



universidad
de león

programa
de biología molecular
y biotecnología

Aplicaciones del cultivo *in vitro* en la
caracterización del efecto del ancimidol en
paredes celulares de maíz (*Zea mays*) y en la
producción de encecalina en *Helianthella*
quinquenervis (Hook.) A. Gray

Juana Mabel Hernández Altamirano



León, 2017



Programa de Doctorado de Biología Molecular
y Biotecnología

Aplicaciones del cultivo *in vitro* en la caracterización del efecto del ancimidol en paredes celulares de maíz (*Zea mays* L.) y en la producción de enecalina en *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray

TESIS DOCTORAL

Juana Mabel Hernández Altamirano

León, España, 2017

Aplicaciones del cultivo *in vitro* en la caracterización del efecto del ancimidol en paredes celulares de maíz (*Zea mays* L.) y en la producción de enecalina en *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray

Applications of *in vitro* cultures in the characterization of the effects of ancymidol on maize (*Zea mays* L.) cell walls and in the production of enecalinalin by *Helianthella*

Memoria presentada para optar por el grado de doctora

por Juana Mabel Hernández Altamirano

Directores

Dr. José Luis Acebes Arranz

Dr. Jesús Miguel Álvarez Fernández

Durante el desarrollo del proyecto de doctorado se participó en los siguientes congresos y artículos:

XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiología Vegetal, 24-28 de julio de 2013. Lisboa, Portugal.

Fascinating experiments with plants: a teaching resource leading to the acquisition of competences in plant physiology. Penélope García-Angulo, Antonio Encina, Ana Alonso-Simón, María Luz Centeno, María de Castro, Asier Largo, Laura García Calvo, Mabel Hernández, José Luis Acebes.

XIV Cell Wall Meeting. 12-17 June 2016. Chania, Crete, Greece.

Effect of ancyamidol in cell wall metabolism of growing maize cells (*Zea mays* L.). J. Mabel Hernández-Altamirano; Asier Largo-Gosens; Romina Martínez-Rubio; Diego Pereda; Jesús M. Álvarez; Penélope García-Angulo; José Luis Acebes; Antonio Encina.

Largo-Gosens, A., Hernández-Altamirano, M., García-Calvo, L., Alonso Simón, A., Álvarez, J. and Acebes, J.L. 2014. Fourier transform mid infrared spectroscopy applications for monitoring the structural plasticity of plant cell walls. *Front Plant Sci* 5: 303.

«La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser

ignorante.» Miguel

de Unamuno

Agradecimientos

A mis directores de tesis: Dr. José Luis Acebes y Dr. Jesús Álvarez de la Universidad de León, España. Por permitirme realizar la tesis en su laboratorio.

Agradezco especialmente la asesoría y el apoyo que he recibido del Dr. José Luis Acebes, porque sin su empuje y paciencia, esta tesis no hubiera visto la luz. Mil

gracias, tienes mi admiración y respeto.

Al Dr. Jesús Álvarez, porque sus consejos y observaciones han enriquecido enormemente esta tesis.

Al Dr. Antonio Encina, por apoyarme con los recursos que estuvieron a su alcance para llevar a cabo el proyecto de Helianthella. Por su asesoría y enorme participación en la elaboración del artículo de ancimidol. A la Dra. Penélope García por su asesoría en los experimentos de viabilidad e incorporación de glucosa y arabinosa radiada.

Al Dr. Javier Palazón, por acogerme en su laboratorio de Fisiología Vegetal (Universidad de Barcelona), aunque fuera brevemente, por su asesoría en la generación de raíces transformadas, gracias por la paciencia, el trato amable y por contestar tan amablemente todas mis dudas. A la Dra. Mercedes Bonfil, mil gracias por su asesoría, por enseñarme esa hermosa ciudad. A Liliana Lalaleo, gracias por la amabilidad y disponibilidad a ayudar.

Al Dr. Robert Bye, por su apoyo, por permitirme conocer la Sierra Tarahumara, su gente y conocer el mundo de la etnobotánica a través de su vasta experiencia. Al pueblo rarámuri por compartir su conocimiento del uso de sus plantas medicinales.

Al Dr. Víctor Chávez, jefe del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, UNAM, México, la que fuera mi segunda casa por tantos años, gracias porque el proyecto de Helianthella inició ahí, con tu apoyo. Gracias por la amistad de tantos años y los ánimos que me envían a distancia.

Al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León, especialmente a la Dra. María Francisca Martínez por el análisis y cuantificación de enecalina, y a Pablo de la Instalación Radiactiva.

A la comunidad de software libre y de fuente abierta porque parte de esta tesis fue creada con las siguientes herramientas: los editores gráficos Gimp (<https://www.gimp.org/>) e Inkscape (<https://inkscape.org/en/>); Veusz: un programa para la graficación científica (<https://veusz.github.io/>); Chemtool: para el diseño y dibujo de estructuras químicas (<http://ruby.chemie.uni-freiburg.de/~martin/chemtool/>).

A Laura Pascual, por su amena charla, por saber escuchar y ayudar desinteresadamente, me llevo un hermoso recuerdo de Sahagún y de su familia. A Irene Fernández Ugidos, por permitirme guiar su TFG, por su apoyo con el desarrollo del proyecto de Helianthella. A mis compañeros de laboratorio, Ana Alonso, Laura García, Romina Martínez y Asier Largo.

Quiero agradecer a nuestros amigos de León: Ma. Jesús y Luís Martínez;

Inmaculada y Enrique; Tino y Bernardo López; Ana Braña e Ian Ross; Yamelis y Lionel; Rosa Fernández, a todos aquellos que nos abrieron las puertas de sus casas, nos enseñaron sus costumbres y tradiciones, nos apoyaron en todo momento, en las buenas y en las malas, gracias por no dejarse seducir por el miedo y la desconfianza al que viene de fuera o es diferente. La amistad y los buenos momentos los recordaremos siempre.

Quiero especialmente dar las gracias a mi compañero de vida, Bruno Unna, por caminar conmigo, apoyándome y ayudándome a resolver juntos las dificultades, en México, España, Irlanda o en cualquier parte del mundo. Por las horas de trabajo compartidas, por ayudarme a no rendirme.

Este trabajo se lo dedico a mis queridos brotes: Sofía, Bruno André y Otto. Tienen por delante un mundo para maravillarse y aprender. Que el conocimiento y los valores que podamos inculcarles sean su bandera contra la ignorancia y el miedo.

A mis padres, Sofía y Octavio, por apoyarme en cada proyecto de mi vida.

Abreviaturas

ANW: ácido acético, nítrico, agua

[³H]Ara: arabinosa tritiada

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

CBI: inhibidor de biosíntesis de celulosa

CesA: celulosa sintasa

CDTA: ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N, N, N', N', -tetraacético

CG-MS-MS: cromatografía de gases con detector de masas en método de masas masas

CSC: complejo celulosa sintasa

DCB: diclobenil

DW: peso seco

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

FW: peso fresco

GA₃: ácido giberélico

[¹⁴C]Glc: glucosa marcada

I₅₀: concentración del compuesto que inhibe el crecimiento en peso fresco en un 50% respecto al material no tratado

MS: Medio Murashige-Skoog (1962)

MSP: metabolitos secundarios de plantas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción

SD: desviación estándar

SnCR: sobrenadante del residuo de celulosa

YEP: extracto de levadura y peptona

Tabla de contenido

1.

Resumen..... 3

1 Introducción

..... 3

Efecto del ancimidol en el metabolismo de la pared celular de células en crecimiento de maíz 5

5

Introducción 5

5 Materiales y

métodos..... 6 Resultados

..... 7

Discusión 14

14

Producción de encocalina en cultivos celulares y raíces transformadas de *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray: una planta medicinal tarahumara 16

16

Introducción 16

16 Materiales y

métodos..... 18 Resultados

..... 19 Discusión

..... 31

Discusión y conclusiones 33

Bibliografía..... 36

2. Introducción 39

39 Cultivos celulares de plantas: principios y aplicaciones generales 41

41 La pared celular de las plantas..... 43

43 Composición de la pared celular tipo II 46

Los cultivos celulares de maíz como modelos para el estudio de la pared celular	49
Utilización de inhibidores de la biosíntesis de celulosa.....	50
El ancimidol: un retardante del crecimiento con potencial actividad como inhibidor de la biosíntesis de celulosa	52
Metabolitos secundarios en plantas, importancia y aplicaciones biotecnológicas	53
Biosíntesis de metabolitos secundarios.....	54
plantas medicinales como fuente de metabolitos secundarios con actividad terapéutica.	58
Producción de metabolitos secundarios por vías biotecnológicas	59
Raíces transformadas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	63
Producción de cromenos en la familia Asteraceae y en <i>Helianthella quinquenervis</i>	67
Objetivos	71
4. Resultados	75
4.1. Effect of ancymidol on cell wall metabolism in growing maize cells.....	77
Abstract.....	77
Introduction	78
Materials and methods.....	80
Results	84
Discussion.....	93
References	97
Supplementary material.....	103
4.2. Production of encephalin and other secondary metabolites in cell cultures and hairy roots of <i>Helianthella quinquenervis</i> (Hook.) A. Gray, a Tarahumaran medicinal plant	105
Abstract.....	10
5	Introduction
.....	106
and Methods	109
.....	114
Discussion.....	12
7	Conclusions
.....	132
References
.....	132
5. Discusión general.....	139
6. Conclusiones	143
7. Bibliografía general.....	147
8. Anexos	177
Anexo I.....	179

Anexo II

195 Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).....195 Medio Medio YEP (yeast extract peptone)

.....196

Aplicaciones del cultivo *in vitro* en la caracterización del efecto del ancimidol en paredes celulares de maíz (*Zea mays* L.) y en la producción de enecalina en *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray

1. Resumen

Introducción

El cultivo de células y tejidos de plantas comprende a un conjunto de técnicas que, en condiciones asépticas, permiten la inducción de una variedad de respuestas al controlar las condiciones físicas y químicas de los cultivos. Es una herramienta importante tanto en los estudios básicos como en los aplicados ya que tiene importantes aplicaciones comerciales. Debe su origen a las ideas del científico alemán, Haberlandt (1902), quien introdujo el término de totipotencia, que es la capacidad que tiene cualquier célula viva con núcleo, de regenerar una planta completa.

Las aplicaciones de cultivos *in vitro* incluyen la obtención de plantas haploides (Germanà, 2011), la obtención de híbridos somáticos a través de la fusión de protoplastos (Eeckhaut et al., 2013) y la obtención de plantas libres de virus, así como la producción de MSP (Karuppusamy, 2009), la micropropagación y el estudio de aspectos concretos de la biología de las plantas: genética, fisiología, bioquímica y patología (Rao y Ravishankar, 2002).

En la investigación básica, se ha avanzado en el conocimiento de la bioquímica y fisiología de la pared celular y sus aplicaciones en la industria textil, del papel, y en la fabricación de nuevos combustibles (Kim y Triplett, 2001), así como en los mecanismos de la síntesis y degradación de la celulosa, y su relación con otras moléculas en la pared celular (Acebes et al., 2010).

Para profundizar en el conocimiento del metabolismo de la pared celular, se ha

hecho uso de inhibidores de la biosíntesis de celulosa (CBI por sus siglas en inglés), estos son un grupo de moléculas de diversa naturaleza química cuyo sitio de acción es desconocido en la mayoría de los casos; sin embargo, algunos de ellos se usan como herbicidas al bloquear la formación de la pared celular. Recientemente, se ha propuesto al ancimidol como un probable CBI (Hofmannová et al., 2008). Esta propuesta está basada principalmente en la promoción de malformaciones celulares por parte del ancimidol. Con el fin de determinar el posible papel del ancimidol como inhibidor de la biosíntesis de celulosa, se ha llevado a cabo un estudio completo del efecto del ancimidol en el crecimiento celular y el metabolismo de la pared celular de cultivos de células de maíz en crecimiento a través de un enfoque bioquímico y molecular.

3

1. Resumen

Otra de las líneas del cultivo *in vitro* de plantas es la obtención de MSP de interés para las industrias agroquímica, farmacéutica y alimentaria. Una de sus ventajas es que a través del cultivo *in vitro* los recursos pueden ser utilizados de manera sostenible ya que la producción no depende de las condiciones ambientales. Este sistema aplicado a plantas medicinales cuya colecta es de ejemplares silvestres, reduciría la presión sobre sus poblaciones. Tal es el caso de *Helianthella quinquenervis*. Esta planta, es conocida por los indios rarámuri (tarahumara) de Chihuahua, México, como «rarésoa» o «corsonero», a la que se le atribuyen una variedad de actividades terapéuticas. El análisis fitoquímico de las raíces y las partes aéreas de *H. quinquenervis* ha permitido el aislamiento e identificación de diversos cromenos (benzopiranos), prenil acetofenonas y benzofuranos. Algunos de estos, como la encecalina y la desmetilencecalina, han demostrado poseer una citotoxicidad marginal contra varias líneas celulares tumorales humanas y un efecto inhibidor del crecimiento vegetal (Castañeda et al., 1996).

Aunque las técnicas de cultivo de callos y células en suspensión han generado una gran cantidad de protocolos exitosos en la producción de MSP, hay casos en los que estos son deficientemente producidos, ya que requieren la diferenciación del tejido. Un ejemplo de la necesidad de diferenciación es la síntesis de MSP en raíces, ya sea cultivadas *in vitro* o generadas a través de la transformación por *Agrobacterium rhizogenes*.

La infección por *A. rhizogenes* se caracteriza por la producción de raíces adventicias con numerosas raíces pilosas en la zona de la herida, estas raíces también son conocidas como «hairy roots». Este sistema de producción de raíces pilosas ha permitido la producción de MSP cuya síntesis se realiza en este órgano, además es una opción para la explotación biotecnológica de cultivos

celulares de plantas, ya que presentan una elevada tasa de crecimiento, estabilidad genética y desarrollo en medios libres de hormonas.

El uso de cultivos *in vitro* de plantas ha sido una herramienta muy útil en la caracterización de procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares, tanto en la investigación básica como aplicada. En este contexto, el **objetivo principal** de este trabajo de tesis es usar cultivos *in vitro* de dos especies: suspensiones celulares de maíz para analizar los efectos del ancimidol en el desarrollo celular y en el metabolismo de la pared celular, y callos, suspensiones celulares y raíces

4

1. Resumen

transformadas de *Helianthella quinquenervis* para estudiar la producción de enecalina y otros metabolitos relacionados. Para la consecución de este objetivo general se plantean los siguientes **objetivos parciales**:

Analizar la toxicidad del ancimidol en cultivos celulares de maíz, tanto a nivel celular (determinando cómo afecta a los parámetros de crecimiento, viabilidad y morfología del cultivo), como a nivel subcelular (analizando los cambios que produce en la composición y estructura de la pared celular).

Estudiar la producción de enecalina y otros MSP en diferentes cultivos *in vitro* de *Helianthella quinquenervis*: obteniendo callos y suspensiones de células a partir de explantes, desarrollando cultivos de raíces transformadas, para identificar cromosomas en los cultivos, y cuantificando los niveles de enecalina en las raíces transformadas.

[Las descripciones de materiales y métodos de cada objetivo se encuentran detalladas en sendos capítulos]

Efecto del ancimidol en el metabolismo de la pared celular de células en crecimiento de maíz

Introducción

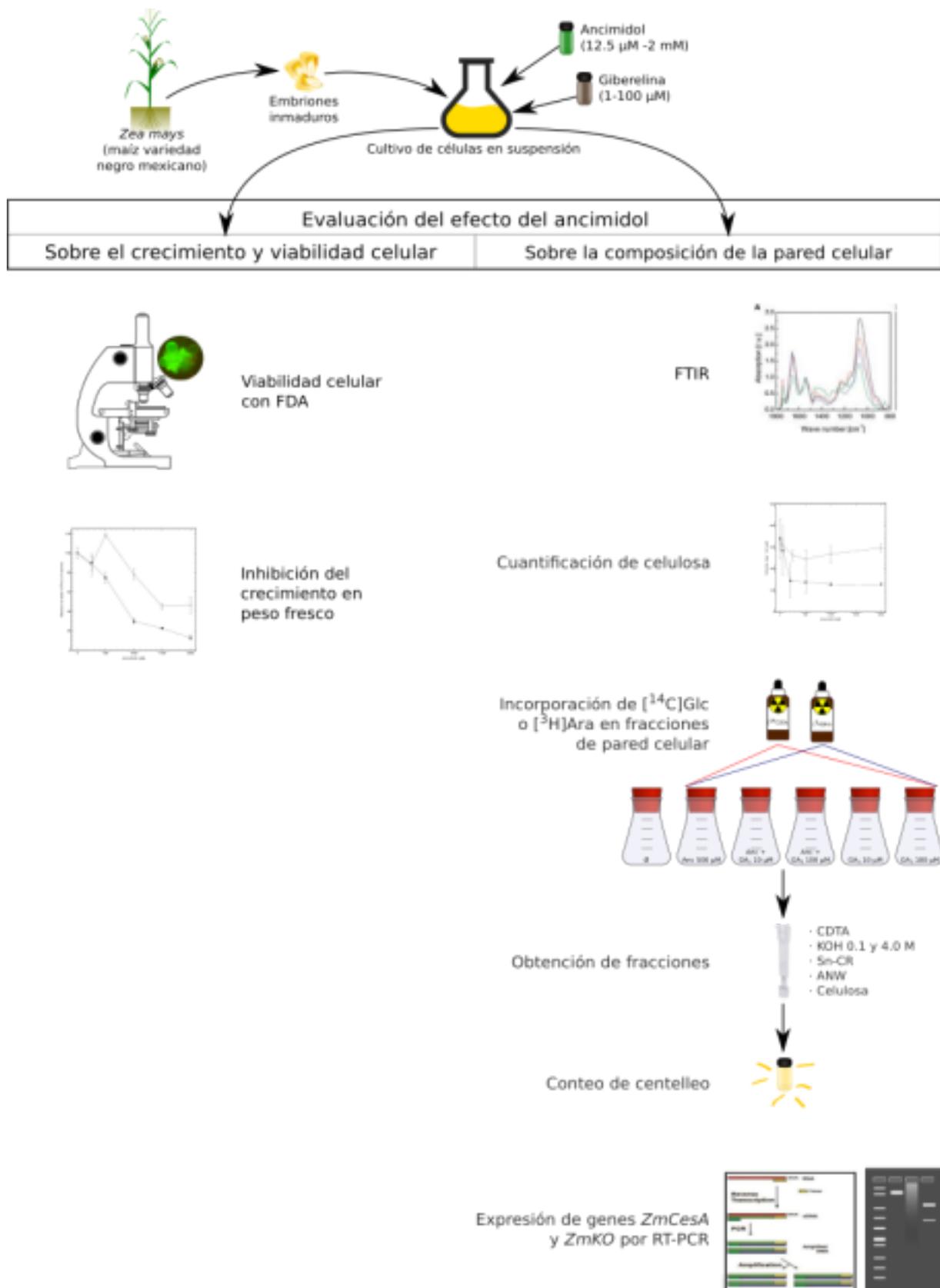
El ancimidol es un reconocido retardante del crecimiento vegetal cuyo modo de acción es la inhibición de la actividad ent-kaureno oxidasa, una monooxigenasa dependiente del citocromo P450 que cataliza la oxidación del ent-kaureno en ácido ent-kaurenoico, afectando de este modo la biosíntesis de las giberelinas. Este efecto se ha aprovechado para reducir el tamaño de plantas de interés hortícola como crisantemos, tagetes y petunias. Además de esta actividad, se ha reportado que el ancimidol inhibe la síntesis de celulosa en células de tabaco de una manera independiente de las giberelinas (Hofmannová et al., 2008). Gran

parte de esta conclusión está basada en la promoción de malformaciones celulares por parte del ancimidol. Con el fin de determinar el posible papel del ancimidol como inhibidor de la biosíntesis de celulosa, se ha llevado a cabo un estudio completo del efecto del ancimidol en el crecimiento celular y el metabolismo de la pared celular de cultivos de células de maíz en crecimiento a través de un enfoque bioquímico y molecular.

5

1. Resumen

Materiales y métodos



6

1. Resumen

Resultados

Efecto del ancimidol en el crecimiento y viabilidad celular Los efectos del ancimidol en células en suspensión de maíz se evaluaron tanto a nivel de crecimiento y viabilidad celular, como a nivel de la composición de la pared celular. En el primer caso, los cultivos expuestos a concentraciones entre 12,5 μM y 2 mM presentaron dos tipos de respuestas. Por debajo de 500 μM , las

células mostraron la formación de protuberancias que dieron origen a células esféricas, malformación típica que inducen los inhibidores de la biosíntesis de celulosa (Fig.1), y la viabilidad se mantuvo por encima del 80% después de 12 días de exposición al ancimidol (Fig.2). Concentraciones por encima de 500 μM redujeron la viabilidad, y este efecto fue más drástico a partir de 1,5 mM (la viabilidad se situó por debajo del 20%). Además, se observó un aumento en el número de células plasmolizadas.

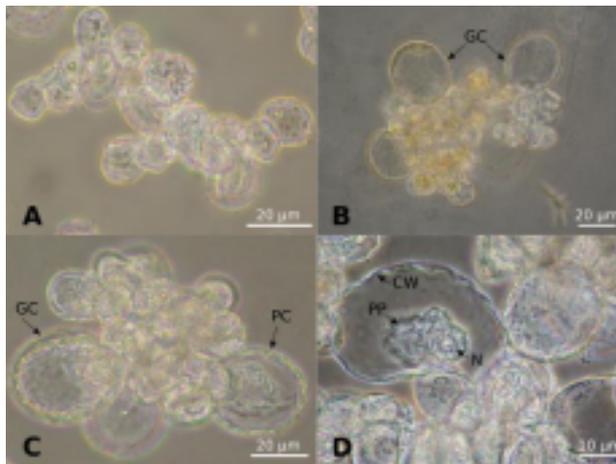


Fig.1 Morfología del cultivo de células de maíz tratadas con ancimidol. A) Control; B) 500 μM ; C) 1 mM y D) 2 mM. Las imágenes fueron tomadas en campo claro. GC, célula globosa; CW, pared celular; PP, protoplasma; N, núcleo; PC, célula plasmolizada.

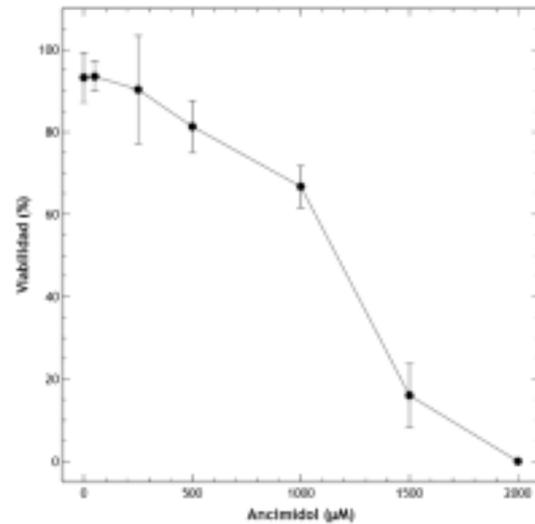


Figura 2. Porcentaje de viabilidad de

células en suspensión de *Zea mays* en presencia de diferentes concentraciones de ancimidol después de 12 días de cultivo. El porcentaje de viabilidad fue establecido por observación aleatoria de aproximadamente 150 células (se muestra el promedio y la DS de 5 mediciones).

1. Resumen

Con el fin de establecer el efecto inhibitor del ancimidol en cultivos de células en suspensión de maíz, se midió la ganancia en peso fresco (FW) después de 12 días de tratamiento con diferentes concentraciones de ancimidol (Fig. 3). La ganancia de FW se redujo significativamente en concentraciones de ancimidol por encima de 250 μM . Concentraciones de ancimidol iguales o superiores a 1 mM afectaron drásticamente el crecimiento de las células de maíz y la ganancia de FW se redujo en un 70% a 90% en comparación con las células de control.

En nuestro sistema experimental, el valor de I_{50} para el efecto del ancimidol se estimó en $\sim 658 \mu\text{M}$.

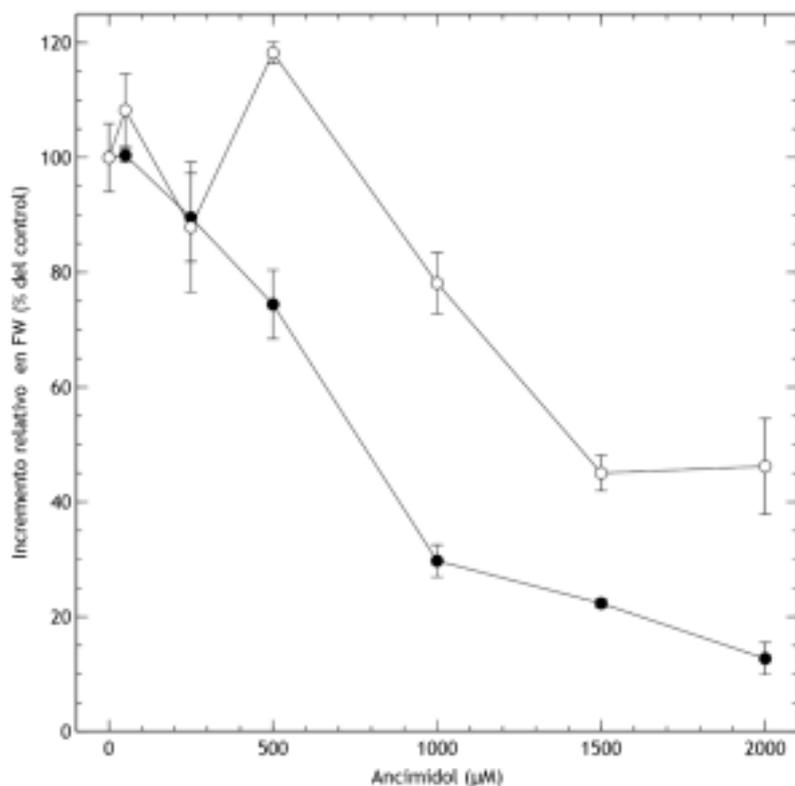


Fig. 3 Curva de inhibición del crecimiento de células en suspensión de maíz por aumento de la concentración de ancimidol (círculo negro) o ancimidol + GA₃ 100 µM (círculo blanco) después de 12 días de cultivo. Los valores son el promedio de tres mediciones ± DS.

La aplicación de GA₃ 100 µM (Fig. 3) restauró la ganancia de FW de las células de maíz a los niveles de control –e incluso por encima del 100 %– cuando se añadió

8

1. Resumen

a células tratadas simultáneamente con concentraciones de ancimidol que oscilaban entre 100 y 500 µM. A mayores concentraciones de ancimidol, la adición de GA₃ sólo revirtió parcialmente el efecto inhibitor del ancimidol sobre el crecimiento celular.

El efecto del ancimidol en los cultivos en suspensión de maíz se evaluó también a nivel de pared celular a través de espectroscopía FTIR, cuantificación de celulosa, incorporación de [¹⁴C]Glc y [³H]Ara en fracciones de pared celular, así como mediante el análisis de la expresión de genes *ZmCesA* y *ZmKO1*.

Los espectros FTIR de las paredes celulares (Fig. 4) mostraron que el efecto del ancimidol es más evidente en células de maíz tratadas con concentraciones superiores a 1 mM. Los espectros de las células expuestas a ancimidol 50 µM no exhibieron diferencias importantes respecto a las células control. Sin embargo,

los espectros FTIR obtenidos a partir de paredes de células tratadas con ancimidol de 1 a 2 mM, mostraron picos positivos en la región que va de 900 a 1200 cm^{-1} , una región donde absorben los polisacáridos de pared celular. Además, se detectaron picos negativos asociados con números de onda indicativos de anillos aromáticos (1515 cm^{-1}), anillos fenólicos (1500 cm^{-1}) y proteínas (1650 cm^{-1}). La comparación entre los espectros diferencia indicó que cuanto mayor es la concentración de ancimidol, las diferencias descritas eran mayores. Estos resultados indican que el tratamiento con ancimidol redujo picos asociados con celulosa y aumentó otros asociados con fenoles y proteínas de pared celular, de una manera dependiente de la dosis.

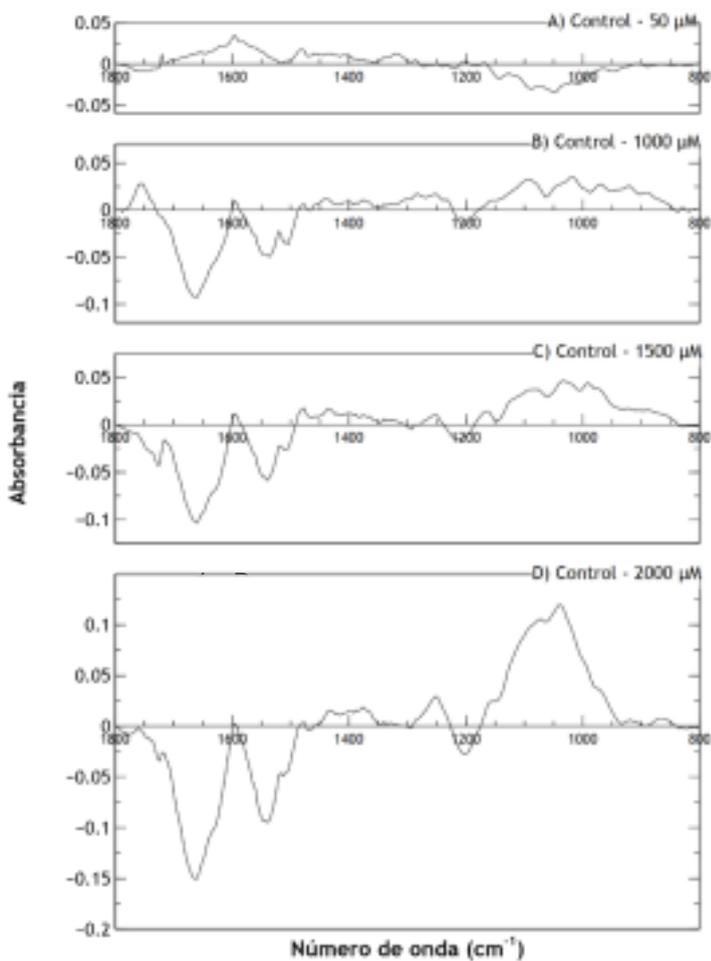
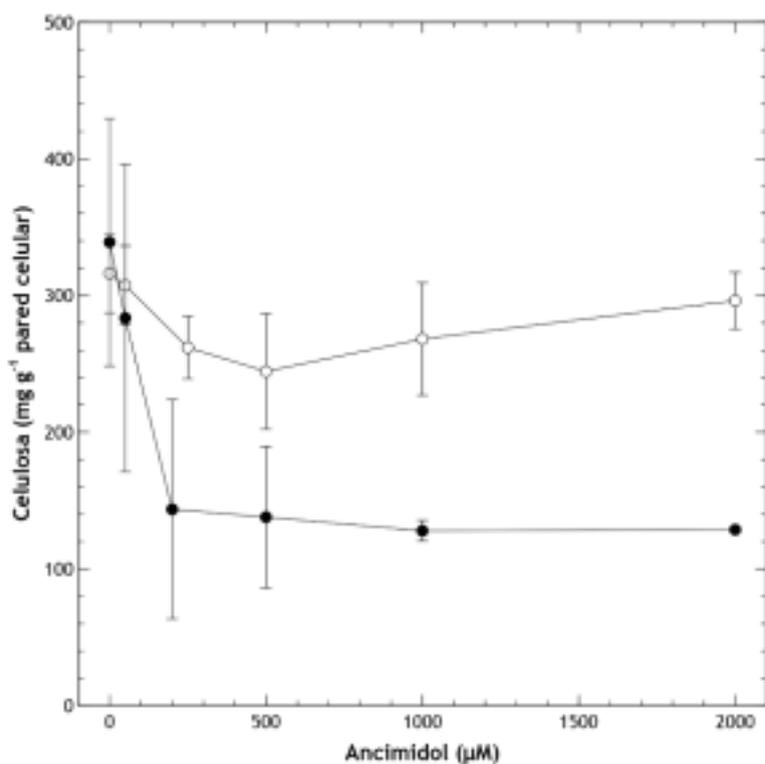


Fig. 4: Espectros diferencia obtenidos de la resta digital de los espectros FTIR de paredes de células no tratadas (control), y paredes de células tratadas con concentraciones crecientes

Cuantificación de celulosa

El ancimídol indujo una reducción sustancial del contenido de celulosa en células en suspensión de maíz: las células tratadas con ancimídol 500 μM mostraron una reducción del 60% en su contenido de celulosa en comparación con las células no tratadas (Fig. 5), lo cual no varió conforme la concentración de ancimídol se aumentó. El contenido de celulosa de la pared celular se restauró parcialmente, pero no totalmente, mediante tratamiento simultáneo con GA_3 100 μM .



1. Resumen

Fig. 5: Efecto de diferentes concentraciones de ancimídol (●), ancimídol + GA_3 100 μM (○), sobre el contenido de celulosa en células en suspensión de maíz después de 12 días de tratamiento. Los datos representan el promedio \pm DS de tres mediciones.

Incorporación de glucosa marcada y arabinosa marcada Para determinar el papel del ancimídol en el metabolismo de la pared celular se utilizó

el radiomarcaje de las células en suspensión de maíz con [¹⁴C]Glc (Fig. 6) y [³H]Ara (Fig. 7), en presencia de ancimídol 500 μM y/o GA₃ 10 o 100 μM.

En el análisis de radiomarcaje se observó poca diferencia en el porcentaje de [¹⁴C]Glc incorporada en la pared celular dependiendo del tratamiento: los valores oscilaron entre 38,7% en células de control y 34,4% en células tratadas con ancimídol (datos no mostrados). La incorporación de [¹⁴C]Glc en α-celulosa se redujo en ~20% en células tratadas con ancimídol en comparación con los controles no tratados (Fig. 6). Cuando el ancimídol se suplementó con GA₃ (10 o 100 μM), la incorporación de [¹⁴C]Glc en α-celulosa fue similar a la obtenida con ancimídol solo. La presencia de GA₃ por si solo (10 o 100 μM) prácticamente no afectó la incorporación de [¹⁴C]Glc en α-celulosa.

No hubo diferencias notables en la incorporación de [¹⁴C]Glc en las otras fracciones de pared celular (CDTA, KOH 0,1M, KOH 4M, Sn-CR y ANW) cuando las células se incubaron en presencia de ancimídol y / o GA₃.

1. Resumen

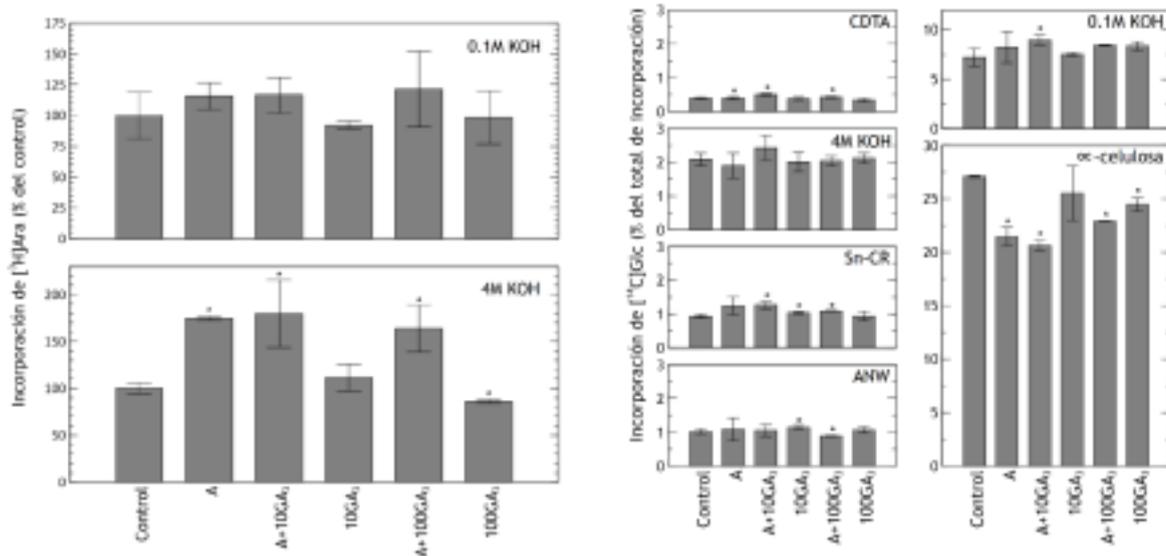


Fig. 6 Incorporación de [¹⁴C]Glc en fracciones de pared celular de células de maíz tratadas con ancimídol, ancimídol + GA₃ o GA₃. Se añadieron a las células de maíz: (A) ancimídol 500 μM; (A + GA₃10) ancimídol 500 μM + GA₃ 10 μM; (A + GA₃100) ancimídol 500 μM + GA₃ 100 μM; (GA₃10) de GA₃ 10 μM o (GA₃100) GA₃ 100 μM, y se agitó durante 24 h a 25°C. El control indica que la muestra se cultivó en las mismas condiciones sin adición de ancimídol o GA₃. El asterisco refleja diferencias significativas entre el control y cada tratamiento según la prueba t de Student (p < 0,05). Los valores son la media ± DS de tres experimentos independientes.

Fig. 7 Incorporación de [³H]Ara en fracciones de hemicelulosas de pared celular (0,1M KOH y 4M KOH) de células de maíz tratadas con ancimídol, ancimídol + GA₃ o GA₃. Se añadieron a las células de maíz: (A) ancimídol 500 μM; (A + GA₃10) ancimídol 500 μM + GA₃ 10 μM; (A + 100GA₃) ancimídol 500 μM + GA₃ 100 μM; (GA₃10) de GA₃ 10 μM o (GA₃100) GA₃ 100 μM y se agitó durante 24 h a 25°C. El control indica que la

muestra se cultivó en las mismas tratamiento según la prueba t de Student condiciones sin adición de ancimídol o (p <0,05). Los valores son la media ± DS GA₃. El asterisco refleja diferencias de tres experimentos independientes. significativas entre el control y cada

Con el fin de dilucidar cualquier efecto adicional del ancimídol sobre la biosíntesis de hemicelulosas, el segundo componente principal de las paredes celulares primarias de maíz, se analizó el efecto del ancimídol sobre la incorporación de [³H]Ara en la pared celular. Los resultados obtenidos (Fig. 7) demostraron que después del tratamiento con ancimídol (solo o en combinación con GA₃), la incorporación de [³H]Ara en la fracción KOH 4M aumentó mientras que, tal como ocurría con el marcaje de [¹⁴C]Glc, no se observó aumento en la [³H]Ara cuando

12

1. Resumen

las células tratadas con GA₃ se compararon con células control. La incorporación de [³H]Ara en la fracción KOH 0,1M no experimentó ningún cambio comparando los diferentes tratamientos y células control

Expresión de genes

Partiendo de la hipótesis de que los efectos inhibitorios de ancimídol en la biosíntesis de celulosa proceden de una reducción de la expresión de genes celulosa sintasa *CesA*, se llevó a cabo un análisis para determinar el efecto del ancimídol sobre la expresión de genes *ZmCesA* después de una hora de exposición (Fig. 8).

Los resultados mostraron que en los tratamientos con ancimídol, ninguno de los genes *CesA* analizados fue reprimido: por el contrario, los análisis de la expresión de genes indican una temprana sobreexpresión de los genes *ZmCesA6*, *ZmCesA7* y *ZmCesA8* tras los tratamientos con ancimídol o ancimídol + GA₃ en comparación con las células control. El tratamiento con GA₃ de las células de maíz también incrementó la expresión de los genes antes mencionados.

No se observaron cambios en la expresión relativa de *ZmCesA1-2* y *ZmCesA4* tras el tratamiento con ancimídol. Sin embargo, cuando se añadió ancimídol con GA₃, los genes *ZmCesA1-2* y *ZmCesA4* aparecieron subexpresados.

La expresión de *ZmCesA3* no fue detectada en el experimento.

Se analizó además la expresión del gen de la kaureno oxidasa *ZmKO1*. Dicha expresión permaneció inmutable tras los tratamientos de 1 h ya con ancimídol, ya con GA₃. Sin embargo, el tratamiento con ambos a la vez provocó una represión de la expresión del gen *ZmKO1*.

1. Resumen

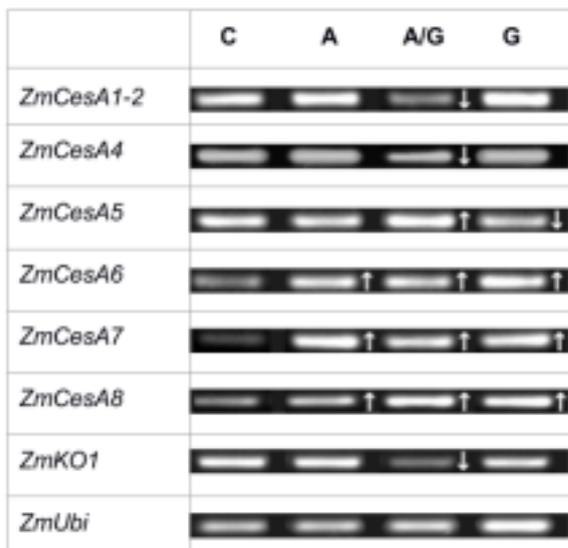


Fig.8 Expresión relativa de genes ZmCesA y ZmKO1 analizada por RT PCR en células de maíz en fase exponencial de crecimiento. A las células en fase exponencial se les adicionó: (A) ancimídol 500 μM ; (A / G) ancimídol 500 μM + GA₃ 100 μM o (G) GA₃ 100 μM , y se agitaron durante 1 h a 25°C. (C) indica una muestra control cultivada en las mismas condiciones sin adición de ancimídol o GA₃. \uparrow indica más contenido de mRNA que el control, \downarrow indica menos contenido de mRNA que el control.

Discusión

Estudios previos realizados en células de tabaco sugirieron que el ancimídol promovía la inhibición de la síntesis de celulosa de una manera no relacionada con su efecto anti-giberelina (Hofmannová et al. 2008). Con el fin de comprobar este hecho, desarrollamos varios experimentos en los que células en suspensión de maíz fueron expuestas a concentraciones crecientes de ancimídol y/o ácido giberélico (GA₃) en el medio líquido durante su crecimiento para, a través de análisis como la cuantificación de celulosa y la incorporación de [¹⁴C]Glc o [³H]Ara en fracciones de pared celular, establecer el efecto del ancimídol.

Nuestros resultados mostraron dos grupos de respuestas dependiendo de la concentración del ancimídol. Por debajo de 500 μM , tuvo un ligero efecto en el desarrollo y en la viabilidad celular: la producción de biomasa se redujo cerca de un 30% respecto al control mientras que la viabilidad se mantuvo por encima del 80%, y el efecto inhibitor del ancimídol se vio revertido por la presencia de GA₃. Sin embargo, con concentraciones por encima de 500 μM , la producción de

biomasa se redujo entre un 70 y un 85%, la viabilidad decreció drásticamente hasta alcanzar valores de cero y la reversión inducida por GA₃ en la producción de biomasa fue limitada.

El conjunto de resultados indica que el ancimidol afecta a la composición y a la biosíntesis de la pared celular de células de maíz. Este efecto podría entenderse

14

1. Resumen

principalmente como consecuencia de la reducción del contenido de celulosa, ya que: (a) las células expuestas a de ancimidol 500 μ M (concentración que afectó al crecimiento, pero no a la viabilidad) mostraron la típica forma globosa que indica debilidad en la estructura de la pared celular, respuesta que coincide con lo descrito en células de tabaco en presencia del ancimidol; (b) los análisis de espectroscopía FTIR indican que la cantidad de celulosa en paredes celulares se redujo progresivamente conforme la concentración de ancimidol se incrementó. Este descenso en el contenido de celulosa fue acompañado por un incremento en proteínas y compuestos fenólicos; (c) la reducción en la cantidad de celulosa (que llegó al 60%) se confirmó con el método de Updegraff; y (d) la incorporación de [¹⁴C]Glc en la fracción de α -celulosa fue reducida en un 20% por el tratamiento con ancimidol 500 μ M.

Por otra parte, las incorporaciones de [¹⁴C]Glc y [³H]Ara en las fracciones de hemicelulosas de paredes de células tratadas con ancimidol 500 μ M se incrementaron, lo que apunta a un aumento en la biosíntesis de polisacáridos hemicelulósicos que compensaría el empobrecimiento de la celulosa. Este efecto compensatorio ha sido descrito también en otros casos en los que se produce una disminución en el contenido en celulosa, como ocurre en células de maíz habitadas a crecer en presencia de inhibidores de la biosíntesis de celulosa (Acebes et al., 2010).

En células tratadas con otros inhibidores de la síntesis de giberelinas también se ha descrito una reducción en el contenido de celulosa: este efecto ocurre en brotes de manzano con diferentes concentraciones de paclobutrazol y en plantas de sorgo tratadas con cloruro de clormecuat o daminozida. Paralelamente, la acción de las giberelinas en la elongación celular y por lo tanto en la estimulación del crecimiento ha sido también relacionada con el incremento de síntesis de celulosa, aunque el mecanismo exacto no es bien conocido. Se tiene constancia de que plantas de arroz mutantes en la biosíntesis de giberelinas muestran un déficit en el contenido de celulosa. Recientemente varios trabajos han demostrado que las giberelinas regulan positivamente la expresión de un

En nuestro sistema, la aplicación de GA₃ promovió la sobreexpresión de *ZmCesA1-2*, *ZmCesA7* y *ZmCesA8*, precisamente algunos de los genes asociados a la síntesis de celulosa en la pared celular primaria. Sin embargo, de forma diferente a la

15

1. Resumen

descrita en plantas de arroz, la inducción de genes *CesA* promovida por GA₃ no aumentó la incorporación de [¹⁴C]Glc en α -celulosa y sólo revirtió parcialmente la reducción en el contenido de celulosa en la pared celular observada con el tratamiento con ancimidol. En cuanto a la expresión génica de *ZmKO1*, esta fue inhibida cuando se aplicó ancimidol al medio de cultivo de nuestras células de maíz, lo que indica que su efecto radica en la inhibición de la actividad enzimática y no en la expresión génica.

En definitiva, los resultados apuntan a un doble efecto del ancimidol en cultivos de células de maíz, dependiendo de su concentración. A valores bajos (500 μ M), los efectos del ancimidol estarían relacionados con la inhibición de la biosíntesis de giberelinas, y la aplicación de giberelinas tiende a revertir los efectos. Sin embargo, a niveles muy altos (por encima de 500 μ M), los efectos de ancimidol no son revertidos por las giberelinas, y se desencadena la muerte celular.

Producción de enecalina en cultivos celulares y raíces transformadas de *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray: una planta medicinal tarahumara

Introducción

Helianthella quinquenervis (Hook) A. Gray es una planta herbácea perteneciente a la familia Asteraceae. Crece en bosques de pino-encino en las Montañas Rocosas del oeste de los Estados Unidos y Canadá, y también en Chihuahua y Nuevo León, México. *H. quinquenervis* es conocida por los indios rarámuri (tarahumara) de Chihuahua, México, como «rarésoa» o «corsonero», donde las raíces secas y en polvo se usan como preparados terapéuticos para combatir o aliviar la tos, dolores musculares, enfermedades gastrointestinales y úlceras. El extracto crudo de las raíces de *H. quinquenervis* ha demostrado actividad antimicrobiana, así como actividad antiprotozoaria.

El análisis fitoquímico de las raíces y las partes aéreas de *H. quinquenervis* ha permitido el aislamiento e identificación de diversos cromenos (benzopiranos),

prenil acetofenonas y benzofuranos. Algunos de estos, como la encecalina y la desmetilencecalina, poseen una citotoxicidad marginal contra varias líneas celulares tumorales humanas y un efecto inhibitor del crecimiento vegetal.

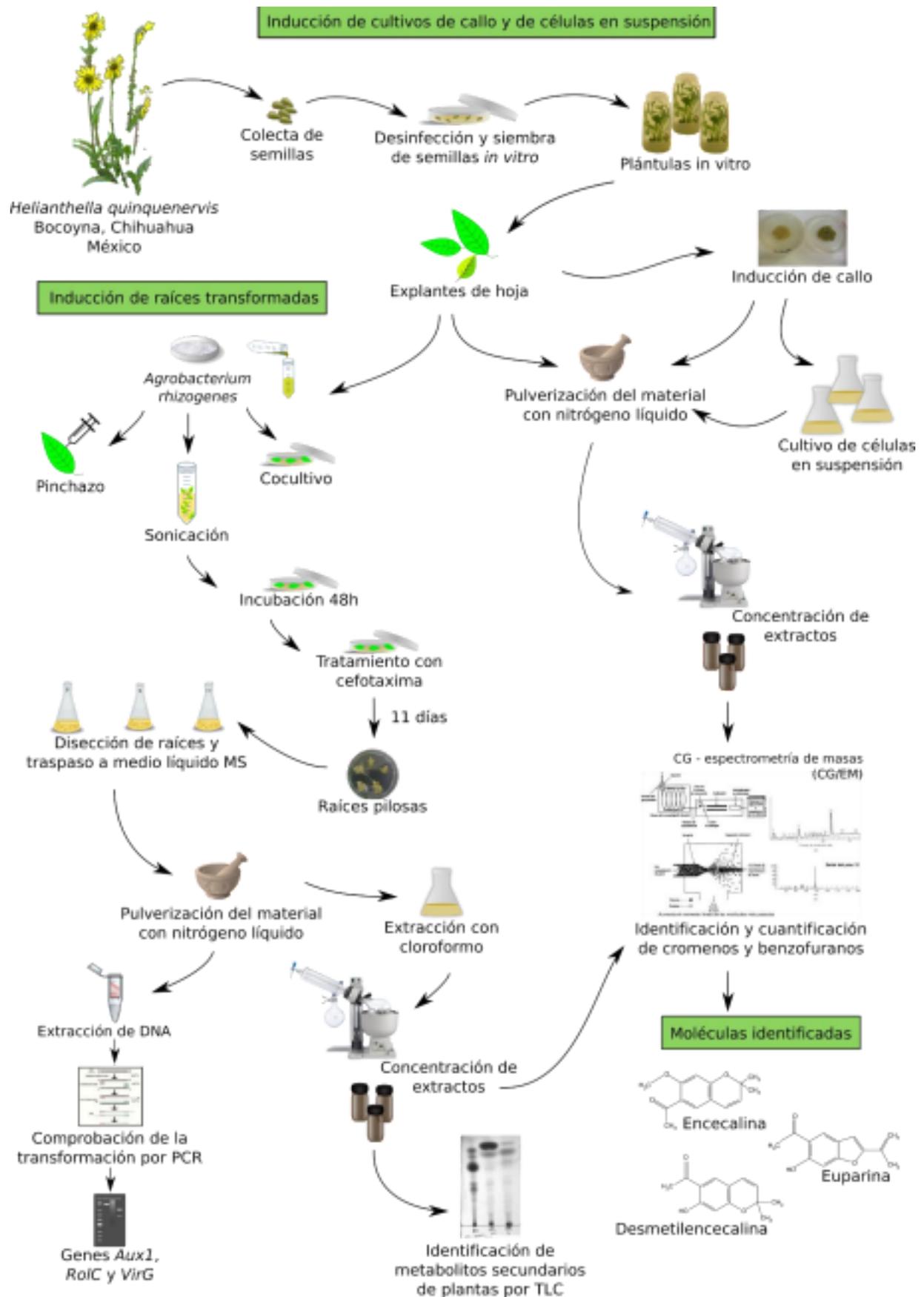
Las fuentes de estos compuestos siguen siendo las plantas silvestres, como en la mayoría de las plantas medicinales con algún antecedente etnobotánico, lo que su explotación pone en riesgo sus poblaciones. La producción de MSP de plantas (MSP) de interés a escala comercial por parte de *H. quinquenervis* es difícil de alcanzar, porque está sujeta a condiciones ambientales fluctuantes y porque ocurre en concentraciones muy bajas.

Una alternativa para la producción de MSP es su síntesis orgánica, pero esto es asumible sólo para algunas estructuras sencillas. Para compuestos con una estructura compleja la síntesis puede ser difícil, costosa y generar productos tóxicos que dañan el ambiente. En el caso de *H. quinquenervis*, no se tiene constancia de la síntesis orgánica de la encecalina. El cultivo de células en suspensión, la generación de raíces transformadas (raíces pilosas), la biotransformación y la ingeniería de vías metabólicas son algunas de las estrategias que se están abordando para obtener MSP de interés para las industrias agroquímica, farmacéutica y alimentaria. A través del cultivo vegetal *in vitro* los recursos pueden ser utilizados de manera sostenible, ya que la producción no depende de las condiciones ambientales. El cultivo de raíces pilosas obtenido por infección de tejidos de células vegetales con *Agrobacterium rhizogenes* es una opción para la explotación biotecnológica de cultivos *in vitro* de plantas, ya que presentan una elevada tasa de crecimiento, estabilidad genética y crecimiento en medios libres de hormonas.

En este trabajo describimos el desarrollo de diferentes estrategias para la producción de encecalina y otros MSP relacionados (con potencial interés comercial) por medio del cultivo de células y órganos de *Hellianthella quinquenervis* (callos, células en suspensión y raíces pilosas).

1. Resumen

Materiales y métodos



Resultados

Tratamientos de germinación e inducción de callo

La escarificación mecánica, que consistió en la eliminación del pericarpio del

aqueno, (Fig.1-A) aumentó el porcentaje de germinación ya que las semillas de *H. quinquenervis* tenían una dormición extraembrionaria debido a la dureza e impermeabilidad del pericarpio: al analizar el efecto de la escarificación en dos condiciones diferentes (*in vitro* y suelo), esta afectó claramente la tasa de germinación, aumentando de 13% y 38%, respectivamente, a cerca de 90% después de trece días.

Cuando las plantas germinadas *in vitro* alcanzaron dos meses de edad y presentaban una altura entre 5 y 8 cm (Fig. 1-B), con varios segmentos nodales y hojas, se seleccionaron explantes de tallo y hoja (Fig. 1-C) para inducir la producción de callo.

Después de probar diversos tipos de explantes, combinaciones y concentraciones de auxina/citoquinina, el medio seleccionado fue BAP (1 mg/L) + 2,4-D (0,1 mg/L) y se escogieron los explantes de secciones de hoja, debido al alto porcentaje de callogénesis (90%) que lograron y su baja tasa de oxidación, lo que produjo una cantidad de biomasa de 0,273 mg FW/explante, mostrando un color amarillo pálido de consistencia friable (tabla 1). A pesar del mayor porcentaje de callos inducido por el tratamiento BAP (1 mg/L) + NAA (2 mg/L) con explantes de hoja (0,318 mg FW/explante), esta opción fue descartada debido al proceso de oxidación que apareció durante los subcultivos, además de su consistencia compacta. Los explantes de tallos generaron callos en un 58% en presencia de BAP (1 mg/L) + NAA (2 mg/L) y en un 60% con BAP (1 mg/L) + 2,4-D (0,1 mg/L). La cantidad de biomasa generada por los explantes de tallo fue menor en ambas combinaciones y presentó oxidación y menor friabilidad en comparación con los explantes de hoja, por lo que se descartó su uso para futuros experimentos.

1. Resumen

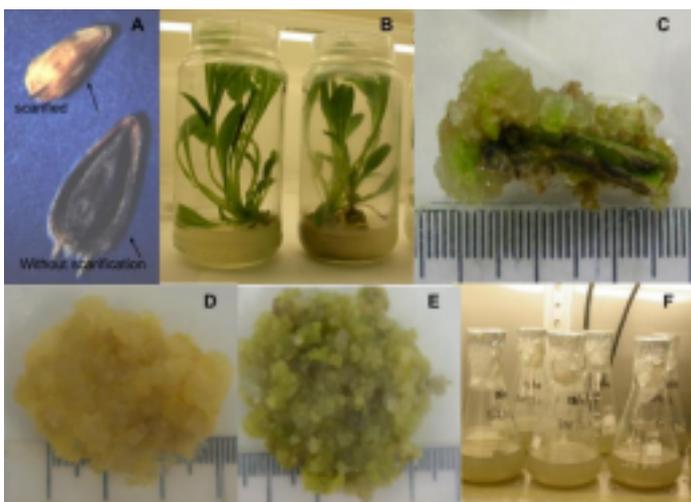
Tabla 1. Producción de callo con explantes de hoja y tallo en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BAP + NAA o BAP + 2,4-D.

Explante	Tallo		Hoja	
Tratamiento	BAP 1 mg/L + NAA 2 mg/L	BAP 1 mg/L + 2,4-D 0,1 mg/L	BAP 1 mg/L + NAA 2 mg/L	BAP 1 mg/L + 2,4-D 0,1 mg/L

Proporción	21/36	24/40	37/40	36/40
Producción de biomasa estimada*	+	++	+++	+++

*producción de biomasa: +escasa, ++abundante, +++ muy abundante

Una vez establecidas las condiciones de inducción del callo, se mantuvo un conjunto de callos en oscuridad y otro en fotoperiodo (Fig. 1-D y 1-E respectivamente). Los callos que se mantuvieron en fotoperiodo mostraron una



tendencia friable, excepto en algunas áreas en las que se mantuvo firme. Por su parte, los callos mantenidos en la oscuridad mostraron una mayor friabilidad que los callos verdes.

Fig. 1. Semillas y cultivos de células de *Helianthella quinquenervis*: (A) Aquenios con y sin escarificación. (B) Plantas in vitro de dos meses. (C) Explante de hoja con callo en formación. (D) Callo en oscuridad. (E) Callo en fotoperiodo. (F) Cultivo de células en suspensión.

Caracterización de cultivos de células en suspensión Se obtuvieron cultivos de células en suspensión (Fig. 1-F), a partir de callos procedentes de secciones de hojas en presencia de BAP (1 mg/L) y 2,4-D (0,1 mg/L) mantenidos en fotoperiodo. La figura 2 muestra la cinética de crecimiento en peso seco de las suspensiones celulares. El crecimiento mostró una fase de adaptación (lag) de 2 días, después de la cual la biomasa aumentó, alcanzando la fase estacionaria en el octavo día. Mediante el tratamiento con diacetato de fluoresceína (Fig. 3) se determinó una viabilidad del 70% durante el crecimiento activo este cultivo en suspensión.

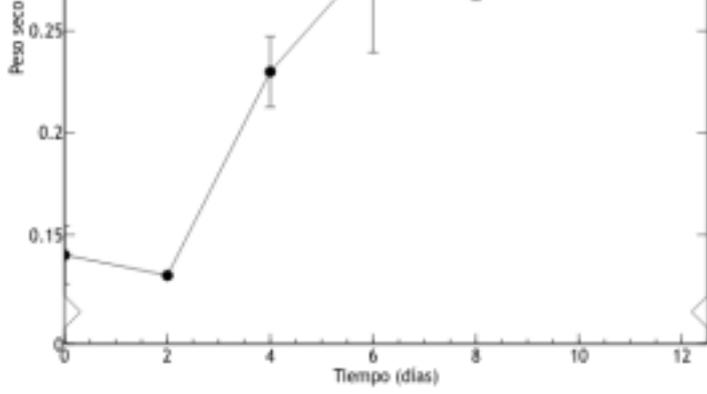


Fig. 2. Cinética de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *Helianthella quinquenervis* expresada en peso seco (g/150 ml). Los valores son promedios \pm S.D. de las mediciones en tres frascos.

1. Resumen

21

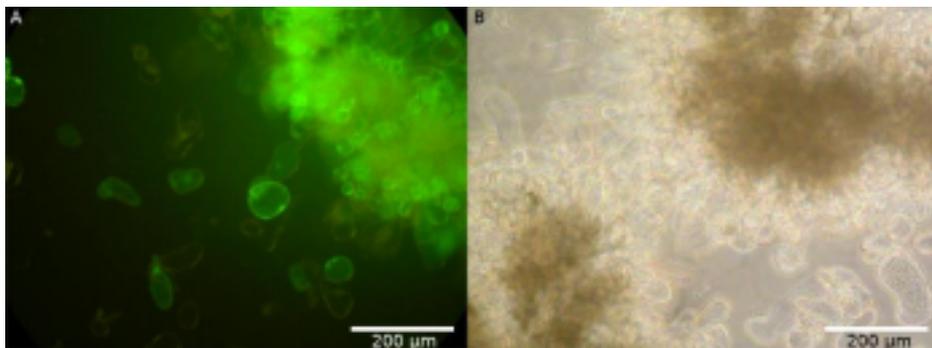


Fig. 3 Viabilidad del cultivo en suspensión analizado en la fase exponencial. (A) Agregados de células expuestas a diacetato de fluoresceína. (B) Los mismos agregados de células observados en campo claro.

La filtración diferencial a través de filtros de diferente tamaño de poro mostró

diversidad en el tamaño de los agregados celulares en la fase estacionaria (Fig. 4). Los resultados están expresados como el porcentaje de peso seco retenido en cada filtro, y son valores promedio \pm S.D. de cinco mediciones.



Fig. 4. Tamaño de los agregados celulares de suspensiones de *Helianthella quinquenervis* analizados en la fase estacionaria (al octavo día). Los resultados están expresados como el porcentaje de peso seco retenido en cada filtro, y son valores promedio \pm S.D. de cinco mediciones.



Fig. 5. Viabilidad de dos fracciones de cultivo en suspensión obtenidas por filtración diferencial con una malla de 2 mm de poro (A y C), y

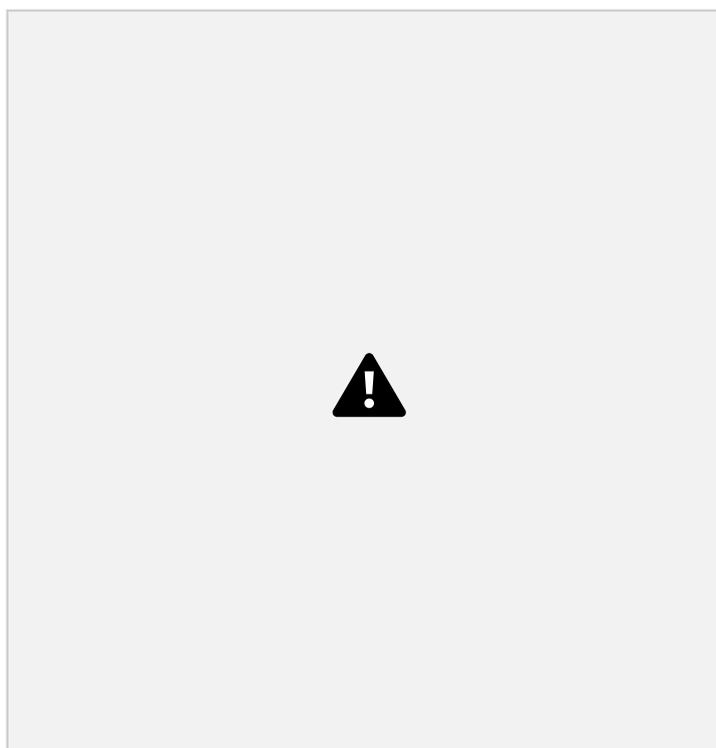
cultivos homogéneos obtenidos por filtración a través una malla de 22 μm de poro (B y D), durante la fase estacionaria. (A y B) con campo claro, (C y D) con fluorescencia.

Inducción de raíces transformadas

Los explantes de hoja infectados por *Agrobacterium rhizogenes*, cepa A4, y mantenidos en un medio sólido libre de hormonas, con cefotaxima, comenzaron a desarrollar pequeñas raíces después de doce días de infección, brotando de la herida (Fig. 6-A). Después de veinte días (Fig. 6-B) la longitud de las raíces aumentó, al igual que su número. Las raíces eran de color amarillo pálido y se observó formación de callos en la base de las mismas después de treinta días (Fig. 6-C), pero esto no afectó al crecimiento de las raíces. Después de varios subcultivos en medio MS líquido al 50% con antibiótico, las raíces fueron subcultivadas (Fig. 6-D) en medio MS líquido donde siguieron desarrollándose, ahora sin antibiótico. Las raíces mostraron las características típicas de raíces transformadas: crecimiento plagiotrópico, raíz gruesa y presencia de pelos radiculares.

23

1. Resumen



La respuesta a la infección en los tres ensayos utilizados para la transformación (pinchazo, sonicación y co-cultivo) mostró la susceptibilidad de los explantes de *Helianthella quinquenervis* a ser transformados por *Agrobacterium rhizogenes* cepa A4 (tabla 2). Después de cuarenta días, el ensayo de pinchazo generó la respuesta más baja de transformación (17%), tanto en número de explantes

generadores de raíces, como en el número total de explantes infectados. En este caso, los explantes infectados mostraron oxidación con el tiempo. En el ensayo de sonicación el porcentaje de infección fue menor (40%), pero se obtuvieron numerosas raíces pilosas (56). El co-cultivo mostró la mayor frecuencia de infección (66%). Se observó una gran diversidad en cuanto al número de raíces por explante entre los ensayos; sin embargo, no se apreciaron diferencias en la morfología de las raíces, generalmente delgadas y de color amarillo pálido. El número de raíces generadas por explante en cada tratamiento fue variable a los cuarenta días (entre 1 y 9), pero con el tiempo los explantes generaron más raíces y crecieron en longitud (tabla 2, Fig. 6-C y D). En los tres tratamientos los explantes que no dieron respuesta fueron necrosados o reinfectados, lo que impidió su uso posterior. De las diferentes raíces transformadas que se obtuvieron se descartaron aquellas en las que la infección por *A. rhizogenes* no pudo ser eliminada.

24

1. Resumen

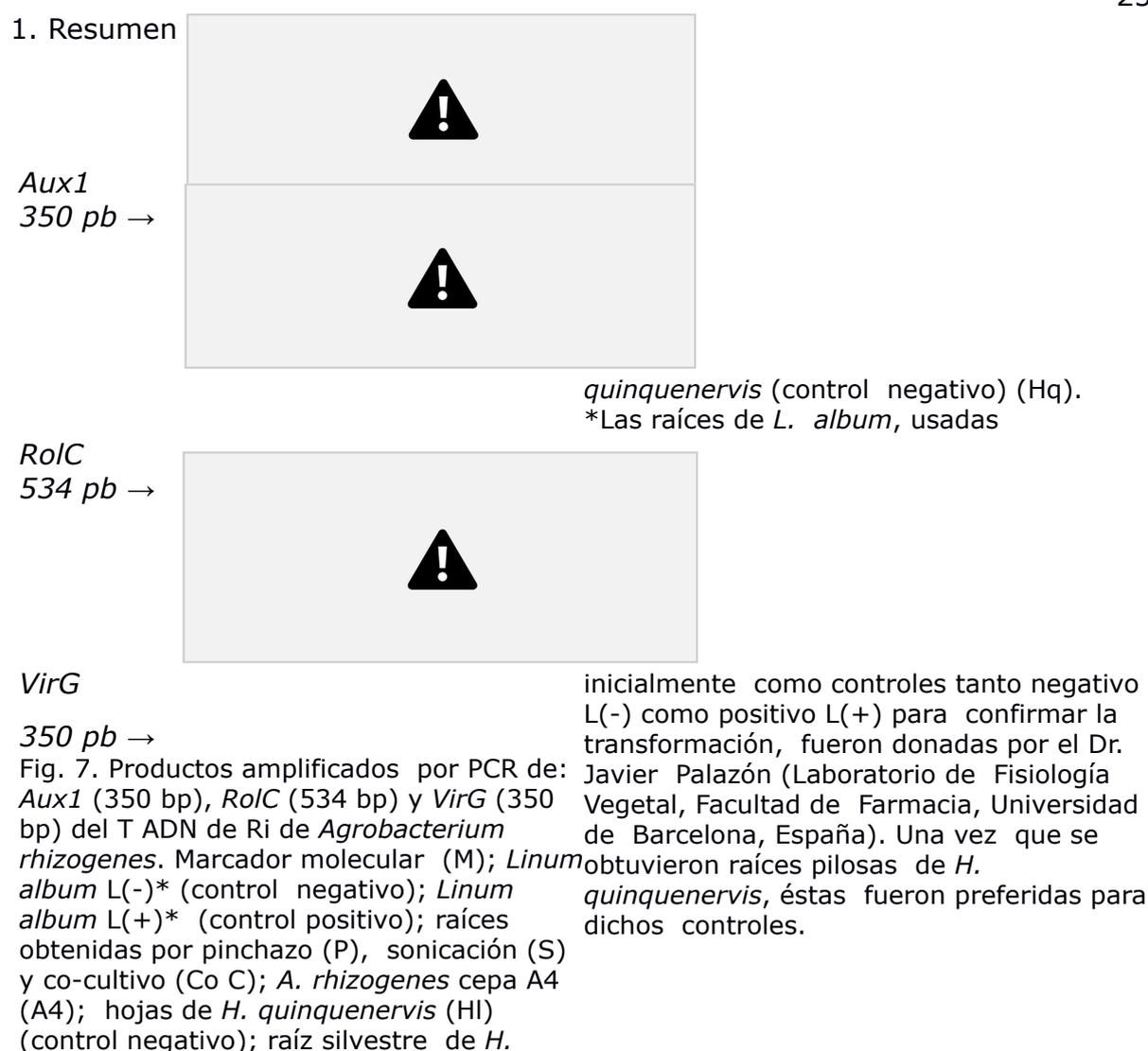
Después de cuarenta días se escogieron raíces pilosas de 4-6 cm de longitud y se mantuvieron en medio líquido con sacarosa y antibiótico. Después del cuarto subcultivo bajo estas condiciones, la transformación y contaminación de los cultivos se analizaron usando PCR.

Tabla 2. Formación de raíces transformadas de *Helianthella quinquenervis*, después de 40 días de inoculación.

Método de infección	Número de explantes infectados/total de explantes	Rango de raíces/explante
Pinchazo	6/35	1-3
Sonicación	18/45	1-5
Co-cultivo	20/30	1-9

PCR para la confirmación de la transformación de raíces La transformación genética de las raíces pilosas de *Helianthella quinquenervis* fue confirmada por PCR. Los primers *RoIC*, *Aux1* y *VirG* fueron amplificados, mostrando un sistema completo y estable de transformación (Fig. 7). Los resultados de PCR revelaron la inserción de fragmentos de TL-DNA (*RoIC*) y TR

DNA (*Aux1*) en los tres ensayos. La eliminación exitosa de la infección por *A. rhizogenes* en los tres cultivos también se demostró por la ausencia de la banda correspondiente al producto amplificado *VirG*. Esta banda sólo se observó en la muestra correspondiente a la cepa *A. rhizogenes* A4. La ausencia de infección por *A. rhizogenes* cepa A4 también se confirmó en hojas (que sirvieron como explantes), así como en raíces no transformadas de *H. quinquenervis*.



Producción de enecalina en las raíces transformadas Los tres ensayos produjeron raíces pilosas de *Helianthella quinquenervis* en cantidades suficientes para realizar la cuantificación de enecalina (Fig. 8). Aunque los resultados indicaron que el mejor ensayo para producir raíces pilosas, atendiendo a la frecuencia de la infección, fue co-cultivo, el ensayo de sonicación

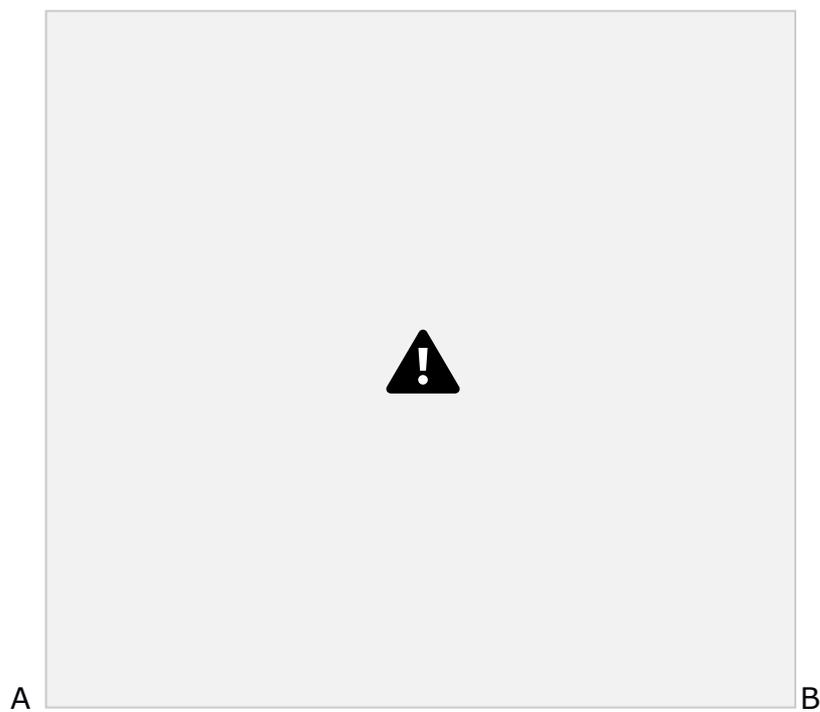
produjo una mayor concentración de enecalina (120 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco). El co cultivo produjo algo menos (110 $\mu\text{g/g}$), mientras que con el ensayo de pinchazo sólo se alcanzaron 19 $\mu\text{g/g}$, y la frecuencia de infección fue menor.



1. Resumen

Fig. 8. Producción de enecalina en raíces pilosas y porcentaje de infección (ver tabla 2) en tres ensayos: pinchazo (P), sonicación (S) y co cultivo (CC). La frecuencia de infección representa el promedio \pm SD de cinco mediciones. Los datos de cuantificación de enecalina representan el promedio \pm SD de tres determinaciones.

El contenido de enecalina por unidad de peso seco de raíz pilosa (Fig. 9-A), frente al crecimiento de la raíz pilosa, valorado por aumento de peso seco, mostró una correlación inversa: a medida que aumentaba el peso seco de las raíces, la cantidad de enecalina disminuía. Sin embargo, esta tendencia se invierte a partir del día 30: el crecimiento de las raíces decae mientras que la cantidad de enecalina experimenta un gran aumento. Sin embargo, cuando el contenido de enecalina se representó por explante, éste aumentó gradualmente hasta el día 30, y experimentó un gran aumento en la fase estacionaria (Fig. 9-B).



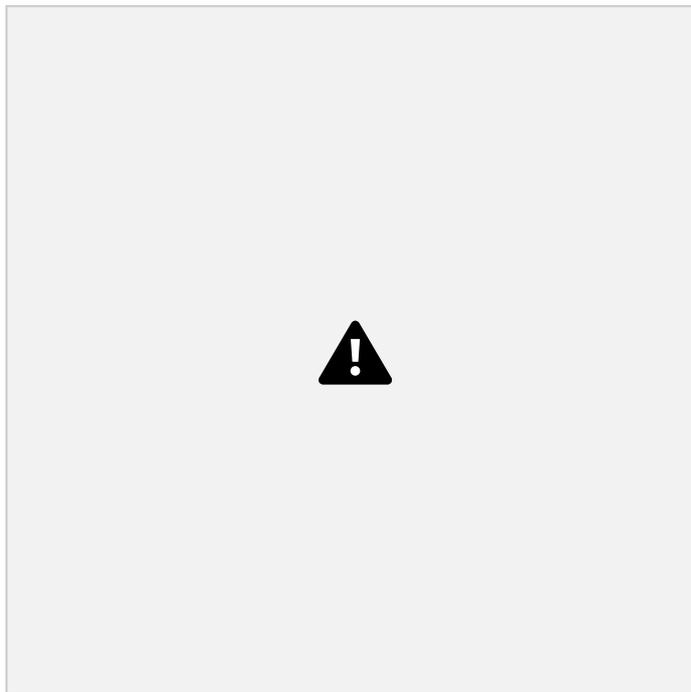


Fig. 9. Producción de enecalina en raíces pilosas de *H. quinquenervis*. A) Crecimiento de raíces pilosas (●) y cuantificación de enecalina (○). B) Producción de enecalina por explante. Los datos de peso seco representan el promedio \pm SD de tres mediciones.

Detección y cuantificación de cromenos

Se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) la presencia de algunos de los MSP más importantes de *H.*

quinquenervis (encecalina, desmetilencecalina y euparina) en las muestras utilizadas a lo largo del estudio: callos, cultivos de células en suspensión, hojas y raíces de plantas cultivadas *in vitro*, raíces pilosas, así como de hojas y raíces de plantas maduras silvestres (tabla 3, figuras 10 y 11). Cuando se analizaron las raíces maduras a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), se detectaron, además de la enecalina, algunos compuestos relacionados estructuralmente: euparina y desmetilencecalina. Sin embargo, en las raíces de dos meses de plantas *in vitro* solo se detectaron euparina y enecalina.

En los siete tipos de muestras se detectó la presencia de enecalina, pero también se encontró euparina en las muestras de raíces (raíces de plantas maduras, de plantas obtenidas *in vitro* y de raíces transformadas), y desmetilencecalina únicamente en raíces maduras.

La presencia de enecalina y euparina en las raíces pilosas se encontró en las

tres líneas de raíces transformadas, pinchazo, sonicación y co-cultivo.

En callo mantenido en oscuridad o en condiciones de fotoperiodo, solo se detectó encecalina (Fig. 12) al igual que en cultivo de células en suspensión.

Tabla 3. Metabolitos secundarios identificados por GC-MS MS en *Helianthella quinquenervis*.

Cultivo	Euparina	Encecalina
Callos* (fotoperiodo)	nd	+
Callos (oscuridad)	nd	+
Cultivo de células en suspensión	nd	+
Raíces planta <i>in vitro</i>	+	++
Raíces transformadas	+	++

*Callos mantenidos en fotoperiodo 16 h/luz 8/oscuridad.
 +: presencia y abundancia, nd: no detectado. GC-MS-MS: detección por cromatografía de gases con detector de masas en método de masas-masas.

1. Resumen

Encecalina ^a	Desmetilencecalina ^b	Euparina ^c
		

Fig. 10. Estructuras químicas encontradas en las muestras de *Helianthella quinquenervis*.

^a Fue detectada usando GC-MM en raíces maduras, raíces *in vitro* de plantas de dos meses, raíces pilosas y callos mantenidos en luz y en oscuridad. ^b Solo fue detectada en raíces maduras. ^c Detectada en raíces maduras, raíces *in vitro* de plantas de dos meses y en raíces pilosas.

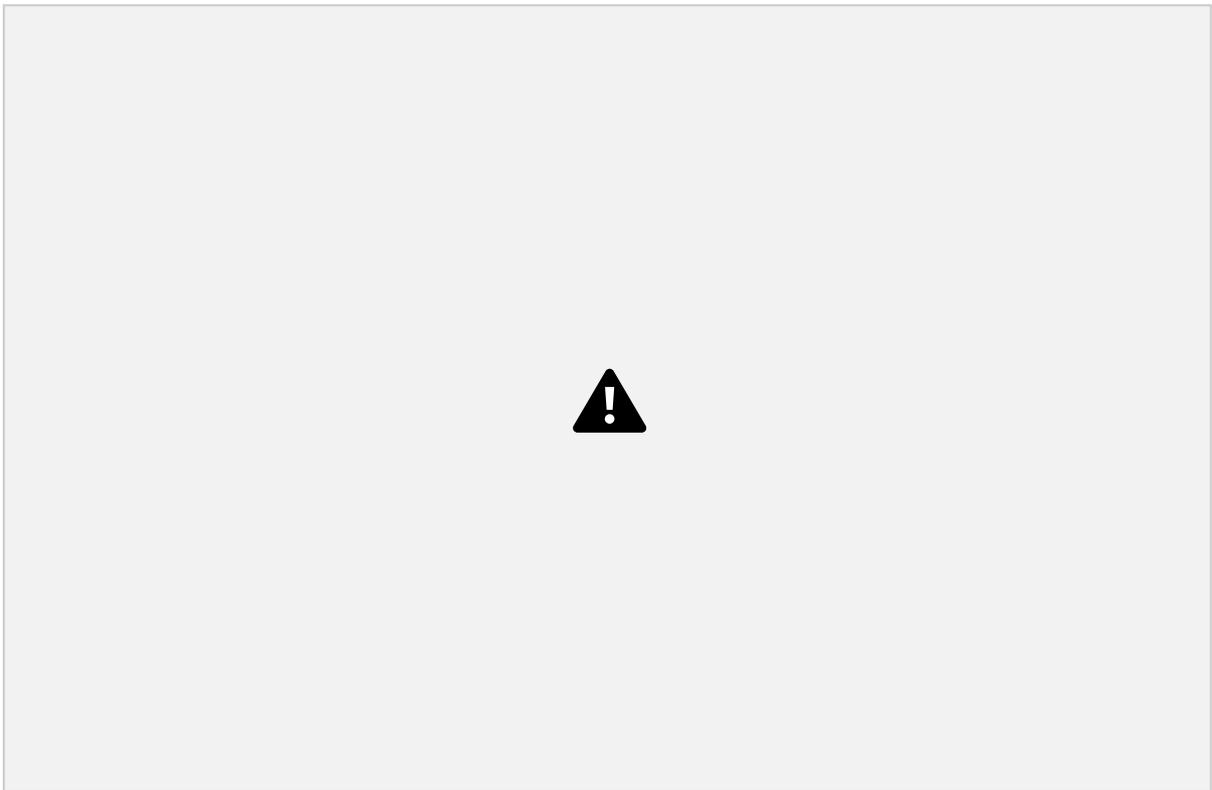


Fig. 11 Espectro representativo de enecalina.

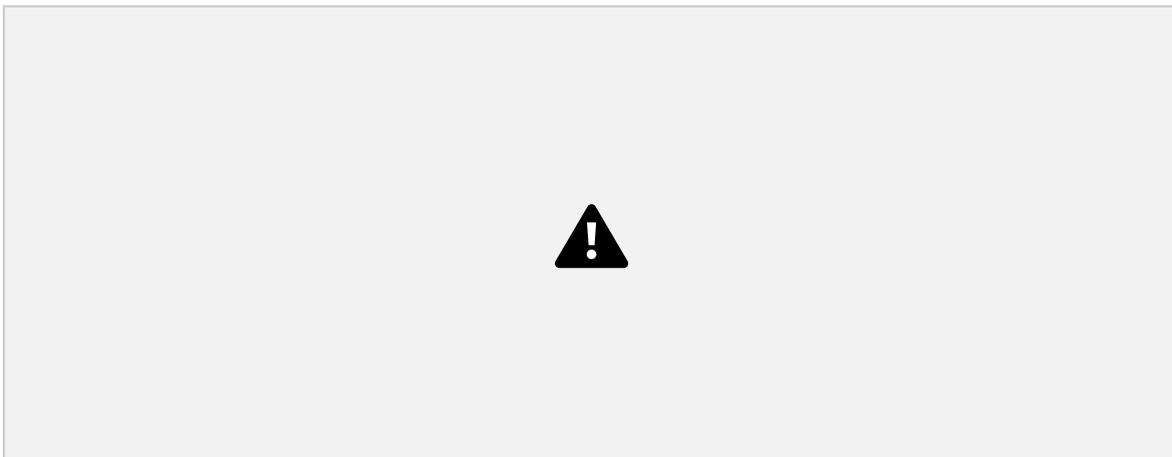


Fig. 12. Cromatograma de la muestra de callo donde el pico de enecalina puede verse, así como los espectros de masas-masas, obtenidos mediante la fragmentación del ion precursor de masa 217.

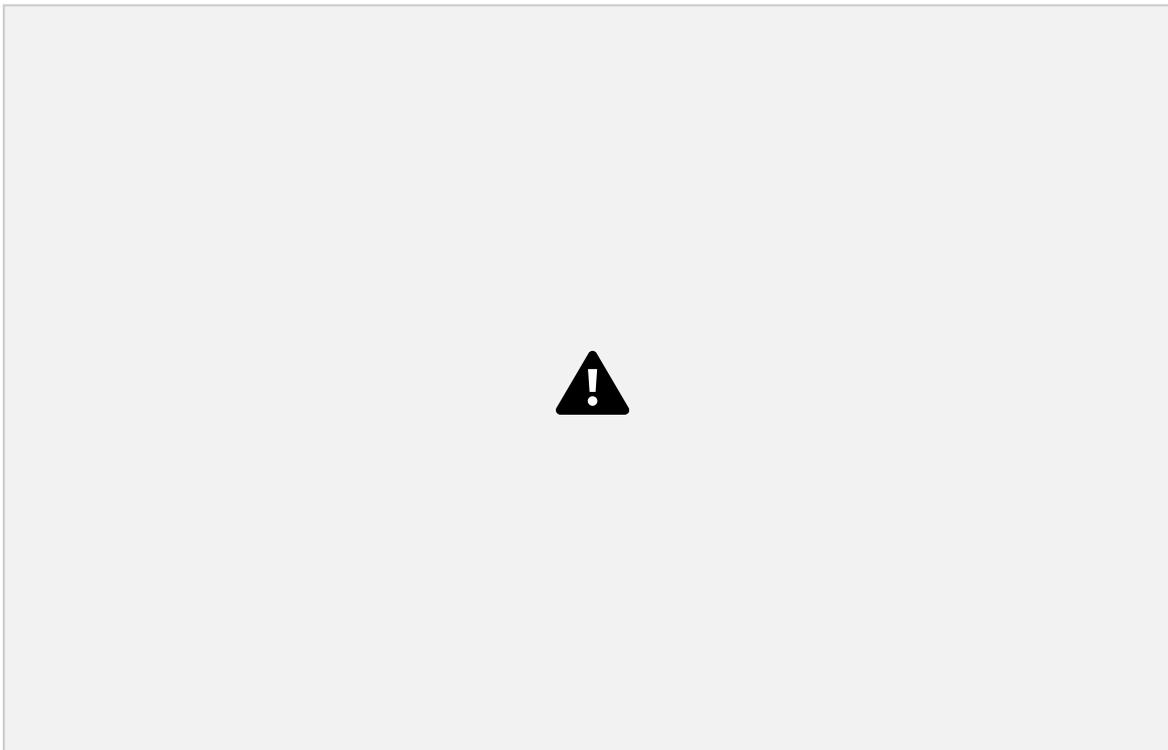


Fig.13 Cromatograma de la muestra de raíces pilosas donde el pico de enecalina puede verse, así como los espectros de masas-masas, obtenidos mediante la fragmentación del ion precursor de masa 217.

Discusión

La germinación de las semillas de los aquenios de *Helianthella quinquenervis* requirió la escarificación mecánica como condición importante para obtener altos porcentajes de germinación, ya que éstos aumentaron del 13% de las semillas no

31

1. Resumen

escarificadas al 80% en las escarificadas. Estos resultados indican que se trata de una dormición extraembrionaria debida a la dureza e impermeabilidad del pericarpio.

En forma silvestre, *H. quinquenervis*, produce cromenos y benzofuranos que han sido identificados en partes aéreas y raíces. Con el fin de identificar los cultivos *in vitro* de *H. quinquenervis* que producen MSP de interés, se desarrolló inicialmente un ensayo para producir callos. Los mejores resultados se obtuvieron con explantes de hoja en medio MS con BAP (1 mg/L) + 2,4-D (0,1 mg/L). A partir de los callos se obtuvieron suspensiones celulares de *H. quinquenervis* que presentaron una gran variación en los tamaños de los agregados celulares, pero esto no afectó la viabilidad del cultivo.

Un problema frecuente de las masas de células indiferenciadas (callos y suspensiones celulares) es que no producen cantidades significativas de MSP, por

la frecuente dependencia del estado de diferenciación celular que tiene el metabolismo secundario. No obstante, tanto los callos de *H. quinquenervis* desarrollados y mantenidos en fotoperiodo de 16 h/luz 8/oscuridad y en oscuridad, como las suspensiones celulares mostraron la presencia de enecalina.

Además, se probó la susceptibilidad de explantes foliares de la planta a ser transformados por *Agrobacterium rhizogenes* utilizando tres técnicas. El pinchazo y el co-cultivo son las técnicas más usadas, pero también se llevó a cabo la sonicación (Georgiev et al., 2011). En nuestro experimento el co-cultivo y la sonicación fueron las mejores opciones para transformar los explantes de *H. quinquenervis*. Después de 40 días desde la inoculación, los explantes que no respondieron a la técnica de pinchazo presentaron necrosis o reinfección con *A. rhizogenes*.

Comprobamos mediante la identificación de los genes bacterianos *RolC* y *Aux1* presentes en el plásmido que la transformación genética de raíces de *H. quinquenervis* había sido completa y estable. Además, la ausencia del gen *VirG* sirvió para descartar la contaminación por *A. rhizogenes* de las raíces transformadas.

32

1. Resumen

La sonicación y co-cultivo fueron también las mejores opciones para producir enecalina. Esto podría estar relacionado con el abundante crecimiento de la raíz que desarrollaron y con sus características morfológicas.

El aumento drástico de la producción de enecalina en las fases finales del crecimiento de las raíces pilosas puede deberse a varios factores, incluyendo la diferenciación de las células al disminuir los nutrientes del medio de cultivo una vez que el cultivo se aproxima a la fase estacionaria y hay suficientes intermediarios para llevar a cabo la síntesis de los MSP.

La presencia de benzofuranos como euparina, también identificada en las raíces de *H. quinquenervis*, tanto *in vitro* como en plantas maduras y raíces pilosas, también se ha confirmado además en otras especies como *Eupatorium cannabinum*.

Se ha descrito la producción natural de enecalina en hojas de *Encelia farinosa* (Kunze et al., 1996) y partes aéreas de *Centaurea solstitialis* (Merril, 1989), y

también en raíces y hojas de *H. quinquenervis* (Castañeda et al., 1996). En nuestro estudio, la presencia de enecalina fue confirmada en hojas y raíces jóvenes de esta especie. Respecto a la desmetilencecalina, su presencia sólo se ha detectado en tejidos maduros (Castañeda et al., 1996 y Herz y Kulanthaivel, 1984), no en hojas jóvenes ni en raíces de plantas *in vitro* o raíces pilosas. Esto indica que la síntesis de ese compuesto parece estar vinculada con su ontogenia. La expresión diferenciada de los MSP durante la ontogenia de las plantas podría

En definitiva, se desarrollaron exitosamente las diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de plantas: callos, células en suspensión y en particular raíces transformadas, lo que nos ha permitido proponer un sistema preliminar de producción de enecalina. Todo ello deja patente el potencial biotecnológico de *Helianthella quinquenervis* en relación con este importante metabolito.

Discusión y conclusiones

El uso de algunas técnicas del cultivo *in vitro* de células y tejidos de plantas nos ha permitido ahondar en el campo de la investigación básica y de la aplicada.

Por una parte, el uso de cultivos en suspensión de maíz nos ha permitido investigar el papel que tiene el ancimidol en el metabolismo de la pared celular; la

33

1. Resumen

homogeneidad de los cultivos en suspensión y la alta tasa de división que presentan han permitido evaluar el efecto del ancimidol en el crecimiento, viabilidad y morfología celulares, que se han visto afectados conforme se aumentaba la concentración del ancimidol hasta provocar la muerte celular. Nos ha permitido asimismo profundizar el análisis a nivel subcelular, determinando cómo participa el ancimidol en la composición y estructura de la pared celular; a través del uso de diferentes técnicas como la espectroscopía FTIR, la cuantificación de celulosa, el seguimiento de la incorporación de [¹⁴C]Glc y [³H]Ara en fracciones de pared y la expresión de genes de la celulosa sintasa. Los cultivos en suspensión de maíz resultaron ser un medio idóneo para el estudio del metabolismo de la pared celular a niveles bioquímico y molecular.

Por otra parte, tres cultivos (de callo, de células en suspensión y de raíces transformadas) han sido ensayados hacia la producción de MSP. Nuestro objetivo era desarrollar un protocolo preliminar, basado en *Helianthella quinquenervis*, para la producción de enecalina.

Cada sistema de cultivo presenta ventajas y desventajas. Los cultivos de callo

son un punto de partida para otras técnicas, son una técnica útil para la producción inicial de MSP, pero su cultivo es lento, porque el acceso de los diversos estratos de células a los nutrientes es inequitativo, y porque el intercambio de gases y la concentración de residuos en el medio genera un crecimiento desigual.

Los cultivos en suspensión son más versátiles que los de callo, pues la agitación a la que se ven sometidos distribuye de manera más homogénea los nutrientes del medio, y facilita la evaluación de los parámetros de crecimiento y producción de MSP. En nuestro caso, los cultivos mostraron cierta heterogeneidad que, sin embargo, no nos impidió identificar la presencia de la enecalina.

Sin duda, la generación de raíces transformadas ha sido y es una vía muy prometedora de obtención de MSP, dado que algunos metabolitos son sintetizados en ese órgano. Su cultivo *in vitro* tiene grandes ventajas al no necesitar la adición de hormonas para su crecimiento y desarrollo. Sus problemas se presentan durante el escalamiento a niveles piloto o industrial. Para nosotros, las raíces pilosas generadas a través de diferentes técnicas de transfección en explantes de hoja permitieron determinar que *H. quinquenervis* es susceptible a ser infectada

34

1. Resumen

por *Agrobacterium rhizogenes*, generando raíces transformadas con una alta producción de biomasa y biosíntesis confirmada de enecalina y euparina.

Como consecuencias del trabajo con las diversas técnicas de cultivo *in vitro* de plantas utilizadas en esta tesis se encuentran, por una parte, la mejora en el conocimiento de los procesos fisiológicos y bioquímicos de las paredes celulares de células en suspensión de maíz expuestas a un herbicida (ancimidol) y, por otra, un mejor uso biotecnológico de *Helianthella quinquenervis* para la producción de enecalina. Este es, por cierto, el primer reporte de producción de enecalina en esta especie.

Las dos líneas de trabajo descritas dan lugar a una serie de conclusiones:

Se ha caracterizado la toxicidad del ancimidol a nivel celular y subcelular. El crecimiento y la morfología dependen de la concentración, con un efecto reversible hasta cierto grado por ácido giberélico. En altas concentraciones, la viabilidad decreció hasta cero inclusive.

A nivel subcelular, la cantidad de celulosa en paredes depende inversamente de

la concentración de ancimídol, pero las proteínas y los compuestos fenólicos lo hacen de manera directa.

La incorporación de [¹⁴C]Glc en la fracción de α-celulosa fue reducida por la aplicación de ancimídol, mientras que las incorporaciones de [¹⁴C]Glc y [³H]Ara en las fracciones de hemicelulosas se incrementaron. Adicionalmente, las concentraciones de GA₃ 10 y 100 μM no revirtieron completamente la reducción de la incorporación de [¹⁴C]Glc en la celulosa, observada con el tratamiento con ancimídol.

La aplicación de ácido giberélico promovió la expresión de *ZmCesA1-2*, *ZmCesA7* y *ZmCesA8*, genes asociados a la síntesis de celulosa en la pared celular primaria. La expresión génica de *ZmKO1* no se inhibió cuando se aplicó ancimídol al medio de cultivo de nuestras células de maíz, lo que indica que el efecto del ancimídol está en la inhibición de la actividad enzimática y no en la expresión génica.

Nuestros resultados apuntan a un doble efecto de ancimídol en cultivos de células de maíz, dependiendo de su concentración. A valores bajos, los efectos del ancimídol estarían relacionados con la inhibición de la biosíntesis de giberelinas, y

35

1. Resumen

la aplicación de giberelinas tiende a revertir los efectos. Sin embargo, a niveles muy altos, los efectos de ancimídol no son revertidos por las giberelinas, y se desencadena la muerte celular.

En lo que se refiere a *Helianthella quinquenervis*, se han desarrollado diferentes cultivos *in vitro* de la planta y se ha evaluado en ellos la producción de enecalina y otros metabolitos relacionados.

La escarificación mecánica de las semillas de *Helianthella quinquenervis* resultó ser determinante para obtener altos porcentajes de germinación. La combinación de BAP 1 mg/L 2,4 D + 0,1 mg/L con explantes de hoja, promovió el desarrollo de callos de consistencia friable, apta para inducir cultivos en suspensión. Los cultivos en suspensión mostraron elevada viabilidad, así como diversidad en el tamaño de los agregados celulares. Se logró la infección de explantes de hoja con las técnicas de pinchazo, sonicación y co-cultivo con *Agrobacterium rhizogenes*.

Con las tres técnicas se obtuvo la generación de raíces pilosas, aunque con co cultivo y sonicación se generaron más raíces que con la técnica de pinchazo. A

través de PCR se confirmó la transformación de las raíces con la amplificación de los genes *Aux1* y *RolC* y se descartó la contaminación del material, por la ausencia de la expresión del gen *VirG*.

La detección de enecalina se comprobó en las raíces generadas con los tres procedimientos a través de CG-EM. De los diferentes cromenos identificados en *Helianthella quinquenervis*, la enecalina fue detectada en cultivos de callo, cultivos en suspensión y en las raíces transformadas por *A. rhizogenes*. También se identificó en las raíces la presencia de euparina.

Este es el primer resultado de generación de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* A4 en *Helianthella quinquenervis*.

Bibliografía

Acebes, J.L., Encina, A., García-Angulo, P., Alonso-Simón, A., Mérida, H. and Álvarez, J.M. 2010. Cellulose biosynthesis inhibitors: their uses as potential herbicides and as tools in cellulose and cell wall structural plasticity research. Cellulose: Structure and Properties, Derivatives and Industrial Uses. Ed. Nova Publishers. 39-73.

36

1. Resumen

Castañeda, P., Gómez, L., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., Anaya, A.L. and Bye, R. 1996. Phytogrowth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. *J Nat Prod* 59: 323-326.

Haberlandt, G. 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien* 111: 69-92.

Hofmannová, J., Schwarzerová, K., Havelková, L., Boříková, P., Petrášek, J. and Opatrný, Z. 2008. A novel, cellulose synthesis inhibitory action of ancymidol impairs plant cell expansion. *J Exp Bot* 59: 3963-3974.

Kim, H.J. and Triplett, B.A. 2001. Cotton fiber growth in planta and in vitro. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant Physiol* 127: 1361-1366.

Rao, S.R. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv* 20: 101-153.

2. Introducción

Cultivos celulares de plantas: principios y aplicaciones generales

El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos de plantas comprende un conjunto de técnicas que, en condiciones asépticas, permiten el mantenimiento o la inducción de determinadas respuestas del desarrollo de células, tejidos u órganos bajo condiciones físicas y químicas controladas, es una herramienta importante tanto en los estudios básicos como en los aplicados que tiene importantes aplicaciones comerciales (Thorpe, 2007). Debe su origen a las ideas del científico alemán, Haberlandt (1902), quien introdujo el término de totipotencia, que es la capacidad que tiene cualquier célula viva con núcleo, de regenerar una planta completa.

Los cultivos *in vitro* suelen iniciarse partiendo de órganos o tejidos axénicos que contienen células vivas y se denominan explantes. Los explantes se colocan sobre medios nutritivos y, mediante manipulación de las condiciones del cultivo, o de la composición de los propios medios de cultivo, se induce inicialmente una respuesta determinada: elongación, división o diferenciación celular, que tendrá una consecuencia concreta y cuya elección dependerá de la finalidad del trabajo que se quiera hacer (Bhojwani y Dantu, 2013).

En el manejo de cultivos vegetales, tanto *in vitro* como *ex vitro*, el uso de fitohormonas y/o reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas, brasinoesteroides) así como de retardantes del crecimiento (paclobutrazol, daminocida) son esenciales para generar plantas con las características hortícolas deseadas. En general, los reguladores de crecimiento van a regular la expresión de genes involucrados en la división celular y la diferenciación, controlando de esta manera el crecimiento y desarrollo que dirigirá la morfogénesis.

Las aplicaciones de cultivos *in vitro* incluyen la obtención de plantas haploides (Germanà, 2011), la obtención de híbridos somáticos a través de la fusión de protoplastos (Eeckhaut et al., 2013) y la obtención de plantas libres de virus, así como la producción de MSP de plantas (MSP) (Karuppusamy, 2009), la micropropagación y el estudio de aspectos concretos de la biología de las plantas: genética, fisiología, bioquímica y patología (Rao y Ravishankar, 2002).

2. Introducción

La aplicación de la técnica de cultivo *in vitro* de plantas ha permitido también avances en la clonación de plantas de interés ornamental y su transformación genética (Rout, et al., 2006), inducción de mutagénesis, así como el rescate de plantas con algún grado de amenaza de sus poblaciones (Engelmann, 2011; Pence, 2011).

En nuestro caso, los cultivos de callos, células en suspensión y la generación de raíces transformadas nos han permitido investigar por una parte la producción de MSP y por otra la respuesta bioquímica de las células ante la exposición a un inhibidor de la biosíntesis de celulosa.

Las ventajas o desventajas del uso del cultivo de tejidos dependen en parte de los propios objetivos a cubrir. Podemos considerar ventajas el producir clones de plantas de una especie en extinción, pero entonces debemos considerar que se reduce su diversidad genética y las poblaciones en esas circunstancias son más

susceptibles a las enfermedades. En el caso de los cultivos de células, una suspensión muy homogénea será muy útil si se quiere estudiar el efecto que desencadena una sustancia concreta, puesto que todas las células, estarán en las mismas condiciones y la respuesta será uniforme. Sin embargo, la heterogeneidad celular puede ser muy útil en la selección de células con caracteres determinados y en la obtención de variantes somaclonales o fisiológicos. Más ventajas suele presentar el uso de cultivos para la obtención de MSP, ya que la producción de biomasa y/o metabolitos suele efectuarse de manera más rápida que en las plantas completas.

Para la generación de cultivos *in vitro*, ya sea de callo, suspensiones celulares u órganos de plantas, deben tomarse en cuenta varios aspectos, como la calidad y estado de desarrollo de la planta madre de la cual se obtendrán los explantes, el tipo y edad del explante, los medios y las fitohormonas a utilizar. El balance entre las fitohormonas utilizadas afectará tanto al grado de diferenciación o desdiferenciación del tejido como la generación de callo o la formación de brotes ya sea por organogénesis directa o indirecta. Para el establecimiento de cultivos de callos y suspensiones celulares, es indispensable una alta tasa de división celular; ésta se logra generalmente con concentraciones superiores de auxinas y menores de citoquininas. Esta respuesta se debe a la presencia de células totipotentes en los tejidos, y a los efectos de las fitohormonas, ya que ellas pueden

42

2. Introducción

inducir la expresión de genes involucrados en la activación del ciclo celular, estimulando con ello a la división celular (Hu et al., 2000; Ikeuchi et al., 2003). La alta producción de biomasa en estos sistemas los convierte en útiles herramientas para la producción de MSP.

Por otra parte, la producción de MSP es de interés en las áreas farmacéutica, agroquímica alimentaria (Horsch et al., 1985; Bourgaud et al., 2001; Kolewe et al., 2008; Hussain et al., 2012), y en la ingeniería de rutas metabólicas para reorientar una ruta enzimática y producir un compuesto nuevo o aumentar la producción de compuestos ya existentes, así como para regular su degradación (Verpoorte, et al., 1999; DellaPenna, 2001).

A través del uso de cultivos *in vitro*, se han desarrollado modelos experimentales que han permitido una mayor comprensión de los procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que ocurren en las plantas. Casos especialmente importantes son *Arabidopsis thaliana* por haber sido una de las primeras plantas

modelo (Kaul et al., 2000; Arabidopsis Genome Initiative, 2000), el arroz (Goff et al., 2002; Project, I.R.G.S., 2005), el maíz (Schnable, et al., 2009), el trigo (Brenchley, et al., 2012) y el frijol o alubia (Vlasova et al., 2016), por ser cultivos de primera importancia agrícola a nivel mundial. En todos estos la investigación se ha enfocado hacia el conocimiento de su genoma y del papel de los genes y sus productos en la resistencia a plagas y sequías, mejora del contenido nutricional, y aumento de su producción agrícola (Song et al., 1995; Chaves et al., 2003; Paine et al., 2005).

La pared celular de las plantas

Los cultivos celulares vegetales han sido una herramienta fundamental en el estudio de la pared celular: su biosíntesis (Ohlsson et al., 2006), el papel que desempeñan en numerosos procesos celulares como la elongación celular, la destoxificación de xenobióticos, las reacciones de defensa frente al estrés biótico, etc. (Lozovaya et al., 1996).

La pared celular tiene un papel muy importante definiendo la estructura de las plantas, guiando su desarrollo y sirviendo como defensa contra patógenos, debido a su composición y arquitectura compleja. Un mejor conocimiento tanto de su estructura como de sus componentes ha sido logrado también a través del uso de

43

2. Introducción

cultivos celulares. La caracterización de polisacáridos y el desarrollo de técnicas de aislamiento de la pared celular han sido descritos usando cultivo de células en suspensión de arce (York et al., 1988). El cultivo de protoplastos proporciona un excelente medio para visualizar la dinámica de la regeneración de la pared celular,

lo cual ha sido abordado en numerosas especies como *Arabidopsis thaliana* (Yokoyama et al., 2016) y en suspensiones celulares de *Catharanthus roseus* (Takeuchi y Komamine, 1978).

Las principales características de la pared celular, así como el efecto que causan en ella compuestos como los inhibidores de la biosíntesis de celulosa (CBIs), que forma parte de una de las investigaciones de esta tesis, se describe a continuación.

La pared celular de las plantas evolucionó a partir de las algas verdes hace alrededor de 430 millones años (Zhong et al., 2010). Entonces comenzó la colonización de la tierra por las plantas y su subsiguiente diseminación y

diversificación. Es razonable suponer, entonces, que para ello las paredes celulares han jugado papeles cruciales (Kenrick y Crane, 1997).

La conformación de la pared celular es una parte tan importante del metabolismo, que gran parte de la producción de la fotosíntesis se canaliza a ella (Wang et al., 2013), y un gran número de genes se dedican a su biosíntesis (Pauly y Keegstra, 2008). Se estima que un 10% del genoma de la planta (unos 2.500 genes, según las especies) se dedica a genes implicados en el metabolismo o la funcionalidad de la pared celular (Carpita, 2011).

Las paredes celulares confieren características importantes a las células vegetales permitiendo una serie de funciones esenciales: proporcionan forma y soporte a los diferentes tipos celulares necesarios para formar los tejidos y órganos de una planta, forman la interfase entre las células adyacentes, y a menudo desempeñan un papel importante en la comunicación intercelular. Además, debido a su ubicación superficial, las paredes celulares de las plantas juegan un papel importante en las interacciones planta-microorganismos, incluyendo las respuestas de defensa contra patógenos (Keegstra, 2010).

La división de las células de las plantas implica la biogénesis y la integración de nuevas paredes en el plano de división. En este proceso, dos paredes opuestas se

forman dentro de la célula madre, y luego las nuevas paredes se integran con la pared existente para formar las células hijas.

Las células en crecimiento están rodeadas de una pared celular primaria metabólicamente activa, la cual es capaz de expandirse. Durante la división celular se forma la primera capa o estructura amorfa que se conoce como **lámina media**, rica en polisacáridos pécticos que mantiene unidas a las células. Entre la lámina media y la membrana plasmática se depositan los materiales que dan forma a la **pared celular primaria**. La pared celular primaria está compuesta principalmente por tres redes estructurales: pectinas, hemicelulosas-celulosa, glicoproteínas y pequeñas cantidades de fenoles. La celulosa se deposita en la pared celular primaria como microfibrillas, embebidas en una matriz compuesta por polisacáridos hemicelulósicos (Sandhu et al., 2009). Las redes de pectinas y proteínas son cuantitativamente más minoritarias, aunque también desempeñan una importante función. En algunas células se depositan, en la cara interna de la pared celular primaria, capas de

otros materiales que modificarán la proporción de los polímeros de pared celular primaria y lámina media, lo que dará origen a la **pared celular secundaria**. En ella, se depositan compuestos como la lignina o suberina; esta acumulación de capas da mayor espesor a esta pared, perdiendo con ello la capacidad de crecimiento y la posibilidad de variar la forma y tamaño de la célula.

En plantas superiores, las microfibrillas elementales de celulosa de 3 nm pueden agregarse en fibrillas de celulosa de mayor tamaño que varían de 5-10 nm de ancho en paredes celulares primarias, a 30-50 nm en paredes celulares secundarias (Davies y Harris, 2003; Zhang, 2014). Las cadenas de celulosa de la pared primaria se consideran de bajo peso molecular en comparación con las cadenas de celulosa de la pared secundaria, sus microfibrillas son altamente cristalinas y se disponen transversalmente al eje de elongación durante la síntesis de la pared celular primaria. Las paredes celulares secundarias también adoptan una organización similar de microfibrillas de celulosa. Durante la formación de la pared celular secundaria, las microfibrillas de celulosa se disponen como diferentes capas consecutivas (S1, S2, S3). Dentro de cada capa, las microfibrillas de celulosa son altamente ordenadas y paralelas, pero entre cada capa los ángulos de las láminas de microfibrillas están orientados de manera diferente (Li et al, 2014). Junto con hemicelulosas (xilanos) y lignina, la organización multicapa de

45

2. Introducción

microfibrillas de celulosa hace que la pared celular secundaria sea una estructura con gran resistencia y rigidez, incapaz de relajarse para permitir la expansión celular.

Dependiendo de los componentes y sus proporciones en la matriz, existen dos tipos de arquitectura de la **pared celular primaria**, la **pared celular tipo I** y **pared celular tipo II** (Carpita y Gibeaut, 1993) (Fig. 1).



Fig. 1. Modelo tridimensional de la pared celular tipo I (arabidopsis) y tipo II (arroz) mostrando la interacción molecular entre los diferentes componentes de la pared celular. (Tomado de Jones et al., 2013).

Composición de la pared celular tipo II

La pared celular tipo II es la propia de gramíneas (pastos y cereales), y es la que presenta el maíz, que es la especie que utilizaremos en la primera parte de la tesis. Los componentes que forman parte de la arquitectura de las paredes celulares de este tipo se describen a continuación:

Celulosa

La celulosa es el mayor componente de las paredes celulares y no difiere en proporción entre las paredes de tipo I y II. El contenido de celulosa suele representar entre el 35-50% del peso seco de la pared celular (Cheng, 2014). La celulosa está formada por una estructura paracristalina de 36 cadenas de β -1,4-D-glucano (McFarlane et al., 2014). Este tipo de enlace provoca que las glucosas

que participan en él estén rotadas 180° , lo que permite la formación de una estructura plana en la que la celobiosa es en realidad la unidad repetitiva que forma la celulosa. Esta disposición planar permite la interacción estrecha de unas cadenas con otras a través de puentes de hidrógeno, aportándole estabilidad estructural a la molécula (Somerville, 2006).

El proceso de síntesis de celulosa se sitúa en la membrana plasmática y se lleva a cabo a través de un complejo proteico en forma de rosetas conocido como complejo celulosa sintasa (CSC), las proteínas CESA son las glicosiltransferasas responsables de permitir la incorporación de UDP-glucosa en un glucano

incipiente. El CSC es pre-ensamblado en el aparato de Golgi (Haigler y Brown, 1986; Bashline et al., 2014). Las subunidades CesA se sintetizan en el retículo endoplásmico, aunque también se han observado rosetas del CSC en el aparato de Golgi, pero aún no está claro dónde se produce la oligomerización de las CesA y el montaje en CSCs (Zhang et al., 2016). Las subunidades que forman el complejo son inactivas, y se mueven a la membrana plasmática, donde se activan. Los complejos CSC se mueven a través de la membrana plasmática durante la síntesis de celulosa en direcciones que coinciden con la orientación de los microtúbulos (Somerville, 2006). Estos ejercen una influencia directa sobre la orientación de la deposición de celulosa y posibilitan su transporte a la membrana plasmática a través de la red trans-Golgi. Estas cadenas están unidas por puentes de hidrógeno para formar la microfibrilla de celulosa (Nishiyama, 2009; Kumar y Turner, 2015). Al menos 3 diferentes clases de proteínas CesA son necesarias para formar el CSC.

Hemicelulosas

Las hemicelulosas son polisacáridos que incluyen a los xiloglucanos, xilanos, mananos y glucomananos y se caracterizan por tener una cadena principal de restos de azúcares (principalmente xilosa, manosa y glucosa) unidos a través de enlaces β -1,4 (Scheller y Ulvskov, 2010). Las hemicelulosas, son sintetizadas en el aparato de Golgi por glicosiltransferasas y exportadas a la pared celular por exocitosis para intercalarse con la celulosa. La estructura detallada de las hemicelulosas y su abundancia varían ampliamente entre diferentes especies y tipos de células. En paredes celulares tipo II los polisacáridos hemicelulósicos más abundantes son los xilanos, típicamente constituyendo entre 20 y 30% de la pared

47

2. Introducción

celular total (Hatfield et al., 2017), y en menor proporción el glucano mixto -en proporción variable- y el xiloglucano, que constituye entre el 1 y 5 % al peso seco de la pared (O'Neil y York, 2003).

Los xilanos son un grupo de polisacáridos con la característica común de tener una cadena principal de restos de xilosa unidos mediante enlace β -1,4 (Scheller y Ulvskov, 2010). Los xilanos suelen tener restos de arabinosa unidos a la cadena central y forman los arabinoxilanos o **glucuronoarabinoxilanos** (si presentan además restos de ácido glucurónico), y son los principales polímeros que interconectan con las microfibrillas de celulosa (Benattiet al., 2012).

Los arabinoxilanos desempeñan un papel estructural importante uniéndose entre

sí y con la lignina, por restos de hidroxycinamatos (Scalbert et al., 1985) principalmente de ácido ferúlico, esterificado en la arabinosa (Wende y Fry, 1997; Marcia, 2009).

Pectinas

Las pectinas son una familia de polisacáridos ricos en ácido galacturónico que incluyen a los homogalacturonanos, ramnogalacturonano-I, ramnogalacturonano II y xilogalacturonanos (Mohnen, 2008). Aunque constituyen el 35% de las paredes primarias en paredes celulares tipo I, en las de tipo II sólo están presentes en un 2-5% de peso seco (Vogel, 2008). Su síntesis se realiza en las membranas del aparato de Golgi.

En virtud de la relación que guarda la pectina, junto con otros polímeros, en la porosidad de la pared celular, juega un importante papel al proporcionar una barrera contra el ambiente exterior (Harholt et al., 2010). Son abundantes en la lámina media, donde actúan en la regulación de la adhesión intercelular. Proporcionan soporte estructural y son un reservorio de moléculas de señalización de oligosacáridos. Las propiedades gelificantes y estabilizadoras de las pectinas son explotadas para mejorar los alimentos y con diferentes fines industriales y tienen múltiples beneficios para la salud, actuando de diversos modos sobre la reducción de los niveles de colesterol y glucosa en el suero, la inhibición del crecimiento del cáncer y la metástasis y promoviendo una función prebiótica en el intestino (Atmodjo et al., 2011).

Fenoles

Las paredes tipo II contienen compuestos fenólicos derivados de la ruta de los fenilpropanoides (que incluyen varios hidroxycinamatos como los ácidos ferúlico y *p*-cumárico) como componentes de este tipo de pared. Su función es básicamente estructural, confiriendo a la pared celular rigidez. Une cadenas de arabinoxilanos entre sí a través del carbono C-5 de restos de arabinosa (Hatfield et al., 2017). Tanto el ácido ferúlico como el *p*-cumárico tienen gran demanda en las industrias química y farmacéutica (Winkel-Shirley, 2001).

Proteínas

Las proteínas de paredes celulares se clasifican en dos grupos: las proteínas estructurales y proteínas solubles en el apoplasto. Dentro de las proteínas estructurales se encuentran: las proteínas ricas en hidroxiprolina, (HRGP) o

extensinas; arabinogalactano proteínas (AGP); proteínas ricas en glicina (GRP) y las proteínas ricas en prolina (PRP). Las proteínas estructurales son mucho menos abundantes en paredes celulares tipo II, 1% mientras que las de tipo I pueden alcanzar el 10% (Vogel, 2008).

La naturaleza de las proteínas de la pared celular es muy variada. Con la excepción de las proteínas ricas en glicina, todas están glicosiladas y contienen hidroxiprolina; también contienen secuencias altamente repetitivas que pueden ser compartidas entre ellas. Las proteínas de pared tienen diferentes propiedades fisicoquímicas, pueden interactuar con otros componentes de la pared celular y su abundancia relativa es variable. La mayoría de las proteínas de la pared celular están embebidas en la pared y tienen funciones estructurales, y/o participan en la morfogénesis (Cassab, 1998). Algunas proteínas, contribuyen a la señalización mediante la interacción con los receptores de la membrana plasmática o mediante la liberación de moléculas señal como péptidos u oligosacáridos.

Los cultivos celulares de maíz como modelos para el estudio de la pared celular

El maíz (*Zea mays* L.), al igual que las demás monocotiledóneas commelinoides, presenta pared celular tipo II. Este es uno de los cultivos de gramíneas más antiguos que se conocen, segundo en producción a nivel mundial después del trigo y delante del arroz. Es también uno de los cultivos más tecnificados y ha sido

49

2. Introducción

mejorado usando técnicas tradicionales y biotecnológicas. Asimismo, se ha convertido en un modelo biológico para el estudio en múltiples áreas; en nuestro caso, los cultivos de células en suspensión de maíz han sido utilizados para estudiar la plasticidad estructural de la pared celular ante compuestos inhibidores de la biosíntesis de celulosa, recientemente, en el estudio de la toxicidad del ancimidol.

Utilización de inhibidores de la biosíntesis de celulosa

Los inhibidores de la biosíntesis de celulosa (CBIs por sus siglas en inglés), son un grupo de moléculas de diversa naturaleza química cuyo modo de acción es desconocido en la mayoría de los casos, que bloquean la formación de la pared celular, es por este motivo que algunos de ellos se usan como herbicidas. Los CBIs se clasifican en tres grupos (Álvarez et al., 2012) el grupo 1 incluye compuestos como isoxaben y taxtomina A, flupoxam, triazofenamida, y cestrina.

Los compuestos de este grupo inducen la eliminación de proteínas CESA de la membrana plasmática. El Grupo 2 está compuesto por diclobenil (2,6-diclorobenzonitrilo o DCB) e indaziflam, que a diferencia del grupo 1 provocan una reducción de la velocidad de CESA e hiperacumulación en la membrana plasmática. Por último, los compuestos morlina y cobtorina (Grupo 3) inducen a CESA a moverse más lentamente y con una trayectoria aberrante dentro de membrana celular (Sabba y Vaughn, 1999; DeBolt y Brabham, 2013; Worden et al., 2015; Tateno et al., 2016).

Cuando se cultivan células en presencia de inhibidores de la biosíntesis de celulosa, frecuentemente se obtienen paredes celulares que muestran un empobrecimiento en celulosa, que se ve compensado por un aumento en otros componentes estructurales de la pared celular (Acebes et al., 2010; Álvarez et al., 2012). De este modo el uso de los inhibidores de la biosíntesis de la celulosa ha generado conocimientos básicos en la fisiología y biología molecular de las plantas, como el papel de los mecanismos de biosíntesis de celulosa y sus efectos a nivel de pared celular (Acebes et al., 2010; Álvarez et al., 2012).

Tres CBI's han sido extensamente estudiados: isoxaben, DCB y taxtomina A. El **isoxaben** es un herbicida pre-emergente, usado principalmente en césped y plantas ornamentales (Huggenberger et al., 1982). Además de su conocido papel pre-emergente, estudios recientes han descubierto mecanismos de algunas

50

2. Introducción

plantas para resistir la toxicidad del mismo (Scheible et al., 2001). El **DCB**, uno de los CBI's más estudiados y mejor caracterizados, es una molécula simple con actividad herbicida pre-emergente. Ha sido utilizado para eliminar plántulas jóvenes de monocotiledóneas y de diferentes especies de dicotiledóneas (Rao, 2000). La **taxtomina A** es una fitotoxina producida por el fitopatógeno *Streptomyces scabies* causante del desarrollo de la enfermedad de la costra común de la patata. Al igual que isoxaben y DCB, la taxtomina A ha sido utilizado en diversos cultivos celulares para analizar los efectos que provoca a nivel de pared celular. Es el tercer CBI, aparte del DCB y el isoxaben para el que se ha conseguido adaptar suspensiones de células, concretamente de álamo (Brochu et al 2010).

Existen otros compuestos que fueron inicialmente propuestos como inhibidores de la síntesis de celulosa, como el ancimidol (objeto del presente trabajo), o el quinclorac (que ha sido descartado como CBI al analizarse más a fondo las modificaciones de la pared celular en células habituadas de alubia) (Alonso-Simón et al., 2008). Otros han pasado a formar definitivamente parte

de los CBIs, como morlina, triaziflam e indaziflam (Tateno et al., 2016). Algunos candidatos a ser catalogados como CBIs pueden mostrar actividad biológica que los ubique como herbicidas auxínicos o retardantes del crecimiento, como es el caso del ancimidol.

Uso de cultivos celulares en la habituación a CBIs

Las células son capaces de desarrollar tolerancia a la inhibición de síntesis de celulosa causada por los CBIs, si se exponen gradual y prolongadamente a los mismos. Son capaces de dividirse y crecer con una pared celular anómala, al modificar la proporción de algunos de sus componentes.

Las estrategias de habituación de las paredes celulares a los CBIs han sido analizadas tradicionalmente mediante la extracción y análisis de las fracciones de polisacáridos de la pared celular. Por ser estas técnicas muy drásticas, en algunos casos pueden inducir a una falsa interpretación de los cambios en las paredes celulares. Recientemente se han empezado a utilizar técnicas inmunocitoquímicas (García-Angulo et al., 2006) o espectroscópicas, como la espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), que permiten monitorizar los cambios que ocurren en la pared celular *in muro* (Alonso-Simón et al., 2011; Largo-Gosens et al., 2014).

51

2. Introducción

Cultivos de callos de alubias han sido habituados a crecer en concentraciones tóxicas del inhibidor, mediante la formación de una pared celular anómala en la que la celulosa es reemplazada por otros polisacáridos (Díaz-Cacho et al., 1999).

Con DCB la habituación de *Phaseolus vulgaris* se logró hasta una concentración 12 μM , registrando además una reducción en los niveles de celulosa, hemicelulosas del tipo de los xiloglucanos y diferencias en los niveles de pectinas (Encina et al., 2001; 2002). Las células de frijol que son expuestas a DCB reducen sus contenidos de celulosa y xiloglucanos en las paredes. Aun así, las células mantienen el metabolismo de la pared, lo cual les permite continuar con un rearrreglo de glucanos en presencia del DCB. En cultivos celulares de maíz la inhibición de síntesis de celulosa, de un 75%, fue compensada con un incremento del contenido y entrecruzamiento de arabinoxilanos. En cultivos en fase de desarrollo y estacionaria la reducción de celulosa provocó el incremento de algunos genes involucrados en la síntesis de hidroxicinamatos, resultando en un aumento en el nivel del ácido ferúlico cinámico, y también alteró la expresión de genes *CesA*, sugiriendo que *ZmCesA5* y *ZmCesA7* podrían tener un papel en la habituación (Melida et al., 2009; 2010).

En cultivos de células en suspensión de álamo expuestos a taxtomina A las células mostraron, en el proceso de habituación, modificaciones en la composición de la pared celular, una disminución de la celulosa cristalina y un aumento de pectinas (Brochu et al 2010). En cultivos en suspensión de *Arabidopsis thaliana* la respuesta sugiere que la inhibición de la síntesis de celulosa induce la muerte celular programada por la activación de las vías relacionadas con el estrés biótico y abiótico (Duval et al, 2005). Un análisis transcripcional mostró que más del 75% de los genes regulados por TA también eran regulados por isoxaben (Duval y Beaudoin, 2009).

El ancimidol: un retardante del crecimiento con potencial actividad como inhibidor de la biosíntesis de celulosa

El ancimidol (α -ciclopropil- α -[4-metoxifenil]-5-pirimidina-metanol) pertenece al grupo de los retardantes del crecimiento. Es un análogo estructural de la pirimidina sintética (Shive y Sisler, 1976), y su principal modo de acción es la inhibición de la actividad de la enzima ent-kaureno oxidasa dependiente del citocromo P450, que cataliza la oxidación de ent-kaureno a ácido ent-kaurenoico

52

2. Introducción

(Coolbaugh et al., 1978), una reacción que ocurre al inicio de la biosíntesis y por tanto común en la biosíntesis de todas las giberelinas. Como consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de las GAs, disminuye la capacidad de las células para alargarse y perjudica el crecimiento de los brotes en un conjunto variado de especies mono- y dicotiledóneas. Este compuesto se utiliza comercialmente como retardante del crecimiento y es conocido como A-rest[®] o Abide[®]. Reduce la elongación de los entrenudos y controla la altura de flores de invernadero comerciales como crisantemos, tagetes, petunia y zinnia (Menhenett, 1984; Ahmad et al., 2015), evita el encamado de algunas cosechas, y promueve el crecimiento lento de las plantas en el proceso de conservación de germoplasma (Sarkar et al., 2001; Cha-um y Kirdmanee, 2007). El ancimidol también ha sido útil en la micropropagación, estimulando la producción de los brotes de hosta (Maki et al., 2005) y *Philodendron*, mejorando su producción en cultivos *in vitro* a gran escala (Ziv y Ariel, 1991) donde la respuesta fisiológica depende de la concentración. El ancimidol ha sido recientemente propuesto como un inhibidor de la síntesis de celulosa (Hofmannová et al., 2008).

A nivel celular, el ancimidol reduce el tamaño de las células (Bořková et al., 2003), que muestran composiciones y propiedades alteradas de las paredes celulares, con mayores contenidos de galactosa (Tanimoto, 1987) y peso

molecular modificado de pectinas (Tanimoto y Huber, 1997), lo que a su vez afecta a la extensibilidad de las paredes celulares (Kelles et al., 1990, Tanimoto, 1994). Basándose únicamente en las malformaciones provocadas por el ancimidol en células cultivadas de tabaco BY-2, semejantes a las producidas por otros CBIs, se ha sugerido que el ancimidol inhibe la biosíntesis de celulosa (Hofmannová et al., 2008). No tenemos conocimiento hasta la fecha de hoy que haya sido publicado ningún resultado más sobre este posible nuevo modo de acción del ancimidol.

Metabolitos secundarios en plantas, importancia y aplicaciones biotecnológicas

Los metabolitos secundarios de plantas (MSP) son compuestos no implicados directamente en la estructura o función de la célula y por tanto no son imprescindibles para que la planta que los forma complete su desarrollo. En general los MSP tienen un papel importante en la interacción de la planta con su ambiente, confiriendo una ventaja que mejora el desarrollo de la planta que los

53

2. Introducción

formó (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004). Hace décadas se consideraba que los MSP no tenían una función específica en las plantas o eran compuestos de desecho del metabolismo primario; actualmente se sabe que tienen una función importante en la relación de la planta con su ecosistema, ya que al ser las plantas organismos sésiles, han desarrollado estrategias que les permiten no solo relacionarse químicamente con otras plantas: muchos de estos compuestos o MSP tienen un papel importante como atrayentes de polinizadores y agentes de dispersión de frutos o semillas, desempeñan un papel de defensa contra herbívoros (mamíferos, insectos, moluscos, etc.) o alelopático contra otras plantas, disminuyendo la competencia por los nutrientes del suelo, o de defensa frente a microorganismos, o incluso sirven para combatir situaciones de estrés abiótico. Sin duda, MSP han colaborado en la evolución y supervivencia de las plantas, pero también esas estrategias de defensa que han desarrollado contra virus, bacterias e insectos han sido aprovechadas por los humanos (Balandrin et al., 1985; Bourgaud et al., 2001; Wink, 2010). Son abundantes los MSP que tienen una actividad farmacológica importante, o bien son susceptibles de ser utilizados en numerosas industrias. En este sentido, las plantas son productoras de compuestos de importancia comercial como los aceites esenciales, resinas, taninos, el caucho natural, gomas, ceras, que son utilizadas, por ejemplo, como colorantes, sabores y fragancias, productos farmacéuticos y pesticidas.

Biosíntesis de metabolitos secundarios

La biosíntesis de los MSP se deriva de los procesos fundamentales de la fotosíntesis, la glucólisis y el ciclo de Krebs, al proporcionar precursores e intermediarios biosintéticos (Dias et al., 2012). La síntesis de MSP es dependiente del estado de diferenciación de celular, lo cual origina varias consecuencias importantes como son la alteración de la producción en callos y suspensiones de células indiferenciadas o el hecho de que los MSP suelen sintetizarse en un órgano y almacenarse en otro como en glándulas, tricomas, flores, raíces, semillas, etc. En el interior de la célula y dependiendo de la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica de los MSP, pueden estos estar almacenados en vacuolas o unidos a alguna proteína que regule su actividad.

Los MSP suelen agruparse en tres grandes grupos, terpenoides (isoprenoides), compuestos nitrogenados (principalmente alcaloides, pero también

54

2. Introducción

glucosinolatos, glicósidos cianogénicos y otros) y compuestos fenólicos (Kabera et al., 2014)(Fig 2).

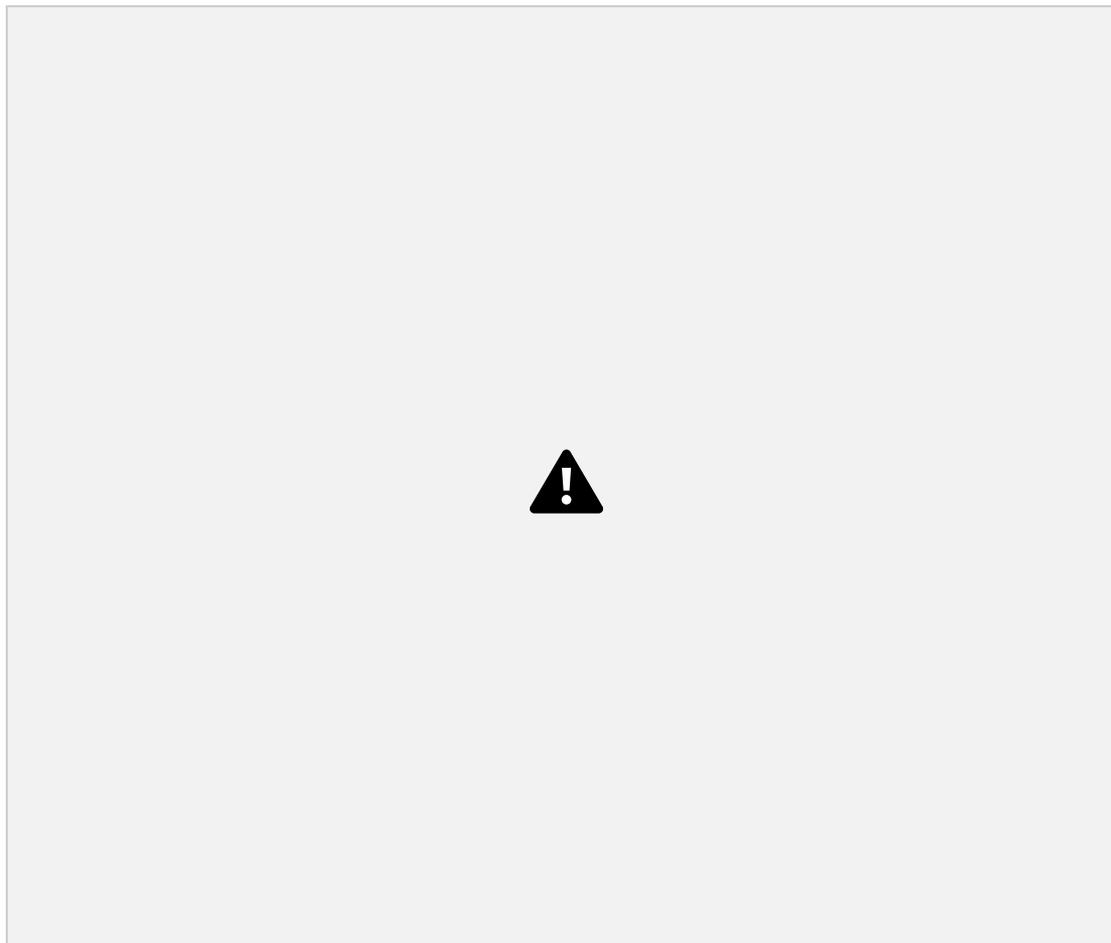


Fig. 2 Diagrama que representa las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas. Tomado de Borrelli y Trono, 2016.

Los terpenoides son el grupo más importante cuantitativamente, al contar con

más de 40,000 moléculas diferentes descritas hasta ahora (Tholl, 2015); muchos de ellos tienen actividad terapéutica y son usados para el tratamiento de enfermedades. Dos de los terpenoides más renombrados son el anti cancerígeno paclitaxel (Taxol®) cuya síntesis tiene un origen mixto (Nicolaou et al., 1994) y el antimalárico artimisinina (Abdin et al., 2003). Los terpenoides también sirven en funciones primarias importantes como pigmentos fotosintéticos (carotenoides), transportadores de electrones (cadenas laterales de ubiquinona y plastoquinona), reguladores del crecimiento y desarrollo (giberelinas, ácido abscísico, estrigolactonas, brasinosteroides) y los esteroides, que influyen en la estructura de las membranas (Tholl, 2015).

55

2. Introducción

En cuanto a su biosíntesis, los terpenoides se derivan de la vía del mevalonato que es activo en el citosol, o de la vía plastidial 2-C metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), a partir de dos bloques de construcción de cinco carbonos, isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetil alil difosfato (DMAPP) (Aharoni et al., 2005). Basándose en el número de unidades isopreno (cinco carbonos), los terpenoides se clasifican comúnmente como hemiterpenos (5C), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (30C), tetraterpenos (40C) y los politerpenos, que son cadenas de más de ocho unidades isopreno. Algunos de estos terpenoides muestran una amplia gama de aplicaciones terapéuticas contra los cánceres, la malaria, los procesos inflamatorios y una variedad de enfermedades infecciosas virales y bacterianas (Wang et al., 2005). Dentro de los monoterpenoides podemos encontrar constituyentes de aceites esenciales (limoneno, mentol), de olores florales y metabolitos defensivos de plantas aromáticas (piretrinas). Los sesquiterpenos son compuestos menos volátiles como las lactonas sesquiterpénicas, a las que se les atribuye la actividad antiinflamatoria en casos de artritis, asma y psoriasis. Dentro de los diterpenos los taxanos son de los más estudiados por de su actividad anticancerígena (Wang et al., 2005). Entre los triterpenos se encuentran esteroides y esteroides, derivados del escualeno. Los tetraterpenos comprenden pigmentos fotosintéticos, al acíclico licopeno, el monocíclico gamma-caroteno y al bicíclico alfa- y betacaroteno, estos últimos una vez ingeridos, serán los precursores de la vitamina A o retinol. Por último, dentro de los politerpenos, se encuentran el caucho y gutapercha, moléculas que pueden estar formadas por cientos o miles de unidades isoprenoides (Bohlmann y Keeling, 2008).

Estos terpenoides muestran una amplia gama de actividades biológicas contra los cánceres, la malaria, los procesos inflamatorios y una variedad de enfermedades

infecciosas virales y bacterianas (Wang et al., 2005).

El segundo grupo en importancia son los alcaloides, un grupo de productos naturales que contienen nitrógeno heterocíclico y que se encuentran en aproximadamente el 20% de las especies de plantas, aunque su presencia no es exclusiva de ellas. Muchos de los aproximadamente 12,000 alcaloides vegetales para los cuales se han elucidado estructuras han mostrado una potente actividad biológica (Facchini et al., 2001).

56

2. Introducción

A diferencia de otros tipos de MSP, los numerosos y diversos tipos de estructuras alcaloídicas (alcaloides, protoalcaloides y pseudoalcaloides) tienen orígenes biosintéticos independientes. Las enzimas implicadas en la biosíntesis de estas están asociadas con diversos compartimentos subcelulares incluyendo el citosol, la vacuola, la membrana tonoplástica, el retículo endoplásmico, el estroma del cloroplasto y las membranas de los tilacoides. Debido a que no todas las estructuras alcaloídicas tienen en su origen un aminoácido, y a que el nitrógeno que contienen no siempre es heterocíclico, se han establecido cuatro grupos: 1, alcaloides derivados de los aminoácidos tales como arginina, ornitina, lisina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido antranílico y ácido nicotínico. 2, purina alcaloides (xantina, cafeína). 3, aminato alcaloides. 4, policétido alcaloides (Roberts, 2013).

La potente actividad biológica de algunos alcaloides ha llevado también a su explotación como productos farmacéuticos: estimulantes, narcóticos y venenos. Encontramos en este grupo moléculas como la de la morfina (analgésico), atropina (midriático) hiosciamina (antiespasmódico), quinina (agente antimalárico) y la cafeína (estimulante).

Los compuestos fenólicos, cuya síntesis se deriva ya de la vía del ácido shikímico, ya de la ruta del acetato malonato o de ambas, son caracterizados por poseer el anillo aromático hidroxilado (que pueden ser varios) y constituyen una de las vías metabólicas más estudiadas y ampliamente explotadas (Mandal et al., 2014). La mayoría de los compuestos fenólicos se derivan de fenilalanina vía ácido shikímico a través de la ruta principal fenilpropanoide que conduce a 4-cumaroil-CoA. A partir de ahí, las ramas de las rutas distribuyen precursores a la biosíntesis de las diversas clases de fenilpropanoides, incluyendo monolignoles, flavonoides, cumarinas, estilbenos, xantonas, ésteres fenólicos, derivados benzoicos, etc. (Boudet, 2007). Aunque algunos de estos compuestos juegan un papel estructural en la pared celular, los tejidos sintetizan una amplia

gama de constituyentes que desempeñan diversas funciones en el crecimiento y supervivencia de las plantas. La síntesis de algunos compuestos fenólicos (o el aumento de los mismos, pues hay MSP que están en una concentración pequeña e inactiva y tiene que aumentar su producción para desencadenar su actividad) como respuesta a algún tipo de estrés ya sea biótico o abiótico ha sido ampliamente documentada (Dixon y Paiva, 1995; Moura et al., 2010; Atkinson y Urwin, 2012). Ese aumento se debe al

57

2. Introducción

correspondiente incremento de la actividad de diversas enzimas, como la fenilalanina amonio liasa, chalcona sintasa, o la fosfoenolpiruvato-carboxilasa. Los compuestos fenólicos confieren diversas funciones orientadas a que las plantas sobrevivan y se adapten a las perturbaciones ambientales (Cheynier et al., 2013), un ejemplo de ello es la juglona, un fenol extraído de raíces y cáscaras del nogal que presenta actividad alelopática (Terzi, 2008).

Muchos compuestos fenólicos también son una parte importante en la dieta y en la salud de los humanos, dadas sus propiedades antioxidantes. Esta propiedad depende de la estructura, en particular del número y de las posiciones de los grupos hidroxilo y de las sustituciones en los anillos aromáticos (Balasundram et al., 2006). Estos compuestos antioxidantes se encuentran principalmente conjugados con ácido hidroxicinámico y los flavonoides, componentes importantes de las frutas, verduras y bebidas (Boudet, 2007). Dentro de los fenoles también podemos encontrar compuestos que exhiben una amplia gama de propiedades terapéuticas: antiasmáticas (Jang et al., 2010), antialérgicas (Chandrashekar, et al., 2011), anti-aterogénicas (Norata et al., 2007), antiinflamatorias (Costa et al., 2012), antimicrobianas y antioxidantes (Sengul et al., 2009), así como efectos antitrombóticos, cardioprotectores y vasodilatadores (Han et al., 2012; Vasanthi et al., 2012).

Las plantas medicinales como fuente de metabolitos secundarios con actividad terapéutica

Las plantas medicinales han sido desde hace miles de años un recurso para curar diversas enfermedades en humanos y otros animales. La ciencia contemporánea ha reconocido su actividad y ha incluido en la farmacoterapia moderna una gama de fármacos de origen vegetal, que ya eran conocidos por las civilizaciones antiguas y utilizados a lo largo de los milenios (Petrovska, 2012).

La evidencia del uso medicinal ancestral se soporta en diversas fuentes como documentos escritos, muestras de plantas, así como la conservación del conocimiento a través de la tradición oral (Bye y Linares, 2016). Una muestra

escrita es el códice de la Cruz-Badiano (*Libellus de medicinalibus indorum herbis*):

un libro que ilustra y describe el uso de plantas medicinales usadas por los mexicas (aztecas) antiguos pobladores de México (Ruiz et al., 2007; Ávila Blomberg, 2012). Muchas drogas comerciales han sido desarrolladas usando el conocimiento

58

2. Introducción

indígena de plantas y de sus usos populares. La vinculación de dicho conocimiento con las actividades de investigación modernas proporciona un nuevo enfoque más eficiente que la recolección aleatoria para el descubrimiento de nuevos fármacos (Pant, 2014; Heinrich, 2015). Son muchos los ejemplos: el barbasco (*Dioscorea composita*), de cuya raíz se extrae la diosgenina, la base para la hemisíntesis de hormonas esteroidales hasta la obtención de la progesterona (Lozoya, 1994); la cinchona (*Cinchona pubescens*), cuya corteza es fuente principal de la quinina, potente antimalárico descubierto por el pueblo indígena Quechua (Breedlove y Arguin, 2015), la *Artemisia annua*, fuente de la artemisinina, también antimalárico, y cuyos usos probablemente irán disminuyendo ante el positivo avance de la liberación de la vacuna recombinante contra la malaria (Price, 2000; Teng et al., 2016), y los sauces (*Salix* spp.), fuentes del ácido salicílico, base de la aspirina, cuyos nuevos efectos en la prevención de cáncer y la reducción del riesgo de metástasis están siendo investigados, así como su papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares y por su actividad antiagregante de plaquetas (Ugurlucan et al., 2012; Bibbins-Domingo, 2016; Vilar et al., 2016).

El aumento de la población humana y la creciente demanda de productos de plantas, junto con el comercio ilegal de las mismas, están provocando el agotamiento de las plantas medicinales y en muchos casos están amenazando su densidad en el hábitat natural. La técnica de cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser una alternativa para la producción de componentes bioactivos deseables, para producir la cantidad suficiente de material vegetal y para la conservación de especies amenazadas (Pant, 2014).

Producción de metabolitos secundarios por vías biotecnológicas

De las 400.000 especies de plantas vasculares que se estima existen en el mundo (<http://www.theplantlist.org/>) un número muy reducido se utiliza con fines biotecnológicos y aunque la obtención de MSP se hace desde hace cientos de años (shikonina, vainillina, aceites esenciales, etc.), hace apenas unas pocas décadas empezaron a ser consideradas otras técnicas para su producción. Los

sistemas de cultivo *in vitro* de células de plantas representan una alternativa para la producción renovable de algunos valiosos compuestos de carácter medicinal, sabores, fragancias y colorantes, que no pueden ser producidos, al menos de

2. Introducción

forma rentable, por células microbianas o síntesis química (Mulabagal y Tsay, 2004).

El cultivo de tejidos, órganos y células de plantas ha permitido en algunos casos, la producción a gran escala de MSP, debido a mejoras en las técnicas, a un mejor conocimiento de la fisiología de algunas plantas y de las rutas metabólicas, así como al desarrollo de trabajo interdisciplinario, donde la ingeniería ha llevado a la producción a un nivel a gran escala (Murthy et al., 2014). Ejemplo de ello es la producción de shikonina y berberina (Fujita, 1988) a través de la selección por citometría de flujo de líneas celulares altamente productivas y la optimización de las condiciones ambientales y los procedimientos para tener una alta producción a bajos costes.

La principal ventaja de utilizar esta tecnología de cultivo *in vitro* es el crecimiento rápido que proporciona una fuente continua y fiable de productos farmacéuticos de plantas, que podría utilizarse para el cultivo a gran escala de células a partir de las cuales se pueden extraer los metabolitos.

Una alternativa para la producción de MSP también es su síntesis orgánica en el laboratorio, pero esto usualmente depende de la complejidad de la estructura, naturaleza y posición de los sustituyentes. Para muchos compuestos con una estructura compleja la síntesis es difícil, típicamente muy costosa y puede generar subproductos tóxicos que dañarían el ambiente (Wu y Chappell, 2008).

Para el caso de las plantas silvestres, la producción de los MSP de interés a escala comercial generalmente es difícil de conseguir, porque están sujetos a las condiciones ambientales fluctuantes y porque ocurren en concentraciones muy bajas. Además, en el caso de plantas medicinales cuya raíz se recoge de plantas silvestres, la recolección no sólo mata la planta, sino que también impide la formación de nuevas semillas que permitan la regeneración y el mantenimiento de estas poblaciones en sus hábitats.

En este sentido, el cultivo *in vitro*, al ocurrir en laboratorio y no depender de condiciones ambientales fluctuantes, permite tener un recurso constante, sin

requerir de un aporte de material silvestre. Por ello, la metodología de cultivo *in vitro*, junto con el uso de tejidos, órganos y plantas modificados genéticamente, son algunas estrategias que se están abordando no solo para obtener MSP de

60

2. Introducción

interés para las industrias agroquímica, farmacéutica y alimentaria (Balandrin et al., 1985; Ochoa-Villarreal et al., 2016), sino también para la conservación de la planta de interés.

Los enfoques biotecnológicos, específicamente el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, juegan un papel vital en la búsqueda de alternativas a la producción de compuestos medicinales deseables a partir de plantas (Rao y Ravishankar, 2002). Si bien la investigación realizada hasta la fecha ha logrado una amplia gama de MSP valiosos en células indiferenciadas como son los que aparecen en el cultivo de callos o suspensiones celulares, en otros casos se requiere una planta diferenciada o cultivos de órganos (Karuppusam, 2009). Casos exitosos de la

síntesis de MSP en callo ha sido descrita, por ejemplo, en *Piqueria trinervia* (Asteraceae), cuyo callo sintetizó piquerol A, un monoterpeno con actividad antifúngica y alelopática (Saad et al, 2000). Algunos alcaloides como ajmalicina y catharantina han sido obtenidos mediante este sistema a partir de plantas de *Cataharantus roseus* (Zhao et al., 2001), mientras que la obtención de ácido rosmarínico en *Lavandula officinalis* es mayor a partir de callo que del cultivo de células en suspensión (Wilken et al., 2005).

En la producción de MSP suelen incidir varios factores como la composición del medio (nutrientes minerales, fuente de carbono, etc.), el tipo y concentración de las fitohormonas, la variación de la producción durante el cultivo o el uso de elicitores). En callos, por ejemplo, la producción de MSP ha sido en general mejorada mediante la elicitación (Ram et al., 2013; Al-Gendy et al., 2015). Esta puede ser biótica (a través de sustancias de origen biológico, como polisacáridos derivados de paredes celulares de plantas, como pectinas o celulosa; o de microorganismos, como quitina o glucanos) o abiótica (sustancias de origen no biológico). Un elicitador o «inductor», desde el punto de vista de la producción de MSP, puede definirse como aquel compuesto químico biótico o abiótico, así como factor físico, que puede desencadenar una respuesta en organismos vivos que resulta en la acumulación de MSP (Vasconsuelo y Boland, 2007). Los factores que pueden generar estrés abiótico son, entre otros, la temperatura (frío o calor), la salinidad, la falta de disponibilidad de agua, la radiación (luz, U.V. o ionizante), diferentes compuestos (sales minerales, metales pesados, pesticidas)

o estrés mecánico. Todos ellos, aplicados a plantas y/o cultivos celulares, han confirmado su efecto en la biosíntesis de MSP (Akula y Ravishankar, 2011; Ramirez-Estrada

2. Introducción

et al., 2016). Un ejemplo de ello es la producción de flavonoides y otros compuestos fenólicos en callos de romero (*Rosmarinus officinalis*) expuestos a bajas intensidades de rayos gamma (El-Beltagi et al., 2011). El jasmonato y metil jasmonato, aunque son moléculas señal que median la respuesta de las plantas ante estrés biótico o abiótico, también son elicitores que cuando se aplican exógenamente promueven respuestas de defensa, induciendo la producción de MSP de diversa naturaleza, ya que actúan en un amplio espectro de rutas metabólicas. Reportes recientes del uso del MeJa en cultivos celulares, muestran una fuerte inducción de taxanos en *Taxus spp.* (Onrubia et al., 2013; Cursido, et al., 2014) y de flavonoides en *Hypericum perforatum* (Wang et al., 2015).

Cuando se valora la producción de MSP durante el cultivo es frecuente observar que la producción de MS varía durante las diferentes fases del cultivo. En general, los MSP se producen durante la fase estacionaria (Srinivasan et al., 1995). La falta de producción de grandes cantidades de MSP durante las primeras etapas puede explicarse porque la asignación de carbono es principalmente distribuida para el metabolismo primario (construcción de estructuras celulares y respiración) cuando el crecimiento es muy activo (Bhojwani y Dantu, 2013). Se ha observado con frecuencia que muchas nuevas actividades enzimáticas, ausentes durante la fase de latencia, aparecen durante la fase estacionaria (Pichersky y Gang, 2000). La formación de MSP al ser dependiente del estado de diferenciación celular, varía durante el cultivo aumentando en la fase estacionaria, cuando se inicia el proceso de diferenciación celular (como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la escasez de una fuente de carbono reducido). Esto ha llevado a muchos autores a hablar de una posible diferenciación bioquímica de las células cuando el crecimiento cambia. Un ejemplo de ello es la mayor producción de ácido ginnémico en cultivos celulares de *Gymnema sylvestre* en fase estacionaria (Nagella y Murthy, 2011), y la producción de triterpenoides en células suspensión de *Lantana camara* igual en fase estacionaria (Srivastava et al., 2011).

Sin embargo, hay algunos MSP, como las betalainas y los carotenoides, cuya producción está asociada al crecimiento de células indiferenciadas (Bourgaud et al., 2001). A pesar del gran número de éxitos en la producción de MSP por

cultivo de callos o células en suspensión, hay casos en los que estos son deficientemente producidos, ya que requieren la diferenciación del tejido, pues ello facilita la caracterización enzimática de la ruta biosintética (Hartmann, 2007). Un ejemplo

62

2. Introducción

de lo anterior es la síntesis de MSP en raíces, ya sea cultivadas *in vitro* o generadas a través de la transformación por *Agrobacterium rhizogenes*.

Raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria Gram-negativa que se encuentra principalmente en el suelo y que puede infectar tanto mono como dicotiledóneas a través de heridas en las plantas. Aunque hay varias especies patógenas dentro del género *Agrobacterium* las más conocidas son las especies *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*.

La infección por *A. tumefaciens* se caracteriza por la producción de un tumor de células transformadas indiferenciadas en la zona de la herida. Por su parte, en el caso de *A. rhizogenes* se observa un desarrollo masivo de raíces adventicias con numerosas raíces pilosas, también conocidas como «hairy roots» (Nilsson y Olsson, 1997).

El plásmido Ri de *A. rhizogenes* tiene genes en diferentes segmentos (Fig. 3). El T-ADN es parte del plásmido, de aproximadamente 200 kb, y cuya expresión permite la conjugación del mismo, y la síntesis y catabolismo de opinas. Las regiones T del plásmido Ri nativo tienen aproximadamente 10-30 kpb de tamaño (Chandra, 2012).

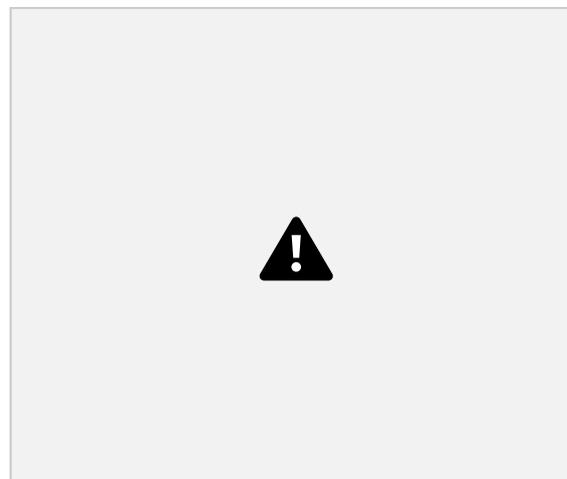


Fig. 3. Representación esquemática del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* (Chandra, 2012).

La integración y expresión del ADN transferido (T-ADN) de plásmidos Ti provocan cambios metabólicos principalmente en los genes *IaaM* e *iaaH* que codifican para

2. Introducción

las enzimas implicadas en la síntesis del ácido indoleacético (AIA) y en el gen *ipt*, cuyo producto cataliza el primer paso en la biosíntesis de citoquininas (Akiyoshi et al., 1984; Thomashow et al., 1984). Los genes que integran el T-ADN consisten en dos tramos o segmentos no contiguos de ADN. Estas regiones, denominadas TL-DNA y TR-DNA, se pueden transferir independientemente al genoma nuclear de las células vegetales infectadas (Huffmann et al., 1984). La cepa de *Agrobacterium rhizogenes* A4 alberga un Ri, que posee dos regiones separadas que llevan los genes *Rol* (TL-DNA) (Bercetche et al., 1987) y los genes *aux + ags*

(TR-DNA). El TL-DNA contiene varios genes, pero cuatro de ellos son indispensables para la inducción de raíces; se trata de los genes *Rol A, B, C y D*. Por su parte, la región TR-DNA lleva los genes responsables de la síntesis de opina y los genes que representan dos etapas de biosíntesis de auxina, denominados *aux1* y *aux2* (también denominados *tms1* y *tms2*, respectivamente). En las raíces

pilosas, el IAA se sintetiza a partir de triptófano mediante dos pasos como resultado de la expresión de los genes integrados *aux1* y *aux2* (Nemoto et al., 2009; Mano y Nemoto, 2012); esta es una de las razones por las que las raíces pilosas pueden crecer en medios libres de hormonas. Las cepas de *Agrobacterium*

se pueden clasificar según las opinas presentes en los tumores, como cepas de octopina, nopalina, leucinopina y succinamopina (Hooykaas y Schilperoort, 1992), estas opinas, son metabolizadas como una fuente de carbono y nitrógeno exclusivamente por *Agrobacterium*, confiriéndoles una ventaja sobre otros microorganismos del suelo (Gelvin, 2003).

El mecanismo molecular a través del cual se produce la infección de *Agrobacterium* en las plantas ha sido estudiado extensivamente desde hace décadas. La respuesta de formación de callo o raíces se debe a la transferencia de oncogenes, los cuales están contenidos en un plásmido, que se transfiere de la bacteria a la planta.

El inicio de la infección se da a través del reconocimiento de compuestos fenólicos que produce la planta como respuesta al estrés biótico causado por la bacteria. Las plantas suelen producir compuestos fenólicos como respuesta a la sequía, a las heridas o al ataque de patógenos. Los fenoles como la acetosiringona y la hidroxacetosiringona, exudados desde las heridas de las plantas, son potentes

quimioatrayentes e inducen la expresión de los genes de virulencia de *Agrobacterium* (Escobar y Dandekar, 2003). La recepción de las señales químicas