se ha hecho más marcado, ya que aunque las células se mantienen con una alta viabilidad su capacidad de división se ha visto muy afectada y por tanto, el aumento de biomasa es muy limitado. Por ello, hasta este momento no se ha tenido material suficiente de cada línea celular transformada para poder estudiar la integración y expresión del gen *BAPT* en el genoma las mismas por qPCR y Northern blot análisis, así como tampoco se ha podido determinar la acción de la presencia

de dicho gen sobre la biosíntesis de taxol y taxanos relacionados. Estos estudios están previsto que se llevarán más adelante, en cuanto se haya optimizado el crecimiento de las líneas celulares transformadas.

Solo en base a la expresión estable del gen *gusA* y consecuentemente a la probable integración del gen *BAPT* en el genoma de nuestras líneas celulares, éste sería el primer caso de transformación estable por biolística en *Taxus* que integra un gen clave flujo limitante sobreexpresado, para la síntesis de taxol.

5. CONCLUSIONES

El objetivo de éste trabajo de investigación a sido desarrollar y mejorar estrategias biotecnológicas para la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus* spp. suplementados con nuevos potenciales elicitores. De igual manera, mediante transformación genética por biolística, el generar líneas celulares que sobreexpresen genes claves que regulan la ruta metabolíca de taxanos para la incrementar su obtención. Concluido nuestro estudio, tras analizar y discutir los resultados obtenidos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

I. En los cultivos celulares elicitados de *T. media,* y de *V. vinífera*, se presentó un efecto sinérgico favorable en la producción de taxanos al darse la interacción con Coronatina y β-ciclodextrinas, siendo con PDFdegas donde se registró la mayor producción. Con esto resultados se confirma la efectividad de los elicitores para incrementar la producción en ambas especies

II. Los tratamientos conjugados donde estuvieron presentes Coronatina y β-ciclodextrinas demostraron ser los más efectivos sobre la producción de taxanos y *t*-resveratrol, respectivamente, que aquellos con los elicitores suplementados individualmente.

III. Los perfiles de expresión de los genes clave en la biosíntesis de taxanos, en los cultivos celulares elicitados de *Taxus media*, demostraron una reprogramación de la expresión

génica, siendo diferencial de a cuerdo al elicitor empleado, siendo indispensable para esto la presencia de Coronatina y β-ciclodextrinas conjugada. En el caso de *V. vinífera* el comportamiento en la expresión fue similar, aumentando en presencia de Jasmonato de metilo y β-ciclodextrina.

IV. Con estudios previos de la variación de los perfiles transcriptómicos en cultivos elicitados de *Taxus* spp, determinada por cDNA-AFLP se identificò el gen *TB595* codifica para el péptido Taximin.

V. La adición del homólogo HyproTaximin en los cultivos celulares, incrementó los niveles de taxanos conjuntamente con MeJa, teniendo un efecto transitorio pero notable, sobre la producción de taxol y taxanos relacionados, lo que lo propone como miembro de la familia de péptidos elicitores involucrado en mecanismo de defensa.

VI. Se logró estandarizar un protocolo de transformación para nuestra línea celular de *T. media*, superando así la dificultad que presenta el sistema biológico empleado a las modificaciones de éste tipo.

VII. El sistema de transferencia directa de DNA por biolística con nanoparticulas de oro, resultó efectivo para la transformación genética estable de células de *T. media*. La eficiencia de

transformación, aunque efectiva, resultó baja debido a la afectación de las células en su proceso de formación de biomasa.

VIII. De ser confirmada la transformación, sería de los primeros casos de sobreexpresión de un gen clave flujo limitante en *Taxus*, logrado por biolística.

BIBLIOGRAFíA

Adrian MP and Jeandet P. Trans-resveratrol as an antifungal agent, in: BB Agrawal, BB, Shishodia S. (Eds.). Resveratrol in Health and Disease. CRC Press 2006; 475–497.

Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. Science. 2010; 330:70-74.

Almagro L, Belchí-Navarro S, Sabater-Jara AB, Vera-Urbina JC, Selles-Marchart S, Bru R, Pedreño MA. Bioproduction of trans-resveratrol from grapevine cell cultures In Handbook of Natural Products, (Ramawat KG, editor and Merillon JM, editor., eds). 2013; 1683–1713. Heidelberg: Springer.

Almagro L, Belchí-Navarro S, Martínez-Márquez A, Bru R, Pedreño MA. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and coronatine. Plant Physiology and Biochemistry. 2015; 97:361-367.

Almagro L, Garcia-Perez P, Belchi-Navarro S, Sanchez-Pujante PJ; Pedreño MA. New strategies for the use of *Linum usitatissimum* cell factories for the production of bioactive compounds. Plant Physiology and Biochemistry. 2016; 99:73-78.

Arimura GI, Ozawa R, Horiuchi JI, Nishioka T, Takabayashi J. Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. Biochem Sys Ecol. 2001; 29:1049–1061.

Baebler S, Hren M, Camloh M, Ravnikar M, Bohanec B, Plaper I, Ucman R, Zel J. Establishment of cell suspensions cultures of yew (*Taxus×media* Rehd.) and assessment of their genomic stability, In Vitro Cell. Dev Biol Plant. 2005; 41:338–343.

Bai C, Berman J, Farre G, Capell T, Sandmann G, Christou P, Zhu C. Reconstruction of the astaxanthin biosynthesis pathway in rice endosperm reveals a metabolic bottleneck at the level of endogenous

β-carotene hydroxylase activity. Transgenic Research. 2017; 26:13–23.

Banakar R, Alvarez Fernández A, Abadía J, Capell T, Christou P.The expression of heterologous Fe (III) phytosiderophore transporter HvYS1 in rice increases Fe uptake, translocation and seed loading and excludes heavy metals by selective Fe transport. Plant Biotechnology Journal. 2017; 15:423–432

Bate NJ and Rothstein SJ. C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. Plant J. 1998; 16:561–569.

Beekwilder J, Wolswinkel R, Jonker H, Hall R, de Vos CH, Bovy A. Production of Resveratrol in Recombinant Microorganisms. Appl Environ Microbiol. 2006; 72: 5670-5672.

Belchí-Navarro S, Pedreño MA, Corchete P. Methyl jasmonate increases silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaernt cell cultures treated with β-cyclodextrins. Biotechnol Lett. 2011; 33:179–184.

Belchí-Navarro S, Almagro L, Lijavetzky D, Bru R, Pedreño MA. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. Plant Cell Rep. 2012; 31:81–89.

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

Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1999; 63:266–292.

Bentebibel S, Moyano E, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Eibl R, Piñol MT. Effects of immobilization by entrapment in alginate and

scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. Biotechnology and Bioengineering. 2005; 89:647-655.

Bonfill M, Palazón J, Cusidó RM, Joly S, Morales C, Piñol MT. Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzymeA reductase activity in *Taxus x media* cells. Plant Physiol. Biochem. 2003; 41:91-96.

Bonfill M, Expósito O, Moyano E, Cusidó RM, Palazón J, Piñol MT. Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus*, In Vitro Cell. Dev Biol Plant. 2006; 42:422–426.

Capell T and Christou P. Progress in plant metabolic engineering. Curr Opin Biotechnol. 2004; 15148-154.

Christou P, Ford T, Kofron M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Biotechnology. 1991; 9:957–62.

Choi YE, Kim YS, Paek KY. Types and designs of bioreactors for hairy root culture. In: Gupta SD, Ibaraki Y (eds) Plant tissue culture engineering. 2008. Springer, Dordrecht.

Chu M, Pedreño MA, Alburquerque N, Faize L, Burgos L, Almagro L. A new strategy to enhance the biosynthesis of trans-resveratrol by overexpressing stilbene synthase gene in elicited *Vitis vinifera* cell cultures. Plant Physiology and Biochemistry. 2017; 113:141-148.

Colling J, Takayuki T, De Clercq R, Brunoud G, Vernoux T, Fernie AR, Makunga NP, Goossens A, Pauwels L. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* signalling peptide TAXIMIN1 affects lateral organ development. J Exp Bot. 2015; 66:5337-5349.

Colling J, Pollier J, Bossche RV, Makunga NP, Pauwels L, Goossens A. Hypersensitivity of Arabidopsis TAXIMIN1 overexpression lines to light stress is correlated with decreased sinapoyl malate abundance and countered by the antibiotic cefotaxime. Plant Signal Behav. 2016.1143998.

Collins-Pavao M, Chin CK, Pedersen H. Taxol partitioning in two-phase plant cell cultures of *Taxus brevifolia*. Journal of Biotechnology. 1996; 49:95-100.

Croteau R, Ketchum R, Long RM, Kaspera R, Wildung MR. Taxol biosynthesis and molecular genetics. Phytochem. 2006; 5:75-97.

Cusidó RM, Palazón J, Navia-Osorio A, Mallol A, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. Production of Taxol and baccatina III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. Plant Sci. 1999; 146:101-107.

Cusidó RM, Palazón J, Navia-Osorio A, Mallol A, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. Production of taxol® and baccatine III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. Plant Sci. 1999; 146:101–107.

Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus* × *media*. Biotech Progr. 2002; 18:418–423.

Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Expósito O, Moyano E, Piñol MT. Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*. Biochemical Engineering Journal. 2007; 33:159–167.

Cusidó RM, Onrubia M, Sabater-Jara AB, Moyano E, Bonfill M, Goossens A, Pedreño MA, Palazón J. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. Biotechnol Adv. 2014; 32:1157-1167.

Dai Y, Qin Q, Dai D, Kong L, Li W, Zha X, Jin Y, Tang K. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding methyl jasmonate-

responsive transcription factor TcAP2 from *Taxus cuspidata*. Biotechnol Lett. 2009; 31:1801-1809.

Davis EM and Croteau R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. Top Curr Chem. 2000; 209:53–95.

De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. Trends Plant Sci. 2012; 17:349-359.

Dong HD, Zhong JJ. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. Biochemical Engineering Journal. 2001; 8:145–150.

Donnez D, Jeandet P, Clément C, Courot E., Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. Trends Biotechnol. 2009; 27:706-713.

Duncan DR, Widholm JM. Measurements of viability suitable for plant tissue cultures. Methods Mol. Biol. 1990; 6:29–37.

Engelberth J, Alborn HT, Schmelz EA, Tumlinson JH. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101:1781–1785.

Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili MH, Cusidó RM, Palazón J. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 2009; 9:109-121.

Expósito O, Syklowska-Baranek K, Moyano E, Onrubia M, Bonfill M, Palazón J, Cusidó RM. Metabolic responses of *Taxus media* transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate. Biotechnol Prog. 2010; 26:1145-1153.

FAO. The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) - Managing systems at risk. Food and

Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London. 2011.

Farag MA and Paré PW. C6-green volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. Phytochemistry. 2002; 61:545–554.

Farag MA, Fokar M, Abd H, Zhang H, Allen RD, Paré PW. (Z)-3-hexenol induces defense genes and downstream metabolites in maize. Planta. 2005; 220:900–9.

Farmer EE and Ryan CA. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87:7713–7716.

Farmer EE. Surface-to-air signals. Nature. 2001; 411:854–856.

Farmer EE, Almeras E, Krishnamurthy V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. Curr Opin Plant Biol. 2003; 6:372–378.

Fett-Neto AG, DiCosmo F. Taxol and taxane production by cell culture. In: Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine. 1997; Vol. 6. VCH Verlagsgesllschaft mbH: Weinheim.

Fornalè S, Esposti DD, Navia-Osorio A, Cusidò RM, Palazòn J, Piñol MT. Taxol transport in *Taxus baccata* cell suspension cultures. Plant Physiol. Biochem. 2002; 40:81–8.

Furmanowa M and Syklowska-Baranek K. Hairy root cultures of *Taxus x media* var. Hicksii Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III. Biotechol Lett. 2000a; 22:683-686.

Furmanowa M, Oledzka H, Syklowska-Baranek K, Józefowicz J, Gieracka S. Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidata* and *Taxus×media* by some elicitors and precursors, Biotechnology Letters. 2000b; 22:1449–1452.

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

Gaosheng H and Jingming J. Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants. In: Leva A, Rinaldi LMR (eds) Recent advances in plant *in vitro* culture, InTech. 2012;DOI: 10.5772/53038.

Giovinazzo G, Ingrosso I, Paradiso A, De Gara L, Santino A. Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional improvement of food.Plant Foods Hum Nutr. 2012; 67:191-9.

Goossens A, Hakkinen ST, Laakso I, Seppanen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Soderlund H, Zabeau M, Inzé D, Oksman-Caldentey KM. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003; 100:8595-8600.

Guo BH, Kai GY, Jin Hb, Tang KX. Taxol synthesis. Afr J Biotechnol. 2006; 5:15-20.

Häkkinen ST, Tilleman S, Swiatek A, De Sutter V, Rischer H, Vanhoutte I, Van Onckelen H, Hilson P, Inzé D, Oksman-Caldentey KM, Goossens A. Functional characterisation of genes involved in pyridine alkaloid biosynthesis in tobacco. Phytochemistry. 2007; 68:2773-2785.

Han KH, Fleming P, Walker K, Loper M, Chilton WS, Mocek U, Gordon MP, Floss HG. Genetic transformation of mature *Taxus*: an approach to genetically control the *in vitro* production of the anticancer drug, taxol. Plant Sci. 1994; 95:187-196.

Hao DC, Xiao PG, Ge GB, Ming M. Biological, chemical, and omics research of Taxus. Med Resour Drug Develop Res. 2012; 73:477–86.

Hatanaka A, Kajiwara T, Sekiya J. Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. Chem Phys Lipids. 1987; 44:341–361.

Held M, Boulaflous A, Brandizzi F. Advances in fluorescent protein-based imaging for the analysis of plant endomembranes. Plant Physiol. 2008; 147:1469-1481.

Ho CK, Chang SH, Lung J, Tsai CJ, Chen KP. The strategies to increase taxol production by using *Taxus mairei* cells transformed with TS and DBAT genes. Int J Appl Sci Eng. 2005; 3:179-185.

Hu Y, Gai Y, Yin L, Wang X, Feng C, Feng L, Li D, Jiang XN, Wang DC. Crystal structures of a *Populus tomentosa* 4-coumarate:CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms. Plant Cell. 2010; 22:3093-3104.

Jennewein S, Long RM, Williams RM, Croteau R. Cytochrome P450 taxadiene 5a-hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis. Chemistry and biology. 2004a; 11:379–387.

Jennewein S, Wildung MR, Chau M, Walker K, Croteau R. Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2004b; 101:9149-9154

Karimi M, Inzé D, Depicker A. GATEWAYTM vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends Plant Sci. 2002; 7:193–5

Katsir L, Schilmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe, G.A. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. Proc Natl Acad Sci. USA. 2008; 105:7100–7105

Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. Biotechnology and Bioengineering. 1999; 62:97-105.

Ketchum R, Wherland L, Croteau R. Stable transformation and long-term maintenance of transgenic *Taxus* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 2007; 26:1025-1033.

Kim BJ, Gibson DM, i Shuler ML. Effect of subculture and elicitation on instability of Taxol production in *Taxus sp*. suspension cultures. Biotechnology Progress. 2004; 20:1666-1673.

Kim BJ, Gibson DM, i Shuler ML. Relationship of viability and apoptosis to taxol production in *Taxus sp*. suspensions cultures elicited with methyl jasmonate. Biotechnology Progress. 2005; 21:700-707.

Kim JA, Baek KH, Son YM, Son SH, Shin H. Hairy root cultures of *Taxus cuspidata* for enhanced production of paclitaxel. J Korean Soc Appl Biol Chem. 2009; 52:144-150

Kiselev KV, Dubrovina AS, Vuslova MV, Bulgakov VP, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. J. Biotechnol. 2007; 128:681-692.

Kiselev KV. Perspectives for production and application of resveratrol. Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 90:417–425.

Lackman P, González-Guzmán M, Tilleman S, Carqueijeiro I, Pérez AC, Moses T. Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; 108:5891-5896.

Langcake P and Pryce RJ.The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. Physiol. Plant Pathol. 1976; 9:77–86.

Lenka SK, Boutaoui N, Paulose B, Vongpaseuth K, Normanly J, Roberts SC, Walker EL. Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing *Taxus cuspidata* suspension culture cells. BMC Genomics. 2012; 13:148

Li FL, Ma XJ, Hu XL, Hoffman A, Dai JG, Qiu DY. Antisense-induced suppression of taxoid 14b-hydroxylase gene expression in transgenic *Taxus x media* cells. Afr J Biotechnol. 2011; 10:8720-8.

Li ST, Zhang P, Zhang M, Fu CH, Zhao CF, Dong YS, Guo AY, Yu LJ. Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate. BMC Genomics. 2012a; 13:295

Li ST, Fu CH, Zhang M, Zhang Y, Xie S, Yu LJ. Enhancing taxol biosynthesis by overexpressing a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in transgenic cell lines of *Taxus chinensis*. *Plant Mol Biol Rep.* 2012b; 30:1125-30.

Lijavetzky D, Almagro L, Belchi-Navarro S, Martínez-Zapater JM, Bru R, Pedreño MA. Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. B.M.C. Res. Notes. 2008; 1:132.

Liu JR, Choi DW, Chung HJ, Woo SS. Production of useful secondary metabolites in plants: Functional genomics approaches. J Plant Biol. 2002; 45:1-6

Liu WC, Zhu P. Pilot studies on scale-up biocatalysis of 7-b-xylosyl-10-deacetyltaxol and its analogues by an engineered yeast. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2015; 42:867-876.

Lowe KC. Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems, J. Fluorine Chem. 2002; 118:19–26.

Luan EC, Allen SE, Bolyard MG. Transient GUS expression in zygotic embryos of *Taxus brevifolia*. In vitro Cel Dev Biol-Plant. 1996;32:81-85

Ludwig-Müller J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production. Biotechnol Lett. 2015; 37:1325-1334

Lynette J, Grace LJ, Charity JA, Gresham B, Kay N, Walter C. Insect-resistant transgenic *Pinus radiata*. Plant Cell Reports. 2005; 24:103-111.

Malik S, Cusidó RM, Mirjalili MH, Moyano E, Palazón J, Bonfill M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. Process Biochem. 2011; 46:23–34

Martínez-Márquez A, Morante-Carriel J, Ramírez-Estrada K, Cusidó R, Sellés-Marchart S, Palazón J, Pedreño MA, Bru-Martínez R. A reliable protocol for the stable transformation of non-embryogenic cells cultures of grapevine (*Vitis vinifera* L.) and *Taxus x media*. J Biol Methods. 2015; 2:e21.doi: 10.14440/jbm.2015.51

Matsubayashi Y. Recent progress in research on small post-translationally modified peptide signals in plants. Genes Cells. 2012; 17:1–10.

McLaughlin JL, Miller RW, Powell RG, Smith CR. 19-Hydroxybaccatin III, 10-deacetylcephalomannine, and 10-deacetyltaxol: new antitumor taxanes from *Taxus wallichiana*. Journal of Natural Products. 1981; 44:312-319.

Miele M, Mumot AM, Zappa A, Romano P, Ottaggio L. Hazel and other sources of paclitaxel and related compounds. Phytochem Rev. 2012; 11:211–25.

Moon WJ, Yoo BS, Kim D-I, Byun SY. Elicitation kinetics of taxane production in suspension cultures of *Taxus baccata* Pendula. Biotechnology Techniques. 1998; 12:79–81.

Morales M, Bru R, García-Carmona F, Ros Barceló A, Pedreño MA. Effect of dimethyl-β-cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with shape *Xylophilus ampelinus*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1998; 53:179–187.

Morales R, Selles S, Casado-Vela J, Belchi-Navarro S, Pedreño MA. Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures J. Agric. Food Chem. 2006; 54:65-71.

Mroczek T, Glowniak K, Hajmos M. Screening for pharmaceutically important toxoids in *Taxus baccata* var. Aurea Corr. With CC/SPE/HPLC-PDA procedure. Biomedical Chromatography. 2000; 14:516-529.

Nigro SA, Makunga NP, Jones NB, van Staden J. A biolistic approach towards producing transgenic *Pinus patula* embryonal suspensor masses. Plant Growth Regulation. 2004; 44:187-197.

Nims E, Dubois CP, Roberts SC, Walker EL. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering, Metabolic Engineering 2006; 8:385–394

Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Expósito O, Palazón J, Cusidó, RM. An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures. The role of *txs* and *bapt* gene expression. Biochemical Engineering Journal. 2010; 53:104-111.

Onrubia M. A molecular approach to taxol biosynthesis. PhD Thesis, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, April 2012.

Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Palazón J, Goossens A, Cusidó RM. The relationship between TXS, DBAT, BAPT and DBTNBT gene expression and taxane production during the development of Taxus baccata plantlets. Plant Sci. 2011; 181:282-287

Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Cusidó RM, Goossens A, Palazón J. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. Journal of Plant Physiology. 2013a; 170:211-219.

Onrubia M, Cusidó RM, Ramírez K, Hernández-Vázquez L, Moyano E, Bonfill M, Palazón J. Bioprocessing of plant in vitro systems for the mass production of pharmaceutically important metabolites: paclitaxel and its derivatives. Current Medicinal Chemistry. 2013b; 20:880-891.

Onrubia M, Pollier J, Vanden Bossche R, Goethals M, Gevaert K, Moyano E, Vidal-Limon H, Cusidó RM, Palazón J, Goossens A.

Taximin, a conserved plant-specific peptide is involved in the modulation of plant-specialized metabolism. Plant Biotechnol J. 2014; 12:971–983.

Osuna L, Tapia N, Cusidó R, Palazón J, Bonfill M, Zamilpa A, Lopez-Upton J, Cruz-Sosa F. Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltdl) Acta Physiol Plant, 2015; 37:199.

Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. 2005 In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Springer, Dortrecht.

Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. J Biotechnol. 2003; 10:157–163

Pauwels L, Inzé D, Goossens A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? Trends Plant Sci. 2009; 14:87–91

Pavlova OA, Matveyeva T V, Lutova LA. *rol*-Genes of *Agrobacterium rhizogenes*. Russ J Genetics. 2014; 4:137-145.

Pestchanker LJ, Roberts SC, Shuler ML. Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type birreactor. Enzyme and Microbial Technology. 1996; 19:256–260.

Pietrowska-Borek M, Czekała L, Belchí-Navarro S, Pedreño MA, Guranowski A. Diadenosine triphosphate is a novel factor which in combination with cyclodextrins synergistically enhances the biosynthesis of transresveratrol in *Vitis vinifera* cv. Monastrell suspension cultured cells. Plant Physiology and Biochemistry. 2014; 84:271-276.

Pilarek M and Szewczyk KW. Effects of perfluorinated oxygen carrier application in yeast, fungi and plant cell suspension cultures. Biochem. Eng. J. 2008; 41:38–42.

Pollier J, Moses T, González-Guzmán M, De Geyter N, Lippens S, Bossche RV. The protein quality control system manages plant defense compound synthesis. Nature. 2013; doi: 10.1038/ nature12685.

Qi Q, Mokhtar MN, Zimmermann W. Effect of ethanol on the synthesis of large-ring cyclodextrins by cyclodextrin glucanotransferases. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. 2007; 57:95-99.

Qiu D, Pan X, Wilson IW, Li F, Liu M, Teng W, Zhang B. High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*) Gene. 2009; 436:37–44.

Ramírez-Estrada K, Osuna L, Moyano E, Bonfill M, Tapia N, Cusidó RM, Palazón J. Changes in gene transcription and taxane production in elicited cell cultures of *Taxus* × *media* and *Taxus globosa.* Phytochemistry. 2015a; 117:174-184

Ramírez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó RM, Palazón J. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. Molecules. 2015b; 21:182.

Ramírez-Estrada K, Altabella T, Onrubia M, Moyano E, Notredame C, Osuna L, Vanden- Bossche R, Goossens A, Cusidó RM, Palazón J. Transcript profiling of jasmonate-elicited *Taxus* cells reveals a β-phenylalanine-CoA ligase. Plant Biotechnol J. 2016; 14:85–96.

Richheimer SL, Tinnermeier DM, Timmons DW. High-performance liquid chromatographic assay of taxol. Anal. Chem. 1992; 64:2323–6.

Rischer H, Oresic M, Seppanen-Laakso T, Katajamaa M, Lammertyn F, Ardiles-Diaz W, Van Montagu MC, Inzé D, Oksman-Caldentey KM,

Goossens A. Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006; 103:5614-5619.

Sabater-Jara AB, Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Palazón J, Pedreño MA, Cusidó RM. Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures. Plant Biotechnol J. 2014; 12:1075–1084.

Salaj T, Moravcikova J, Grec-Niquet L, Salaj J. Stable transformation of embryogenic tissues of *Pinus nigra* Arn. using a biolistic methoc. Biotechnology letters. 2005; 27:899-903.

Seki M, Takeda M, Furusaki S. Continuous production of taxol by cell culture of *Taxus cuspidata*. Journal of Chemical Engineering of Japan. 1995; 28:488-490.

Sharma P, Sharma S, Yadau S, Srivastava A, Puroit I, Shirivastava N. Plant derived biomolecules: culture vessels to bioreactors. In: Paek KY, Murthy HN, Zhong JJ (Eds.) 2014. Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology. Springer Science+Business Media, Dordrecht.

Sun G, Yang Y, Xie F, Wen JF, Wu J, Wilson IW, Tang Q, Liu H, Qiu D. Deep sequencing reveals transcriptome re-programming of *Taxus* × *media* cells to the elicitation with methyl jasmonate. PLoS One. 2013; 8:e62865.

Syklowska-Baranek K, Pietrosiuk A, Kokoszka A, Furmanowa M. Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. Hicksii. J Plant Physiol. 2009; 166:1950-1954

Syklowska-Baranek K, Pilarek M, Cichosz M, Pietrosiuk A. Liquid Perfluorodecalin Application for In Situ Extraction and Enhanced Naphthoquinones Production in *Arnebia euchroma* Cell Suspension Cultures. Appl Biochem Biotechnol. 2014; 172:2618–2627.

Syklowska-Baranek K, Pilarek M, Bonfill M, Kafel K, Pietrosiuk A. Perfluorodecalin-supported system enhances taxane production in hairy rooy cultures of *Taxus x media* var. Hicksii carrying a taxadiene synthase transgene, Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2015; 120:1051-1059.

Szejtli J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. Journal of Materials Chemistry. 1997; 7:575-587

Vamvaka E, Evans A, Ramessar K, Krumpe LRH, Shattock RJ, O'Keefe BR, Christou P, Capell T. Cyanovirin-N produced in rice endosperm offers effective pre-exposure prophylaxis against HIV-1BaL infection in vitro. Plant Cell Reports. 2016; 35:1309–1319

Vera-Urbina JC, Sellés S, Pedreño-García MA, Bru-Martinez R. Design of a scalable bioreactor for plant cell liquid culture and production of bioactive compoundsNew Biotech. 2009; S25, S241.

Vongpaseuth K, Roberts SC. Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture. Curr Pharm Biotechnol. 2007; 8:219-236.

Vongpaseuth K, Nims E, St. Amand M, Walker EL, Roberts S. Development of a Particle Bombardment-Mediated Transient Transformation System for *Taxus spp*. Cells in Culture. Biotechnol Prog. 2007; 23:1180-1185.

Vouong TV, Franco C, Zhang W. Strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures. Biotechnol. Rep. 2014; 1-2:15-21.

Vuylsteke M, Peleman JD, van Eijk MJ. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. Nature Protocols. 2007; 2:1399-1413.

Wagner A, Phillips L, Narayan RD, Moody JM, Geddes B. Gene silencing studies in the gymnosperm species *Pinus radiata*. Plant Cell Reports. 2005; 24:95-102.

Walker K and Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2000; 97:583–587.

Walker K, Fujisaki S, Long R, Croteau R. Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2002a; 99:12715-20.

Walker K, Long R, Croteau R. The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from Taxus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2002b; 99:9166-71.

Walker K, Klettke K, Akiyama T, Croteau R. Cloning, heterologous expression and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry. 2004; 279:53947–53954.

Watts KT, Lee PC, Schmidt-Dannert C. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered Escherichia coli. BBMC Biotechnol. 2006; 6: 22-29.

Wickremesinhe RM and Arteca RN. *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimitazion, characterization and Taxol production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1993; 35:181-193.

Wildung MR and Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of Taxol biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271:9201–9204.

Wu YX, Masison DC, Eisenberg E, Greene LE. Application of photobleaching for measuring diffusion of prion proteins in cytosol of yeast cells. Methods. 2006; 39:43-49

Xu M, Jin H, Dong J, Zhang M, Xu X, Zhou T. Abcisic acid plays critical role in ozone-induced taxol production of *Taxus chinensis* suspension cell cultures. Biotechnol Prog. 2011; 27:1415-1420

Xu J, Zhang N. On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect. Pharm Bioprocess. 2014; 2:499-518

Yamaguchi Y, Huffaker A. Endogenous peptide elicitors in higherplants. Current Opinion in Plant Biology. 2011; 14:351–357.

Yousefzadi M, Sharifi M, Behmanesh M, Ghasempour A, Moyano E, Palazón J. The effect of light on gene expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Linum album* cell culture. Plant Physiology and Biochemistry. 2012; 56:41-46

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

Zanga D, Capell T, Zhu C, Christou P, Thangaraj H. Freedom-to-operate analysis of a transgenic multivitamin corn variety. Plant Biotechnology Journal. 2016; 14:1225-1240

Zárate R. Plant secondary metabolism engineering: methods, Strategies, Advances, and Omics. In: Fett-Neto AG (ed) Plant secondary metabolism engineering. Methods and applications. Methods in Molecular Biology Springer. 2010; 643:629–668.

Zhang W, Franco C, Curtin C, Conn S. To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: anthocyanin as a case study. J Biomed Biotechnol. 2004; 5:264-271

Zhang M, Lu X, Zhang J, Zhang S, Dong M, Huo Ch, Shi Q, Gu Y, Cong B. Taxanes from the leaves of *Taxus cuspidata*. Chemistry of Natural Compounds, 2010; 46: 53-58.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolitres. Biotechnology Advances. 2005; 23:283-333.