





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

**Caracterización de la producción de resveratrol y análisis de  
proteínas en cultivos celulares de *Vitis vinifera* cv Monastrell**

**Sarai Belchí Navarro**

**2012**



El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Dpto. de Biología Vegetal (U.D. Fisiología Vegetal) de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia con la ayuda de una “Beca asociada a la realización de proyectos de i+d, innovación y transferencia de tecnología” (04886/BPS/06) de la Fundación Séneca. Este trabajo de investigación ha sido financiado por la Consejería de Educación y Cultura dentro del proyecto para la “Producción de metabolitos con actividad antitumoral a partir de células vegetales *in vitro*”; la Fundación Séneca dentro del proyecto “Genómica funcional del mecanismo de elicitación de cultivos celulares vegetales para la producción de compuestos con actividad antitumoral” y del proyecto “GrapeGen” (proyecto internacional financiado por Genoma España y Genoma Canada); el Centro Europeo de Empresas e Innovación de Murcia (CEEIM) dentro del proyecto “Obtención de fitoalexinas farmacológicas”; la Universidad de Alicante dentro del proyecto “Caracterización de los procesos desencadenados por elicitación de cultivos celulares de vid que determinan la producción y acumulación extracelular de *trans*-resveratrol” (BIO2008-02941) y del proyecto “Estrategias para incrementar y diversificar la producción de estilbenos y flavolignanós en cultivos celulares vegetales” (BIO2011-29856-C02-02).

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

#### **Artículos originales de investigación derivados de la tesis**

\*Ambos autores contribuyen por igual a este trabajo

**Bru R, Sellés S, Casado-Vela J, Belchí-Navarro S, Pedreño MA** (2006) Modified cyclodextrins are chemically-defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 65-71

**Lijavetzky D\*, Almagro L\*, Belchí-Navarro S, Martínez-Zapater JM, Bru R and Pedreño MA** (2008) Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Research Notes* 1: 132-140

**Almagro L, Gomez Ros LV, Belchí-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A and Pedreño MA** (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 60: 377-390

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

**Collado-González M, Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R, Belchí-Navarro S, Argüelles JC** (2012) Resveratrol lacks antifungal activity against *Candida albicans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 2441-2446

**\*Belchí-Navarro S, \*Almagro L, \*Sabater-Jara AB, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA** (2012) Early signaling events in grapevine cells elicited with methyl jasmonate and cyclodextrins. *Plant Signaling and Behavior* (En revisión, 2012PSB0266)

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

**\*Fernández-Pérez F, \*Belchí-Navarro S, \*Almagro L, Bru R, Pedreño MA, Gómez Ros LV** (2012) Cytotoxic effect of natural *trans*-resveratrol obtained from elicited *Vitis vinifera* cell cultures on three cancer cell lines. *Plant Food for Human Nutrition* (En revisión)

### Otros artículos de investigación

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

**Belchí-Navarro S, Pedreño MA, Corchete P** (2011) Methyl jasmonate increases silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaernt cell cultures treated with  $\beta$ -cyclodextrins. *Biotechnology Letters* 33: 179-184

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

### Capítulos de libro

**Belchí-Navarro S, Almagro L, Tallón Vila CI, Bru R and Pedreño MA** (2009) Characterization of *trans*-resveratrol production from grapevine cell cultures. *BioVeg* 2009. ISBN: 978-959-16-0979-3

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

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

**\*Sabater-Jara AB, \*Almagro L, \*Belchi-Navarro S, Martinez-Esteso MJ, Youssef SM, Casado-Vela J, Vera-Urbina JC, Selles S, Bru R, Pedreño MA** (2012) Plant cell cultures as a tool to analyze the extracellular proteome. *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 2<sup>nd</sup> edition. (Ed.) Springer protocols

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

## Patente

**Sarai Belchí Navarro, Lorena Almagro Romero, Roque Bru Martínez, M<sup>a</sup> Ángeles Pedreño García** (2009) Uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para la producción de resveratrol. PCT/WO 2009106662

## Comunicaciones a congresos

**García JJ, Belchí-Navarro S, Bru R, Pedreño MA** (2005) Optimización de las variables de crecimiento para la producción de nutraceuticos (Póster) Jornadas de Nutraceuticos. Murcia

**Peón Casanova E, S. Belchí-Navarro, Gómez-Ros LV, Bru R, Pedreño MA** (2006) Effect of polyamines on browning tissue of *in vitro* cell cultures of *Vitis vinifera* (Póster) Congreso XXIX de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Elche

**Gómez-Ros LV, Peón-Casanova E, Belchí-Navarro S, Ros Barceló A, Pedreño MA** (2006) Effect of polyamines on recovering of non-browning tissue from browning tissue and their effect on callus growth in *Taxus* (Póster) BioSpain Biotec. Madrid

**Peón-Casanova E, García JJ, Belchí-Navarro S, Pedreño MA, Sellés-Marchart S, Vera-Urbina JC, Bru R** (2006) Caracterización del crecimiento de los cultivos celulares de *Vitis vinifera* L. cv Gamay para la producción de biomasa y metabolitos y escalado a biorreactores (Póster) BioSpain Biotec. Madrid

**Belchí-Navarro S, Almagro L, Peon-Casanova E, Bru R y Pedreño MA** (2007) Caracterización de la producción de *trans*-resveratrol en cultivos celulares elicitados de *Vitis vinifera* cv Monastrell (Póster) VII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo de Tejidos Vegetales. Alcalá de Henares

**Belchí-Navarro S, Almagro L, Sellés S, Bru R y Pedreño MA** (2007) Alternativas Biotecnológicas para la Producción de Metabolitos Secundarios (Conferencia Invitada) VII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales. Alcalá de Henares

**Almagro L, Belchí-Navarro S, Tallón C, Sellés S, Bru R y Pedreño MA** (2007) Yield improvement in Muscat Hamburg cell cultures for *trans*-resveratrol production by the manipulation of inducing factors in culture media. (Póster) From traits to genes and backwards in grapevine, COST-858. Logroño

**Belchí-Navarro S, Almagro L, Tallón C, Vera-Urbina JC, Sellés S, Bru R y Pedreño MA** (2007) Los cultivos elicitados de vid como biofactorias celulares para la producción de *trans*-resveratrol. (Ponencia invitada) XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Alcalá de Henares

**Martínez Esteso MJ, Sellés S, Vilella Antón MT, Pedreño MA, S. Belchí-Navarro, Elliot M, Ohlund L, R. Bru** (2007) Aplicación de DiGE e iTRAQ para la caracterización de perfiles proteómicos de la baya de uva de mesa (Comunicación Oral) XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal- X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Alcalá de Henares

**Sellés S, Martínez MJ, Vilella-Antón MT, Vera-Urbina JC, Belchí-Navarro S, Pedreño MA, Bru R** (2007) Changes in extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv Gamay) cells in liquid culture upon elicitation (Póster) 2<sup>nd</sup> Congreso of the Spanish Proteomics Society 1<sup>st</sup> Meeting of the European Proteomics Association. Valencia

**Almagro L, Belchí-Navarro S, Gómez Ros LV, Martínez Estesos MJ, Sellés S, Bru R y Pedreño MA** (2008) Cross-talk between signalling pathways in plant defence: following peroxidases (Ponencia invitada) 8<sup>th</sup> International Peroxidase Symposium 2008. Tampere (Finlandia)

**Belchí-Navarro S, Almagro L, Lijavetzky D, Bru R y Pedreño MA** (2008) Effect of elicitors on stilbene biosynthesis gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures (Póster) FESPB. Tampere (Finlandia)

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

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

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

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

**Almagro L, Belchí-Navarro S, Martínez-Parra J, López-Pérez AJ, Sottomayor M, Pedreño MA** (2009) Caracterización de la producción de indol alcaloides en cultivos celulares de *Catharanthus roseus* (Póster) XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología vegetal. Zaragoza

**Belchí-Navarro S, Tallón Vila CI, Almagro L, Bru R, Pedreño MA** (2009) Characterization of *trans*-resveratrol production from grapevine cell cultures (Póster) 7th International Congress on Plant Biotechnology. Cuba

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

**Belchí-Navarro S, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA** (2010) Strategy to increase *trans*-resveratrol production in grapevine suspension cultured cells and evaluation of its antitumoral activity (Ponencia invitada) 1<sup>st</sup> International Conference of Resveratrol and Health. Elsinore (Dinamarca)

**Belchí-Navarro S, Almagro L, Miras-Moreno B, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA** (2011) Regulation of the production of *trans*-resveratrol in elicited grapevine cell cultures by signalling compounds (Ponencia invitada) 1<sup>st</sup> Annual Meeting FA1006-COST Action: PlantEngine I: Current state and vision for the future. Murcia

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

**Collado-González M, Guirao-Abad JP, Argüelles A, Belchí-Navarro S, Sánchez-Fresneda R, Argüelles JC** (2012) Análisis de la actividad antifúngica y antioxidante del resveratrol sobre *C. albicans* (Ponencia invitada) IV Congreso GEBMP. Badajoz



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

**Fernández-Pérez F, Almagro L, Belchí-Navarro S, Sottomayor M, Bru R, Maria A Pedreño** Cytotoxic effects of indole alkaloids and *trans*-resveratrol obtained from elicited plant cell cultures on human acute leukemia cell lines (Ponencia) 2<sup>st</sup> Annual Meeting FA1006-COST Action: PlantEngine I: Current state and vision for the future. Rumanía

### **Premios**

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



## Agradecimientos

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

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra M<sup>a</sup> Angeles Pedreño, directora de este trabajo, la confianza que un buen día depositó en mi y que me permitió comenzar mi carrera investigadora. Agradecerle su tiempo y enseñanzas, su forma de ser, su preocupación por todos nosotros, su fuerza y su optimismo.

Agradecer al Dr Roque Bru, director de esta memoria, que desde la distancia ha seguido y dictado algunos de mis pasos. Siempre resolviendo los “problemillas” que le he ido planteando y que me haya recibido en su laboratorio con la mayor simpatía y agrado, poniendo a mi disposición todo aquello que he necesitado.

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

A Laura que fue mi primera Maestra Jedi en el laboratorio, con quien compartí mis primeras experiencias con el cultivo *in vitro* y los geles de proteínas. No he visto persona más escrupulosa en el orden y la limpieza y estoy muy agradecida por haber aprendido de ella.

A Lorena, porque a su lado la vida es una montaña rusa, no hay tiempo para el aburrimiento, ni lunes sin anécdota y con la que tengo pendiente un chino de resveratrol.

A Ana, una gran compañera de laboratorio, con una extraordinaria capacidad para realizar cualquier tarea, desde la limpieza y el orden del laboratorio hasta poner un satélite en órbita. Discreta y aplicada, en definitiva, una gran investigadora.

A Fran, un currante como pocos, autodidacta y autosuficiente (hasta con el brazo roto te hace una PCR). Porque me encanta cuando me llama por mi apellido (mal acentuado) o cuando me hace una de sus rimas cutres pero espontáneas, todo un personaje.

A Bego, con la que aparte de dedicarme a las terrenales tareas del laboratorio he compartido largas charlas sobre la música, el cine, la vida... Una joven padawan que se ha convertido en Maestra.

A Rosa, porque más simpática no se puede ser. Derrocha energía, alegría, positividad. Es un gusto trabajar a su lado, porque además, no he visto a nadie trabajar como ella, puede con todo.

A mis antiguos compañeros de laboratorio M<sup>a</sup> del Mar, Edu, Carlos T, Jorge, Carlos G y Juanjo con los que también compartí trabajo y diversión y a los que no olvidaré.

A Pepita, dueña y señora de las “Monastrelles”, con quien he hecho cientos de litros de medio de cultivo y hemos pasado horas de entretenidas charlas y música de “la Kiss FM” en el P3.

A Pepe Martínez Parra, que ha sido compañero (hachepelecero), consejero y buena persona donde las haya.

A Susana Sellés, Juan Carlos Vera, M<sup>a</sup> José Martínez y Mayte de la Universidad de Alicante. Todos ellos se han mostrado encantadores ante cualquier llamada de auxilio que les he hecho, ¿qué más se puede pedir?

A Esther, porque por complicada que sea cualquier tarea del laboratorio la hace fácil y divertida, porque en su compañía no paro de reir y las jornadas de trabajo son productivas y amenas.

Al Dr. Matías y al Dr. Alberto Esteban, dos eminencias a las que he tenido el gran honor de conocer.

A Joaquín, porque sin conocerme de nada me tendió una mano en un momento de apuro. Un futuro y merecido Dr. Coincido absolutamente con él en que hace falta mucha vara. Todo un Señor.

A Andrés, paciente y atento, siempre dispuesto a escuchar mis lamentos y paranoias. Un gran compañero, gran investigador y gran amigo.

A M<sup>a</sup> Angeles Agulló y Hülya por valorarme como investigadora y sobre todo como persona. Estupendas las dos!

A Isabel Santos, la que lo comenzó todo con esas maravillosas clases de Biología en el instituto. Me quedaba absorta escuchándola, qué bien transmite, qué ganas de enseñar, qué rectitud y saber estar.

A mis abuelos, mis padres, mi hermana, mis cuñados, mis suegros y mi querido ahijado. Por quererme sin más, porque son la mejor Familia que se pueda tener.

A Jose, mi compañero de fatigas, de diversión y de locuras en la vida. Por su cariño, paciencia, comprensión y respeto.

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

A mi Familia

"And I thank you  
For bringing me here  
For showing me home  
For singing this tears  
Finally I've found  
That I belong here"

Home-Depeche mode



# Índice





<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	5
<b>1.1 <i>Vitis vinifera</i></b> .....	7
<b>1.1.1 Monastrell</b> .....	8
<b>1.1.2 Química de la vid e interés de los compuestos naturales de la uva</b> .....	8
<b>1.1.2.1 Ruta fenilpropanoide</b> .....	9
<b>1.1.2.2 El resveratrol y sus propiedades</b> .....	15
<b>1.2 Metabolitos secundarios</b> .....	17
<b>1.2.1 Evolución del conocimiento de los metabolitos secundarios</b> .....	17
<b>1.2.2 Biotecnología y metabolitos secundarios de plantas</b> .....	19
<b>1.2.2.1 Funciones de los metabolitos secundarios</b> .....	19
<b>1.2.3 Biotecnología y cultivos celulares</b> .....	20
<b>1.2.3.1 Evolución de la Biotecnología Vegetal</b> .....	22
<b>1.2.3.2 El cultivo <i>in vitro</i> de células vegetales</b> .....	23
1.2.3.2.1 Selección del explanto y línea celular.....	24
1.2.3.2.2 Condiciones de cultivo .....	25
<b>1.2.3.3 Cultivos celulares vegetales y producción de metabolitos secundarios</b> .....	27
<b>1.2.4 Estrategias para aumentar la producción de metabolitos secundarios mediante cultivo <i>in vitro</i> de células, órganos y tejidos vegetales</b> .....	28
<b>1.2.4.1 Adición de precursores de los metabolitos secundarios</b> .....	29
<b>1.2.4.2 Producción de metabolitos secundarios en cultivos de tejidos y órganos vegetales</b> .....	30
<b>1.2.4.3 Elicitación</b> .....	31
1.2.4.3.1 Elicidores bióticos .....	33
a) Ciclodextrinas.....	33
b) Moléculas señal como inductoras de la síntesis de metabolitos secundarios .....	35
1.2.4.3.2 Elicidores abióticos .....	38
a) Fosetil de aluminio .....	38
b) Radiación ultravioleta .....	39
<b>1.2.4.4 Ingeniería metabólica</b> .....	39
<b>1.2.5 Producción de metabolitos secundarios a gran escala</b> .....	40
<b>1.2.6 Rendimiento de la producción de metabolitos</b> .....	43
<b>1.3 Señalización inducida por elicitación</b> .....	44
<b>1.3.1 Implicación del calcio en la señalización intracelular inducida por la elicitación</b> ...	47
<b>1.3.2 Implicación de las especies reactivas de oxígeno y el óxido nítrico en la señalización intracelular inducida por elicitores</b> .....	48
<b>1.3.2.1 ROS</b> .....	48

1.3.2.2NO .....	50
<b>1.4 Proteínas extracelulares</b> .....	<b>51</b>
<b>1.4.1 Proteínas relacionadas con la patogénesis (PRp)</b> .....	<b>51</b>
<b>1.4.2 Peroxidasas</b> .....	<b>53</b>
<b>1.4.2.1 Características generales de las peroxidasas</b> .....	<b>54</b>
1.4.2.1.1 Naturaleza química de las peroxidasas .....	54
1.4.2.1.2 Clasificación de las peroxidasas .....	55
1.4.2.1.3 Polimorfismo enzimático de las peroxidasas .....	55
<b>1.4.2.2 Localización tisular y subcelular de las peroxidasas</b> .....	<b>56</b>
<b>1.4.2.3 Peroxidasas de la vid</b> .....	<b>57</b>
<b>1.4.2.4 Funciones fisiológicas de las peroxidasas</b> .....	<b>58</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>61</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	<b>65</b>
<b>3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1.1 Inducción y mantenimiento de callos</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1.2 Iniciación y mantenimiento de suspensiones celulares</b> .....	<b>67</b>
<b>3.2 Medida del crecimiento celular</b> .....	<b>68</b>
<b>3.2.1 Curva de crecimiento</b> .....	<b>68</b>
<b>3.3 Elicitación</b> .....	<b>69</b>
<b>3.3.1 Adición de elicitores</b> .....	<b>70</b>
<b>3.3.1.1 Reactivos</b> .....	<b>70</b>
<b>3.3.1.2 Metodología</b> .....	<b>70</b>
• Elicitación con ciclodextrinas de distinta naturaleza.....	70
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con distintas concentraciones de ciclodextrinas metiladas al azar.....	71
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar solas o en combinación con metil jasmonato a distintos volúmenes de empaquetamiento celular .....	71
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar y/o concentraciones variables de jasmonato de metilo .....	71
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar y/o metil jasmonato a diferentes concentraciones sacarosa .....	71
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ácido salicílico y etefón (etileno).....	72
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con fosetil de aluminio en presencia de ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo .....	72
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell en presencia de ciclodextrinas metiladas al azar, jasmonato de metilo y luz UV-A o C .....	72
<b>3.3.2 Señalización</b> .....	<b>73</b>

<b>3.3.2.1 Reactivos</b> .....	73
<b>3.3.2.2 Metodología</b> .....	73
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell a distintas concentraciones de calcio.....	73
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell en presencia de antagonistas de calcio.....	73
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell en presencia de inhibidores de protein kinasas y protein fosfatasa.....	75
• Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell en presencia de inhibidores de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y NO.....	75
<b>3.4 Determinación de estilbenoides</b> .....	76
<b>3.4.1 Extracción de resveratrol y derivados</b> .....	78
<b>3.4.1.1 Extracción de resveratrol y derivados del medio extracelular de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo</b> .....	76
<b>3.4.1.2 Extracción de resveratrol y derivados intracelulares de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo</b> .....	76
<b>3.4.2 Análisis de estilbenoides</b> .....	76
<b>3.4.2.1 Reactivos</b> .....	77
<b>3.4.2.2 Equipos de cromatografía y espectrometría</b> .....	77
<b>3.4.2.3 Método de HPLC/MS</b> .....	77
<b>3.5 Determinaciones enzimáticas</b> .....	78
<b>3.5.1 Medida de la actividad peroxidasa en el medio extracelular</b> .....	78
<b>3.5.2 Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno mediante el método del naranja de xilenol</b> .....	78
<b>3.5.3 Determinación del patrón isoenzimático mediante isoelectroenfoque analítico</b> .....	79
<b>3.5.4 Determinación del patrón de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</b> .....	79
<b>3.5.5 Determinación del contenido en proteínas total mediante la utilización del reactivo de Bradford</b> .....	80
<b>3.5.6 Microsecuenciación de bandas de proteínas del medio extracelular de suspensiones celulares de Monastrell</b> .....	80
Espectrometría MALDI-TOF/TOF.....	81
Espectrometría de masas ESI.....	82
<b>3.5.7 Técnicas bioinformáticas</b> .....	83
<b>3.5.7.1 Búsqueda de secuencias en la base de datos</b> .....	83
<b>3.5.7.2 Alineamiento de proteínas</b> .....	83
<b>3.5.7.3 Búsqueda de secuencias homólogas</b> .....	83
<b>3.5.8 Extracción de proteínas e identificación mediante label-free</b> .....	84
<b>3.5.8.1 Extracción</b> .....	84

3.5.8.2 Análisis de MS y MS/MS.....	84
3.5.8.3 Análisis mediante label-free de las carreras LC-MS.....	84
3.5.8.4 Análisis ontológico.....	85
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>87</b>
4.1 Caracterización de la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares elicidadas de <i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell.....	89
4.1.1 Caracterización del crecimiento de las suspensiones celulares de vid para la producción de biomasa.....	91
4.1.1.1 Cinética de crecimiento celular en función del medio mineral: Gamborg B <sub>5</sub> vs Murashige Skoog.....	91
4.1.1.2 Cinética del crecimiento celular en medio Gamborg B <sub>5</sub> a diferentes concentraciones de sacarosa.....	93
4.1.2 Caracterización de la producción extracelular de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell.....	96
4.1.2.1 Estudio comparativo de los distintos tipos de ciclodextrinas para incrementar la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell.....	96
4.1.2.2 Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar.....	97
4.1.2.3 Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar solas o en combinación con jasmonato de metilo, a distintos volúmenes de empaquetamiento celular.....	98
4.1.2.4 Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell a densidad celular intermedia con ciclodextrinas metiladas al azar y diferentes concentraciones de jasmonato de metilo.....	100
4.1.2.5 Efecto de la adición de ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo sobre la biomasa celular.....	101
4.1.2.6 Estudio temporal de la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	102
4.1.2.6.1 Caracterización de la producción intracelular de estilbenoides en cultivos celulares de Monastrell elicidados con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	104
4.1.2.7 Efecto del medio mineral basal sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	105
4.1.2.8 Variación anual de la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo... ..	106

4.1.2.9 Efecto de la luz UV-C y UV-A sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo.....	107
4.1.2.10 Efecto de la adición de fosetil de aluminio sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo.....	111
4.1.2.11 Efecto de distintas concentraciones de sacarosa y jasmonato de metilo sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar.....	112
4.1.2.12 Efecto de la aireación del medio de cultivo sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol por suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	114
4.1.2.13 Efecto del escalado sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol por suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	116
4.1.2.14 Efecto de ciclos de elicitación continua sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	118
4.1.2.15 Efecto de la adición de compuestos implicados en respuestas de defensa (ácido salicílico y etileno) sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	120
4.2 Señalización de la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares elicidadas de <i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell.....	123
4.2.1 Implicación del calcio en la producción de <i>trans</i> -resveratrol desencadenada por ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	125
4.2.1.1 Efecto de la carencia de calcio y de la presencia de EGTA sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	125
4.2.1.2 Estudio temporal de la producción de <i>trans</i> -resveratrol en presencia de distintas concentraciones de calcio en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar.....	127
4.2.1.3 Efecto de antagonistas y bloqueadores de los flujos de calcio intra y extracelular sobre la producción de <i>trans</i> -resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	128
4.2.2 Implicación de eventos de fosforilación/defosforilación en la producción de <i>trans</i> -resveratrol dirigida por ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	132

4.2.3 Implicación H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y NO en la producción de <i>trans</i> -resveratrol desencadenada por ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo.....	133
4.3 Proteínas extracelulares expresadas en suspensiones celulares elicidadas de <i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell.....	137
4.3.1 Características de la peroxidasa de Monastrell en presencia de elicitores.....	139
4.3.1.1 Patrón isoenzimático de peroxidases extracelulares de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar .....	139
4.3.1.2 Patrón isoenzimático de peroxidases extracelulares de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o luz UV-C .....	140
4.3.1.3 Patrón isoenzimático de peroxidases extracelulares de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo.....	141
4.3.1.4 Actividad peroxidasa y producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo.....	142
4.3.2 Patrón de proteínas extracelulares totales de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas .....	144
4.3.2.1 Patrón de proteínas extracelulares totales de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo.....	144
4.3.3 Identificación del proteoma extracelular de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo mediante la técnica label-free.....	146
4.3.3.1 Anotación y análisis de ontología.....	151
4.3.3.2 Análisis diferencial.....	153
4.3.4 Identificación del proteoma extracelular de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o moléculas señal (jasmonato de metilo, ácido salicílico) y etileno mediante microsecuenciación.....	162
5. Conclusiones.....	173
6. Bibliografía.....	179







**Abreviaturas**

**2,4-D:** ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**4-MN:** 4-metoxi- $\alpha$ -naftol

**ADPRc:** adenosín difosfato ribosa cíclica

**AIA:** ácido indolacético

**ANA:** ácido 1-naftalenacético

**Ap:** apigenina

**BA:** 6-bencil adenina

**BIM:** bis-indolilmaleimida

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub>:** concentración de calcio citosólico libre

**Can:** cantaridina

**CD:** ciclodextrina(s)

**CDM:** ciclodextrinas metiladas al azar

**CDH:** ciclodextrinas hidroxipropiladas al azar

**c-P:** *cis*-piceida

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

**c-R:** *cis*-resveratrol

**cv:** cultivar

**DAG:** diacilglicerol

**DDT:** ditiotreitól

**DPI:** ioduro de difenilo

**EDTA-Na:** etilendiaminotetraacetato de sodio

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

**ESI:** ionización por electrospray

**Est:** estaurosporina

**ET:** etileno

**FAI:** fosetil de aluminio

**GB5:** Gamborg B<sub>5</sub>

**Gen:** genisteína

**GMPc:** guanosín monofosfato cíclico

**GO:** gene ontology

**h:** hora(s)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad

**HO<sup>•</sup>:** radical hidroxilo

**HPLC-DAD:** cromatografía líquida de alta presión acoplado a un fotodiodo array

**HR:** respuesta hipersensible

**IEF:** isoelectroenfoque

**IP<sub>3</sub>:** inosítidos fosfato

**JA:** ácido jasmónico

**La<sup>3+</sup>:** cloruro de lantano

**LC-MS/MS:** cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**L-NNA:** N $\omega$ -Nitro-L-Arginina

**MALDI-TOF-TOF:** desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a tiempo de vuelo

**min:** minuto(s)

**MJ:** jasmonato de metilo

**MS:** Murashige y Skoog

**Neo:** neomicina

**NAD(P)H:** nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)

**NF $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NO:** óxido nítrico

**NPS:** nitroprusiato sódico

**OFA:** óxido de fenilarsina

**OPDA:** ácido 12-oxofitodienólico

**PAL:** fenilalanina amonio liasa

**PF:** peso fresco

**Phe:** fenilalanina

**PK:** protein kinasas

**PP:** protein fosfatasas

**PRp:** proteínas relacionadas con la patogénesis

**PS:** peso seco

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**RR:** rojo rutenio

**Rt:** tiempo de retención

**SA:** ácido salicílico

**SAR:** respuesta sistémica adquirida

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**SIRT**: reguladores silenciosos de la información

**SOD**: superóxido dismutasa

**t<sub>0</sub>**: tiempo cero

**T<sup>a</sup>**: temperatura

**Ta**: tiempo de agotamiento de los nutrientes

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

**t-P**: *trans*-piceida

**t-R**: *trans*-resveratrol

**TNF $\alpha$** : factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**Tyr-PK**: tirosin protein kinasa(s)

**UV**: ultravioleta

**VEC**: volumen de empaquetamiento celular

**VEC<sub>max</sub>**: volumen de empaquetamiento celular máximo

**VEC<sub>t<sub>0</sub></sub>**: volumen de empaquetamiento celular a tiempo cero

**V<sub>exp</sub>**: velocidad de crecimiento celular en la fase exponencial





# 1. Introducción



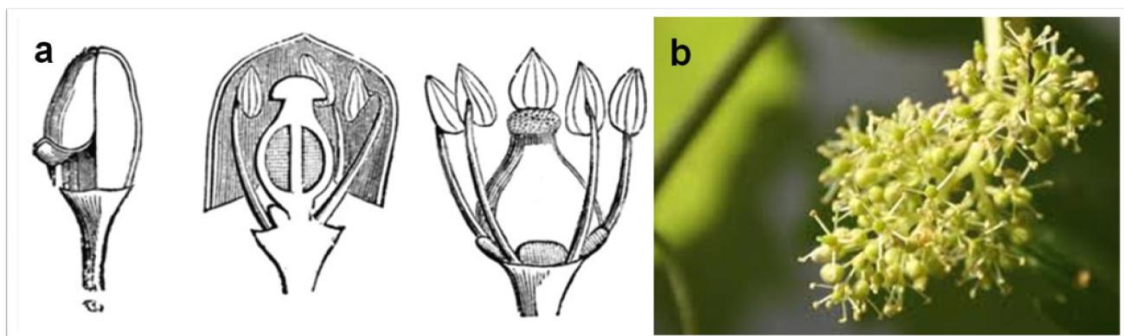




## 1.1 *Vitis vinifera*

La familia de las Vitáceas comprende setenta géneros en los que se incluyen casi mil especies. Cerca de 470 de estas especies son leñosas, en su mayoría lianoides, poseen hojas esparcidas, compuestas o simples pero profundamente lobuladas, con estípulas y abundantes zarcillos derivados de modificaciones en las inflorescencias. Se distribuyen por las regiones templado-cálidas. Las flores, muy pequeñas, son actinomorfas, unisexuales o hermafroditas, muestran una estructura pentámera (raramente tetrámera), y están provistas de un disco en el ápice del pedúnculo. El perianto está formado por 5 sépalos verduzcos muy reducidos, 5 pétalos libres en la base y soldados en el extremo formando una especie de capucha que cae por el alargamiento de los estambres. Estos últimos están en número de 5, mientras el gineceo, formado por 2 carpelos, cada uno con 2 óvulos, es súpero y bilocular.

El fruto es una baya carnosa y contiene de 2 a 4 semillas oleaginosas. A esta familia pertenece una importante planta cultivada, la vid (*Vitis vinifera*), originaria del Cáucaso y cultivada en toda la cuenca del Mediterráneo desde la antigüedad.



**Figura 1.1** Esquema (a) e imagen (b) de la inflorescencia de *V. vinifera*.

En todo el mundo, la vid (*Vitis sp.*) se encuentra entre las especies vegetales cultivadas más importantes, con una superficie de cerca de 9 millones de hectáreas. La principal especie cultivada es *V. vinifera* L. La domesticación de *V. vinifera* ocurrió hace mucho tiempo como lo demuestran las semillas de 5000 años de edad que se encuentran en Jericó. El Medio Oriente se cree que es el origen de las uvas domésticas (Bassermann-Jordan 1923; Zohary y Spiegel-Roy 1975). Desde este centro ancestral, la viticultura se extendió desde la cuenca del Mediterráneo hasta el Lejano Oriente y se introdujo más tarde en el Nuevo Mundo, en particular, por los colonos de los países vinícolas de la zona del Mediterráneo. La rápida domesticación de la vid fue apoyada por los múltiples usos de la uva para la producción de fruta de mesa, el vino, el mosto y las pasas. La vid también muestra una gran diversidad

genética y amplia adaptabilidad a diferentes suelos y climas. Sin embargo, la variación en *V. vinifera* era insuficiente para permitir el cultivo universal y llevó a la domesticación de otras especies silvestres. Entre estas se encuentran: *V. labrusca* L. y *V. rotundifolia* Michaux en América (Einset y Pratt 1975) y *V. amurensis* Ruprecht en China.

### 1.1.1 Monastrell

La variedad Monastrell (también llamada: Alcayata, Garrut, Gayata, Mataró, Monastrell, Morastrell, Morrastrell, Mourvedre, Murviedro y Verema Blanca), es una variedad de uva tinta española presente, sobre todo, en Murcia (52%), Alicante, Albacete y Valencia. Considerada variedad principal en las denominaciones de origen Alicante, Almansa, Costers del Segre, Jumilla, Penedés, Valencia y Yecla de la que se obtienen vinos ricos en alcohol, muy pigmentados y ásperos en juventud. Esta cepa requiere un cultivo delicado y temperatura ( $T^a$ ) elevada. Los racimos son grandes y densos, las uvas son pequeñas, redondas y con piel gruesa. Muy sensible a la sequía pero poco sensible a *Botrytis cinerea*, medianamente sensible al oídio y ácaros así como al mildiú y a la podredumbre ácida.



Figura 1.2 *V. vinifera* L. cv Monastrell.

### 1.1.2 Química de la vid e interés de los compuestos naturales de la uva

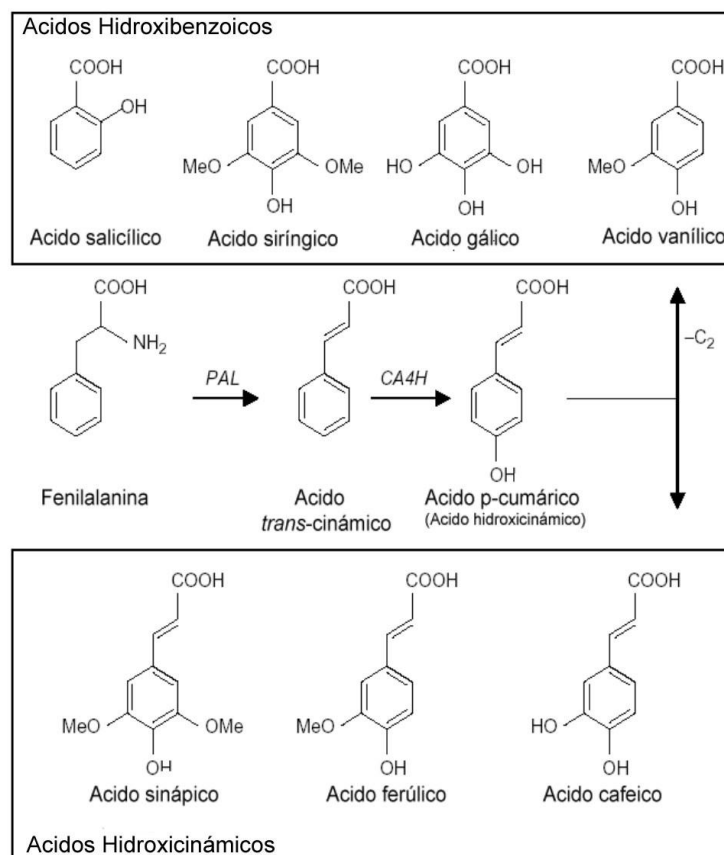
Las uvas se consumen como fruta y, junto con los tallos, se usan para la vinificación, sin embargo, las hojas no se utilizan normalmente como vegetales comestibles por el hombre. Por lo tanto, se hará hincapié en los fitoquímicos presentes en los tejidos de los frutos. La química de la uva es bastante compleja y se han identificado miles de compuestos en el género *Vitis*, comprendidos en las tres clases principales de productos naturales, fenilpropanoides, isoprenoides y alcaloides, ampliamente

distribuidos tanto en alimentos como en hierbas medicinales (Iriti et al. 2006; Pezzuto et al. 2008).

Hay un interés creciente en el uso de compuestos naturales como potenciales agentes quimiopreventivos del cáncer en las poblaciones humanas. En este sentido, existe una correlación significativa en los datos epidemiológicos generados en todo el mundo, y en experimentos con animales, entre la ingesta dietética y muchos tipos de cáncer. Estos incluyen las catequinas del té verde, el licopeno, isoflavonas de la soja, compuestos fenólicos de la granada, selenio, vitaminas E y D, curcumina, silibinina y resveratrol (Athar et al. 2007).

### 1.1.2.1 Ruta fenilpropanoide

De entre la gran diversidad de compuestos producidos por *V. vinifera*, en esta memoria de investigación se destacan los obtenidos a partir de la ruta fenilpropanoide, concretamente los pertenecientes a la familia de los estilbenos, por ser el objetivo principal de estudio.

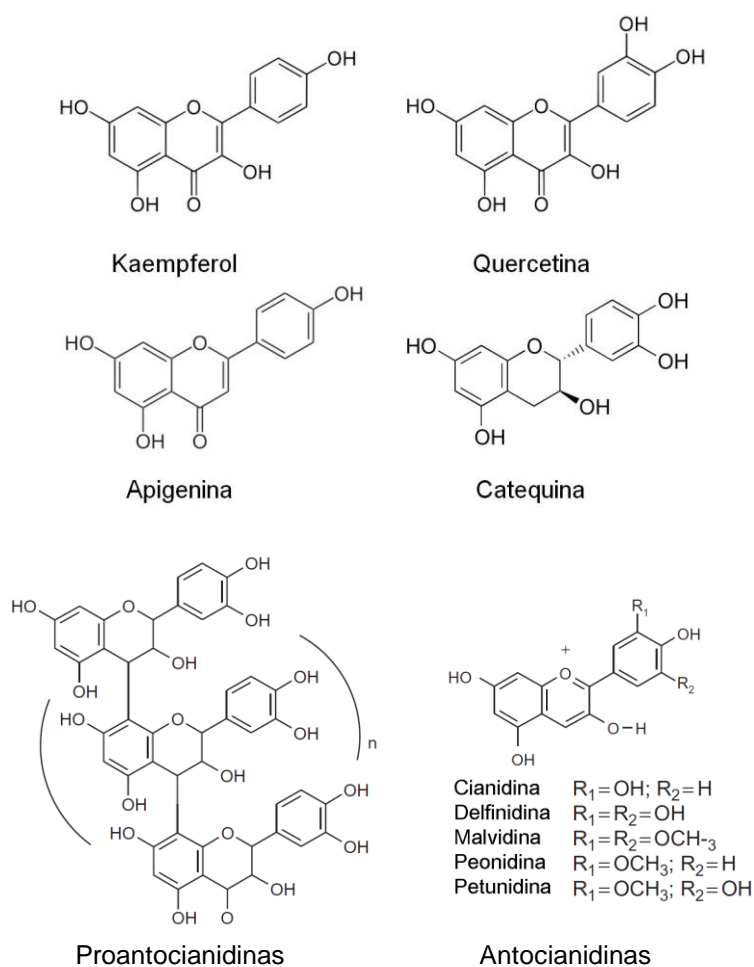


**Figura 1.3** Inicio de la ruta fenilpropanoide a partir de la desaminación de la fenilalanina por la acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y fenoles simples (hidroxicinamatos e hidroxibenzoatos) generados a partir de la fenilalanina. Tomado de Iriti y Faoro (2010).

La ruta fenilpropanoide (Figura 1.3) parte de la fenilalanina (Phe) y conduce a la formación de derivados de uno, dos o más anillos aromáticos ( $C_6$ ), cada anillo con un patrón característico de sustitución y con diferentes modificaciones del residuo de propano de la Phe ( $C_3$ ). Los ácidos hidroxicinámicos ( $C_6-C_3$ ) entre los que se incluyen p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, presentan diferentes grados de hidroxilación y metilación en  $C_6$ . La escisión de un fragmento de  $C_2$  de la cadena lateral alifática del ácido p-cumárico conduce a la formación de los ácidos hidroxibenzoicos ( $C_6-C_1$ ), tales como salicílico, siríngico, gálico y vanílico (Herrmann 1989).

La condensación de tres residuos  $C_2$  con un ácido hidroxicinámico activo produce dos clases de metabolitos con un segundo anillo aromático vinculados a la fracción fenilpropanoide, los flavonoides ( $C_6-C_3-C_6$ ) y los estilbenos ( $C_6-C_2-C_6$ ) (Iwashina 2000) (Figuras 1.4 y 1.6).

La estructura química básica de los flavonoides es el núcleo flavano, compuesto por 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos: dos anillos de benceno en combinación con un anillo pirano que contiene oxígeno (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Estructura de algunos flavonoides.

Entre los flavonoides destacan las antocianidinas por ser los pigmentos más abundantes en la piel de las uvas. Asimismo, se encuentran otros compuestos de interés como kaempferol, quercetina, apigenina y catequinas. Estas últimas, constituyen la unidad monomérica para la biosíntesis de las proantocianidinas, también conocidas como taninos condensados (Figura 1.4). Las proantocianidinas presentes en la piel de las uvas tienen un bajo grado de polimerización, lo que las hace fácilmente extraíbles durante el proceso de fabricación del vino, y se localizan en la vacuola y la pared celular, confiriéndole importantes propiedades organolépticas al vino, tales como la astringencia, amargor, coloración y turbidez (Pieur et al. 1994; Souquet et al. 1996; Gavetta et al. 2000).

Las moléculas que pertenecen a la familia de los estilbenos son compuestos fenólicos de bajo peso molecular localizados de forma específica en los tejidos no lignificados de las plantas, como compuestos inducidos (fitoalexinas) (Langcake y Pryce 1976) y de forma genérica en los tejidos lignificados, como compuestos constitutivos de estos tejidos (Bavaresco y Fregoni 2001).

Se han identificado compuestos de naturaleza estilbenoide en numerosas especies de familias tan distintas como las Vitáceas, Pináceas, Aracáceas (o palmáceas), Mirtáceas, Fagáceas, Liliáceas, Fabáceas (o leguminosas) y Moráceas. En la familia de las Vitáceas, destaca la especie *V. vinifera*, que es la más importante en la producción mundial de uvas de mesa, pasas y producción de vino. Los frutos de la vid y los productos derivados de los mismos, constituyen la principal fuente de estilbenos disponibles en la naturaleza para la dieta humana (Mattivi et al. 1995) siendo la última etapa de la síntesis catalizada por la enzima estilbeno sintasa (Ingham 1976; Rupprich y Kindl 1978).

Entre los estilbenos se encuentran compuestos tales como el resveratrol (formas *cis*- y *trans*-), pterostilbeno (3,5-dimethyl resveratrol), piceida (glucósido de resveratrol),  $\epsilon$ -viniferina (dímero resveratrol), y  $\alpha$ -viniferina (trímero resveratrol) descubiertos en hojas. Otros estilbenoides se identificaron en cultivos celulares, piceatanol,  $\delta$ -viniferina y pallidol. La mayor parte de ellos están presentes en los frutos de vid y en los vinos producidos a partir de estos (Langcake y Pryce 1977a y 1977b; Langcake et al. 1979; Pezet y Pont 1988; Waffo-Teguo et al. 1996b y 2001; Vitrac et al. 2002).

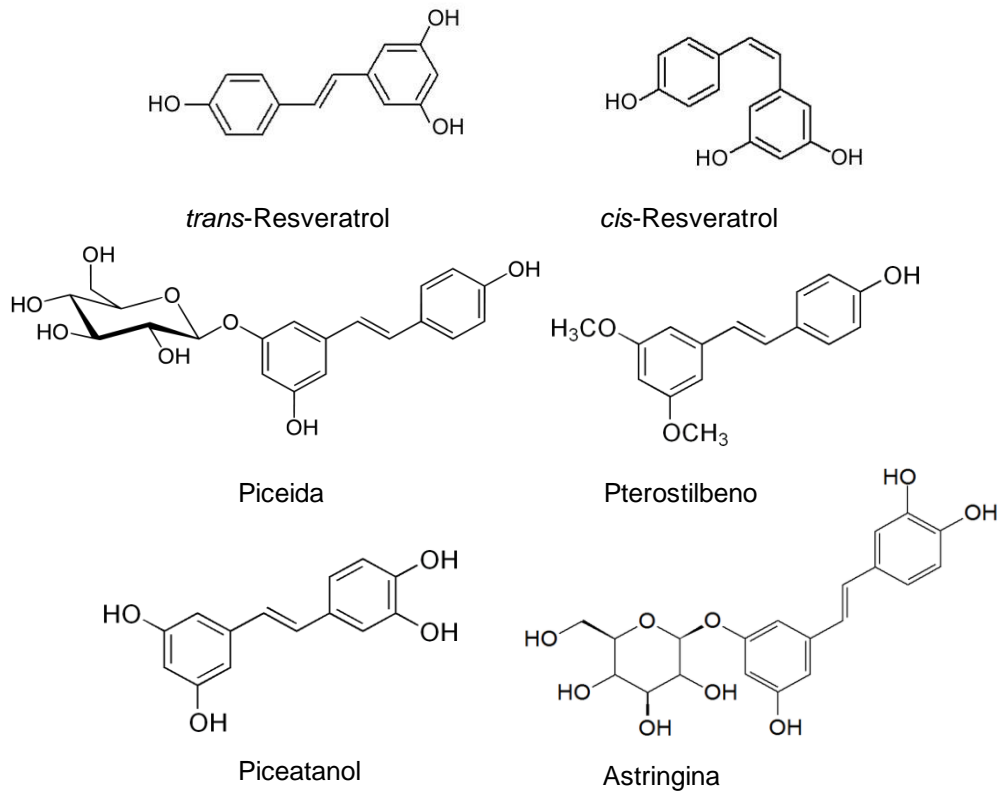


Figura 1.5 Estructura de algunos estilbenos.

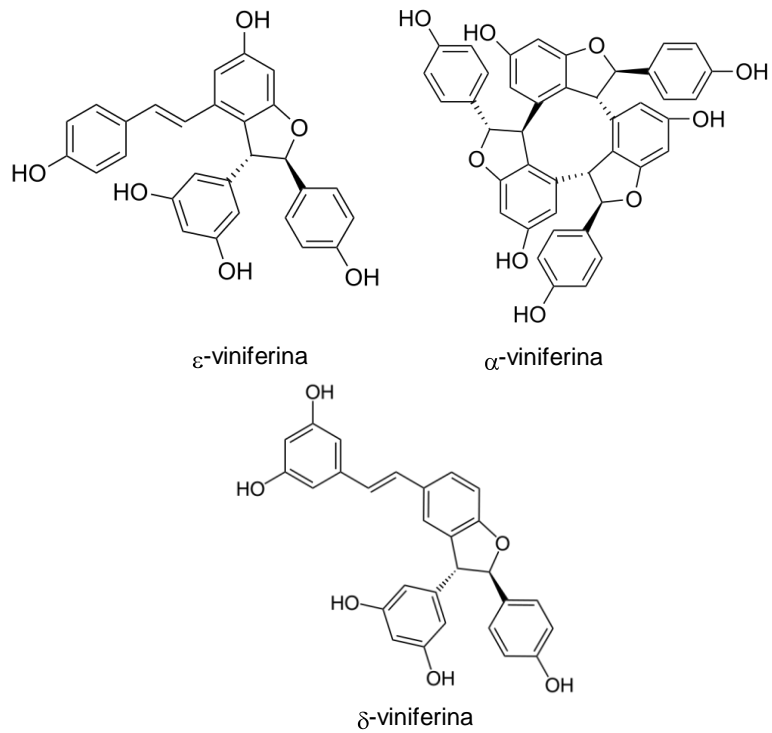


Figura 1.6 Oligómeros del *t*-R.

La estructura química de algunas viniferinas se basa en el esqueleto químico de un hidroxiestilbeno, el *t*-R (3,5,4'-*trans*-trihidroxiestilbeno) (Langcake y McCarthy 1979a), sintetizado a través de la ruta fenilpropanoide y el malonato procedente de la ruta de los ácidos tricarbóxicos (Figura 1.7) (Schröder y Schröder 1990) siendo una peroxidasa, la enzima que lleva a cabo el acoplamiento oxidativo de monómeros de *t*-R, originando los distintos tipos de oligómeros conocidos como viniferinas. En cultivos de células de vid, la única enzima descrita hasta el momento con actividad fenol-oxidasa, capaz de oxidar al resveratrol, ha sido la peroxidasa (Morales y Ros Barceló 1997; Morales et al. 1997).

La mayoría de las isoenzimas de peroxidasa capaces de oxidar los 4-hidroxiestilbenos son constitutivas (Calderón et al. 1994a), aunque algunas se expresan en determinados estados de resistencia (Zapata et al. 1994).

Tanto la cantidad como la especificidad de un determinado estilbeno en un tejido concreto, depende no sólo de la planta o de la célula en sí misma, sino también de las condiciones nutricionales y de los factores de estrés que rodeen a la planta (Decendit et al. 1996; Waffo-Teguo et al. 1996a y 1996b). La síntesis de estilbenos puede inducirse como respuesta a la infección por patógenos (Langcake y Pryce 1976) o a factores abióticos. La expresión de estos genes se induce de forma diferente dependiendo de cual sea la señal externa que reciba la planta (Preisig-Müller et al. 1999; Brehm et al. 1999).

Las viniferinas son consideradas fitoalexinas (*phyton* –planta; *alexin* –defensa) (Reichling 1999) por presentar actividad biológica frente a un amplio rango de agentes fitopatógenos (Jeandet y Bessis 1989). Así, estudios realizados en cultivos celulares elicitados con hidrolizados de paredes celulares de fitopatógenos generan como respuesta de defensa, la síntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la inducción de enzimas de la biosíntesis de fitoalexinas y la síntesis y acumulación de fitoalexinas específicas de la planta (Reichling 1999). Por ello, la presencia de viniferinas a concentraciones biológicamente significativas se ha asociado a estados infectivos o inducidos, ya que en células sanas o no inducidas, la concentración de viniferinas presentes es muy baja (Bavaresco y Fregoni 2001).

La presencia de las fitoalexinas en las plantas es transitoria y durante el corto periodo de interacción entre la planta y el patógeno se encuentran muy localizadas en la zona de infección siendo su concentración total en la planta extremadamente baja, por lo que los métodos clásicos de extracción con fines comerciales resultan muy costosos. La ventaja de la utilización de las suspensiones celulares en este caso, es que todas

las células responden de forma global ante la presencia de un elicitador adecuado en el medio de cultivo, de manera que la cantidad de fitoalexina producida es mucho mayor que en la planta y su síntesis está en función de la biomasa de células elicidadas y de las condiciones de cultivo que afectan al crecimiento y proliferación de las mismas (Bru et al. 2006).

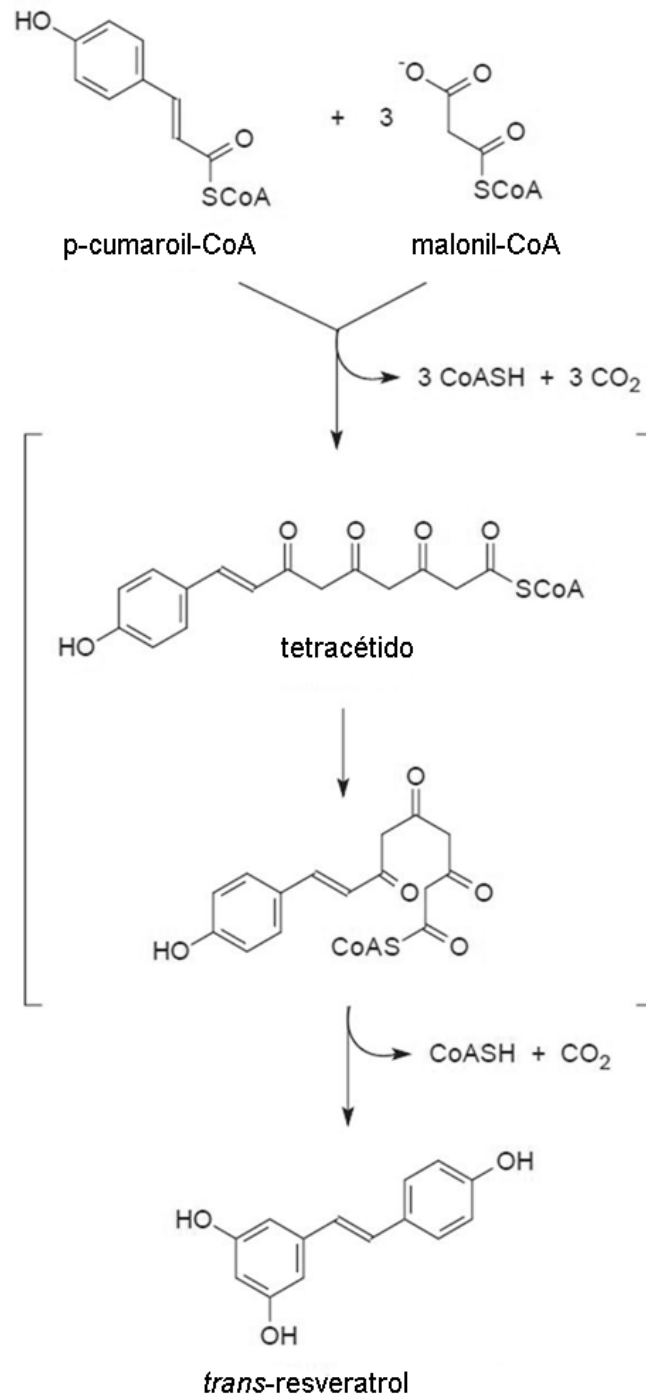


Figura 1.7 Ruta biosintética del *t*-R.



### 1.1.2.2 El resveratrol y sus propiedades

La unidad estilbénica más interesante en cuanto a las propiedades mostradas para la salud humana es el *t*-R, que además es el más abundante en el reino vegetal. Se ha demostrado que el *t*-R es el hidroxiestilbeno mayoritario en los frutos de vid en estados infectivos (Langcake y Pryce 1977a) y en condiciones de estrés abiótico (Creasy y Coffee 1988; Dercks y Creasy 1989; Calderón et al. 1993a; Adrian et al. 1996; Adrian et al. 2000). El *t*-R fue identificado químicamente por primera vez en 1982, por investigadores japoneses (Arichi et al. 1982) como componente activo principal de una medicina tradicional oriental que se elaboraba a partir de raíces desecadas de *Polygonum cuspidatum*. El resveratrol también se ha identificado en una amplia variedad de plantas (Morales et al. 2000), pero sobre todo en los frutos de las Vitáceas. Las propiedades de los compuestos procedentes de la vid probablemente se deban al efecto combinado de todos sus compuestos bioactivos más que de una o unas pocas moléculas, aunque el resveratrol constituye el ejemplo más estudiado de entre los compuestos biológicamente activos de las uvas (Iriti et al. 2006; Pezzuto et al. 2008). Entre las propiedades del resveratrol se encuentran:

- Prevención contra el cáncer

La quimioprevención es una estrategia de parada o marcha atrás de la carcinogénesis mediante el uso de agentes quimiopreventivos. A nivel molecular se ha propuesto que las interacciones con los factores de transcripción y los receptores podrían ser las responsables de la actividad anticarcinogénica de los polifenoles de la vid (Iriti y Faoro 2010). En este sentido, Pezzuto et al. (2008) demostraron que el resveratrol inhibía el desarrollo de lesiones preneoplásicas en cultivos de glándula mamaria de ratón tratados con un carcinógeno, así como la formación de tumores en la piel de ratones (Jang et al. 1997).

Asimismo, se ha observado que existe una correlación directa entre la inflamación crónica y diversos tipos de cáncer, ya que durante la inflamación se produce un aumento de la expresión de los genes implicados y de la actividad de las enzimas que sintetizan los compuestos proinflamatorios derivados del araquidonato (Kundu y Surh 2005; Aggarwal et al. 2006). En este sentido, el resveratrol es capaz de bloquear varios componentes de la cascada proinflamatoria tales como la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (Kimura et al. 1985; Ferrandiz et al. 1991; Laughton et al. 1991; Pace-Asciak et al. 1995) así como la cascada de las prostaglandinas, inhibiendo las tres etapas de la carcinogénesis (Subbaramaian et al. 2003).

El resveratrol también actúa inhibiendo dos importantes factores de la transcripción, NF $\kappa$ B, implicado en la ruta de señalización que media la inflamación, oncogénesis (angiogénesis y metástasis) y apoptosis y el activador de la proteína 1 (AP-1) que regula la expresión de los genes implicados en la adaptación, diferenciación y proliferación celular (Holmes-McNary y Baldwin 2000; Pervaiz 2003).

Otro mecanismo por el que el resveratrol ejerce actividad quimiopreventiva es mediante su interacción con los receptores de andrógenos y estrógenos (Iriti y Faoro 2010). En algunos tipos de tumor, como leucemia, el resveratrol activa la vía mitocondrial de la apoptosis mediante la sobre-expresión de proteínas proapoptóticas como p53 y Bax e impide la expresión de proteínas inhibidoras de la muerte celular como Bcl-2 (Roman et al. 2002). En líneas celulares de melanoma humano, el resveratrol induce apoptosis mediante la activación de proteín kinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Niles et al. 2003), mientras que en líneas celulares de cáncer de páncreas humano, induce apoptosis por la vía de las caspasas 3 y 8, detiene el ciclo celular en fase G<sub>1</sub> e inhibe la expansión del tumor por la matriz extracelular (Cui et al. 2008).

- Aterogénesis, hipertensión y cardioprotección

En las enfermedades cardiovasculares tiene lugar un proceso inflamatorio en el que se produce la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana plasmática liberando ácido araquidónico que es el sustrato de ciclooxigenasa y lipooxigenasa. Uno de los productos de ciclooxigenasa es el tromboxano A<sub>2</sub> el cual potencia la reactividad de las plaquetas favoreciendo la formación de las placas de ateroma (Smith 1989). Como se menciona en el apartado anterior, el resveratrol inhibe a estas dos enzimas impidiendo la formación de mediadores de la inflamación, previniendo la agregación plaquetaria.

También se ha observado en individuos cuya dieta se ha suplementado con resveratrol, que se produce una modificación del perfil de lipoproteínas, dando lugar a un aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y a un descenso de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como de otros marcadores de la inflamación asociados a riesgo cardiovascular (Castilla et al. 2006). También se produce un descenso de los niveles del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y de las concentraciones de triglicéridos plasmáticos (Zern et al. 2005).

El resveratrol también actúa induciendo la liberación de óxido nítrico (NO) por la óxido nítrico sintasa endotelial, el descenso de la producción de endotelina 1 y la supresión de NF $\kappa$ B (mediada por TNF $\alpha$ ).

Además, el resveratrol incrementa los niveles de activadores del plasminógeno transformándolo en plasmina, el cual es responsable de la degradación de la fibrina del trombo, disolviendo el coágulo (Zou et al. 2000).

- Neuroprotección y envejecimiento

El resveratrol promueve la degradación intracelular de los péptidos  $\beta$  amiloides que se depositan en las neuronas causando su degeneración (Marambaud et al 2005). Asimismo, reduce la citotoxicidad inducida por NO y por la acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bastianetto et al. 2000). Todos los inhibidores polifenólicos eficaces están compuestos por al menos dos anillos fenólicos con 2-6 uniones atómicas y un mínimo de tres grupos -OH en los anillos aromáticos. Estas características estructurales son esenciales para la interacción no covalente con las estructuras en lámina  $\beta$  presentes en las placas amiloideas (Porat et al. 2006).

Otro mecanismo por el que resveratrol retarda los procesos de envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad es la restricción calórica, sugiriendo que este compuesto comparte rutas metabólicas comunes a la restricción calórica (Howitz et al. 2003). Este proceso está mediado por proteínas de la familia de los reguladores silenciosos de la información (SIRT). Las SIRT están implicadas en una gran diversidad de funciones celulares desde silenciamiento génico, control del ciclo celular y apoptosis, hasta metabolismo energético (Outeiro et al. 2008).

## 1.2 Metabolitos secundarios

### 1.2.1 Evolución del conocimiento de los metabolitos secundarios

El fenómeno del metabolismo secundario y su diferenciación del metabolismo primario fue reconocido en la segunda mitad del siglo XIX. En 1873, Julius Sachs, uno de los padres fundadores de la fisiología de plantas, dio la siguiente definición: "Se pueden designar como productos secundarios del metabolismo aquellos compuestos que se forman durante el metabolismo pero que ya no vuelven a usarse para la formación de nuevas células. Cualquiera que sea la importancia de estos compuestos para el metabolismo primario es hasta ahora desconocido."

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios y no tienen función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de

proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de biomoléculas. Estos compuestos tienen una distribución restringida en el reino vegetal, ya que se encuentran con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal (Taiz y Zeiger 2002).

Los metabolitos secundarios de origen vegetal, incluyen un amplio rango de compuestos que superan las 200000 estructuras definidas. El metabolismo secundario cubre tanto aspectos funcionales como evolutivos.

Podría considerarse que el estudio de los metabolitos secundarios comenzó en 1806, cuando Friedrich Wilhelm Sertürner aisló la morfina (*"principium somniferum"*) de la adormidera. Esta fue la primera demostración de que el principio activo de una droga de origen vegetal podía aislarse y atribuírsele este efecto a un único compuesto químico, lo cual inició la química de productos naturales.

Pero no fue hasta mediados del siglo XX que se produjo un gran avance en la enzimología del metabolismo secundario, apoyada por dos grandes avances tecnológicos:

1. La introducción de la columna de cromatografía en la química de proteínas, con nuevos disolventes, permitiendo una separación rápida y selectiva de las proteínas por tamaño de exclusión, intercambio iónico y cromatografía de afinidad.

2. El uso de cultivo de órganos y células vegetales. A principios de los setenta, los cultivos celulares cobraron gran popularidad en el estudio del metabolismo secundario. Al mismo tiempo se establecieron algunos cultivos celulares de plantas medicinales para producir metabolitos secundarios de forma continua y en cantidades que, en algunas ocasiones, superaban a las de la planta de procedencia (Zenk 1991). Transcurridos unos años, se desvaneció la euforia que supuso en un principio el uso de los cultivos celulares vegetales como factorías de productos naturales de alto valor añadido, sin embargo, los cultivos celulares se habían convertido en una poderosa herramienta para el estudio de la bioquímica vegetal. Un gran número de rutas biosintéticas se caracterizaron a nivel enzimático gracias al uso de suspensiones celulares en estos años.

A pesar del éxito de la aplicación de los cultivos celulares para el estudio de las rutas biosintéticas, algunos tipos de metabolitos secundarios no son producidos (o lo son pero con menor eficiencia) en cultivos de células desdiferenciadas, como ocurre con los terpenoides, que en la mayoría de los casos, necesitan la planta completa (o partes diferenciadas) para ser sintetizados de forma eficiente.

Los progresos realizados en la caracterización molecular de las vías del metabolismo secundario a nivel genético, abrieron nuevas perspectivas. Otra ventaja que proporcionaron las herramientas moleculares fue la localización específica de las rutas del metabolismo secundario, las cuales no solo están bien organizadas bioquímicamente sino que también están expresadas en determinados tipos celulares.

## **1.2.2 Biotecnología y metabolitos secundarios de plantas**

### **1.2.2.1 Funciones de los metabolitos secundarios**

La funcionalidad de los metabolitos secundarios comenzó a estudiarse por los químicos orgánicos del siglo XX, interesándose por estas sustancias a las que denominaron “productos naturales”, debido a su utilización como drogas, venenos o saborizantes (Taiz y Zeiger 2002).

En cuanto a las funciones que desempeñan los metabolitos secundarios en las plantas, inicialmente se consideraron productos de desecho o de detoxificación (Peach 1950; Reznik 1960). Este punto de vista cambió en los años setenta con el aumento del conocimiento del metabolismo secundario. A partir de este momento dejaron de considerarse como productos finales inertes del metabolismo, considerándose componentes dinámicos del metabolismo de las plantas (Robinson 1974; Barz & Köster 1980). Así se les ha reconocido i) un papel ecológico debido a las características que poseen, tales como su sabor amargo o su toxicidad, protegiendo a las plantas de su ingestión por herbívoros y de la infección por patógenos microbianos. Sin embargo, Fraenkel (1959) y más tarde Ehrlich & Raven (1964) destacaron la importancia de las ii) respuestas recíprocas que se producen entre organismos estrechamente relacionados, sirviendo así como atrayentes de polinizadores y dispersadores de semillas y como agentes en la competencia planta-planta, siendo ésta, la base de la variación genética en la coevolución de determinadas especies.

Por otra parte, una característica inherente de los metabolitos secundarios es su alta diversidad y plasticidad genética, que garantiza una adaptación de las plantas a las demandas de su entorno, que a su vez, está continuamente sometido a cambios. En general, los metabolitos secundarios ejercen un iii) papel primordial en la ecología de las plantas, principalmente como fitoalexinas. Estos compuestos están implicados en la defensa contra los patógenos y fitófagos, así como en la tolerancia a condiciones abióticas (clima adverso, alta radiación ultravioleta (UV), foto-oxidación, estrés hídrico) y contaminantes antropogénicos (Jeandet et al. 2002; Iriti et al. 2004).

El metabolismo secundario comprende todas las interacciones de las plantas con su entorno (biótico y abiótico) ya que es indispensable para la supervivencia del individuo en su medio ambiente. El rápido avance del conocimiento de los mecanismos de diversificación evolutiva de los genes implicados en el metabolismo secundario es quizás el descubrimiento más importante que apoya la función ecológica del metabolismo secundario. La duplicación de los genes y la adquisición de una nueva función del duplicado, que no subyace a las estrictas funciones del gen de procedencia, parece ser la clave que explica la evolución de esta diversidad metabólica. Si un gen que dirige una función esencial se duplica, la copia del gen se libera de la función principal; por tanto puede ocurrir que sea eliminado por inactivación, o bien que sea modificado y que adquiera una nueva función. De este modo los genes duplicados pueden evolucionar de formas distintas:

- 1) bien mediante continuas modificaciones de su función a lo largo de la especialización de la planta, dando lugar a una gran familia de genes que presenta una amplia diversidad funcional.
- 2) o bien, el duplicado puede adquirir una nueva función en un nuevo ambiente bioquímico como consecuencia de una única copia del gen original.

Gracias a esta evolución genética, los metabolitos secundarios han alcanzado funciones tan diversas como la de actuar como señal molecular dentro de la planta, o entre la planta que los produce con otras plantas, microorganismos, herbívoros, insectos polinizadores o animales que dispersan semillas. Asimismo, los metabolitos secundarios sirven como arsenal químico para defenderse de predadores o entrar en competición con otras plantas (sustancias alelopáticas) siendo algunos de estos compuestos constitutivos y otros inducidos en respuesta a una agresión (fitoalexinas) (Sánchez-Sampedro 2006).

El aumento del conocimiento de la información genética y el gran desarrollo de las herramientas genéticas de las que se disponen en la actualidad, permitirán el avance de la caracterización molecular completa de las rutas del metabolismo secundario que servirán como base para su aplicación biotecnológica en medicina y agricultura (Hartmann 2007).

### **1.2.3 Biotecnología y cultivos celulares**

Podría decirse que la biotecnología se inició hace unos 10000 años cuando el hombre de la Edad de Piedra empieza a utilizar los seres vivos y sus productos. Otros autores apuntan que la biotecnología comenzó hace algo menos de 6000 años, que es el

tiempo estimado desde que el hombre empezara a desarrollar la agricultura. Desde el momento en el que el hombre comienza a seleccionar e introducir mejoras en los seres vivos que utiliza, para obtener productos de su agrado y en su propio beneficio, se considera que está haciendo biotecnología. Este término se acuñó hace algo más de un siglo, concretamente, a partir de la repercusión que tuvo para la ciencia la aplicación de los estudios sobre la “evolución de las especies” de Charles Darwin (1809-1882) y de los estudios sobre herencia genética realizada por Gregor Mendel (1822-1884) a finales del siglo XIX.

La biotecnología puede ser definida desde diferentes puntos de vista. Así por ejemplo, El Mansouri y Quesada (1996), la definen como “una tecnología que tiene como finalidad, introducir en el mercado un producto al que se le supone un valor añadido que lo identifica como mejor, más limpio, más barato o simplemente preferible para el consumidor, y que ha sido obtenido mediante el uso de organismos vivos o partes de los mismos”. Avalos (1990) definió la biotecnología como “un conjunto de técnicas que permiten la utilización de seres vivos o parte de éstos para producir o modificar productos, mejorar plantas o animales o desarrollar microorganismos con propósitos industriales y comerciales”. En ese mismo año, el directorio holandés para la cooperación internacional emplearía la siguiente definición: “Biotecnología es el uso integrado de la genética molecular, la bioquímica, la microbiología y la tecnología de procesos para suplir bienes y servicios, empleando microorganismos, o células y tejidos de organismos superiores”.

Suárez de Castro (1993), la divide en tres etapas:

- La primera etapa se caracteriza por el proceso de fermentación, básico en la fabricación de vino, pan y cerveza, conocido desde 2000 años antes de Cristo, y por la selección empírica de plantas y animales. Esta etapa se extendió hasta mediados del siglo XIX.
- La segunda etapa se inicia con las observaciones de Darwin sobre el origen de las especies y con los estudios de herencia genética por parte Mendel, a lo largo del siglo XIX. Esta etapa se ha caracterizado por la manipulación sistemática de las bases de la herencia y el aprovechamiento de los beneficios de la hibridación y el cruzamiento de seres vivos. En el ámbito de la biotecnología vegetal, la llamada “Revolución Verde”<sup>(1)</sup> constituyó el más notable logro de esta etapa, durante la cual, gracias a la utilización de nuevas

---

<sup>(1)</sup> Revolución Verde: término que el administrador de la Agencia Estadounidense para el Desarrollo Internacional (USAID), acuñara en 1968 para referirse a la mejora en la producción de trigo llevada a cabo en la India y Pakistán.

variedades híbridas y las prácticas intensivas con abonos y pesticidas llevaron a grandes aumentos de producción en muchos países que antes tenían graves problemas de suministros de alimentos.

- La tercera etapa se inicia con el descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick (1953) y las posteriores aplicaciones de la tecnología del ADN recombinante, que han posibilitado la manipulación del genoma de cualquier ser vivo.

### 1.2.3.1 Evolución de la Biotecnología Vegetal

El cultivo de tejidos (principios de siglo XX) y la biología molecular (años 70) han sido los pilares sobre los que históricamente se ha impulsado el desarrollo de esta disciplina. El cultivo de células y tejidos vegetales se han fundamentado por un lado, en la teoría celular de Schleiden (1838) y Schwann (1839), que dio lugar al concepto de totipotencialidad (Morgan, 1902), según el cual *“los tejidos vegetales son una masa organizada de células, en la que cada una tiene capacidad de vida independiente y, en principio, de regenerar un tejido”*; y por otro lado, en la teoría formulada por Darwin sobre la regulación hormonal del crecimiento vegetal (Darwin, 1880). Pese a los intentos de Haberlandt en 1902 por obtener cultivos de células y tejidos vegetales aislados, los estudios rigurosos y detallados no comenzaron hasta los años 30. Estos estudios estuvieron fuertemente influenciados por el descubrimiento de la primera sustancia natural reguladora del crecimiento vegetal, la auxina ácido indolacético (descrita por Went en 1926 e identificada químicamente por Kögl en 1934).

Años más tarde, en 1939, White en Estados Unidos y, Roger Gautheret y Pierre Nobercourt en Francia, publicaron simultáneamente sus famosos experimentos sobre cultivo *in vitro* de células vegetales, que significaron la base para los posteriores estudios de organogénesis *in vitro*. White también observó que algunas raíces subcultivadas, frecuentemente se encontraban libres de virus. Esta observación llevó posteriormente al establecimiento de cultivos de meristemas libres de virus (Morel y Martin 1952) y sirvió para establecer las bases de las actuales técnicas de micropropagación. Posteriormente, el descubrimiento de las citoquininas, concretamente la quinina (Miller y Skoog 1955) y el hallazgo de que éstas, en combinación con las auxinas, regulan la morfogénesis de brotes (Skoog y Miller 1957), fueron dos descubrimientos decisivos en el desarrollo de técnicas para la regeneración: organogénesis y embriogénesis somática. Pero no sería hasta 1958 cuando se presentara la evidencia inequívoca de la totipotencia de las células



vegetales completamente aisladas gracias a los estudios de embriogénesis somática con agregados de callos y suspensiones celulares de *Daucus carota*, llevados a cabo independientemente por Reinert y Steward en Alemania (1958), confirmando de esta manera la teoría de Schleiden y Schwann.

Por otro lado, el aislamiento (Cocking 1960) y fusión de protoplastos vegetales (Power 1970; Carlson 1972; Melchers 1974), así como la regeneración de plantas a partir de la obtención de híbridos somáticos (Melchers 1978), generó mucho optimismo en el desarrollo de proyectos para la mejora vegetal, siendo la técnica del aislamiento de los protoplastos la que ha mostrado una gran utilidad para:

- La introducción directa de ADN, lo que ha facilitado los estudios sobre transformación genética y creación de variantes genéticas.
- Estudios fitopatológicos (interacción con virus, bacterias, nemátodos y otros patógenos).
- Estudios fisiológicos relacionados con el metabolismo primario y secundario, los ciclos celulares, la morfogénesis y el desarrollo celular y tisular.

Paralelamente a los progresos realizados en regeneración se han realizado avances muy significativos en los sistemas de mejora genética de cultivares, en los sistemas de transferencia de genes a células vegetales y en la producción de plantas transgénicas. El descubrimiento de la arquitectura tridimensional del ADN por Watson y Crick (1953), el aislamiento de las enzimas de restricción (Smith 1970) y el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante han sido determinantes para alcanzar el éxito en la mejora genética de plantas. Esta metodología, junto con la obtención de híbridos somáticos a partir de la fusión de protoplastos y la electroporación de los mismos (Dekeyser 1990) han constituido las técnicas más utilizadas hasta ahora para transformación o manipulación genética, produciendo plantas transgénicas en especies de cultivo importantes, en las que se han integrado de manera estable genes de importancia agronómica. Asimismo, el sistema de microinyección (Crossway 1985), y el sistema de aceleración de partículas o biolística (Sanford 1987) han mostrado ser en ciertos casos, otras herramientas valiosas para la transformación genética directa de plantas.

### **1.2.3.2 El cultivo *in vitro* de células vegetales**

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales se define como "*el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células o protoplastos de plantas superiores*" (Pierik 1987).

Entre las características del cultivo *in vitro* destacan:

- Ocurre a micro-escala.
- Crecen en condiciones ambientales optimizadas y estériles, salvando los problemas ocasionados por las condiciones geográficas, climáticas y de tiempo.
- No responden al patrón normal de desarrollo de una planta cultivada *in vivo*.

Las perspectivas y uso de los métodos de propagación *in vitro* de células y tejidos vegetales se han centrado hasta ahora en la micropropagación acelerada de material vegetal seleccionado o transformado, la propagación de variedades libres de virus, el mantenimiento de bancos de germoplasma, la obtención de plantas resistentes o tolerantes a estrés abiótico, la obtención de plantas resistentes a herbicidas, insecticidas, fungicidas y nematicidas, la obtención de plantas resistentes a enfermedades y plagas, la obtención de plantas que produzcan frutos con mayor valor nutricional, la obtención de plantas capaces de fijar nitrógeno, la producción de metabolitos secundarios, la biotransformación de compuestos orgánicos y la producción de híbridos somáticos y cíbridos.

#### 1.2.3.2.1 Selección del explanto y línea celular

Una de las condiciones más importantes a la hora de iniciar un cultivo *in vitro*, es la elección del explanto del cual derivará el cultivo. Lo más apropiado es seleccionar aquél que combine una buena tasa de síntesis y acumulación de los productos de interés siendo imprescindible que retenga la capacidad para expresar la ruta de síntesis del compuesto de interés, en cultivo.

Una vez obtenido el cultivo de células en suspensión en un medio líquido adecuado, hay que tener en cuenta que en una misma población celular pueden aparecer diferencias tales como en el tamaño, cariotipo y comportamiento metabólico. La rotura de la organización que asegura la comunicación entre los distintos tejidos de la planta y con ello su desarrollo coordinado, da lugar, a la gran inestabilidad observada en este tipo de cultivos. Sin embargo, la variabilidad generada puede ser explotada como una fuente de diversidad genética (Dix 1986 y 1990). Además, la heterogeneidad en la actividad bioquímica existente dentro de una población celular ha sido explotada para obtener líneas celulares altamente productivas (Ogino et al. 1978). Existen métodos mediante los cuales se pueden obtener cultivos homogéneos que produzcan altos niveles de metabolitos secundarios realizando en primer lugar el aislamiento de células como los establecidos por Dodds y Roberts (1982) y Dixon (1985) seguido de la

clonación somática (Berlin y Sasse 1985). A partir de estos clones se pueden seleccionar los clones de alta productividad para un particular metabolito secundario. Pese a la validación de estas investigaciones otros autores (Tabata e Hiraoka 1976; Zenk et al. 1977; Ellis 1985; Dougall 1987; Wilson 1990) han observado problemas relacionados con la estabilidad de los clones de alta productividad (Deus-Neumann y Zenk 1984). Investigaciones realizadas por los mismos autores demostraron que este efecto puede ser revertido por re-selección clonal. Por otro lado, hay evidencias de la existencia de líneas celulares con una producción estable después de varios años (Yamada y Hashimoto 1990).

En conclusión además de la selección de líneas altamente productivas es necesario asegurar la estabilidad de la producción a lo largo de sucesivos subcultivos.

#### 1.2.3.2.2 Condiciones de cultivo

El control de las condiciones de cultivo se lleva a cabo mediante la manipulación de los siguientes factores:

##### *Factores físicos:*

- $T^a$ : Cada tipo de células presenta un rango de  $T^a$  óptima de crecimiento, que generalmente oscila entre 20 y 25 °C. Existen pocos estudios sobre los efectos de la  $T^a$  en la acumulación de metabolitos secundarios, pero algunos de los ensayos realizados, muestran efectos dramáticos en el crecimiento y acumulación del producto dependiendo de la  $T^a$  (Fowler 1988).
- Luz: Se han realizado estudios para determinar el efecto de la luz sobre la producción de metabolitos secundarios y se ha comprobado que puede actuar tanto inhibiendo la producción (Otha y Yatazawa 1978; Hobbs y Yeoman 1991), como aumentándola (Stickland y Sunderland 1972; Berlin et al. 1986).
- Humedad relativa: las condiciones de humedad dependen mucho de la planta seleccionada, pero en general, las plantas cultivadas *in vitro* se crecen en porcentajes elevados de humedad.
- Aireación y agitación: a nivel de laboratorio se realiza mediante el uso de agitadores orbitales cuya velocidad de giro se determina empíricamente y puede oscilar entre 30 y 150 rpm. A escala industrial, estos procesos son vitales para la oxigenación del cultivo y por lo tanto, para la producción de metabolitos (Fowler 1988; Westphal 1990; Payne et al. 1991; Schlatmann et al. 1993).

*Factores químicos:*

- pH: el crecimiento óptimo de las células vegetales en cultivo se produce entre 5.5 y 6.0, y normalmente disminuye durante la asimilación de las sales de amonio y aumenta con la asimilación de los nitratos (McDonald y Jackman 1989). Este factor puede influir en la toma de nutrientes y precursores, permeabilidad de membranas y salida de precursores desde la vacuola al medio de cultivo (Brodelius 1990; Matile 1990).
- Composición del medio de cultivo: el medio de cultivo consta básicamente de un aporte inorgánico (macro- y microelementos), un aporte orgánico (azúcares, vitaminas, aminoácidos, etc.) y reguladores del crecimiento. Muchos de los constituyentes son determinantes del crecimiento celular y de la acumulación de metabolitos secundarios (Stafford et al. 1986; Misawa 1985). Generalmente, los metabolitos secundarios se acumulan cuando la división celular ya ha concluido y las células dejan de sintetizar las biomoléculas necesarias para la formación de nuevas células por lo que éstas derivan su actividad metabólica hacia el metabolismo secundario. De este modo, mediante el desarrollo de estrategias nutricionales se podría inhibir la división y expansión celular y aumentar la diferenciación celular y la capacidad para sintetizar y acumular metabolitos secundarios (Yeoman 1987).

Es sabido que la reducción o insuficiencia de nitrógeno y/o fosfato está asociada con una limitación del crecimiento y un incremento considerable del nivel de metabolitos secundarios (Knobloch y Berlin 1981; Yamakawa et al. 1983).

En algunos estudios basados en la variación del contenido en sacarosa del medio de cultivo revelan que con el aumento en los niveles iniciales de sacarosa se consigue un incremento en la producción de metabolitos secundarios (Mantell y Smith 1983; Davies 1972; Yamakawa et al. 1983; Cormier et al. 1990; Do y Cormier 1991).

La interacción del nitrógeno con concentraciones variables de sacarosa muestra que tanto las altas como las bajas concentraciones de sacarosa dan lugar a la acumulación de antocianinas en suspensiones celulares de *V. vinifera* (Yamakawa et al. 1983) sugiriendo que existe una proporción óptima C:N para la producción del pigmento.

Por otra parte, es bien conocido que el balance entre los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo influye en el metabolismo secundario ya que éstas están implicadas en la diferenciación celular.

### 1.2.3.3 Cultivos celulares vegetales y producción de metabolitos secundarios

Las técnicas de cultivo de células vegetales se introdujeron a finales de los años 60 como una posible herramienta para el estudio y la producción de metabolitos secundarios. Posteriormente se comprobó que la aplicación de la biotecnología no daba los resultados esperados ya que en un elevado porcentaje de casos, la producción de metabolitos secundarios era inferior a la de la planta nativa y este descenso se atribuyó a la ausencia de diferenciación (necesaria para la correcta expresión de las rutas metabólicas).

Desde mediados de los 90 y gracias a los avances realizados en los métodos de cultivo de células vegetales se han abierto nuevos caminos al procesamiento comercial de estos cultivos como fuentes renovables de productos bioactivos de gran valor (DiCosmo y Misawa 1995).

Algunas de las ventajas que presentan estos cultivos son:

- Independencia de factores geográficos, estacionales y ambientales.
- Posibilidad de sistemas de producción estables, que aseguren la obtención continua de producto, con calidad y productividad uniformes.
- Escasos requerimientos de espacio para el desarrollo de la producción.
- Sistemas renovables que proporcionan poblaciones uniformes.
- Proceso de purificación del producto de interés más fácil siendo óptimo cuando el producto se libera al medio.
- Producción del compuesto de interés a gran escala.
- Permite el estudio de rutas biosintéticas, aislamiento de enzimas, regulación del metabolismo y acumulación de estos compuestos.
- Utilización a nivel genético para clonar genes de enzimas reguladoras una vez purificadas.
- Posibilidad de obtención de productos nuevos que no son sintetizados por las plantas de forma natural.
- Fuente de enzimas para catalizar reacciones de biotransformación con especificidad estero- y regiospecífica.

Hay que tener en cuenta, que el cultivo de células vegetales no es un cultivo de organismos propiamente dicho, como ocurre en el caso del cultivo de microorganismos, por tanto las condiciones necesarias para obtener gran cantidad de biomasa y diferenciación necesaria para la producción de los metabolitos secundarios de interés, son diferentes. La correlación entre la acumulación del metabolito y el aumento de biomasa puede seguir distintos modelos según la línea celular; por

ejemplo en el caso de los cultivos de *Catharanthus roseus*, productores de alcaloides (Morris 1986), sigue un modelo positivo, de manera que el metabolito se acumula a lo largo del ciclo de cultivo. Por otro lado, el modelo de correlación negativa es el más extendido y se basa en la acumulación del producto durante la fase estacionaria, es decir, cuando el cese de la actividad proliferativa celular conduce a una diferenciación bioquímica del cultivo (Mantell y Smith 1983). Existen otros casos en los que se puede observar acumulación del metabolito secundario en la fase de latencia, pero esto podría ser debido a una continua producción desde la fase estacionaria previa (Noguchi y Sankawa 1982; Boyd 1991).

En muchos casos aunque las condiciones de cultivo estén optimizadas para el crecimiento de células aisladas puede ocurrir que no se produzcan los metabolitos secundarios asociados con las estructuras diferenciadas de la planta.

Los cultivos de células se inician primeramente con la formación de un callo. Un callo es una masa indiferenciada de células en crecimiento activo que, de forma natural, se origina a partir de tumores, heridas o por interacción del tejido con patógenos invasores. Los callos originados en cultivo *in vitro* se forman al depositar un fragmento seleccionado de tejido vegetal (explanto) en un medio de cultivo adecuado, de manera que sus células proliferan y comienzan a perder la estructura y organización tisular que mantenían en el tejido original (Thorpe 1980; Wagley et al. 1987), mediante el proceso conocido como desdiferenciación.

Las suspensiones celulares se obtienen mediante la transferencia de una porción de callo friable a un medio de cultivo líquido (Rashid 1988). Estas suspensiones celulares deben estar en agitación, para garantizar un aporte equitativo de los nutrientes y del oxígeno a todas las células en suspensión.

Tanto el cultivo de callos como de células en suspensión se emplean para regeneración de plantas por organogénesis y embriogénesis somática. También se utilizan para la obtención de protoplastos, así como para la obtención de metabolitos secundarios.

#### **1.2.4 Estrategias para aumentar la producción de metabolitos secundarios mediante cultivo *in vitro* de células, órganos y tejidos vegetales**

La utilización de cultivos celulares para la producción de metabolitos secundarios presenta una serie de ventajas sobre los cultivos agrónomos como son: la independencia estacional para la producción de dicho compuesto, la ausencia de restricciones de género y especie, la independencia de órganos muy específicos y de

determinados estados de estrés o de la disponibilidad de nutrientes (Verpoorte et al. 2002). También presenta ventajas respecto a otros sistemas de producción de metabolitos ya que las condiciones de producción son más suaves que con otros métodos; existe una mayor especificidad de transformación biológica que en la síntesis química (ej. síntesis de isómeros); permite la síntesis de compuestos que no se pueden obtener por otros métodos; y se puede realizar una selección de líneas sobreproductoras. Sin embargo, la falta de conocimiento que se tiene de las rutas de biosíntesis y su regulación (Verpoorte y Memelink 2002, Sevón 2002) y las dificultades de adaptación de los cultivos celulares a las condiciones y sistemas de cultivo hacen que aun sean muy pocos los metabolitos de alto valor añadido que se han obtenido mediante procesos biotecnológicos. En este apartado se presentan algunas de las estrategias biotecnológicas que se han usado para intentar aumentar la producción de metabolitos secundarios vegetales.

#### **1.2.4.1 Adición de precursores de los metabolitos secundarios**

La biosíntesis de los compuestos producidos en el metabolismo secundario vegetal depende de la constitución genética de la planta. La expresión de genes específicos implicados en la síntesis de las enzimas correspondientes a este metabolismo está restringida a estados específicos del desarrollo del organismo, a células especializadas o a periodos de estrés de distinta naturaleza.

Los precursores del metabolismo secundario proceden de rutas metabólicas básicas del metabolismo primario, como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la ruta del ácido siquímico. Asimismo los metabolitos secundarios se pueden dividir en tres grandes grupos atendiendo a su estructura: terpenos, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos. Los terpenos se sintetizan a partir del isopentenil pirofosfato, producido en la ruta del ácido mevalónico. Los compuestos nitrogenados o alcaloides se sintetizan a partir de aminoácidos aromáticos producidos en la ruta del ácido siquímico y, aminoácidos alifáticos producidos en la ruta de los ácidos tricarbóxicos. Los compuestos fenólicos se sintetizan a partir de los aminoácidos aromáticos producidos en la ruta del ácido siquímico.

Pese a la gran variedad de metabolitos secundarios existentes, el número de rutas biosintéticas es restringido, lo cual no las exime de una alta complejidad que se ve reflejada en varias etapas donde suelen intervenir factores transcripcionales y enzimas reguladoras, siendo esencial la presencia y concentración de moléculas precursoras e inhibidoras.

Se han realizado estudios en los que se demuestra que la adición de valina e isoleucina a cultivos de brotes de *Hypericum perforatum* daba lugar a la síntesis de hiperforina y adhiperforina. Asimismo, la adición de treonina, un precursor de isoleucina, estimulaba la acumulación de adhiperforina (Karppinen et al. 2007). Del mismo modo, la producción de triterpenos en callos y suspensiones celulares de *Centella asiatica* aumentaba al añadir leucina (Kiong et al. 2005). También se ha estudiado la adición del alcohol coniferílico, precursor de flavolignanós, a suspensiones celulares de *Silybum marianum* (Tumova et al. 2006) y usado en forma de complejos con  $\beta$ -ciclodextrinas como precursor de podofilotoxina en suspensiones celulares de *Podophyllum hexandrum*. En este sentido también se ha realizado la adición de fenilalanina para intentar incrementar la producción de *t*-R en cultivos celulares de vid. Kiselev et al. (2007) mostraron que la adición de 0.1 mM de fenilalanina a callos de *V. amurensis* daba lugar a un ligero incremento de la producción de *t*-R mientras que la adición de concentraciones mayores no aumentaban la producción de este metabolito. Saigne-Soulard et al. (2006) analizaron la influencia de 1 mM fenilalanina en la biosíntesis de estilbenos en cultivos celulares de *V. vinifera* cv Gamay Fréaux y observaron que se producía aumento de la producción de estilbenos. Asimismo, Aumont et al. (2004) estudiaron el efecto de 3 mM de este precursor en el mismo tipo de cultivo utilizando una alta densidad celular (300 g PF/L) en un biorreactor de 2 L y observaron un incremento en la producción de estilbenos a los 14 días de cultivo. Sin embargo, Yue et al. (2011) mostraron que el aumento de la producción de *t*-R al añadir 1-3 mM de fenilalanina no era significativo. Por otra parte, Cheng et al. (2006) estudiaron el efecto de la adición de alanina a cultivos celulares de *V. labrusca* tanto en la producción de *t*-R como en la expresión de genes. Estos autores observaron que el uso de 50 mg/L de alanina daba lugar a un incremento significativo de la producción de *t*-R tanto en el medio de cultivo como en las células.

#### **1.2.4.2 Producción de metabolitos secundarios en cultivos de tejidos y órganos vegetales**

En muchos casos, los metabolitos secundarios pueden producirse en callos o suspensiones celulares, en otros, para conseguir la producción de un determinado metabolito se requiere una estructura diferenciada de órganos o microplantas (Dörnenberg y Knorr 1997). Esto suele ocurrir cuando un metabolito es producido en tejidos vegetales especializados o glándulas como ocurre en la producción de



saponina en raíces de *Panax ginseng*. Esto también sucede en especies herbáceas como *H. perforatum*, la cual acumula hipericina e hiperforinas (antidepresivos) en glándulas foliares. Asimismo, en raíces de *Nicotiana tabacum* tiene lugar la transformación de lisina en anabasina mientras que la conversión de ésta en nicotina se produce en las hojas, de manera que los cultivos de callos y suspensiones de *N. tabacum* producen cantidades traza de nicotina debido a la falta de diferenciación en órganos. En la especie *C. roseus* se necesita cierto grado de diferenciación para poder sintetizar vincristina o vinblastina. La producción de ciertos metabolitos secundarios en estructuras especializadas constituye un mecanismo para mantener secuestrados estos compuestos potencialmente tóxicos (Karuppusamy 2009). De esta manera, el uso de cultivo *in vitro* de bulbos de *Fritillaria unibracteata* para la producción de alcaloides ha supuesto un nuevo proceso para producir estos compuestos vegetales naturales (Gao et al. 2004). Asimismo, el cultivo de brotes de *Frangula alnus* y *F. rupestris* suplementados con ácido 1-naftalenacético (ANA) y tidiazurón en el primer caso y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-benciladenina (BA) en el segundo, dio lugar a niveles de producción de antraquinona muy elevados (Kovacevic et al. 2005). De manera similar, el cultivo de brotes en *Gentiana austriaca* suplementados con ANA y BA presentaron la misma composición de metabolitos que las plantas de origen, observándose que la producción estaba fuertemente afectada por la presencia de BA en el medio de cultivo (Vinterhalter et al. 2008).

#### 1.2.4.3 Elicitación

Las plantas, a lo largo de la evolución han desarrollado mecanismos especiales de defensa que les permiten hacer frente a microorganismos, herbívoros o incluso a factores ambientales desfavorables. Estos mecanismos incluyen desde el desarrollo de características físicas particulares (espinas o cortezas) hasta la biosíntesis de determinados metabolitos secundarios de gran efectividad en la defensa del vegetal que los sintetiza (fitoalexinas). Estos metabolitos pueden ser sintetizados “de novo”, ser constitutivos y aumentar sus niveles en respuesta a una agresión externa o encontrarse compartimentalizados en forma de protoxinas que, al hidrolizarse, se transforman en compuestos alelopáticos activos.

Estas respuestas están mediadas en parte por moléculas de diverso origen que se denominan elicitores y que, introducidas en pequeñas concentraciones en un sistema celular vivo, son capaces de perturbar el metabolismo, consiguiendo incrementar la producción de un metabolito en particular. Así, el proceso de elicitación se define como

la inducción o aumento de la biosíntesis de metabolitos debido a la adición de pequeñas cantidades de elicitores.

**Tabla 1.1** Clasificación de los elicitores.

Clasificación de los elicitores			
Bióticos		Abióticos	
Composición definida	Composición compleja	Químicos	Físicos
Ciclodextrinas	Homogenado fúngico	Sales metales pesados	Radiación UV
Jasmonatos	Extracto de levadura	Fosetil aluminio	Estrés térmico
Acido salicílico	Esporas de hongos	Ozono	Estrés osmótico
Etefón (etileno)		Benzotiodiazol	Heridas
Pectina			
Quitina			

El empleo de elicitores es un método muy común para aumentar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de células vegetales.

Muchos de los elicitores utilizados en la estimulación del metabolismo secundario en cultivos de células vegetales son de origen biológico como el extracto de levadura (Sánchez-Sampedro et al. 2005 y 2006); quitosan (Jin et al. 1999); ácido DL- $\beta$ -aminobutírico (Cohen 1994; Pajot et al. 2001) y jasmonatos (Nojiri et al. 1996; Zhang et al. 2001; Bhuiyan et al. 2002; Wu y Lin 2003; Yu et al 2000 y 2002; Kim et al. 2004; Thanh et al. 2005). En otros casos se utilizan como elicitores compuestos de origen no biológico o abióticos entre los que se encuentran la luz UV (Langcake y Pryce 1977; Zapata et al. 1994; Adrian et al. 2000; Lesniewska 2004; Rudolf 2005), benzotiodiazol (Iriti 2004), ozono (Sgarbi 2003), fosetil de aluminio (López-Serrano et al. 1994), ortovanadato (Tassoni et al. 2005) y sales de metales pesados (Zheng y Wu. 2004). En algunas revisiones incluso llegan a considerar como elicitor físico la propia herida que sufre la planta cuando es mordida por un herbívoro (Dixon et al. 1989; Whitehead y Threlfall 1992; Boller 1995; Kessler y Baldwin 2002). Recientemente, Jeong y Park (2007) han usado selenio,  $\text{NiSO}_4$  y  $\text{NaCl}$  como elicitores de cultivos de raíces de *P. ginseng*.

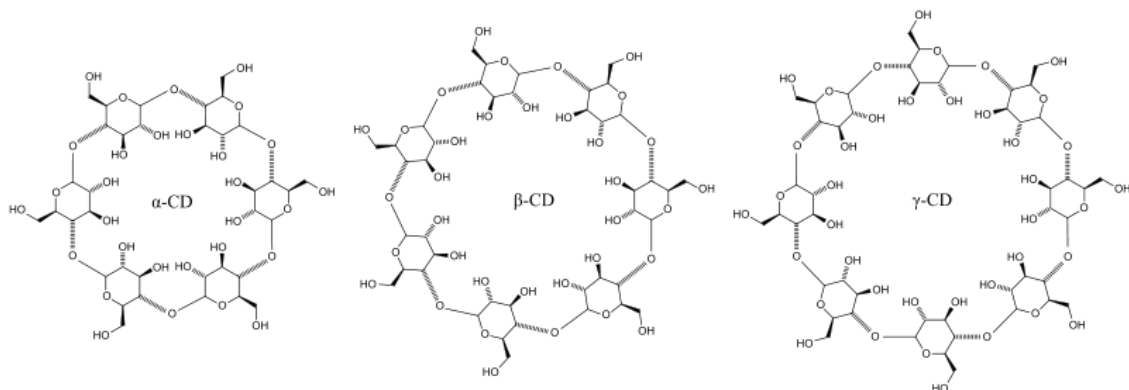
En el caso de vid, se ha observado que tanto en frutos como en discos de hojas se sintetiza *t*-R en condiciones de estrés biótico, provocado por la infección con *B. cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus sp.* Además, los extractos de estos hongos así como los productos de enzimas fúngicas que actúan sobre las paredes celulares vegetales, también son capaces de inducir la síntesis de viniferinas (Liswidowati et al. 1991; Calderón et al. 1993a). El uso de quitosan en cultivos celulares de *V. vinifera* cv. Barbera condujo a un aumento en la producción de *t*-R endógeno, ya que el quitosan es un importante derivado de un

componente estructural de la pared celular de los hongos que mimetiza un ataque fúngico (Ferri et al. 2009; Santamaria et al. 2011). Se ha observado que los cultivos celulares de *V. vinifera* cv Gamay también responden a la presencia de laminarina que es un  $\beta$ -1,3-glucano procedente del alga *Laminaria digitata*, así como a la presencia de oligogalacturónidos como el procedente de la purificación de glicoproteínas de *B. cinerea* (endopoligalacturonasa 1) (Poinssot et al. 2003). También se ha demostrado la eficacia de ciertos oligosacáridos como las ciclodextrinas (CD) a la hora de estimular la producción de *t*-R en distintos cultivares de vid (Morales et al. 1998, Bru et al. 2006). En definitiva la respuesta de un cultivo a un mismo elicitor es dependiente de la variedad del cultivar (Santamaria et al. 2011).

#### 1.2.4.3.1 Elictores bióticos

##### a) Ciclodextrinas

Las CD son oligosacáridos cíclicos formados por 6, 7 u 8 unidades de glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (Saenger 1980), que se denominan  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD, respectivamente. Estos compuestos naturales son producidos a partir de la degradación enzimática del almidón por acción de la enzima ciclodextrín-glicosil-transferasa (Szejtli 1982), y segregados por distintos microorganismos del género *Bacillus* (Nakamura y Horikoshi 1977).



**Figura 1.8** Esquema de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD.

Las CD tienen forma de anillo tronco cónico con los C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> de los residuos de glucosa hacia el interior del anillo y con el C<sub>6</sub> hacia el exterior. A su vez, los -OH del C<sub>6</sub> de las CD se encuentran situados en la cara ancha del tronco cónico mientras que los -OH de los C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> lo hacen en la cara estrecha de dicho cono. Esta disposición química le confiere un interior altamente apolar (grupos -CH) y una superficie exterior hidrofílica

debida a los grupos -OH (Griffit y Bender 1973). Por esta razón, la principal característica de las CD es la formación de complejos de inclusión, nombre que reciben las estructuras formadas por la unión de la CD con una molécula (orgánica, inorgánica o ión) en su cavidad hidrofóbica (López-Nicolás et al. 1995).

Estudios realizados en cultivos celulares de *V. vinifera* ponen de manifiesto que la incubación de estas células con  $\beta$ -CD, a una concentración de 50 mM, es inocua para las células, salvo la presencia de la sulfo- $\beta$ -CD que resulta letal a dicha concentración, como se observó por microscopía y por el pardeamiento de los cultivos (Bru et al. 2006). Estos autores describieron las CD como elicitores de la síntesis de fitoalexinas del siguiente modo: (i) la fracción de las pectinas de las paredes celulares contiene éteres y ésteres, derivados de azúcares tales como metil galacturonato, 3-acetil galacturonato, 2-O-metil xilosa y 2-O-metil-4-acetil fucosa; (ii) el tratamiento de una suspensión celular con enzimas pectolíticas libera oligosacáridos de pectina, los cuales actúan como elicitores de la síntesis de fitoalexinas (Negrel y Javelle 1995). En este sentido, las CD modificadas se parecen a los oligosacáridos pécticos alquil-derivados liberados de forma natural de las paredes celulares durante un ataque fúngico y además participan en la inducción de una cascada de eventos celulares que dan lugar al aumento de la síntesis de fitoalexinas.

Por otra parte, la CD natural ramificada G2- $\beta$ -CD también es capaz de estimular las células pero en menor medida que los derivados éter, mientras que el efecto de la  $\beta$ -CD natural no sustituida es casi insignificante comparada con los derivados ramificados. Así para que estos oligosacáridos actúen como elicitores parece ser importante que algunos grupos hidroxilo sean sustituidos por algún grupo alquilo sin carga que no sea muy voluminoso (Bru et al. 2006).

La actividad peroxidasa y el análisis de los patrones isoenzimáticos de esta enzima en el medio de cultivo de suspensiones celulares de vid elicitadas con CD muestran variaciones respecto de los medios control, por lo tanto la principal ventaja de la utilización de CD es que, además de ser capaces de estimular la síntesis de fitoalexinas (*t*-R, en el caso de vid), son capaces de secuestrar el *t*-R para formar complejos de inclusión de elevada estabilidad (López-Nicolás y García-Carmona 2007), evitando de este modo, el acoplamiento oxidativo de las unidades de *t*-R, realizado por peroxidasas extracelulares.

b) Moléculas señal como inductoras de la síntesis de metabolitos secundarios

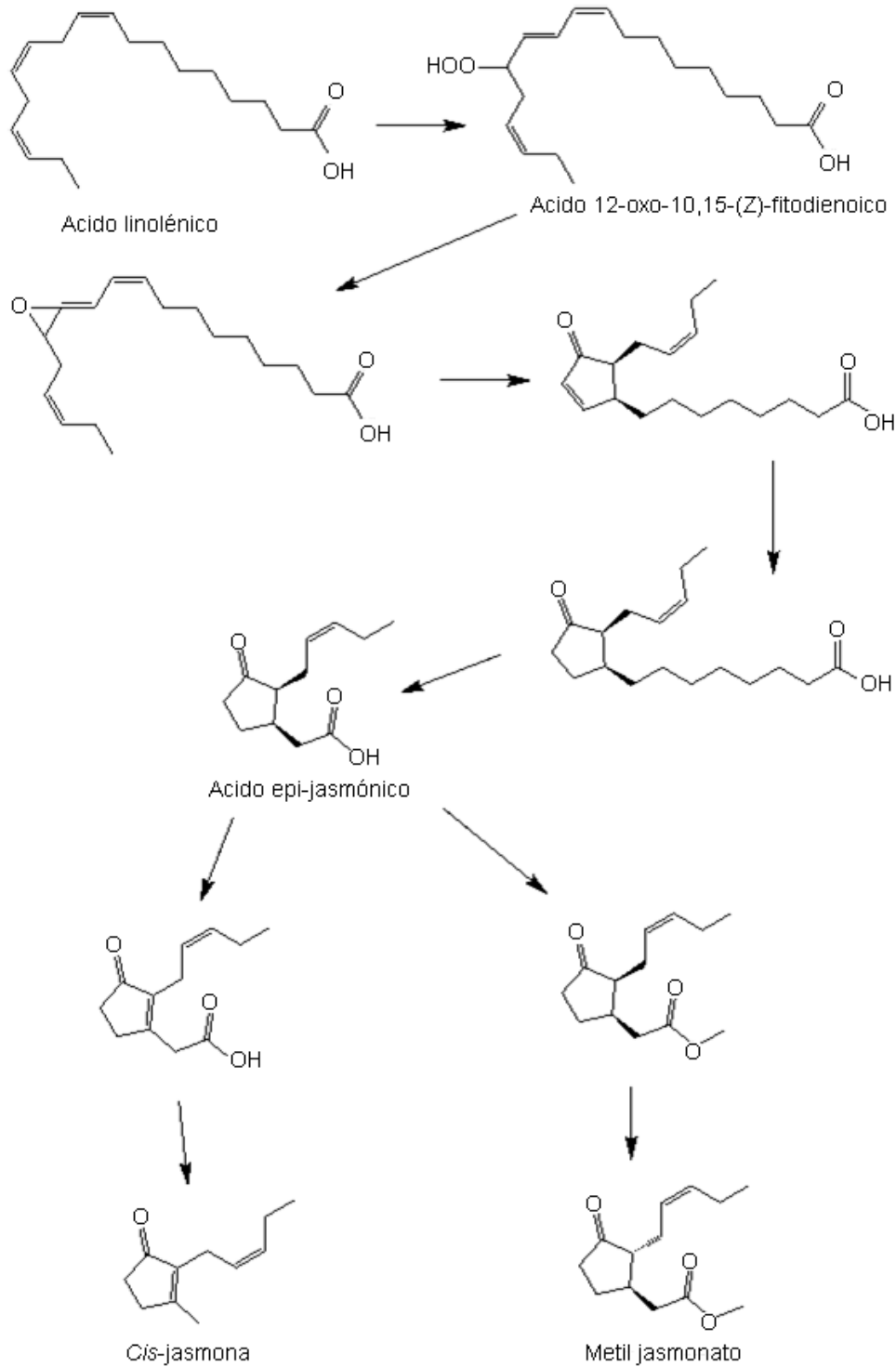
Conocidas las rutas de señalización que conducen a la síntesis de los metabolitos secundarios, la adición exógena de moléculas implicadas en la transducción de la señal que conduce a la biosíntesis de estos compuestos debería incrementar su producción. En este sentido se ha realizado el estudio de tres compuestos principalmente: jasmonatos, ácido salicílico y etileno.

i) Jasmonatos: Ruta de los octadecanoides

Esta ruta es una vía de señalización que implica a un grupo de compuestos conocidos como octadecanoides. En la Figura 1.9 se muestra la ruta de biosíntesis de algunos jasmonatos a partir del ácido linolénico. La activación de esta ruta genera dos compuestos activos biológicamente, el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) y el ácido jasmónico (JA) y sus derivados, principalmente su éster metílico (jasmonato de metilo, MJ), conocidos colectivamente como jasmonatos. Desde el punto de vista químico son derivados de ácidos grasos que presentan un esqueleto de 12 carbonos sintetizado a partir del ácido linolénico. Este ácido por acción de una lipoxigenasa, una aleno-óxido sintasa y una aleno-óxido ciclasa se convierte en el intermediario OPDA que se transformará en ácido jasmónico por una reducción y tres ciclos de  $\beta$ -oxidación (Mueller 1997).

El papel de los jasmonatos en el crecimiento y desarrollo vegetal es muy variado ejerciendo efectos muy diversos en la morfología y fisiología vegetal (Sembdner y Parthier 1993). Entre estos efectos se encuentran la resistencia a patógenos e insectos, maduración de frutos, floración, crecimiento de la raíz y senescencia (Creelman y Mullet 1997). La aplicación exógena de estos compuestos puede estimular de manera directa la acumulación de metabolitos secundarios tales como alcaloides (Aerts et al. 1992; Gundlach et al. 1992; Zabetakis et al. 1999), fenoles (Lee et al. 1997) o cumarinas (Sharan et al. 1998). En otros casos estas moléculas de señalización por sí solas son insuficientes para aumentar la producción de metabolitos secundarios (Singh et al. 1998). La aplicación exógena de los jasmonatos y concretamente MJ induce la transcripción coordinada de los genes que participan en las rutas del metabolismo secundario y se ha visto que la regulación se logra mediante factores de transcripción que interactúan con regiones promotoras del ADN y modulan la tasa de iniciación de la síntesis de RNAm por la polimerasa II. Modificaciones proteicas posteriores o interacciones entre proteínas también serían esenciales en la regulación de estos factores de transcripción y a ese nivel, la fosforilación de proteínas parece ser crucial.

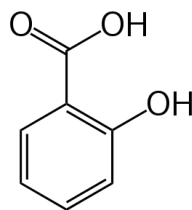
Por otra parte, se ha visto que existen puntos de conexión entre su propia ruta de señalización y la de otras moléculas, por ejemplo, JA actúa sinérgicamente con el etileno y antagónicamente con las auxinas o el ácido salicílico (Sasaki et al. 2001).



**Figura 1.9** Ruta de los octadecanoides

## ii) Acido salicílico

El ácido salicílico (SA) Figura 1.10, es un compuesto de naturaleza fenólica que actúa como regulador endógeno de diversos procesos fisiológicos en plantas. Este compuesto induce la floración en un amplio rango de plantas, controla la entrada de hierro por las raíces y la conductividad estomática. Existen referencias que indican la participación de SA en la regulación de la señal responsable de la inducción de la expresión de los genes de senescencia en *Arabidopsis*. Además, SA actúa como regulador del gravitropismo en algunas plantas e inhibe la maduración de ciertos frutos en otras (Shakirova et al. 2003).



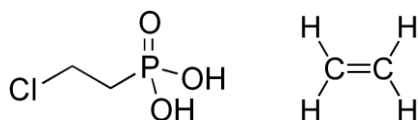
**Figura 1.10** Estructura del ácido salicílico

En los últimos 20 años, el SA ha llamado la atención de los investigadores debido a su habilidad para inducir resistencia sistémica adquirida (SAR) contra diferentes patógenos de plantas, lo cual se pone de manifiesto con la aparición de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRp) ya que SA actúa como señal para la inducción de la expresión de estos genes (Metraux 2001). Asimismo, este compuesto puede inducir un efecto protector en plantas sometidas a estrés. Existen datos que demuestran que puede incrementar la resistencia a la salinidad de las semillas de trigo así como al déficit hídrico, a las baja y/o alta  $T^a$  en maíz, tomate y alubia; también incrementa la resistencia a metales pesados en arroz (Shakirova et al. 2003). De este modo, se ha observado que los efectos protectores de SA no se deben solo a que induce PRp, sino a que también induce la expresión de genes como los que codifican para la elongación celular (*Arabidopsis*), para proteínas de choque térmico (tabaco), lectinas (maíz), así como para la activación de protein kinasas en situaciones de estrés osmótico (tabaco).

## iii) Etileno

El etileno (ET) es el hidrocarburo insaturado más simple de naturaleza gaseosa producido por la mayoría de los tejidos y tipos de células vegetales. Este compuesto actúa como hormona vegetal regulando diversos procesos fisiológicos del crecimiento y del desarrollo que incluyen la germinación de semillas, crecimiento y desarrollo de

hojas, raíces, tallos y flores, maduración de frutos, senescencia y abscisión de órganos. La síntesis de ET está regulada por señales del desarrollo y otras hormonas tales como auxinas, giberelinas, citoquininas y brasinoesteroides. Asimismo, su síntesis se incrementa fuertemente en diversas situaciones de estrés como heridas, salinidad, sequía, baja  $T^a$ , ozono, inundación y ataques de patógenos e insectos (Yoo et al. 2009). En este sentido, ET junto a JA controlan las respuestas inducidas por necrótrofos así como la respuesta sistémica desencadenada por rizobacterias no patógenas que colonizan la raíz (Glazebrook 2005; Pieterse et al. 2009). Estudios realizados en *Arabidopsis* y así como en *Vitis* mostraron que ET combinado con JA regulan la expresión de un conjunto de marcadores de defensa entre los que se encuentran las PRp, tales como  $\beta$ -1,3-glucanasas (PR-2), proteínas tipo taumatina (PR-5) y quitinasas básicas (PR-3) (Thomma et al. 1998; Belhadj et al. 2006 y 2008).

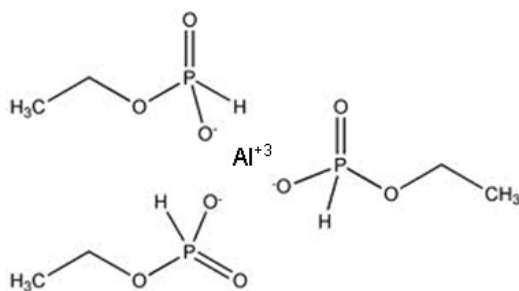


**Figura 1.11** A la izquierda se muestra la estructura del etefón (compuesto liberador de etileno) y a la derecha la molécula de etileno.

#### 1.2.4.3.2 Elicitores abióticos

##### a) Fosetil de Aluminio

El fosetil de aluminio (FAI) o tris[etil fosfonato] de  $Al^{3+}$  es un compuesto que está disponible comercialmente como fungicida contra las enfermedades causadas por oomicetos en vid. Los fungicidas sistémicos poseen la propiedad de facilitar su movimiento por el xilema y en el caso de los fosfonatos, también por el floema (López-Serrano et al. 1997). López-Serrano et al. (1994) observaron que al añadir FAI a cultivos celulares de vid se reducía el nivel de peroxidasas extracelulares. Este efecto debido a los iones de  $Al^{3+}$  se revertía parcialmente al añadir etileno (López-Serrano et al. 1996a), estando implicados factores celulares difundibles mediados por  $Al^{3+}$ , capaces de inactivar dicha peroxidasa (López-Serrano 1996b).



**Figura 1.12** Estructura del fosetil de aluminio



#### b) Radiación ultravioleta

Se denomina radiación UV a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida desde longitudes de onda desde 400 nm hasta menores de 280 nm por lo que se suelen diferenciar tres bandas de radiación UV: UV-A, UV-B y UV-C.

- i) UV-A: Banda comprendida desde los 320 a los 400 nm. Es la más cercana al espectro visible y no es absorbida por el ozono por lo que llega a la superficie terrestre.
- ii) UV-B: Banda comprendida entre los 280 a los 320 nm que es absorbida casi totalmente por el ozono, aunque algunas radiaciones llegan a la superficie de la Tierra. Es una radiación dañina, especialmente para el ADN.
- iii) UV-C: Banda de radiaciones menores de 280 nm. Este tipo de radiación es extremadamente peligrosa, pero es absorbida completamente por el ozono y el oxígeno.

Entre las funciones de los metabolitos secundarios producidos por las plantas se encuentra la protección frente a determinadas situaciones de estrés como la exposición a elevadas radiaciones UV. En el caso de la vid, la luz UV es capaz de inducir la ruta fenilpropanoide ya que estos compuestos sirven para limitar el daño fotoquímico debido al carácter absorbente de los compuestos procedentes de la ruta fenilpropanoide (Mazza et al. 2000).

#### 1.2.4.4 Ingeniería metabólica

A pesar de los esfuerzos que se han realizado hasta ahora en el campo de la producción *in vitro* de fitoquímicos, tan solo se han desarrollado con éxito unos pocos procesos industriales para la producción de estos metabolitos como es el caso de la sikonina, berberina, ginsenósidos y taxol (Ramachandra y Ravishankar 2002). Sin embargo, en muchos casos la producción es insuficiente para su comercialización. Una herramienta complementaria al uso de cultivos *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios es el uso de las técnicas de ingeniería genética aplicadas a estos cultivos dando lugar a lo que se conoce como ingeniería metabólica.

Según la definición dada por Bailey (1991), la ingeniería metabólica es "*la mejora de las actividades celulares mediante la manipulación de las funciones enzimáticas, de transporte y de regulación de la célula con el uso de la tecnología del ADN recombinante*".

Debido a que el metabolismo secundario es periférico al conjunto de procesos esenciales para la supervivencia y bienestar de la planta, los cambios en el metabolismo secundario pueden realizarse sin perjudicar seriamente al metabolismo primario. De este modo, parece razonable contemplar una estrategia que incluya alteraciones en las rutas metabólicas, por manipulación genética, dirigida del material vegetal en cuestión (cultivos celulares o tejidos).

Para aumentar la producción de metabolitos secundarios mediante técnicas de ingeniería genética pueden explotarse cuatro posibilidades: i) aumentar la actividad de las enzimas limitantes de una ruta de biosíntesis determinada; ii) inducir la expresión de los genes que regulan dicha ruta; iii) bloquear las rutas que compitan con la que produce el metabolito; iv) bloquear el catabolismo del metabolito.

En los dos primeros casos se requiere la expresión de los genes que codifican las enzimas activas, por lo que las estrategias desarrolladas se han basado en la introducción de genes aislados de organismos muy eficientes, con promotores que han intensificado la expresión de un gen. En los dos últimos casos, las estrategias utilizadas se basan en el bloqueo de esos genes con genes antisentido y técnicas supresoras de aquellos genes que son responsables de la expresión fenotípica de ciertos caracteres indeseables en las plantas (Bourgand et al. 2001). En cualquier caso, la ruta biosintética destacada debe estar perfectamente caracterizada, incluyendo los mecanismos de regulación, compartimentalización y transporte.

Estas plantas modificadas genéticamente pueden, a su vez, ser utilizadas como “biorreactores naturales” para la producción de compuestos bioactivos de alto valor añadido (Ramachandra y Ravishankar 2002).

Muchos de los compuestos aislados con actividad biológica pertenecen al grupo de los alcaloides. A pesar de que sus efectos han sido ampliamente estudiados, sus rutas metabólicas aun no están totalmente claras. Sin embargo, ya se han clonado algunos genes de las rutas biosintéticas de la escopolamina, nicotina y berberina haciendo posible el uso de la ingeniería metabólica para la obtención de estos alcaloides (Karuppusamy 2009).

### **1.2.5 Producción de metabolitos secundarios a gran escala**

Una de las aplicaciones más extendidas del cultivo *in vitro* de células/tejidos vegetales es la obtención de metabolitos a nivel industrial. Sin embargo, la dificultad principal para la explotación comercial de estos compuestos es su escalado. Estos cultivos pueden sufrir estrés mecánico causado por la agitación, ocasionando daños en las

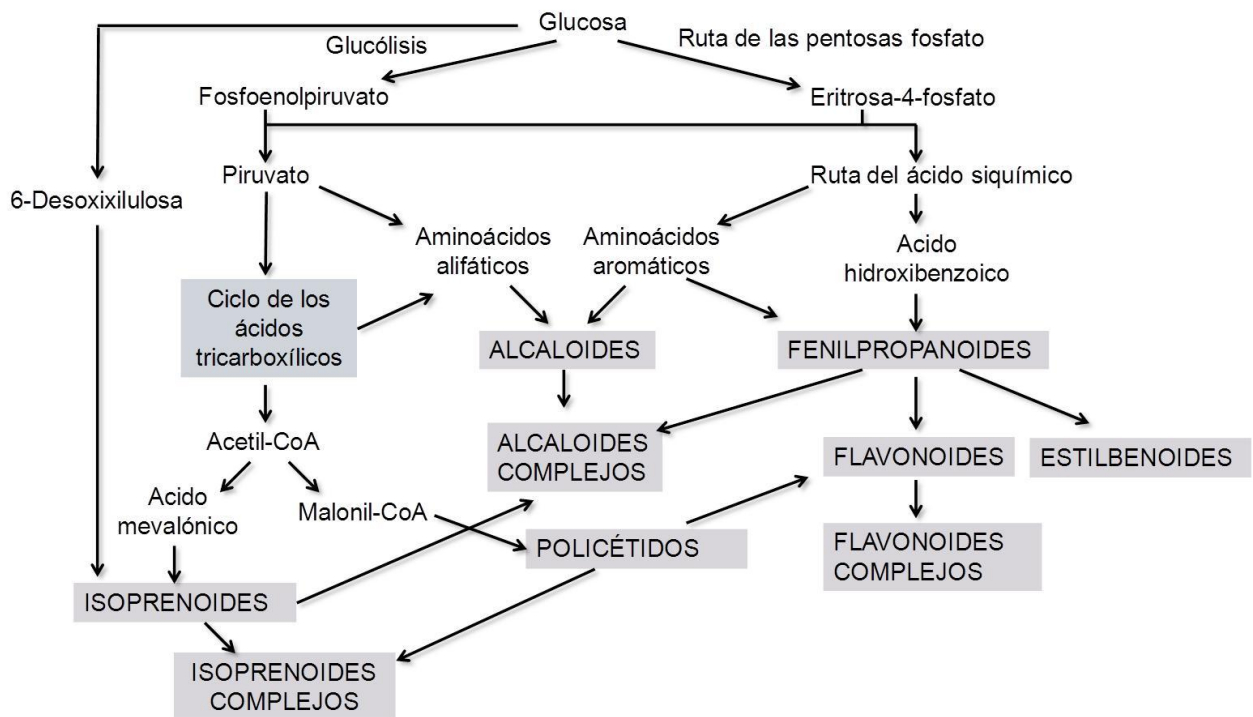
células/tejidos. Así, si el producto tiene un alto valor se pueden usar estrategias de cultivo por lote, en las que se puede recoger todo el cultivo y extraer el producto. Sin embargo, para los compuestos de menor valor, lo deseable es un proceso en continuo que se alargue en el tiempo (Karuppusami 2009).

Los metabolitos secundarios se sintetizan en menor cantidad que los primarios y sus aplicaciones comerciales son más específicas, por lo que son los que mayor valor tienen en el mercado. Algunos metabolitos secundarios producidos por cultivo *in vitro* de plantas se describen en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2** Metabolitos secundarios y aplicaciones descritas.

<b>Producto</b>	<b>Uso</b>	<b>Especie vegetal</b>	<b>Referencia</b>
Ácido rosmarínico	Ind. química	<i>Coleus blumei</i>	Rosevear (1984)
Ajmalicina	Antihipertensivo	<i>C. roseus</i>	Asada y Shuler (1989)
Sikonina	Antibacterial	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Tabata y Fujita (1985)
Berberina	Analgésico intestinal	<i>Coptis japonica</i>	Matsubara et al. (1989)
Piretrina	Insecticida	<i>Chrysanthemum cinerariasfolium</i>	Uchio et al. (1981)
Codeína	Sedante	<i>Papaver somniferum</i>	Furuya et al. (1972)
Escopolamina	Antihipertensivo	<i>Datura stramonium</i>	Evans y Partridge (1953)
Mentol	Aromatizante	<i>Mentha spp.</i>	Leung y Foster (1996)
Digitoxina	Estimulante cardíaco	<i>Digitalis lanata</i> <i>D. purpurea</i>	Alfermann et al. (1980)
Vainilla	Aditivo alimenticio	<i>Vanilla planifolia</i>	Dornenburg y Knorr (1996)
Diosgenina	Precursor esteroidal	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Sahai y Knuth (1985)
Sanguinarina	Antiplaquetario	<i>Sanguinaria canadensis</i> <i>P. somniferum</i>	Duke (1985)
Morfina	Sedante	<i>Spirulina platensis</i>	Ramachandra et al. (1999)
Taxol	Anticancerígeno	<i>Taxus baccata</i>	Cusidó et al. (1999)
Capsicina	Insecticida y saborizante	<i>Capsicum frutescens</i> <i>C. annuum</i>	Lindsey y Yeoman (1984) Johnson et al. (1990)

El cultivo de células vegetales para la producción de metabolitos comienza a escala de laboratorio y su estudio va encaminado en la mayoría de los casos, al establecimiento de las condiciones de cultivo y al ajuste de los parámetros de crecimiento de las células, con el fin de optimizar la producción del metabolito. Cuando además se quiere comercializar el producto a nivel industrial, es necesario realizar un escalado en sistemas que garanticen la producción elevada del metabolito de interés, como por ejemplo, en biorreactores, para alcanzar niveles industriales rentables comercialmente.



**Figura 1.13** Origen biosintético de los principales grupos de metabolitos secundarios

Existen una serie de factores que dificultan el proceso de producción a gran escala (Ravinshankar y Venkataraman 1993), entre los que se encuentran:

- Tecnológicos
- Inestabilidad de las líneas celulares
- Pérdida de productividad
- Lento crecimiento celular
- Escalado

Estos problemas derivan de:

- ◆ El mayor tamaño, complejidad estructural y fisiológica y tiempo de duplicación de las células vegetales en comparación con los microorganismos que hace más difícil su adaptación a los cultivos a gran escala. Además, las células vegetales presentan una alta sensibilidad a los efectos de cizalladura producidos en los biorreactores (Di Cosmo 1995), debido posiblemente, a la rigidez de la pared celular.
- ◆ La densidad celular con la que se debe iniciar un cultivo.
- ◆ Las células vegetales en suspensión que presentan la característica de formar agregados, que impiden obtener crecimientos homogéneos y dificultan los métodos de trabajo.

- ◆ Las mutaciones o variaciones epigenéticas debidas a situaciones de estrés u otros factores, que pueden ocasionar una disminución del rendimiento en la producción de metabolitos.
- ◆ Las células que sintetizan los metabolitos secundarios durante la fase estacionaria del crecimiento, lo que dificulta encontrar un equilibrio entre una alta tasa de crecimiento y una tasa elevada de producción del metabolito.

Sin embargo, algunas dificultades derivadas de la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos celulares vegetales se han resuelto mediante:

- ◆ El diseño de tanques de agitación con burbujeo de aire estéril (Wagner y Vogelmann 1977; Scragg y Fowler 1984; Jolicoeur et al. 1992) que solucionan los problemas de cizalladura y oxigenación.
- ◆ La iniciación del cultivo con una décima parte de biomasa respecto al volumen total de medio fresco (Fowler 1986).
- ◆ El mantenimiento de los cultivos con una agitación vigorosa, la utilización de biorreactores con el sistema de burbujeo, la filtración las suspensiones celulares o la realización de los tratamientos enzimáticos para romper las uniones celulares.
- ◆ La disminución de la variabilidad epigenética se consigue adecuando las condiciones de cultivo a rangos que no originen estrés celular.
- ◆ La utilización de un sistema de cultivo en dos etapas: una primera etapa donde las células crecen en un medio de mantenimiento con alta tasa de crecimiento y una segunda donde se cultivan en un medio óptimo para la producción del metabolito de interés.

### 1.2.6 Rendimiento de la producción de metabolitos

La producción de un metabolito a partir de células vegetales *in vitro* depende principalmente de:

#### i) Las condiciones de cultivo y el sistema productor

Para que la producción resulte óptima no basta con que el material vegetal produzca el compuesto en grandes cantidades, también se requieren unas condiciones de mantenimiento que no presenten demasiadas dificultades. Por otra parte, el sistema productor no debe resultar agresivo con el material vegetal, evitando la rotura y pérdida celular.

#### ii) La localización subcelular de la síntesis y acumulación del metabolito

El caso ideal se produce cuando el metabolito de interés es sintetizado por la célula y secretado al medio de cultivo, de manera que se hace más sencilla la extracción. Los casos más complejos se presentan cuando el metabolito se almacena en orgánulos, por lo que se requieren métodos para la lisis o la permeabilización celular que complican y encarecen la purificación del metabolito.

iii) Los métodos de extracción y purificación del compuesto

Estos dependerán en cada caso del material vegetal y del metabolito que se quiera extraer. Estos métodos y técnicas deben ser reproducibles a gran escala, garantizar un alto porcentaje de éxito (especialmente los de purificación) y resultar sencillos y poco costosos.

iv) Conocimiento de las rutas de biosíntesis de los metabolitos

Mediante estudios realizados en las décadas de los 60 y 70, gracias al marcaje radiactivo de intermedios de las rutas de biosíntesis y técnicas de resonancia magnética nuclear se han podido deducir algunas rutas que conducen a la síntesis de metabolitos (Eisenreich y Bacher 2000).

Por otra parte, la tecnología del ADN recombinante ha abierto una nueva posibilidad para la modificación directa de genes relacionados con las rutas de biosíntesis (Van der Fits 2000; Memelink 2001), permitiendo aislar el enzima responsable de cualquier etapa de una ruta y clonar el gen que la codifica. Esta es sin duda, la mejor alternativa para el establecimiento de cada una de las etapas que constituyen una ruta de biosíntesis.

### **1.3 Señalización inducida por elicitación**

El conocimiento de la regulación de los eventos de señalización que conducen a la activación de la ruta de biosíntesis del *t*-R podría resultar de gran interés para aumentar la producción de este metabolito.

El primer paso en el mecanismo de elicitación es común en los sistemas animales y vegetales e implica la percepción del estímulo por parte de proteínas receptoras de membrana desencadenándose una serie de respuestas que divergen haciéndose específicas de animales o plantas. Estas respuestas se integran en las denominadas “redes de señalización”.

El contacto de la planta con compuestos derivados de patógenos, moléculas derivadas de plantas o compuestos químicos sintéticos pueden inducir la activación de las defensas naturales de las plantas protegiéndolas de un amplio rango de patógenos

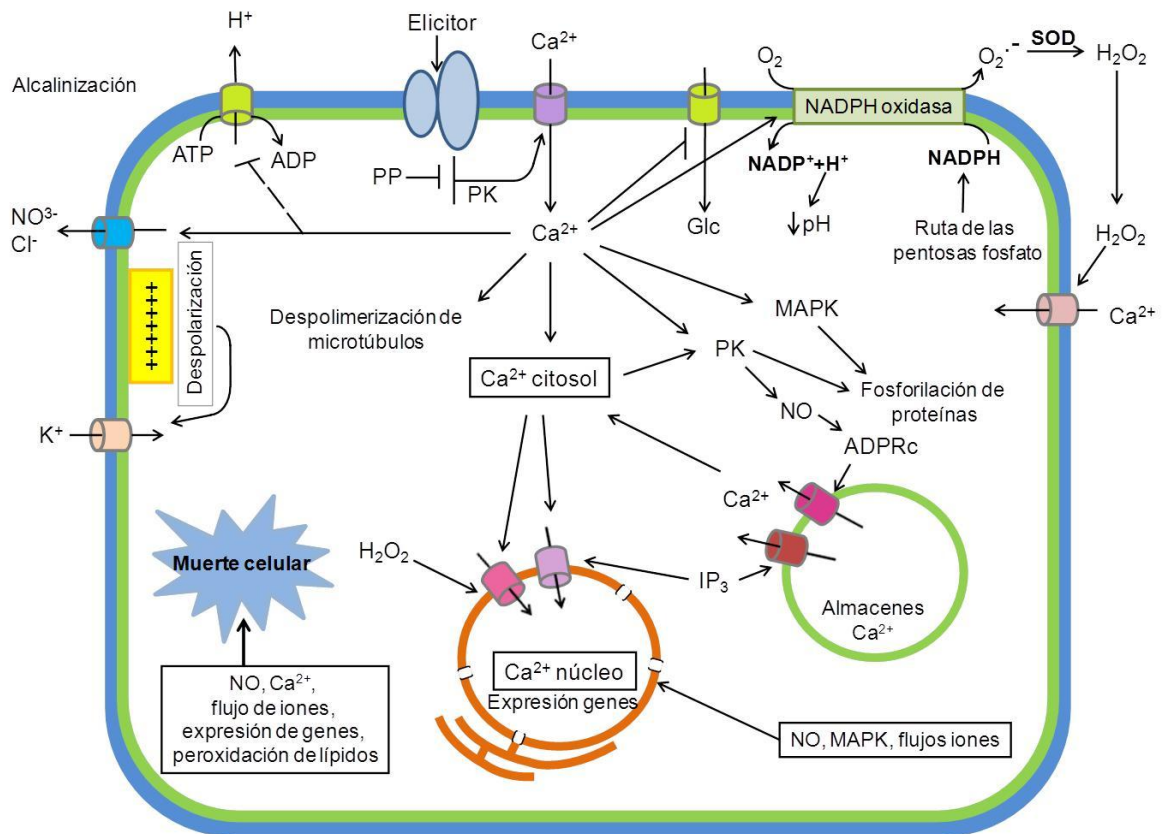
(Faurie et al. 2009). El evento más temprano en la inducción de las defensas de las plantas expuestas a un elicitador es su reconocimiento mediado por los receptores localizados en la membrana plasmática (Kaku et al. 2006, Zimmermann et al. 1997).

La percepción del elicitador activa efectores acoplados a estos receptores. De esta manera, las respuestas bioquímicas que se suceden después del reconocimiento del estímulo (Radman et al. 2003) incluyen (Figura 1.14):

- Cambios en los flujos de iones a través de la membrana (Mathieu et al. 1991): flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma desde el medio extracelular y movilización de reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares (Mithofer et al. 2001, Castañeda y Pérez 1996, Gelli et al. 1997); estimulación de flujos de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Bach et al. 1993, Ivashikina et al. 2001); acidificación del citoplasma causada por la inactivación de ATP-etasas de  $\text{H}^+$  (Lebrun-García et al. 1999; Armero y Tena 2001), despolarización de la membrana plasmática (Pugin et al. 1997) y alcalinización del medio extracelular (Bolwell et al. 1995).
- Cambios rápidos en la fosforilación y defosforilación de proteínas (Felix et al. 1991; Yang et al. 1997; Romeis 2001), estimulación MAPK (Droillard et al. 2000; Agrawal et al. 2002), activación de proteínas-G (Kelly et al. 1995, Luan 1998; Roos et al. 1999).
- Síntesis de segundos mensajeros: inosítidos fosfatos ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG) (Mahady et al. 1998) capaces de mediar en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, NO (Delledone et al. 2002, Huang et al. 2002) y en la ruta de señalización de los octadecanoides (Piel et al. 1997).
- Activación de NAD(P)H oxidasas responsables de la generación de ROS tales como el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que podrían tener un efecto antimicrobiano directo así como contribuir a la generación de derivados de ácidos grasos y estar implicados en la unión de proteínas ricas en prolina a la pared celular (Dixon et al. 1994, Low y Merida 1996).
- La producción de intermediarios como JA, SA y ET que activan la expresión de genes de defensa (Nürnberg et al. 2004)
- Reorganización del citoesqueleto (Kobayashi et al. 1995).
- Acumulación de PRp como quitinasas, glucanasas, endopoligalacturonasas que contribuyen a la liberación de oligómeros pécticos de señalización (elicitors endógenos), glicoproteínas ricas en hidroxiprolina e inhibidores de proteasas (Stinzi et al. 1993, Benhamou 1996; Moreno et al. 1996).

- Muerte celular en el lugar de la infección (respuesta hipersensible (HR)) (Kelli et al. 1995).
- Cambios estructurales de la pared celular (lignificación de las paredes celulares, deposición de callosa, activación de la ruta fenilpropanoide) (Kauss et al. 1989).
- Activación transcripcional de los correspondientes genes de defensa (Memelink et al. 2001, Cormack et al. 2002).
- Síntesis o acumulación de metabolitos secundarios (Pedras et al. 2002, Schopfer et al. 1998).
- SAR (Lebrun-García et al. 1999).

En cualquier caso, no todos los elicitors siguen esta serie de acontecimientos ya que otros actúan a través de receptores de membrana plasmática, mientras que ciertos péptidos bacterianos son capaces de entrar en la célula infectada y ser transportados a distintos orgánulos actuando ellos mismos como segundos mensajeros y transductores de la señal.



**Figura 1.14** Esquema de los eventos de señalización desencadenados después de la percepción de un elicitor por un receptor de membrana. Tomado de García-Brugger et al. (2006).



### 1.3.1 Implicación del calcio en la señalización intracelular inducida por la elicitación

La percepción del elicitador activa a efectores acoplados al receptor tales como proteínas de unión a GTP (proteínas-G) o protein kinasas (PK) y protein fosfatasas (PP) que además movilizan o generan diversas moléculas señal directa o indirectamente ( $\text{Ca}^{2+}$ , NO y ROS).

Una de las primeras respuestas detectadas es la modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática a determinados iones, en particular,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ , así como flujos de algunos aniones (Nürnberg y Scheel 2001). Entre estos iones, el  $\text{Ca}^{2+}$  constituye el segundo mensajero principal en numerosas rutas de señalización de plantas (Yang et al. 1997). Para la activación de las respuestas de defensa son esenciales cambios específicos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ ) (Lecourieux et al 2002). Estas variaciones pueden estar causadas por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular, por la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  de los orgánulos o por ambas.

Estos eventos de señalización regulan muchos procesos dirigidos a la amplificación de las respuestas de defensa (Lecourieux-Ouaked et al. 2000). Uno de los eventos clave para regular las respuestas de defensa lo constituye la fosforilación/desfosforilación de proteínas (Félix y Boller 2003). En este sentido, las PK tales como las MAPK regulan la transducción de la señal desencadenada por el elicitador de forma positiva, mientras que las PP 1, 2A o ambas se encargan de la regulación negativa para evitar una activación constitutiva en condiciones normales. Lecourieux-Ouaked et al. (2000) demostraron que en presencia de estaurosporina (un inhibidor general de Serin/Treonin PK), se inhibió el incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  dirigido por criptogeína en células de tabaco. Estos datos sugieren la implicación de eventos de fosforilación/desfosforilación de proteínas entre el reconocimiento del elicitador y la activación de canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . Asimismo, Nühse et al. (2003) identificaron la syntaxina entre las proteínas fosforiladas aisladas de la membrana plasmática de células de *Arabidopsis* elicitadas con el péptido flagelina. La syntaxina es fosforilada por PK dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y está involucrada en la fusión de membranas y la exocitosis, por lo que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  podría estimular la exocitosis de metabolitos relacionados con la defensa.

Por otra parte, la biosíntesis de ROS es otro evento temprano que se produce en las plantas como respuesta de defensa (Wojtaszek 1997). Esta respuesta es dependiente de flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  y de fosforilación de proteínas (Yoshioka et al. 2009). El  $\text{Ca}^{2+}$  induce

una rápida producción de  $O_2^{\cdot-}$  y de  $H_2O_2$  a través de la activación del complejo NADPH oxidasa localizado en la membrana plasmática (Faurie et al. 2009). Asimismo, varios autores han sugerido que el incremento de  $H_2O_2$  podría provocar un incremento de la entrada de  $Ca^{2+}$  por activación de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a  $H_2O_2$  (Lecourieux et al. 2006). Del mismo modo, cuando las plantas se someten a estrés, se desencadena la producción de NO (Wendehenne et al. 2004) y numerosos trabajos describen la estrecha relación entre la biosíntesis de NO y el  $Ca^{2+}$  (Ma et al. 2008, Yoshioka et al. 2009). De hecho, cuando las células de tabaco se elicitan con criptogeína se produce un rápido incremento de la producción de NO dependiente de  $Ca^{2+}$  (Lamotte et al. 2004). Asimismo, el NO puede estar implicado en el incremento de  $[Ca^{2+}]_{cit}$  (Durner et al. 1998). Lamotte et al. (2004) demostraron que el NO biosintetizado por células de tabaco elicitadas con criptogeína participaba en las variaciones de  $[Ca^{2+}]_{cit}$  promoviendo su movilización desde los almacenes internos de  $Ca^{2+}$  (Wendehenne et al. 2004).

### **1.3.2 Implicación de las especies reactivas de oxígeno y del óxido nítrico en la señalización intracelular inducida por elicitores**

#### **1.3.2.1 ROS**

Las ROS son formas parcialmente reducidas/activadas de oxígeno atmosférico que conducen a la formación de radicales  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  o hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) (Nanda et al. 2010). Las ROS son capaces de realizar una oxidación de los componentes subcelulares y pueden conducir a una destrucción oxidativa de la célula (Dat et al. 2000, Shetty et al. 2008). En condiciones normales de crecimiento, la producción de ROS en las plantas es baja, sin embargo en condiciones de sequía, calor, estrés mecánico, ataque de patógenos y elicitores se produce un incremento (Mittler 2002, Dat et al. 2000, Bowler et al. 1992, Noctor y Foyer 1998, Desikan et al. 2001, Allen 1995, Lamotte et al. 2004). Existen muchas fuentes potenciales de ROS en las plantas (Mittler 2002), algunas forman parte de procesos como la fotosíntesis y la respiración considerándose tradicionalmente subproductos del metabolismo aeróbico (Asada y Takahashi 1987). Entre las enzimas que producen ROS se encuentran las NADPH oxidasas y las amino oxidasas. Estas enzimas participan en la producción de ROS en procesos como la muerte celular programada y la defensa vegetal (Dat et al. 2000, Hammond-Kosack y Jones 1996, Grant y Loake 2000). La enzima NADPH oxidasa, localizada a nivel de la membrana plasmática, utiliza NADPH citosólico como poder reductor para generar  $O_2^{\cdot-}$  que dismuta a  $H_2O_2$  espontáneamente, o por acción de una superóxido dismutasa

(Lherminier et al. 2009). Las NADPH oxidasas de membrana se activan generalmente en respuesta a la infección por patógenos o a elicitores (Sandalio et al. 2001, Dat et al. 2000, Aziz et al. 2007, Vandelle et al. 2006, Achard et al. 2008, Navarro et al. 2008) y son enzimas cuya actividad está regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  libre o unido a calmodulina y eventos de fosforilación (Lecourieux et al. 2002).

Las ROS desempeñan un papel como segundos mensajeros en respuesta a diferentes situaciones de estrés biótico y abiótico (Torres et al. 2002, Rossard et al. 2010)

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es estable en solución, tiene una vida media relativamente larga y además tiene la capacidad de difundir a otras células. La estabilidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  lo convierte en la especie más apropiada para actuar como molécula señal. En cuanto a su modo de acción, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede modificar la regulación de la expresión génica, bien activando sensores de ROS o bien, mediante la oxidación de otras moléculas señal o incluso modificando la actividad de factores de transcripción. Uno de los primeros efectos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consiste en la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (Murata et al. 2001) lo que conduce a un aumento de los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  (Leucorieux et al. 2006). Además, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  activa la cascada de fosforilación de proteínas dirigida por las MAPKs (Jonak et al. 2002). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  también regula las PK mediante inhibición de PP (Gupta y Luan 2003).

Por otra parte, las plantas reaccionan frente a la invasión de un patógeno a través de la HR en la zona infectada y mediante el establecimiento de un mecanismo de SAR (Kawasaki et al. 2006). En estos procesos, la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se incrementa por la activación de NADPH oxidasas, peroxidasas de pared celular y aminooxidasas apoplásticas, y por la disminución de actividades antioxidantes como la ascorbato peroxidasa y la catalasa (Grant y Loake 2000, Rossard et al. 2010). La reducción de estas enzimas es dependiente de SA y NO. Como consecuencia de ello, se estimula la acumulación de ROS y la muerte celular programada (Klessig et al. 2000).

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

### 1.3.2.2 NO

El NO es un mensajero intra e intercelular en eucariotas (Xu et al. 2007, Perchepped et al. 2010, Palavan-Unsal y Arisan 2009, García-Pineda 2010). En plantas, el NO participa en un gran número de procesos fisiológicos. Estos incluyen la germinación, el desarrollo de la raíz, el control de los movimiento estomáticos, la floración, el crecimiento del tubo polínico y la senescencia de hojas (Beligni y Lamattina 2000, Neil et al. 2002, Pagnussat et al. 2002, He et al. 2004, Prado et al. 2004, Mishina et al. 2007). También participa en respuestas a factores abióticos (baja y alta  $T^a$ , disponibilidad de hierro, estrés por salinidad o sequía y presencia de metales pesados) y bióticos (interacciones simbióticas o patogénicas) (Delledone et al. 1998, García-Mata y Lamattina 2001, Graziano et al. 2002, Baudouin et al. 2006, Zhao et al. 2007, 2009, Lee et al. 2008, Besson-Bard et al. 2009b). Además, debido a la naturaleza química del NO, su efecto biológico puede estar influenciado por la intensidad, duración y localización de la señal de NO. El 30% de los procesos regulados por NO están asociados a respuestas de defensa (Besson-Bard et al. 2009a). La forma en la que esta molécula da lugar a una respuesta incluye modificaciones post-traduccionales de proteínas las cuales afectan directa o indirectamente al metabolismo de la planta y a la expresión de genes (Baudoin 2010), tales como los que codifican para PRp y enzimas implicadas en la síntesis y respuesta al JA y ET (Murgia et al. 2004, Huang et al. 2002, Guo et al. 2003).

Estos procesos de señalización transcurren a través de una cascada que incluye guanosín monofosfato cíclico (Pasqualini et al. 2009) y adenosín difosfato ribosa cíclica (ADPRc) y en la activación de MAPKs (Kumar y Klessig 2000)

Existen evidencias que indican que la producción de NO en plantas es dependiente de enzimas como la óxido nítrico sintasa (NOS) y la nitrato reductasa, así como otras fuentes de producción no enzimáticas.

La producción de NO ocurre a través de diferentes rutas enzimáticas. Ali et al. (2007) observaron que la ruta de biosíntesis de NO a través de la enzima NOS es regulada por la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular y/o por la movilización de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes internos en *Arabidopsis*. Experimentos realizados por Lamotte et al. (2004) en cultivos celulares de tabaco revelaron que NO moviliza los almacenes internos de  $Ca^{2+}$  a través de ADPc, GMPc y PK. De esta manera, el NO ejerce su función sobre GMPc que activa ADPc, que a su vez actúa como segundo mensajero movilizando y liberando  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplásmico y las vacuolas al citosol (Courtois et al. 2008). Asimismo, el NO puede actuar, a través de una ruta

independiente de GMPc, activando PP y PK (Lanteri et al. 2006). De hecho, se han identificado MAPKs dependientes de NO que están implicadas en respuestas a hormonas y señales medioambientales (Capone et al. 2004) en numerosas especies vegetales, como en pepino (Pagnussat et al. 2002), tabaco (Yamamoto et al. 2003) y *Arabidopsis*. La síntesis del NO y la transducción de su señal también están reguladas por PP. De hecho, en suspensiones celulares de soja tratadas con cantaridina, un inhibidor de PP, se produce un aumento de la actividad NOS (Delledonne et al. 1998). En relación al papel del NO en respuesta a estrés abiótico se ha demostrado que la síntesis de NO puede ser inducida por alta T<sup>a</sup>, salinidad, sequía y ozono (Goul et al. 2003; Wendehenne et al. 2004; Zhang et al. 2007). Sin embargo, su síntesis no se induce por situaciones de estrés lumínico y daño mecánico, por lo que no se puede considerar la producción de NO como una respuesta general de la planta frente a este tipo de estrés (Goul et al. 2003; Wendehenne et al. 2004).

#### **1.4 Proteínas extracelulares**

En el apoplasto se producen importantes procesos de comunicación intercelular, especialmente los relacionados con la defensa y el desarrollo (Kusumawati et al. 2008). Al conjunto de proteínas secretadas al apoplasto se le denomina secretoma. Estas proteínas pueden encontrarse libres en el espacio apoplástico o ancladas en la pared celular o en la membrana. A pesar de la importancia de estas proteínas en el estrés ambiental o frente a patógenos, en el reconocimiento célula-célula y en el desarrollo, siguen siendo menos conocidas que el proteoma intracelular y esto es en parte debido a la incapacidad para obtener el material apoplástico sin dañar el material vegetal y contaminar las muestras con proteínas citoplásmicas. Debido a la importancia del apoplasto se hace necesaria una identificación fidedigna de las proteínas procedentes de este compartimento con el fin de determinar su función. La ventaja que ofrece el uso de suspensiones celulares es que durante el aislamiento de las proteínas, el daño celular es mínimo o no se produce (Kusumawati et al. 2008).

##### **1.4.1 Proteínas relacionadas con la patogénesis (PRp)**

El término PRp hace referencia a aquellas proteínas que no solo se encuentran a concentraciones detectables en tejidos sanos, sino que su acumulación a nivel de proteína se ha demostrado en condiciones patológicas y situaciones relacionadas en, al menos, dos o más combinaciones planta-patógeno (Van Loon et al. 1999 y 2006). El término condiciones patológicas en este caso se utiliza para indicar el ataque directo

de patógenos de diverso origen tales como hongos, bacterias, virus, insectos y herbívoros. También se incluye i) la aplicación de compuestos químicos que mimetizan el efecto del ataque por un patógeno (hormonas como ET, JA, SA) y ii) respuestas a heridas que dan lugar a proteínas que se acumulan durante la infección (Sels et al. 2008). Van Loon et al. (2006) (Tabla 1.3) propusieron el término “proteínas inducibles relacionadas con la defensa” para evitar las posibles confusiones que podría causar la definición propuesta para estas proteínas, debido a que durante estas condiciones patológicas se produce un aumento de numerosas actividades enzimáticas que no son consideradas PRp. Algunas de estas PRp muestran actividad antimicrobiana *in vitro* y su acumulación en la planta se relaciona con respuestas de resistencia, pero aun no se ha demostrado un efecto directo en la defensa de todas ellas (Sels et al. 2008). Sin embargo, la adición de elicitores, como MJ, promueven la activación de los mecanismos de defensa en una amplia variedad de especies vegetales tales como tabaco y tomate donde inducen genes que codifican para PRp entre las que se encuentran peroxidasas, quitinasas y glucan-1,3- $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -1,3-glucanasas), las cuales desempeñan un importante papel en el sistema de defensa de las plantas sirviendo a su vez como marcadores de resistencia.

**Tabla 1.3** Clasificación de las PRp según Van Loon et al. (2006). Tomado de Sels et al. (2008).

Familia	Tipo	Tamaño (kDa)	Propiedades	Diana antimicrobiana propuesta	Referencia original
PR-1	PR-1a Tabaco	15	Antifúngica	Desconocida	Antoniw et al.1980
PR-2	PR-2 Tabaco	30	$\beta$ -1,3-glucanasa	$\beta$ -1,3-glucanos	Antoniw et al.1980
PR-3	P, Q Tabaco	25-30	Quitinasas clase I, II, IV, V, VI, VI	Quitina	Van Loon 1982
PR-4	R Tabaco	15-20	Quitinasas clase I, II	Quitina	Van Loon 1982
PR-5	S Tabaco	25	Taumatina	Membrana	Van Loon 1982
PR-6	Inhibidor I Tomate	8	Inhibidor de proteinasas	-*	Green y Ryan 1972
PR-7	P <sub>69</sub> Tomate	75	Endoproteinasa	-*	Vera y Conejero 1972
PR-8	Quitianasa Pepino	28	Quitinasa clase III	Quitina	Metraux et al. 1988
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina Tabaco	35	Peroxidasa	-*	Lagrimini et al. 1987
PR-10	PR-1 Perejil	17	Ribonucleasa	-*	Somssich et al. 1986
PR-11	Quitinasa de clase V Tabaco	40	Quitinasa clase I	Quitina	Melchers et al. 1994
PR-12	Rs-AFP3 Rábano	5	Defensina	Membrana	Terras et al. 1995
PR-13	THI2.1 <i>Arabidopsis</i>	5	Tionina	Membrana	Epple et al. 1995
PR-14	LTP4 Cebada	9	Proteína de transferencia de	Membrana	García-Olmedo et al. 1995

PR-15	OxOa (germina) Cebada	20	lípidos Oxalato oxidasa	-*	Zhang et al. 1995
PR-16	OxOLP	20	Similar a oxalato oxidasa	-*	Wei et al. 1998
PR-17	PRp27	27	Antifúngica, antiviral	-*	Sabater-Jara et al. 2011

\*No se ha observado actividad antimicrobiana “in vitro”

#### 1.4.2 Peroxidasas

Las peroxidasas vegetales están ampliamente distribuidas dentro de este reino (Siegel 1993). Estas enzimas se encuentran en la mayoría de las plantas vasculares, incluyendo las plantas terrestres primitivas como los helechos, musgos y líquenes (Duroux y Welinder 2003). Estudios filogenéticos sugieren que las peroxidasas de clase III, surgieron con la aparición de las plantas terrestres (Duroux y Welinder 2003) y es posible que esta clase de enzimas confiriera una de las características responsables de la adaptación de las plantas a su nueva vida en la Tierra, con el recubrimiento de los tejidos vasculares con ligninas. Así, no resulta sorprendente que las enzimas responsables de la polimerización oxidativa de los monolignoles aparezcan de forma temprana en la evolución de las plantas terrestres, y que estas enzimas se hayan conservado durante la evolución vegetal. Las plantas son los únicos organismos vivientes capaces de conducir el carbono desde el metabolismo primario al secundario a través de la biosíntesis de ligninas y se acepta que la adquisición evolutiva de la ruta fenilpropanoide ha jugado un papel clave en la capacidad de las plantas para colonizar la Tierra, no solo porque uno de los productos de la ruta (las ligninas) sirve para fortalecer los órganos aéreos de la planta, sino también porque otros productos (los flavonoides) actúan como protectores contra la radiación UV.

La peroxidasa es una enzima constitutiva (Calderón et al. 1992a), sus niveles están fuertemente regulados durante el desarrollo celular de la planta (Kochhar et al. 1979; Cuenca et al. 1989; García-Florenciano et al. 1990) y en respuesta a factores ambientales bióticos (Morales et al. 1998) y abióticos (López-Serrano et al. 1994; Reuveni y Reuveni 1995; López-Serrano y Ros Barceló 1996) de manera que determinados elicitores, como la luz UV-C y *Trichoderma viride* inducen cambios específicos en los niveles de isoenzimas de peroxidasa, que dan lugar a cambios fisiológicos y metabólicos específicos en la vida (Ros Barceló et al. 2003). Para llegar a comprender bien la regulación metabólica de la peroxidasa, algunos autores han estudiado cómo cambian los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de peroxidasa en respuesta a cambios en el medio ambiente. Sin embargo, los resultados obtenidos no son siempre fáciles

de interpretar. En algunos casos, se ha observado un aumento de la actividad peroxidasa durante los procesos de lignificación y endurecimiento de la pared celular asociados a estados infectivos de la planta (Kerby y Somerville 1989; Sekizawa et al. 1990; Ye et al. 1990; Calderón et al. 1994b). En este sentido, se ha descrito que la actividad de algunas isoenzimas de peroxidasa es más patente en las variedades resistentes a infecciones microbianas que en las sensibles (Hoos y Blaich 1988; Calderón et al. 1994a). Sin embargo, el aumento de la actividad enzimática no siempre coincide con la expresión del fenómeno de resistencia (Kerby y Somerville 1989). Este hecho probablemente sea debido a que la peroxidasa interviene indirectamente en la resistencia de la planta frente a las infecciones, alterando determinados procesos bioquímicos que sí están implicados directamente en los mecanismos de defensa de la planta, como son la síntesis de viniferinas (Calderón et al. 1994b; Ros Barceló et al. 2003), las modificaciones de la pared celular por la deposición de diferentes compuestos (Ros Barceló 2003) o la generación de quinonas y ROS (Zapata et al. 1992).

#### **1.4.2.1 Características generales de las peroxidasas**

##### 1.4.2.1.1 Naturaleza química de las peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7; donador de hidrógeno: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxido-reductasa) son glicoproteínas combinadas no covalentemente con un grupo prostético, principalmente protohematina IX (Dunford y Stillman 1976) cuyo átomo de hierro presenta un estado de oxidación +3 [Fe(III)]. Este átomo de hierro está pentacoordinado con cuatro nitrógenos pirrólicos del grupo hemo y con el nitrógeno de una histidina proximal, la cual se ha conservado a lo largo de la evolución. La sexta posición de coordinación está libre, lo que determina un alto estado de spin para el hierro (Banci 1997). En la estructura de la molécula se observan dos átomos de Ca<sup>2+</sup> (Banci 1997) que se consideran esenciales para su estabilidad, además de resultar ser un activador de la enzima (Converso y Fernández 1996).

La mayoría de las secuencias aminoacídicas de peroxidasas establecidas hasta la fecha, contienen entre 300 y 400 aminoácidos, con un peso molecular se encuentra entre los 35-45 kDa (Sciancalepore et al. 1985; Liao et al. 1999; Jackson et al. 2001) dependiendo de su grado de glicosilación. Su función esencial consiste en catalizar la oxidación de un gran número de sustratos a expensas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en una reacción de tipo:





Este peculiar mecanismo de catálisis las hace capaces de utilizar un amplio rango de compuestos naturales como sustratos, como la extensina que es una proteína de la pared celular, reguladores del crecimiento como el ácido indolil-3-acético (AIA), compuestos fenólicos como el ácido benzoico, estilbenos, flavonoles, alcoholes cinamílicos y antocianinas.

#### 1.4.2.1.2 Clasificación de las peroxidasas

Las peroxidasas no son enzimas exclusivas de plantas, por lo que se agrupan en dos superfamilias: por un lado las peroxidasas animales y por otra las peroxidasas fúngicas, bacterianas y vegetales. Dentro de esta última superfamilia se definen tres clases de peroxidasas relacionadas estructuralmente (Welinder 1992).

- *Clase I*: las peroxidasas bacterianas, citocromo c peroxidasa mitocondrial de levaduras y ascorbato peroxidasa citosólica y cloroplástica de plantas superiores se incluyen en este grupo.
- *Clase II*: todas las peroxidasas de secreción de origen fúngico (manganeso peroxidasas) pertenecen a esta clase.
- *Clase III*: todas las peroxidasas de secreción vegetales, las cuales se encuentran localizadas en las vacuolas y en las paredes celulares pertenecen a este grupo. Actúan sobre una extensa variedad de compuestos fenólicos mostrando una extraordinaria e inusual estabilidad térmica.

#### 1.4.2.1.3 Polimorfismo enzimático de las peroxidasas

Las peroxidasas de clase III están codificadas por una gran familia multigénica en plantas (Hiraga et al. 2000), presentando además un alto grado de polimorfismo. El estudio de dicho polimorfismo mediante isoelectroenfoque (IEF) ha permitido su clasificación en (Pedreño et al. 1996):

- isoenzimas ácidas ( $pI < 7$ )
- isoenzimas básicas ( $7.0 < pI < 9.2$ ) e
- isoenzimas fuertemente básicas ( $pI > 9.2$ )

En la mayoría de los casos, el polimorfismo varía con la variedad y con el órgano de la planta del que procede. Esto no sorprende pues las plantas superiores codifican entre 8-15 familias de peroxidasa, algunas de las cuales contienen dos o tres genes muy similares (Welinder 1992). Estudios realizados en peroxidasa de rábano muestran que existe una gran homología (50-95%) entre los genes secuenciados de peroxidasa, lo

que indica que más de una isoenzima determinada por IEF tiene su origen en un único gen, por lo que este alto grado de variabilidad entre isoenzimas de peroxidasas puede estar causado por diferentes patrones de glicosilación (Green y Oliver 1991) o puede ser debido a la heterogeneidad producida por las interacciones conformacionales entre las formas isoenzimáticas y los compuestos fenólicos presentes en las células vegetales (Ros Barceló et al. 1987).

#### **1.4.2.2 Localización tisular y subcelular de las peroxidasas**

Probablemente para compensar su amplio rango de especificidad de sustrato, la peroxidasa es una enzima que muestra una compartimentalización tisular específica en plantas, sobre todo en vid. De este modo, los estudios realizados para determinar su localización indican que en tallos, la peroxidasa se encuentra localizada en los tejidos meristemáticos (Crevecoeur et al. 1997), en las células epidérmicas (Goldberg et al. 1987; Hendriks y van Loon 1990; Ferrer y Ros Barceló 1994) y en los haces vasculares (Czaninski y Catesson 1969; Ros Barceló et al. 2002). En éstos últimos mediante estudios histoquímicos (Ferrer y Ros Barceló 1994), citoquímicos (Hepler et al. 1972, Czaninski 1978, Ros Barceló 1995) e inmunocitoquímicos (Kim et al. 1988, Smith et al. 1994) se ha demostrado que está localizada en las paredes celulares lignificantes de los elementos del xilema. En frutos de vid, la peroxidasa se localiza principalmente en la epidermis y en menor medida en la pulpa, donde el patrón isoenzimático está constituido casi exclusivamente por una peroxidasa fuertemente básica cuyos niveles aumentan durante el desarrollo del fruto (Kochhar et al. 1979; Calderón et al. 1993b). Esta localización tisular específica puede observarse también en hojas y brotes, donde la peroxidasa se localiza principalmente en células epidérmicas y haces vasculares (Ros Barceló 2003).

Las peroxidasas muestran un patrón de compartimentalización subcelular similar en diferentes especies vegetales. Este patrón de localización subcelular revela algunas particularidades de algunas isoenzimas de peroxidasa (Calderón et al. 1993b). El conjunto de isoenzimas de peroxidasa (ácidas y básicas) se encuentra en las paredes celulares y en el apoplasto; sin embargo sólo las más básicas se encuentran colocalizadas en las vacuolas. Esto implica un alto grado de compartimentalización para estas isoenzimas de peroxidasa fuertemente básicas. Así por ejemplo, en las células meristemáticas, cambiales y del mesófilo, la peroxidasa está localizada principalmente en la vacuola, bien en forma soluble (Crevecoeur et al. 1997), o bien firmemente ligada a la cara interna del tonoplasto (Ros Barceló et al. 1991; Sottomayor

y Ros Barceló 1997). En cambio, en las células epidérmicas y en el xilema, la peroxidasa aparece ligada predominantemente a la pared celular, ya sea a la pared primaria (Goldberg et al. 1987) o a los engrosamientos secundarios (Ros Barceló 1995; Ros Barceló et al. 2002).

Tanto la localización vacuolar como parietal de las isoenzimas de peroxidasa se corresponden con sus funciones fisiológicas más reconocidas durante el desarrollo celular en la planta.

#### **1.4.2.3 Peroxidasas de la vid**

La mayoría de los problemas encontrados a la hora de establecer las funciones fisiológicas desempeñadas por las peroxidasas en las plantas radica en la presencia de un elevado número de isoenzimas (Gaspar et al. 1982). Esta abundancia de isoenzimas dificulta, en gran medida, la purificación de las mismas, lo cual supone un grave inconveniente cuando se pretenden evaluar las características de estas isoenzimas y, por lo tanto, asignar un papel concreto a cada una de ellas dentro del metabolismo de la planta.

La capacidad de las peroxidasas para oxidar diversas sustancias de naturaleza fenólica puede modificar su capacidad para oxidar a aquellos dadores de electrones usados para la determinación de su actividad (Gaspar et al. 1985), de modo que dichos compuestos fenólicos se extraen conjuntamente con la enzima cuando se produce la ruptura celular interaccionando con ella (García-Florenciano et al. 1990) e impidiendo su detección en determinados órganos de la vid como frutos inmaduros (Zapata et al. 1993).

En el caso particular de los frutos de vid, los patrones isoenzimáticos de peroxidasas separadas por IEF muestran una sorprendente simplicidad y similitud resultados que, en líneas generales, están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Lee et al. 1983; Sciancalepore et al. 1985; Robinson et al. 1990). Sin embargo, los patrones isoenzimáticos de la peroxidasa procedente de cultivos celulares son más complejos, mostrando la presencia adicional de un grupo de peroxidasas fuertemente ácidas y otro grupo débilmente básicas (Calderón et al. 1992a y 1992b). El mayor número de isoenzimas en los cultivos que en los propios frutos, apoyaría la idea acerca de la represión, probablemente inducida por factores hormonales y ambientales, de los genes que codifican para las peroxidasas en el fruto (Calderón et al. 1992c; Zapata et al. 1994).

Los estudios realizados sobre localización subcelular de las isoenzimas de peroxidasa en suspensiones celulares de *V. vinifera* cv Gamay han puesto de manifiesto que la mayor parte de la actividad peroxidasa se encuentra en el medio de cultivo (alrededor de 80%), mientras que la peroxidasa celular representa aproximadamente un 20% (García-Florenciano et al. 1991).

Estudios más detallados han mostrado que la peroxidasa presente en el interior de la célula se encuentra localizada en forma soluble en las vacuolas, encontrándose probablemente en equilibrio con aquellas isoenzimas ligadas a la superficie interna del tonoplasto (Ferrer et al. 1990; García-Florenciano et al. 1991; Calderón et al. 1992b). Además, el análisis de los patrones isoenzimáticos de la peroxidasa localizada en las vacuolas muestra la presencia mayoritaria de la isoenzima B<sub>5</sub> (Calderón et al. 1992b; García-Florenciano et al. 1991). Esta isoenzima también se encuentra localizada a nivel de la pared celular (García-Florenciano et al. 1991; Calderón et al. 1992b) y es la principal componente del polimorfismo enzimático de la peroxidasa en el fruto (Zapata et al. 1994).

#### **1.4.2.4 Funciones fisiológicas de las peroxidasas**

Las funciones fisiológicas desempeñadas por las peroxidasas en las plantas vienen determinadas por su localización subcelular y, por tanto, por la disponibilidad de sustratos. Precisamente, debido al peculiar mecanismo de acción de esta enzima, la cantidad de posibles sustratos es muy elevada, motivo por el cual la peroxidasa ha sido implicada en multitud de procesos fisiológicos. Sin embargo, la funcionalidad de una enzima *in vivo* depende de otros muchos factores, como por ejemplo la presencia de inhibidores endógenos co-localizados con la enzima.

Entre sus funciones cabe destacar:

i) Control del crecimiento celular. Esta ha sido la función que ha merecido el mayor número de investigaciones (Gaspar et al. 1982). En este sentido, la peroxidasa participa en dicho control a través de dos mecanismos:

Por una parte, regulando los niveles endógenos del AIA. Hay que tener en cuenta que el AIA está compartimentalizado en el citosol y las vacuolas de las células de vid contienen inhibidores del catabolismo del AIA mediado por peroxidasa (García-Florenciano et al. 1992). Sin embargo, hay fuertes razones para pensar que las peroxidasas extracelulares pueden controlar los niveles de AIA durante la formación de raíces adventicias en esquejes de vid (Moncousin et al. 1988) y este catabolismo está controlado por los niveles de protectores de AIA (inhibidores del catabolismo de

AIA). Se ha observado una situación similar en el caso de los protectores de AIA que regulan la actividad AIA oxidasa de las peroxidasas extracelulares durante el ciclo de crecimiento en suspensiones celulares de vid (García-Florenciano et al. 1991).

Por otro lado, la peroxidasa está implicada en el entrecruzamiento de la extensina, proteína estructural de la pared celular de naturaleza glicoproteica que desempeña diversos procesos fisiológicos en plantas entre los que se encuentran el aumento de la fuerza mecánica de la planta, que supone una forma de defensa primaria, impidiendo el paso de los patógenos hasta que las defensas dependientes de factores de transcripción se expresen.

ii) Síntesis de ligninas. Las peroxidasas participan en la polimerización oxidativa de los alcoholes cinamílicos: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Esta reacción es necesaria para la síntesis de ligninas que recubren el interior de los conductos del xilema y de otros tejidos de soporte presentes en todas las plantas vasculares terrestres.

iii) Oxidación de resveratrol y síntesis de viniferinas. La síntesis de derivados del resveratrol requiere el acoplamiento oxidativo de unidades estilbénicas mediante la actuación de una enzima que retire un átomo de hidrógeno (Langcake y Pryce 1977a y b) en un proceso similar a la síntesis de ligninas. La acumulación de estos compuestos en las paredes celulares de las plantas que los biosintetizan (incluida la vid) en respuesta a infección fúngica (Calderón et al. 1994b; Dai et al. 1995a y 1995b), coincidiendo con la localización tisular de la isoenzima de peroxidasa que oxida hidroxiestilbenos con elevada eficacia catalítica (Calderón et al. 1994a) sugiere que la deposición de estilbenos y la lignificación probablemente forman parte de una respuesta de defensa “multifactorial” (Ros Barceló et al. 2003).

iv) Recambio metabólico de los compuestos fenólicos almacenados en la vacuola. El papel de las peroxidasas vacuolares en la biosíntesis y degradación oxidativa de sustratos fenólicos fue descrita por primera vez por Takahama en 1988. Otros estudios (Pérez et al. 2002) sugieren que la peroxidasa participa en el recambio y degradación de los fenoles vacuolares, de manera que esta reacción se acopla bajo situaciones de estrés a la eliminación de  $H_2O_2$  de la vacuola, donde la eficiencia de los enzimas detoxificantes de  $H_2O_2$ , como catalasa o ascorbato peroxidasa son insuficientes.

v) Respuestas del sistema peroxidasa/ $H_2O_2$  a la luz UV-C y a elicitores obtenidos de *T. viride*. Se ha observado que la incidencia de la luz UV-C sobre hojas de tabaco (Miles et al. 2002) induce la producción de  $H_2O_2$  que va acompañada de un incremento de la

actividad peroxidasa. Asimismo, se ha detectado que la radiación UV-C induce cambios específicos de las isoenzimas de peroxidasa en cultivos de vid (Zapata et al. 1994). Por otro lado, entre los efectos producidos por *T.viride* sobre la peroxidasa destaca su capacidad para inducir el estallido oxidativo en células de vid, siendo el  $H_2O_2$  y el  $O_2^{\cdot-}$ , las principales especies ROS (Ros Barceló et al. 1996; Papadakis y Roubelakis-Angelakis 1999), fenómeno que puede ser observado en otras especies vegetales (Harding et al. 1997; Yano et al. 1999; Papadakis y Roubelakis-Angelakis 1999).

## 2. Objetivos







1. El estudio del crecimiento de las suspensiones celulares de *Vitis vinifera* cv Monastrell en distinto medio mineral y a distintas concentraciones de sacarosa.
2. El estudio de la producción de *t*-R en suspensiones celulares de Monastrell en sistemas en discontinuo (matraces en agitación), utilizando elicitores de distinta naturaleza (CDM, MJ, luz UV, FAI, SA y ET) y análisis de algunos factores para su escalado y producción en biorreactores.
3. Estudio de la implicación del  $\text{Ca}^{2+}$ , eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas, NO y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la ruta de señalización celular que dirige la producción de *t*-R en suspensiones celulares elicidas con CDM solas o en combinación con MJ.
4. Estudio del proteoma extracelular de suspensiones celulares de Monastrell en condiciones control y elicidas con CDM solas o en combinación con MJ mediante label-free y mediante microsecuenciación en suspensiones celulares elicidas con CDM solas o en combinación con MJ/SA/ET.



### 3. Materiales y Métodos





### 3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

#### 3.1.1 Inducción y mantenimiento de callos

Los callos de *V. vinifera* cv Monastrell se obtuvieron en el año 1995 a partir de frutos inmaduros de este cultivar de vid siguiendo la metodología descrita por Zapata et al. (1995).

Los callos friables que se obtuvieron se subcultivaron cada tres semanas hasta la actualidad con el fin de mantener esta línea celular. Para ello, porciones de callos friables se transfirieron a medio de cultivo Gamborg B5 (GB5, Gamborg Miller 1968), suplementado con quinetina (0.2 mg/L), ANA (0.1 mg/L), hidrolizado de caseína (250 mg/L) y sacarosa (20 g/L). Los callos se mantuvieron en oscuridad a 25°C y se utilizaron para la obtención de suspensiones celulares.

#### 3.1.2 Iniciación y mantenimiento de suspensiones celulares

Las suspensiones celulares se iniciaron mediante la transferencia de porciones de callo friable en matraces de 250 mL de capacidad, que contenían 100 mL de medio de cultivo GB5, descrito en la Tabla 3.1 Después de varios subcultivos de las suspensiones crecidas en matraces de este volumen se procedió a su transferencia en matraces de 500 mL de capacidad que contenían 200 mL de suspensión celular. Se mantuvieron en agitación a 105 rpm en iguales condiciones de oscuridad y T<sup>a</sup> que las descritas anteriormente y se subcultivaron cada 14-16 días.

**Tabla 3.1** Composición de los medios GB5 y MS.

Reactivo	GB5	MS
<b>Macronutrientes</b>	<b>(mg/L)</b>	
(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	-	1650.0
KNO <sub>3</sub>	2527.5	1900.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150.0	440.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.5	370.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134.0	-
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>	-	170
<b>Micronutrientes</b>		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	150.0	-
KI	0.75	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0	6.18
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3.0	16.9
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.0	8.62
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.24

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.024
<b>Hormonas</b>		
ANA	0.1	1
Quinetina	0.2	1
<b>Vitaminas</b>		
Pantotenato cálcico*	1	1
Mioinositol*	100	100
Biotina*	0,01	0.01
Piridoxina*	1	1
Tiamina*	1	2
Acido nicotínico*	1	3
<b>Otros componentes</b>		
Hidrolizado de caseína	250	250
Sacarosa	20000	20000

\* (Morel y Wetmore 1951)

## 3.2 Medida del crecimiento celular

### 3.2.1 Curva de crecimiento

Para la realización de la curva de crecimiento se partió de suspensiones celulares bien establecidas, las cuales se filtraron en condiciones estériles. Las células filtradas se pesaron, transfiriendo 40 g de células a cada matraz (de 500 mL de capacidad conteniendo 200 mL de medio de cultivo). Al día siguiente del inicio de la suspensión celular se recogieron muestras para los datos correspondientes al primer punto de la curva, considerando este tiempo cero ( $t_0$ ). El resto de las muestras se recogieron con intervalos de 48 horas, durante un periodo de 25 días. La tasa de crecimiento se obtuvo mediante la determinación del volumen de empaquetamiento celular (VEC), el pH y la conductividad, parámetros cuya medida se describe a continuación:

- ❖ Volumen de empaquetamiento celular (VEC): indica el porcentaje de volumen celular en relación al volumen total de suspensión celular. Para su determinación se tomaron dos alícuotas de 3-5 mL de suspensión celular en agitación, por matraz y día de recogida, utilizando una pipeta estéril para cada muestra. A continuación, se centrifugaron a 100 g, durante cinco minutos a 4°C, en una centrífuga refrigerada Heraeus Sepatech.
- ❖ Conductividad y pH: después de la medida del VEC se separó el medio de cultivo de las células y se midió el pH del medio en un pH-metro CRISON Basic



20 y la conductividad del medio, en un conductivímetro CRISON micro CM 2100.

- ❖ **Peso fresco (PF):** las alícuotas recogidas de cada suspensión se filtraron utilizando una bomba de vacío hasta eliminar el medio extracelular. Posteriormente, las células se lavaron con agua fría, se filtraron de nuevo y se pesaron en una balanza de precisión PACISA modelo Precisa 125A.
- ❖ **Medida del peso seco (PS):** después de medir el peso fresco, las células se depositaron en filtros de papel Watman prepesados y se mantuvieron en una estufa a 60 °C durante 24 h. Pasado ese tiempo, se pesaron y se calculó el peso seco restando el peso de los filtros.

La caracterización de las curvas de crecimiento se realizó en base a los parámetros cinéticos “velocidad de crecimiento en la fase exponencial”, “volumen de empaquetamiento celular máximo” y “tiempo de agotamiento”, obtenidos a partir de los datos cinéticos de las curvas de crecimiento, como se indica a continuación:

- ❖ **Velocidad de crecimiento en la fase exponencial (Vexp):** se define como el incremento de biomasa en el intervalo de tiempo transcurrido durante la etapa lineal de la fase exponencial de la curva de crecimiento.

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

- ❖ **Biomasa máxima (VECmax):** es el umbral superior al que tiende el aumento de la biomasa.
- ❖ **Tiempo de agotamiento (Ta):** tiempo estimado a partir del cual, la escasez de nutrientes comenzaría a provocar estrés y muerte celular.

$$T_a = (VEC_{max} - VEC_{t_0}) / V_{exp}$$

siendo  $VEC_{t_0}$ , la biomasa inicial a  $t_0$  si el cultivo se desarrollara en continuo crecimiento exponencial.

### 3.3 Elicitación

Como metodología común a todos los ensayos de elicitación, en primer lugar se filtraron las células utilizando un embudo Büchner esmerilado con placa filtrante de borosilicato, acoplado a un matraz Kitasato. A continuación, se realizó un ligero vacío utilizando para ello una bomba de agua. Todas las manipulaciones de las células se realizaron en condiciones estériles dentro de la cabina de flujo laminar y utilizando el material estéril. Una vez eliminado el medio de cultivo, se lavaron las células con medio de cultivo fresco y se volvió a aplicar vacío. A continuación se pesaron las células y se añadieron a los matraces para realizar los diferentes tratamientos. En general, y salvo que en el experimento se especifique de otra forma, se utilizaron 10 g

de PF de células en 50 mL de medio de cultivo (VEC de 50%) en matraces de 250 mL de capacidad.

Las suspensiones celulares se incubaron durante 96 horas con elicitores/inhibidores, salvo en los ensayos de producción de *t*-R a lo largo del tiempo, que se dejaron hasta 168 horas.

Transcurrido este tiempo de incubación, se recogieron muestras de VEC de cada tratamiento. A continuación se separó el medio de cultivo de las células, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, en ausencia de esterilidad. Las células se lavaron con agua fría y se filtraron realizando un ligero vacío y a continuación se pesaron. Asimismo, se midió el volumen de medio de cultivo recogido tras la elicitación. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

### 3.3.1 Adición de elicitores

#### 3.3.1.1 Reactivos

Como elicitores se utilizaron los compuestos descritos en la Tabla 3.2:

**Tabla 3.2** Elicitores

Elicitor	Concentración mM	Casa comercial
Ciclodextrinas naturales sin sustituyentes	15	Sigma-Aldrich (España)
G2- $\beta$ -ciclodextrinas	50	Ensuko Sugar Refining Co. (Japón)
Ciclodextrinas hidroxipropiladas al azar	50	Sigma-Aldrich (España)
Ciclodextrinas metiladas al azar	50	Wacker Chemie (Alemania)
Sulfo- $\beta$ -ciclodextrinas	50	Sigma-Aldrich (España)
Jasmonato de metilo	0.1	Duchefa (España)
Fosetil de aluminio	1.5	Rhône-Poulenc Agrochimie (España)
Ácido salicílico	0.1	Sigma-Aldrich (España)
Etefón	1	Sigma-Aldrich (España)

#### 3.3.1.2 Metodología

- Elicitación con ciclodextrinas de distinta naturaleza

Para la elicitación de las suspensiones celulares de Monastrell con CD de distinta naturaleza se utilizaron dos tipos de CD naturales (una sin sustituyentes y otra con ramificaciones (G2- $\beta$ -CD)) y tres CD sintéticas (CDM, CDH y sulfo-CD). Estos experimentos se realizaron a una concentración de CD de 50 mM salvo para la CD natural sin ramificaciones, que se utilizó a una concentración de 15 mM, ya que su límite de solubilidad era de 18 mM. Se utilizó esta concentración elevada de CD para

que estos compuestos actuaran como secuestradores de compuestos apolares, que es su uso más generalizado, y además como inductores de la síntesis de *t*-R.

- Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con distintas concentraciones de ciclodextrinas metiladas al azar

Con la finalidad de encontrar la concentración de CDM óptima se realizaron experimentos de elicitación con distintas concentraciones de esta CDM: 5, 10, 25 y 50 mM. Para ello, distintas cantidades de CDM se añadieron a los medios de cultivo y se esterilizaron a 121°C durante 20 min antes de ser utilizados como medios de elicitación.

- Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar solas o en combinación con metil jasmonato a distintos volúmenes de empaquetamiento celular

Para realizar estos experimentos se utilizaron tres VEC que eran representativos de todo el rango de la curva de crecimiento, concretamente 25, 50 y 75% (100, 200 y 300 g PF de células/L, respectivamente). De esta manera, utilizando suspensiones celulares a estas tres densidades celulares se realizó la elicitación de las suspensiones de Monastrell con 50 mM de CDM (Bru et al. 2006) solas o en combinación con 100 µM de MJ (Gunlach et al. 1992; Mizukami et al. 1993; Ketchum et al. 1999; Sanchez-Sampedro et al. 2005). El MJ se adicionó a los medios de cultivo una vez esterilizados, mediante filtración utilizando filtros de 0.22 µm y realizando el proceso en la cabina de flujo laminar.

- Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar y/o concentraciones variables de jasmonato de metilo

Todos los tratamientos con MJ (5, 25, 50, 100, 270 y 450 µM) se realizaron tanto en presencia como en ausencia de CDM. Además se realizó un tratamiento control sin elicitors y un tratamiento sólo con CDM. Asimismo, se realizó un tratamiento que contenía etanol a la máxima concentración empleada en el experimento (1%) para corroborar que la producción de *t*-R era debida al efecto de los elicitors y no a causa de una respuesta desencadenada por la presencia del etanol en el que va disuelto MJ.

- Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar y/o metil jasmonato a diferentes concentraciones sacarosa

Para realizar estos experimentos se utilizó la línea celular de Monastrell crecida con 20 g/L de sacarosa. La elicitación se realizó adicionando diferentes concentraciones de MJ (25, 50, 100 y 270 µM), individualmente o en combinación con CDM a una

concentración fija (50 mM) utilizando un medio de cultivo suplementado con 10, 15 ó 20 g/L de sacarosa en el momento de la elicitación.

- Elicitación de suspensiones celulares de *Monastrell* con ácido salicílico y etefón (etileno)

La elicitación de las suspensiones celulares de *Monastrell* con SA y ET se realizó utilizando cuatro concentraciones distintas de estos compuestos en combinación con CDM. Para SA se utilizaron las concentraciones de 0.05, 0.10, 0.50 y 1.00 mM, mientras que, para ET se utilizaron concentraciones mayores: 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 mM. Las concentraciones de SA y de ET que provocaron junto con la adición de CDM los niveles más elevados de producción de *t*-R se emplearon posteriormente en un experimento en el que se combinaron con CDM y MJ.

- Elicitación de suspensiones celulares de *Monastrell* con fosetil de aluminio en presencia de ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo

Los experimentos se realizaron utilizando FAI de una pureza del 97% a 1.5 mM (López-Serrano et al. 1997) sólo o en combinación con los anteriores elicitores CDM (50 mM) y/o MJ (100  $\mu$ M).

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

Para realizar estas elicitaciones se utilizaron matraces de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de elicitación que contenía 50 mM CDM, 100  $\mu$ M MJ y 4 g de PF de células (equivalente a una densidad intermedia, correspondiente a un VEC de 50%). Una vez añadidas las células a los medios de elicitación, se realizaron irradiaciones con luz UV-A o C (10mW/cm<sup>2</sup>; 360 y 254 nm, respectivamente) durante 5, 15, 30, 60 y 90 minutos para la luz UV-A y 5, 15 y 30 minutos para la luz UV-C a 15 cm de distancia de la lámpara. Se realizaron controles en presencia y ausencia de elicitores y/o luz UV.

La irradiación con luz UV se realizó en condiciones asépticas trabajando en el interior de una cabina de flujo laminar y en agitación continua a 100 rpm. Para ello, dentro de la cabina se introdujo un agitador orbital y sobre éste se colocó la lámpara de luz UV, de modo que las suspensiones podían mantenerse en agitación continua durante todo el tratamiento con la luz UV. Para que la irradiación con luz UV fuese directa sobre las células, las suspensiones se trasvasaron a vasos de plástico estériles. Transcurrido el tiempo de tratamiento con la luz UV se transfirieron a sus correspondientes matraces. Posteriormente, las suspensiones celulares se mantuvieron durante 96 horas en las mismas condiciones que en los experimentos anteriores.

### 3.3.2 Señalización

#### 3.3.2.1 Reactivos

Para el estudio de la ruta de señalización implicada en la producción de *t*-R se utilizaron los compuestos que se muestran en la Tabla 3.3. Estos compuestos se adquirieron en Sigma-Aldrich (España).

#### 3.3.2.2 Metodología

Estos experimentos se realizaron según se describe en el apartado 3.3 Elicitación. Para ello, se utilizaron matraces de 100 mL de capacidad y una densidad celular de 200 g PF/L (50% de VEC). Se utilizaron como elicitores CDM (50 mM) y MJ (100  $\mu$ M). En este caso, los compuestos utilizados para estudiar el mecanismo de señalización se añadieron una hora y media antes que los elicitores con el propósito de que estas moléculas tuviesen tiempo suficiente para actuar sobre sus dianas.

- Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell a distintas concentraciones de calcio.

Para determinar la concentración óptima de  $\text{Ca}^{2+}$  a la que comenzaba a detectarse *t*-R se elicitaron las suspensiones celulares de Monastrell con CDM y/o MJ, utilizando un medio de cultivo de igual composición al medio GB5 pero con distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (0.0, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mM). Asimismo, para determinar el tiempo mínimo de elicitación requerido para detectar *t*-R se realizaron diferentes muestreos periódicos desde tiempo 0 hasta las 168 horas.

- Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell en presencia de antagonistas de calcio.

Para comprobar si la producción de *t*-R era dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se utilizó EGTA, un agente secuestrador de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ensayaron diferentes concentraciones de EGTA (0.1, 0.5, 3.0 y 5.0 mM) para secuestrar el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio de cultivo. Para cada concentración de EGTA quedó una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, efecto que es dependiente del pH del medio. De esta manera, en la Tabla 3.4 se muestran las concentraciones de calcio libre al pH del medio de cultivo (6.0) en cada uno de los casos ensayados.

**Tabla 3.3** Reactivos utilizados para estudiar la señalización inducida por elicitores

Compuesto	Abreviatura	Concentración $\mu\text{M}$	Efecto
<b>Calcio</b>			
Acido etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético	EGTA	5000	Secuestrador de $\text{Ca}^{2+}$ extracelular
Cloruro de lantano	$\text{La}^{3+}$	500	Bloqueador de canales de $\text{Ca}^{2+}$ extracelular
Neomicina	Neo	100	Bloqueador de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular dependiente de $\text{IP}_3$
Rojo rutenio	RR	10	Bloqueador de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular dependiente de receptores de rianodina
<b>Inhibidores de protein kinasas</b>			
Genisteína	Gen	10	Tirosin protein kinasa (Tyr-PK)
Estaurosporina	Est	5	Serin/Treonin protein kinasa (Ser/Thr-PK)
Apigenina	Ap	500	Protein kinasa activada por mitógeno (MAPK)
Bisindolilmaleimida	BIM	5	Protein kinasa-C (PK-C)
<b>Inhibidores de protein fosfatasas</b>			
Cantaridina	Can	5	Protein fosfatasa 2A (PP 2A)
Oxido de fenilarsina	OFA	10	Tirosin protein fosfatasa (Tyr-PP)
<b>Inhibidores de NO y <math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b>			
Carboxi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolelin e-1-oxyl-3-óxido	cPTIO	500	Secuestrador de NO del medio
$\text{N}_\omega$ -nitro-L-arginina	L-NNA	100	Inhibidor irreversible de NO sintasa constitutiva y reversible de NO sintasa inducible
Nitroprusiato sódico	NPS	10	Libera NO <i>in situ</i>
Cloruro de difenileniodonio	DPI	10	Inhibidor específico de NADPH oxidasa

**Tabla 3.4** Concentraciones de EGTA utilizadas para secuestrar el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular.

[EGTA] mM	[ $\text{Ca}^{2+}$ libre] $\mu\text{M}$
0.1	904.0
0.5	534.0
3.0	20.0
5.0	9.6

En cualquiera de los casos siempre queda una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre por lo que también se utilizó un bloqueador de los canales de entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular,  $\text{LaCl}_3$  a una concentración de 0.5 mM (Lecourieux et al. 2005). Para comprobar si estos compuestos podían actuar como elicitores por sí mismos se utilizaron también en ausencia de CDM y MJ. La producción de *t*-R en estos experimentos se midió a las 24 horas. Estos compuestos se añadieron 1 h 30 min antes de realizar la elicitación con CDM y/o MJ.

El estudio de la dependencia de la producción de *t*-R de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes internos se realizó mediante la elicitación de las suspensiones celulares de Monastrell con CDM y/o MJ, en presencia de neomicina (Neo, 100  $\mu\text{M}$ ) y/o rojo rutenio (RR, 10  $\mu\text{M}$ ). Neo actúa en los compartimentos subcelulares sobre la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de la vía de los inosítidos fosfato ( $\text{IP}_3$ ) y RR bloquea la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los compartimentos intracelulares dependientes de receptores de rianodina. Estos compuestos se añadieron 1 h 30 min antes de realizar la elicitación con CDM y/o MJ.

- Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell en presencia de inhibidores de protein kinasas y protein fosfatasa

Para determinar la implicación de PK en la cascada de señalización que dirige la biosíntesis de *t*-R se utilizaron inhibidores específicos de Tyr-PK (Gen), Ser/Thr-PK (Est), MAPK (Ap) y PK-C (BIM). En el estudio de la posible implicación de PP en la cascada de señalización que dirige la biosíntesis de *t*-R, se utilizó un inhibidor de PP-2A (Can) y otro de Tyr-PP (OFA) a las concentraciones detalladas en la Tabla 3.3. Estos compuestos se añadieron 1 h 30 min antes de realizar la elicitación con CDM y/o MJ.

- Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell en presencia de inhibidores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y NO

Para comprobar si NO y/o  $\text{H}_2\text{O}_2$  están implicados en la cascada de señalización que conduce a la biosíntesis de *t*-R desencadenada por la adición de elicitores se utilizó un inhibidor de la NO sintasa (L-NNA), un secuestrador de NO (cPTiO), un donador de

NO (NPS) y un inhibidor de NADPH oxidasa (DPI). Estos compuestos se añadieron 1 h 30 min antes de realizar la elicitación con CDM y/o MJ.

### **3.4 Determinación de estilbenoides**

#### **3.4.1 Extracción de resveratrol y derivados**

##### **3.4.1.1 Extracción de resveratrol y derivados del medio extracelular de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

La extracción de los compuestos presentes en los medios de cultivo de Monastrell se realizó mediante una partición de fases con acetato de etilo (1:1, v/v) y con la finalidad de obtener una clara separación de fases se añadió directamente al medio extracelular NaHCO<sub>3</sub> al 3% (p/v) y 10% de NaCl (p/v). Transcurrida una hora, la fase orgánica se recogió y se realizó una segunda extracción de la fase acuosa durante una hora más con el fin de recoger todos los estilbenos presentes en el medio extracelular. Pasado ese tiempo se recogió la fase orgánica (acetato de etilo) y se evaporó en un rotavapor a 40 °C a vacío, el residuo seco se resuspendió en 1 mL de metanol para su posterior análisis cromatográfico con un HPLC-DAD.

##### **3.4.1.2 Extracción de resveratrol y derivados intracelulares de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

La extracción de los metabolitos celulares se realizó homogeneizando las células de Monastrell con metanol 70 % (1:2, peso/volumen) y dejando el homogenado durante 24 horas a 4°C en la oscuridad. A continuación, se separaron las células por filtración y el sobrenadante se llevó a sequedad con N<sub>2</sub>. El residuo seco fue extraído por partición de fases con acetato de etilo y agua (1:10) durante un periodo de tres horas. Transcurrido ese tiempo se recogió la fase orgánica (acetato de etilo) y se evaporó en un rotavapor a 40 °C a vacío; el residuo seco se resuspendió en 1 mL de metanol para su posterior análisis por HPLC.

#### **3.4.2 Análisis de estilbenoides**

Para la determinación y cuantificación de estilbenoides presentes en las muestras se utilizaron los siguientes equipos:



### 3.4.2.1 Reactivos

Como fase móvil se utilizaron ácido acético y acetonitrilo grado HPLC, ambos de Panreac (España). Las fases acuosas se filtraron a vacío mediante filtros de 45  $\mu\text{m}$  (Pall Corporation, USA). Para la identificación del *t*-R se utilizó un patrón comercial de *t*-R con una pureza >99% de Sigma-Aldrich (España).

### 3.4.2.2 Equipos de cromatografía y espectrometría

Para la identificación y cuantificación de los estilbenos presentes en el medio de cultivo y en las células de Monastrell se utilizó de manera rutinaria un sistema cromatográfico HPLC-DAD de Waters<sup>TM</sup> 600 con bomba binaria, detector de longitud de onda variable (Waters<sup>TM</sup> PDA 996) e inyector manual con loop de 20  $\mu\text{L}$ . Los datos fueron integrados con el programa Empower<sup>TM</sup> 2 de Waters. Se utilizó una columna Spherisorb ODS 2 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). En ciertas ocasiones, también se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent 1100 con automuestreador, desgasificador, columna termostaticada y doble bomba binaria, detector de Diode-Array asociado a espectrometría de masas de trampa iónica (ESI). Las muestras se ionizaron en modo positivo y se midieron en un rango de masa/carga comprendido entre 50-1500.

### 3.4.2.3 Método de HPLC/MS

Los extractos metanólicos procedentes de la extracción de estilbenoides intra- y extracelulares se filtraron utilizando filtros de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  tamaño de poro y 13 mm de diámetro de Membrane-Solutions. Posteriormente se almacenaron en viales ámbar de borosilicato de 2 mL de Labbox.

La fase móvil consistió en un gradiente de ácido acético al 1% (A) y acetonitrilo (B) a una velocidad de flujo de 1 mL/min, tal como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 3.5** Gradiente de los disolventes utilizados para la determinación de *t*-R mediante HPLC.

Tiempo (min)	Acido Acético 1% (A)	Acetonitrilo % (B)
0	85	15
5	80	20
10	65	35
17	10	90
30	65	35
35	85	15

### 3.5 Determinaciones enzimáticas

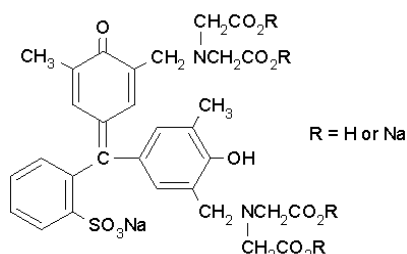
#### 3.5.1 Medida de la actividad peroxidasa en el medio extracelular

Los ensayos cinéticos y las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Kontron-Uvikon modelo 923. Las actividades enzimáticas se expresaron en todos los casos en katalas, unidad que se define como la cantidad de enzima capaz de convertir un mol de sustrato en producto por segundo.

La actividad peroxidasa se determinó en un medio de reacción que contenía tampón acetato sódico 50 mM, pH 5,0 utilizando como sustratos  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$  y 4-metoxi- $\alpha$ -naphthol (4MN) 1.0 mM. La medida de la actividad peroxidasa se realizó mediante la estimación espectrofotométrica directa debida a la aparición de productos coloreados por la oxidación del 4-metoxi- $\alpha$ -naphthol (Ferrer et al. 1990) y se expresó en katalas, siendo el coeficiente de extinción para el 4-MN  $\epsilon_{593}=21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Ferrer et al. 1990). En todos los casos las reacciones enzimáticas se iniciaron mediante la adición de la enzima.

#### 3.5.2 Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno mediante el método del naranja de xilenol

Los niveles del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se midieron mediante el método del naranja de xilenol (3',3''-bis[N,N-bis(carboximetil)aminometil]-*o*-cresolsulfonoptaleina) (Jiang et al. 1990; Wolff 1994; Bellincampi et al. 2000), basado en la oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  mediante el peróxido ( $\text{Fe}^{2+} + \text{ROOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{RO}\cdot + \text{OH}^-$ ), seguido por la detección del  $\text{Fe}^{3+}$  con la sal de sodio del naranja de xilenol. Este método presenta una elevada sensibilidad para detectar niveles bajos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua, siendo el coeficiente de extinción molar de  $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 560 nm.



**Figura 3.1** Sal de sodio del naranja de xilenol

Para determinar la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el cultivo celular se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reactivo (sulfato ferroso amónico  $[(\text{NH}_4)_2 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 mM, naranja de xilenol 200  $\mu\text{M}$  y sorbitol 200 mM) a 500  $\mu\text{l}$  del cultivo tomados en

agitación. Tras un tiempo de incubación de 45 min, se midió la absorbancia del complejo naranja de xilenol-hierro a 560 nm en un espectrofotómetro Kontron-Uvikon modelo 923. Los valores de absorbancia obtenidos se extrapolaron en la recta patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **3.5.3 Determinación del patrón isoenzimático mediante isoelectroenfoque analítico**

La electroforesis se realizó en un sistema MiniProtean III de Bio-Rad. Así, para la preparación de los geles de 1 mm de espesor, se añadieron en un balón de vacío, anfolinas de rango de pH 3.5-10 al 2%, acrilamida/ bisacrilamida (37.5:1) al 6.5 % y glicerol al 5% en agua destilada. El medio resultante se desgasificó durante 10 min, y a continuación se adicionó persulfato amónico (0.1 g/mL) al 0.06%. La disolución se vertió entre los cristales con ayuda de una pipeta y se dejó polimerizar durante 45 min a T<sup>a</sup> ambiente. Tanto las muestras que se analizaron por IEF como las destinadas a SDS-PAGE fueron dializadas previamente con tampón acetato sódico 50 mM (pH 5) durante 24 horas en oscuridad y frío (4°C). Las muestras dializadas se diluyeron con tampón de carga compuesto por glicerol al 3 %, anfolinas al 6 % y agua destilada.

Como marcador se utilizó citocromo C a una concentración de 3 mg/ml.

Como disoluciones de electrodo se utilizaron ácido acético 20 mM para el ánodo e hidróxido sódico 25 mM para el cátodo. Los electrodos se conectaron a una fuente eléctrica (Consort E832) programable en dos etapas, en la primera se aplicó un voltaje de 200 V durante 90 min, y en la segunda, 400 V durante 90 min para el IEF en condiciones de equilibrio, o bien 15 min para el IEF en condiciones de no equilibrio. En ambos casos, la intensidad de corriente fue de 10 mA (1 mA por calle del gel) y la potencia máxima de 150 W. El desarrollo del IEF se realizó a 4 °C.

El revelado se realizó incubando los geles en presencia de 4-metoxi- $\alpha$ -naftol (1 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM) en tampón acetato sódico 50 mM (pH 5.0). Transcurridos 20 min de reacción, los geles se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de reactivos y se fotografiaron.

### **3.5.4 Determinación del patrón de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

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

En primer lugar se preparó el gel separador, compuesto por acrilamida/ bisacrilamida al 10 %, tampón Tris-HCl (1.5 M, pH=8.8) al 25 % y SDS al 0.1 %. La mezcla se desgasificó durante 15 min, tras los cuales se añadió persulfato amónico al 0.05 % y TEMED al 0.15 %. Posteriormente, el medio de polimerización se vertió entre los cristales del mismo sistema MiniProtean III de Bio-Rad utilizado para el IEF y se dejó polimerizar durante 45 min. Antes de comenzar la polimerización se añade un poco de agua sobre el medio de polimerización para la obtención de un buen frente.

El gel concentrador se preparó a partir de acrilamida/ bisacrilamida al 4 %, tampón Tris-HCl (0.5M, pH=6.8) al 25 % y SDS al 0.1 %. Después de desgasificar durante 15 min, se añadió persulfato amónico al 0.08 % y TEMED al 0.2 %. Esta disolución se añadió sobre el gel separador polimerizado, eliminando previamente el agua que lo recubría y dejando polimerizar durante otros 45 min.

Las muestras dializadas se prepararon en tampón de carga y agua destilada (2:1, v/v) y se desnaturalizaron por calentamiento en un baño a 100 °C durante 10 min.

El tampón de carga se preparó al 12.5 % a partir de tampón Tris-HCl (0.5 M a pH 6.8), glicerol al 25 %, SDS al 2 % y azul de bromofenol al 0.01 %.

Como marcador de peso molecular se utilizó un estándar de peso molecular que contenía fosforilasa b (103000 Da), seroalbúmina (77000 Da), ovalbúmina (50000 Da), anhidrasa carbónica (34300 Da), inhibidor de tripsina de soja (28800 Da) y lisozima (20700 Da).

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

Para el revelado, los geles se incubaron durante 30 min en una solución de fijación con etanol puro al 40 % y ácido acético glacial al 10 % en agua destilada. El siguiente paso fue la sensibilización en una disolución de etanol al 30 %, glutaraldehído al 0.125 %, tiosulfato sódico al 0.2 % y acetato sódico al 6.8 %. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 min a los geles con agua destilada y se incubaron durante 20 min, en una disolución que contenía nitrato de plata al 0.25 % y formaldehído al 0.015 %. Se volvieron a lavar los geles 3 veces con agua destilada y se reveló con una disolución que contenía carbonato sódico al 2.5 % y formaldehído al 0.0074 %.

Por último, la reacción se detuvo con EDTA-Na<sub>2</sub> al 1.46 %, conservando los geles en agua destilada hasta el momento de ser fotografiados.

### **3.5.5 Determinación del contenido en proteínas total mediante la utilización del reactivo de Bradford**

Para la medida de la proteína total contenida en el medio extracelular se ha seguido el procedimiento del microensayo de Bio-Rad basado en el método colorimétrico de Bradford (1976), aplicable a muestras de proteínas con una concentración entre 1 y 20 mg, utilizando albúmina de suero bovino (fracción V) como estándar para su valoración.

Las muestras y los estándares se diluyeron con agua destilada en un volumen de 0.8 ml al que se añadieron 0.2 ml del reactivo concentrado. Posteriormente se agitaron y después de 15 min de reacción se tomó lectura de la absorbancia a 595 nm.

Con los valores de absorbancia de la albúmina se realizó la recta patrón y mediante extrapolación en dicha recta, se calculó la concentración de proteína total en las alícuotas de las suspensiones celulares.

### **3.5.6 Microsecuenciación de bandas de proteínas del medio extracelular de suspensiones celulares de Monastrell**

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

Las bandas de interés del gel se recortaron manualmente, se depositaron en placas de 96 pocillos y se procesaron automáticamente en un Proteineer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Para la digestión proteica (Schevchenko et al. 1996), las piezas del gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y se trataron con acetonitrilo. Las proteínas se redujeron con ditioneitol (DDT) 10 mM en bicarbonato amónico 50 mM. La digestión de las proteínas se realizó con tripsina de cerdo modificada (Promega, Madison WI) a una concentración final de 15 ng/μL en bicarbonato amónico 25 mM durante 4 h a 37°C. Los péptidos se eluyeron del gel con ácido trifluoroacético 0.5% en agua durante 30 min a 25 ° C.

- Espectrometría MALDI-TOF/TOF

El espectro de masas se obtuvo mediante análisis automático en un espectrómetro de masas Bruker Reflex IV MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) mediante un software FlexControl 1.1. Los espectros obtenidos se procesaron con el software Xtof 5.1.1 para el análisis de datos obtenidos directamente. Cada espectro se calibró internamente con dos iones de referencia, provenientes de la autólisis de tripsina,

concretamente con los péptidos de 842.510 D y de 2211.105 D, obteniéndose un error medio en la medida de la masa de  $\pm 30$  ppm en el rango entre 800-3000 m/z. Además, todos los contaminantes conocidos se excluyeron durante el proceso. Los parámetros usados para analizar los datos establecieron un umbral de fondo de 20 (relación señal /ruido) y una resolución superior a 4000 (FWHM). Para la identificación de proteínas, las masas de los péptidos trípticos se transfirieron a la interfaz Bio Tools 2.0 (de Bruker Daltonics) para buscar en la base de datos del NCBI nr usando el software Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com); Matrix Science, London, UK). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: carbamidometil cisteína como modificación fija debido al tratamiento con yodoacetamida, metioninas oxidadas como modificación variable, una tolerancia de masa peptídica de 80 ppm y tolerancia de hasta un sitio de ruptura tríptica sin digerir. En todas las identificaciones proteicas, la probabilidad de puntuaciones fue superior a la mínima puntuación establecida como significativa con un valor  $p < 0.05$ .

- Espectrometría de masas ESI

La ionización por electronebulización (Electrospray Ionization, ESI) genera una amplia colección de iones metaestables, fácilmente fragmentables, pero requiere una purificación previa de las muestras por cromatografía capilar de alta resolución (nano-HPLC). La confinación de los iones generados en una trampa iónica y su posterior fragmentación en una cámara de colisión, permite la obtención de información secuencial. Para ello, el primer paso consistió en una digestión de la muestra, la cual se disolvió en 180  $\mu$ L de tampón de digestión compuesto por urea 8 M, bicarbonato de amonio 25 mM, DTT 10 mM. Se incubó a 37°C durante 1 h una alícuota correspondiente a 5  $\mu$ L. Posteriormente, se añadió yodoacetamida a una concentración final de 50 mM y se incubó a Tª ambiente durante 45 min en oscuridad. La muestra se diluyó 5 veces con bicarbonato de amonio 25 mM y se le añadió tripsina recombinante (Roche, Alemania) en una proporción 1:25, incubándose toda la noche a 37° C.

Los péptidos trípticos resultantes se secaron y se disolvieron en tampón ESI (0.5% de ácido acético en agua). La cromatografía líquida del análisis ESI MS/MS se realizó de la siguiente manera: las fracciones se depositaron en una columna de fase reversa C18 de 100 mm x 100  $\mu$ m I.D. (New Objective, Woburn, MA) y se fraccionaron en un sistema cromatográfico Famos-Switchos-Ultimate (LCPackings, Países Bajos) con un gradiente lineal del 5-40 % de tampón ESI B (90 % de acetonitrilo, 0.5 % de ácido acético en agua) a 450 nl/min durante 90 min. Los péptidos eluidos de la columna se

analizaron directamente en un espectrómetro de masas de trampa iónica Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Los espectros de fragmentación MS/MS se obtuvieron mediante conmutación automática entre el modo MS y MS/MS usando exclusión dinámica. Las búsquedas de la base de datos se llevaron a cabo a través de las últimas versiones de las bases de datos NCBI nr y SwissProt usando el software MASCOT (<http://www.matrixscience.com/home.html>).

### **3.5.7 Técnicas bioinformáticas**

#### **3.5.7.1 Búsqueda de secuencias en la base de datos**

Las secuencias de proteínas de diferentes especies vegetales se han contrastado y por homología se han identificado en una de las bases de datos más importantes y comúnmente utilizadas del National Center of Biotechnology (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### **3.5.7.2 Alineamiento de proteínas**

Los alineamientos de las secuencias por homología se llevaron a cabo mediante ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), programa que se encuentra en el portal del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI). ClustalW es un programa de alineamientos de secuencias múltiples para ADN o proteínas. Este programa construye el alineamiento de secuencias múltiples biológicamente significativas a partir de secuencias divergentes. Calcula, mediante algoritmos, el mejor resultado para secuencias relacionadas y las alinea de manera que las similitudes y diferencias entre las secuencias sean fácilmente apreciables (Thompson et al. 1994).

#### **3.5.7.3 Búsqueda de secuencias homólogas**

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

era necesario ampliar la búsqueda, para lo que se disminuyó el umbral, o se quitó el filtro para encontrar un mayor número de secuencias.

### **3.5.8 Extracción de proteínas e identificación mediante label-free**

#### **3.5.8.1 Extracción**

La extracción de las proteínas extracelulares se realizó según Martínez-Esteso et al. (2009). Para ello 30  $\mu\text{g}$  de proteína se digirió con tripsina durante toda la noche (Martínez-Esteso et al. 2009). Los péptidos se limpiaron mediante su paso por una columna PepClean C-18 (Agilent Technologies, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los péptidos extraídos se secaron realizando vacío y se resuspendieron en 0.1% de ácido fórmico a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

#### **3.5.8.2 Análisis de MS y MS/MS**

El análisis de LC-MS/MS se realizó utilizando un sistema Agilent 1100 HPLC-ChipCube/MS Interface acoplado a un espectrómetro de masas Agilent XCTplus Ion Trap equipado con una fuente de nano-ESI. La separación de las muestras se realizó usando un ProtID-Chip-150 (II) que cuenta con una columna de 4 mm y 40 nL de enriquecimiento y una columna de separación analítica de 150 mm x 75  $\mu\text{m}$  (5  $\mu\text{m}$ , ZORBAX 300SB-C18). La cromatografía se realizó con un gradiente lineal de acetonitrilo 5-60% en ácido fórmico con un flujo constante de 0.3  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante 85 min.

Los espectros de MS y MS/MS se adquirieron en el modo standard mejorado (26000  $m/z/s$ ) y en el modo ultrascan (8100  $m/z/s$ ), respectivamente. Los ajustes que se realizaron fueron: potencial de ionización de 1.8 kV y un ICC de 400000 o 150 ms de acumulación. Los espectros de MS/MS se obtuvieron mediante conmutación automatizada con preferencia por los iones con dos cargas, un umbral de 105 y una amplitud de fragmentación de 1.3 V.

#### **3.5.8.3 Análisis mediante label-free de las carreras LC-MS**

Cada uno de los archivos LC-MS generados se convirtió a mzXML para poder ser utilizados por el software de análisis de label-free Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics) v2.5. La cuantificación se realizó en base a la intensidad del pico. La identificación se realizó mediante la búsqueda con Mascot. Las proteínas identificadas



y cuantificadas se filtraron usando un Mascot Score de 60 y un ANOVA p-value < 0.009.

El software Progenesis procesa las carreras en dos pasos, primero realiza el alineamiento y después la normalización. Los archivos con más picos característicos se usaron como referencia, de modo que los tiempos de retención y el resto de medidas se alinearon y las intensidades (área bajo los picos) se normalizaron. La corrección de las variaciones experimentales se llevó cabo mediante el cálculo de la distribución de todos los ratios ( $\log(\text{ratio})$ ).

Una vez que las características se han convertido en una lista de datos de intensidad, se filtran para incluir sólo aquellas que tengan dos o tres cargas, las cuales aparecen en una ventana de tiempo de retención que comprende un rango entre 20 y 60 min. Las listas de intensidad se agruparon de acuerdo a los grupos experimentales (Control, MJ, CDM y CDM+MJ) y los ratios de intensidad media de las características se calculan de forma automática. Para la identificación de proteínas, todos los espectros de MS/MS se lanzaron en una única búsqueda Mascot de la base de datos NCBI nr usando la siguiente configuración: 1 escisión; taxonomía: Viridiplantae; como modificaciones fijas se seleccionaron: carbamidometilación de las cisteínas, desaminación de asparagina o glutamina, oxidación de metionina y de piroglutamato N-terminal de glutamina o glutamato y como modificaciones variables, tolerancia peptídica de 1.2 Da; tolerancia iónica de 0.6 Da; carga peptídica 2<sup>+</sup> y 3<sup>+</sup>.

Cada archivo XML de la búsqueda de resultados se importó a Progenesis LC-MS que asigna identidades de péptidos y proteínas a las correspondientes características. Las identificaciones se filtraron por la aplicación de Mascot con un score superior a 25 y restringiendo la búsqueda al género *Vitis*. Una vez que se determinó a qué proteína pertenecía cada péptido se resolvieron los conflictos de asignación de acuerdo con la puntuación Mascot, o se quedaron sin resolver en caso de tener la misma puntuación, que se correspondería con la misma secuencia. Los datos cuantitativos de proteínas se calculan como el promedio de sus características constitutivas y cuantitativas de los datos normalizados. La calidad de la cuantificación se determina de acuerdo con un ANOVA cuyo p-value se calcula en base a los datos normalizados de las características.

#### **3.5.8.4 Análisis ontológico**

El análisis ontológico de los genes de las proteínas identificadas se realizó utilizando Blast2GO v2.4.037. Para ello, se obtuvo primeramente un archivo de las secuencias

en formato FASTA de secuencias de las proteínas identificadas y/o cuantificadas de la web del NCBI. Los archivos FASTA se cargaron en Blast2GO y se ejecutó en primer lugar para incorporar la descripción de la secuencia mediante la realización de una búsqueda BLASTp contra NCBI nr (e-valor de  $1 \cdot 10^{-50}$ , 100 para el número obtenido de BLAST hits, HSP de 33) y en segundo lugar para mapear los términos GO, CE e Interpro y posteriormente anotar las secuencias (e-valor de  $1 \cdot 10^{-6}$ , HSP-Hit de 0, anotación de corte 55, y un peso GO de 5). La anotación automática realizada por Blast2GO se revisó manualmente para garantizar la asignación precisa.

## 4. Resultados y Discusión



4.1 Caracterización de la producción de *trans*-resveratrol en suspensiones celulares elicidadas de *Vitis vinifera* cv Monastrell



#### 4.1.1 Caracterización del crecimiento de las suspensiones celulares de vid para la producción de biomasa

La determinación del perfil de crecimiento se realizó en suspensiones celulares, previamente estabilizadas a lo largo de los subcultivos, con el fin de determinar con exactitud la duración de las distintas fases del crecimiento. Para ello, se tomaron muestras periódicas desde el inicio hasta los 23 días de cultivo, en las que se midieron parámetros característicos del crecimiento como el VEC y la conductividad del medio del cultivo además del pH.

##### 4.1.1.1 Cinética de crecimiento celular en función del medio mineral: Gamborg B<sub>5</sub> vs Murashige Skoog

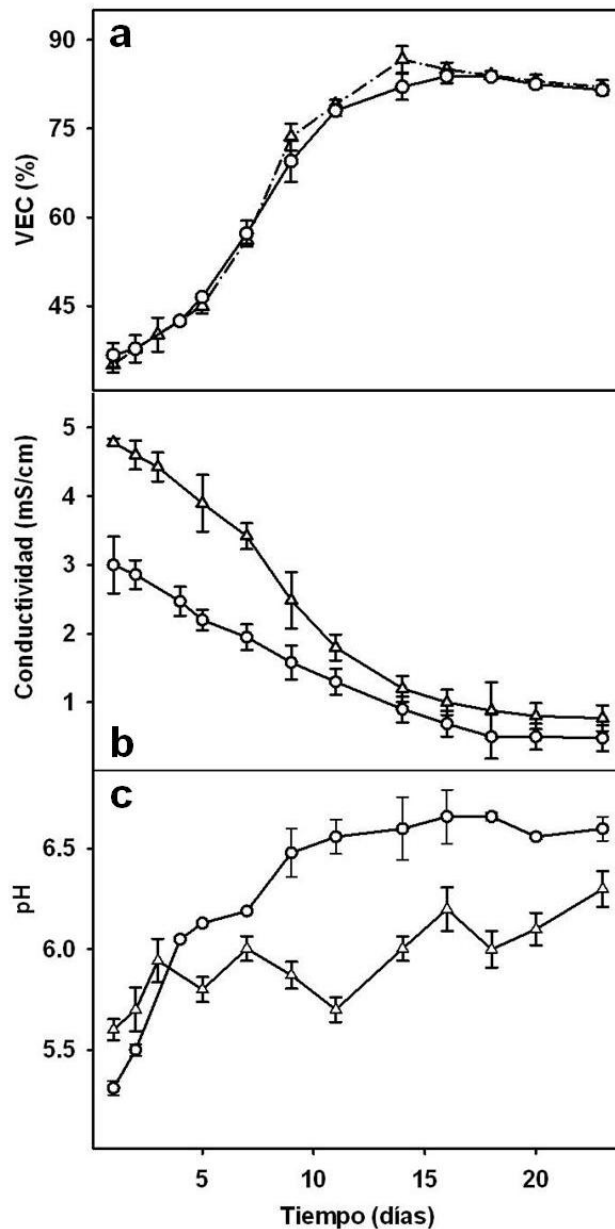
En la Figura 4.1 se muestra la cinética de crecimiento de suspensiones celulares de *V. vinifera* cv Monastrell crecidas en presencia de dos medios minerales distintos GB5 y MS. El medio basal MS es más rico en nutrientes minerales que el medio GB5 sin embargo, como se muestra en la Figura 4.1 a, no se observaron diferencias significativas en el aumento de VEC a lo largo del tiempo, en presencia de cada uno de los medios minerales, alcanzando un VEC máximo del 83% en medio GB5 y del 86 % en MS. Asimismo, se observó que el tiempo de agotamiento de los nutrientes se producía entre los días 14 y 15.

En la Figura 4.1 b se muestra la variación de la conductividad durante el crecimiento celular a lo largo del tiempo. Como puede apreciarse existe una tendencia inversa al crecimiento debido al consumo de los iones del medio. En el caso del medio MS, la conductividad inicial es de 5 mS/cm mientras que en el medio GB5 es de 3 mS/cm, en ambos casos se produce un descenso de la conductividad que es más acusado en el medio MS que en GB5.

En la Figura 4.1 c se representa la variación del pH del medio durante el crecimiento celular a lo largo del tiempo. En ambos medios de cultivo, el pH se ajustó inicialmente a 6.0 y a continuación, se observó una disminución del pH hasta 5.3 en el medio GB5 y 5.6 en el medio MS a las 24 h siguientes del inicio del experimento. Sin embargo, a partir del día 1 cambió esta tendencia, observándose un aumento continuo del pH hasta el día 9, en el caso del medio GB5, manteniéndose constante a partir de ese momento. Del mismo modo, se produjo un aumento del pH en el medio MS pero sólo hasta el día 3, observándose ligeras oscilaciones de pH alrededor de 6.0, el resto del tiempo. Esta variación del pH no sólo depende de la disponibilidad de las fuentes

nitrogenadas sino también del estado energético de las células (presencia de cofactores reducidos).

Como los resultados de la cinética del crecimiento celular no mostraron diferencias significativas, se decidió proseguir con los estudios de caracterización del crecimiento con el medio GB5 ya que posee un menor contenido mineral lo que resulta más propicio para la producción de metabolitos secundarios.



**Figura 4.1** Parámetros cinéticos de crecimiento de suspensiones celulares de *Monastrell albina*, crecidas en dos medios minerales (GB5 y MS). Los círculos blancos representan los datos registrados con la línea celular crecida en GB5 y los triángulos blancos, los de la línea crecida en MS.



#### 4.1.1.2 Cinética del crecimiento celular en medio Gamborg B<sub>5</sub> a diferentes concentraciones de sacarosa

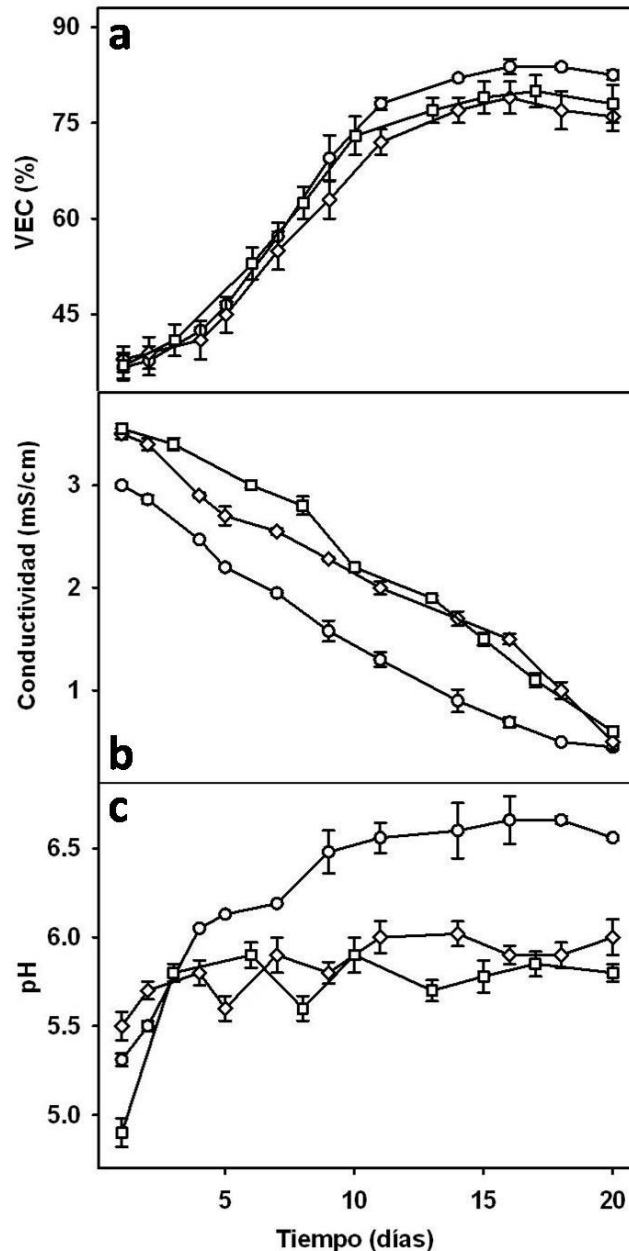
La caracterización del crecimiento en relación al medio GB5 con distintas concentraciones de sacarosa (10, 15 y 20 g/L) se muestra en la Figura 4.2. En ella se aprecian las diferentes curvas de crecimiento, de tipo sigmoidal, y dependientes de la concentración de sacarosa que contiene el medio de cultivo. Así, los cultivos celulares crecidos en 20 g/L de sacarosa alcanzaron una biomasa máxima del 83% mientras que los crecidos en 15 y 10 g/L de sacarosa no sobrepasaron el 80% aunque no se observaron diferencias significativas entre ellas. Tampoco se observaron cambios significativos en el  $T_a$  que se situó entre los días 14-15.

**Tabla 4.1** Parámetros cinéticos para la determinación del crecimiento de suspensiones celulares de *Monastrell*.

Medio de cultivo	Fuente carbonada (g/L)	Inóculo inicial (g/L)	VECmax (%v/v)	Vexp	Rendimiento biomasa ( $\Delta$ VEC/g sacarosa)
GB5	10	200	79	5.2	1.93
	15	200	80	5.6	1.86
	20	200	84	6.7	1.78

A la vista de los resultados cinéticos expresados en la Tabla 4.1, no se observaron diferencias significativas en el rendimiento de biomasa ni en la Vexp con los distintos tratamientos, por lo que estas variaciones de los parámetros cinéticos en el contenido de azúcares no modificaron sustancialmente la producción de biomasa celular.

El aumento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo tiene un efecto positivo sobre la Vexp y la biomasa máxima (VECmax), ya que éstas aumentan conforme se incrementa la concentración de sacarosa (Tabla 4.1). En estas condiciones de disponibilidad de sacarosa se favorece el metabolismo primario de las células que conduce a su crecimiento y a la proliferación celular mientras que el metabolismo secundario, al que está asociada la biosíntesis de *t-R*, se ralentiza. El efecto negativo de la fuente carbonada sobre la producción de *t-R* se explica si se tiene en cuenta que la sacarosa es un sustrato fácilmente metabolizable por las células vegetales crecidas en condiciones heterótrofas y que, por tanto, favorece los procesos del metabolismo primario relacionados con la incorporación de carbono y la obtención de energía a partir de la hidrólisis de la sacarosa.



**Figura 4.2** Cinética de crecimiento de suspensiones celulares de *Monastrell* crecidas en medios de cultivo con distintas concentraciones de sacarosa. Las líneas crecidas con 20, 15 y 10 g/L de sacarosa, se han representado con círculos, cuadrados y rombos, respectivamente.

La conductividad del medio GB5 (Figura 4.2 b) muestra una variación inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento. La conductividad del medio está directamente relacionada con la concentración de iones en el medio. Por tanto, se observa que, cuando las células están en la fase de mayor actividad metabólica (fase exponencial) consumen una mayor cantidad de nutrientes minerales disminuyendo enormemente su concentración en el medio de cultivo. Sin embargo, durante la fase

“lag” y “estacionaria”, el metabolismo primario está reducido, por lo que las variaciones de la conductividad son también menores.

En la Figura 4.2 c se muestra la variación del pH del medio de cultivo de suspensiones celulares de *V. vinifera* cv Monastrell a lo largo del tiempo. La primera muestra se tomó a las 24 h de transferir el material vegetal a medio fresco. A partir de este momento, se produce una subida del pH que se mantiene, con ligeras oscilaciones, en los medios de cultivo que contienen 10 ó 15 g/l de sacarosa mientras que, en los que contienen 20 g/L de sacarosa, la subida del pH es ligeramente mayor y sostenida a partir del día 9 del cultivo. El pH está condicionado por el metabolismo celular que, en el caso de las células cultivadas *in vitro*, dependerá principalmente, de la composición del medio de cultivo. El consumo de nutrientes y, concretamente, el consumo de las fuentes nitrogenadas modifican el pH del medio a lo largo de la curva de crecimiento.

Las células vegetales cultivadas *in vitro* utilizan aquella fuente nitrogenada cuya incorporación les reporte un menor coste energético. Sin embargo, la incorporación de nitrógeno no sólo depende del coste energético para la planta, sino también de la relación de concentraciones de sales de amonio y de nitratos del medio de cultivo (Loulakakis y Roubelakis-Angelakis 2001), e incluso, de la disponibilidad, por parte de la célula, de moléculas capaces de reducir los nitratos y nitritos hasta amonio, lo cual, está directamente relacionado con la utilización de la fuente carbonada para la obtención de energía.

En el medio GB5 se encuentra una mayor disponibilidad de nitratos que de iones amonio. A este hecho hay que añadir que las células en suspensión están creciendo en condiciones heterótrofas, obteniendo la energía a partir de la oxidación de la sacarosa, generando intermedios respiratorios más simples y poder reductor. De este modo, empiezan consumiendo primero los nitratos debido a la mayor disponibilidad de aquellos y a que las células poseen suficiente poder reductor para reducir los nitratos a iones amonio. El consumo de nitratos contribuye al aumento del pH del medio como consecuencia del consumo de protones para la reducción de los nitratos hasta amonio. En un determinado momento, comienzan a utilizar las sales de amonio, probablemente porque las concentraciones de nitratos y sales de amonio se equilibran y a las células les resulta más eficaz incorporar el amonio. Es entonces cuando se produce un ligero descenso del pH ya que la entrada en la célula de iones amonio va acompañada de la salida de protones.

#### 4.1.2 Caracterización de la producción extracelular de *trans*-resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell

##### 4.1.2.1 Estudio comparativo de los distintos tipos de ciclodextrinas para incrementar la producción de *trans*-resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell

El efecto de diferentes tipos de CD, tanto de origen natural como sintéticas, para estimular la producción de *t*-R en suspensiones celulares de vid se muestra en la Tabla 4.2. La concentración de CD que se empleó para este ensayo fue de 50 mM con la finalidad de que actuaran como inductoras y secuestradoras de *t*-R, excepto en el caso de la CD natural, que se utilizó a una concentración de 15 mM debido a que su máxima solubilidad en agua a 25°C es 18 mM.

**Tabla 4.2** Capacidad de los diferentes tipos de CD para inducir la producción de *t*-R en suspensiones celulares de vid. Nd: no detectado. \*CD natural que se utilizó a una concentración de 15 mM.

Tipo de CD	g/L de CD en el medio	<i>t</i> -R g/L	
		Gamay	Monastrell
Sin CD	0	Nd	Nd
CDM	66.5	1.53±0.07	1.68±0.06
CDH	69.0	0.50±0.03	0.38±0.05
G2-CD	72.8	0.20±0.02	0.33±0.02
Sulfo-CD	92.6	Nd	Nd
CD*	17.0	0.02±0.00	0.03±0.00

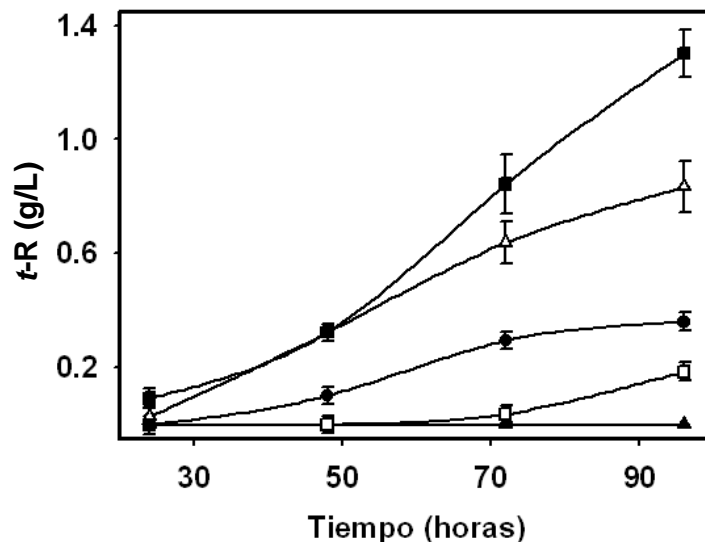
Como se muestra en la Tabla 4.2, las CDM fueron las que dieron lugar a los valores de producción de *t*-R más altos tanto en el cv Monastrell como en Gamay, en comparación con los datos de producción obtenidos con CDH. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ambas líneas celulares con ninguno de los tratamientos. Por otra parte, la CD natural ramificada G2-CD también fue capaz de inducir la síntesis de *t*-R aunque en menor medida que las sintéticas CDM y CDH. Por último, la sulfo-CD resultó ser tóxica para las células a la concentración ensayada (50 mM).

En las dos líneas celulares se detectó como producto mayoritario el *t*-R y la aparición del isómero *c*-R se produjo en la línea celular Gamay ya que en la línea Monastrell se acumulaba sólo el isómero *trans*. Este hecho se debe a que la enzima responsable de la síntesis del resveratrol (estilbeno sintasa) da lugar al isómero *trans* y su transformación en *cis* se debe a un proceso de fotoisomerización (Bru et al. 2006). Por tanto, la aparición de formas *cis* en el cultivar Gamay se debe a que su crecimiento se

realiza en condiciones de fotoperíodo mientras que la línea celular Monastrell se crece en oscuridad.

#### 4.1.2.2 Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar

Debido a los excelentes resultados obtenidos en el ensayo anterior con CDM, se decidió estudiar el efecto que tendría sobre la producción de *t*-R, la adición de distintas concentraciones de CDM. Los ensayos de elicitación se realizaron al inicio de la fase estacionaria ya que el modelo de producción de metabolitos secundarios más extendido es aquel en el que el cese de la actividad proliferativa celular conduce a una diferenciación bioquímica del cultivo (Mantell y Smith 1983).



**Figura 4.3** Acumulación extracelular de *t*-R a lo largo del tiempo en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con distintas concentraciones de CDM (5, 10, 25, 50 mM). Control: triángulos negros; CDM 5 mM: cuadrados blancos; CDM 10 mM: círculos negros; CDM 25 mM: triángulos blancos; CDM 50 mM: cuadrados negros.

Para averiguar el efecto de la concentración de CDM sobre la producción de *t*-R, las suspensiones celulares de Monastrell se incubaron en presencia de distintas concentraciones de CDM (5, 10, 25 y 50 mM) durante 96 horas. Como se aprecia en la Figura 4.3, los cultivos control (sin CDM) no acumulaban *t*-R, mientras que, en presencia de CDM, la producción de *t*-R aumenta conforme se incrementa la concentración de CDM. De hecho, incluso a las concentraciones más bajas de CDM se produce acumulación de *t*-R, de manera que éste se incrementa de manera progresiva hasta las 96 horas de tratamiento. Durante todo este tiempo el medio de cultivo permanecía transparente y sin turbidez ni precipitación de partículas, incluso en

los casos de mayor acumulación de *t*-R, lo cual implica un aumento de la solubilidad del *t*-R en el medio GB5 debido a la presencia de las CD que forman complejos de inclusión aumentando la solubilidad del *t*-R en medios acuosos.

La concentración de CDM que dio lugar a los valores de producción más elevados fue la de 50 mM siendo éstos significativamente diferentes al resto de concentraciones ensayadas, por lo que los ensayos posteriores con CDM se realizaron a esta concentración.

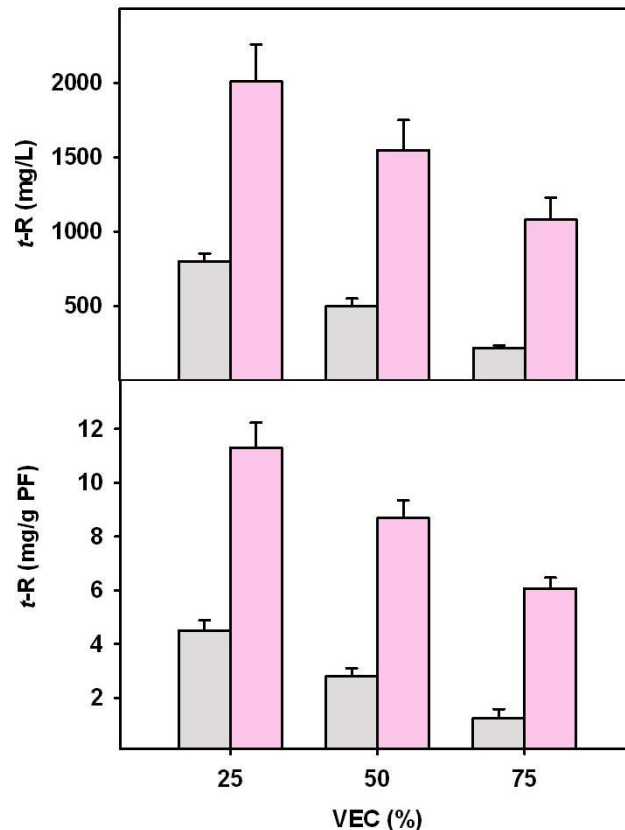
#### **4.1.2.3 Elicitación de suspensiones celulares de Monastrell con ciclodextrinas metiladas al azar solas o en combinación con jasmonato de metilo, a distintos volúmenes de empaquetamiento celular**

El objetivo de estos ensayos era determinar cuál era la densidad celular más adecuada para la producción de *t*-R, utilizando como parámetro de medida el VEC. Dicho parámetro está directamente relacionado con la cantidad de biomasa por volumen de suspensión celular total (densidad celular).

En la Figura 4.4 se observan los valores tanto de productividad (*t*-R mg/g PF) como de producción (mg/L) de suspensiones celulares de Monastrell tratadas con CDM. La cantidad de *t*-R secretado al medio por las células varía de forma inversa al VEC, ya que con un VEC del 25% (4.5 mg/g PF), la productividad es 1.6 veces mayor que cuando se utiliza un VEC del 50% (2.8 mg/g PF) y 3.7 veces mayor que cuando el VEC es del 75% (1.2 mg/g PF). Un comportamiento similar se observa cuando se analizan los resultados en mg/L, ya que la concentración de *t*-R producido por las suspensiones celulares aumenta conforme el VEC disminuye. Estas diferencias en los niveles de producción de *t*-R en función de las diferentes densidades celulares ensayadas, aunque no son muy elevadas, son significativamente diferentes y sugieren que, para obtener una producción de *t*-R máxima, habría que trabajar a baja densidad celular, lo cual haría el proceso de escalado y paso a biorreactores convencionales inviable, ya que su producción industrial no sería económicamente rentable.

Debido a que los complejos de inclusión que forman las CDM con el *t*-R son de tipo 1:1 (Morales et al. 1998), la producción de *t*-R, en cualquiera de estas fases, se podría incrementar aun más ya que la concentración de *t*-R máxima producida se encuentra muy por debajo de la concentración de CD añadida (66.5 g/L). Está bien establecido que el uso combinado de diferentes elicitores puede mejorar la producción de metabolitos en multitud de cultivos celulares (Zhao et al. 2000). Por tanto, una manera de incrementar la producción sería la adición de un segundo elicitador. De esta manera,

la cantidad de *t*-R producida por las suspensiones celulares con alto y medio VEC se incrementaría rellorando las CD que quedan vacías. Existen numerosos estudios que demuestran que el MJ está implicado en la señalización local y sistémica del estrés biótico y abiótico (Turner et al. 2002), así como en la regulación de procesos fisiológicos y expresión de genes. Asimismo, se sabe que la adición exógena de jasmonatos desencadena respuestas de defensa a estrés, entre las que se incluyen la biosíntesis de fitoalexinas (Farmer et al. 1992).



**Figura 4.4** Acumulación extracelular de *t*-R en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM solas o en combinación con MJ a distintas densidades celulares. Se han representado tanto la producción (mg/L) como la productividad de *t*-R (mg/g PF). En color gris CDM y en rosa CDM+MJ.

Para comprobar esta hipótesis se realizó un estudio de la producción de *t*-R en relación a la biomasa celular en suspensiones celulares elicidadas con CDM y MJ, como segundo elicitor. Estudios realizados por otros autores (Gunlach et al. 1992; Mizukami et al. 1993; Ketchum et al. 1999; Sanchez-Sampedro et al. 2005) mostraron que la concentración de MJ óptima para la inducción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de distintas especies vegetales era de 100  $\mu$ M, por lo que se decidió trabajar a esta concentración.

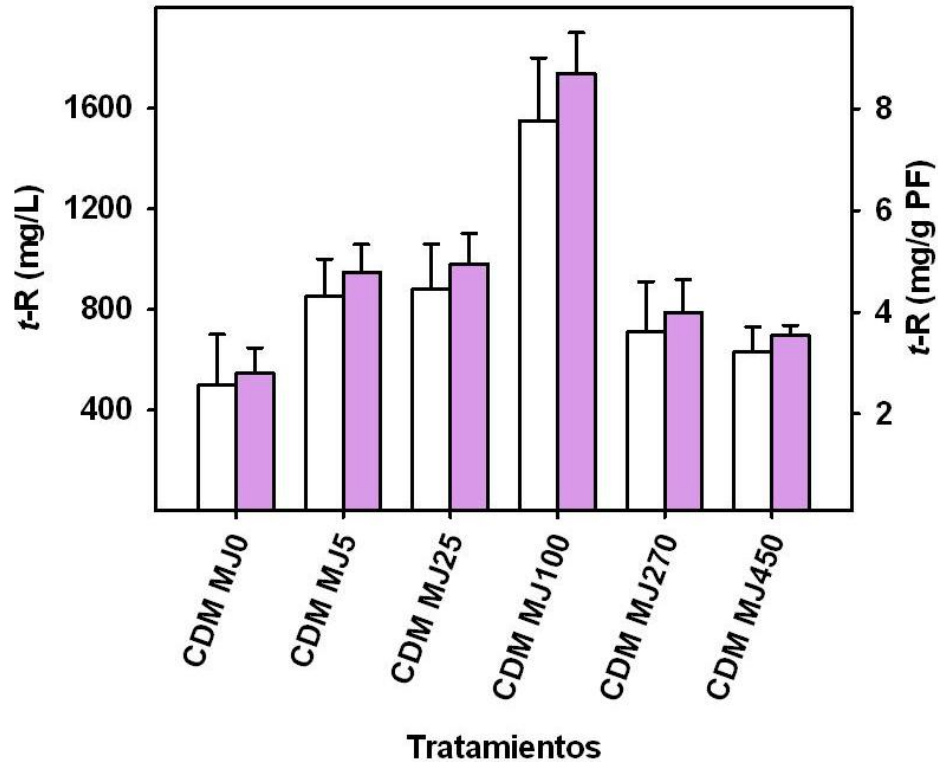
En la Figura 4.4 se muestra la producción y productividad de *t*-R en función del aumento de densidad celular en presencia de CDM y MJ. Los valores de producción observados utilizando un VEC del 50% fueron 1.4 veces inferiores a los observados con un VEC del 25%. En cuanto a la producción de *t*-R con un VEC del 75% resultó ser entre 1.3 y 1.9 veces inferior que cuando se utilizan VEC del 50 y del 25%, respectivamente. La utilización de una densidad celular correspondiente a un VEC del 75% no es viable en biorreactores debido a problemas de aireación y agitación que requiere el sistema de producción. Una alta densidad celular incrementaría la viscosidad de la suspensión celular, reduciendo, de forma significativa, la eficiencia de la transferencia de oxígeno en biorreactores. Una forma tradicional de aumentar la transferencia de oxígeno es aumentando la velocidad de agitación y/o la aireación. Sin embargo, estas estrategias, presentan limitaciones como el daño celular debido a estrés causado por el efecto cizalla de las paletas agitadoras y la reducción de la productividad debido a la evaporación de volátiles esenciales (Thanh et al. 2006). Debido al elevado incremento en la producción de *t*-R que supuso la introducción de un segundo elicitor (MJ) se procedió a la optimización de la concentración de MJ utilizando una densidad celular intermedia.

#### **4.1.2.4 Elicitación de suspensiones celulares de *Monastrell* a densidad celular intermedia con ciclodextrinas metiladas al azar y diferentes concentraciones de jasmonato de metilo**

Como se observa en la Figura 4.5, la combinación de CDM y MJ, a densidad celular intermedia y a distintas concentraciones de éste último elicitor, provocó un aumento significativo de la biosíntesis de *t*-R, incluso a las concentraciones de MJ más bajas ensayadas. El pico de productividad máxima se observó en las suspensiones celulares que contenían 50 mM de CDM y 100  $\mu$ M de MJ, siendo ésta 3.1 veces superior al tratamiento sólo con CDM. Los tratamientos con CDM en presencia de 5 y 25  $\mu$ M de MJ superaron 1.7 veces el tratamiento solo con CDM. Cuando se utilizaron concentraciones superiores de MJ (270 y 450  $\mu$ M) combinadas con CDM (50 mM), la producción de *t*-R observada fue del mismo orden que en los tratamientos realizados sólo con CDM (Figura 4.5). El efecto de la adición de MJ, a concentraciones elevadas, sobre la producción de *t*-R no se debió a un efecto tóxico del etanol requerido para la disolución del MJ. Sin embargo se observó una disminución del crecimiento expresado en pérdida de PF recogido al final del experimento (Figura 4.5). Esta disminución del PF se manifiesta tanto cuando las células se cultivan en presencia de MJ solo o en



combinación con CDM. Además, en los experimentos control realizados en presencia de MJ y ausencia de CDM, no se detectó producción de *t*-R (datos no mostrados). Por lo tanto, el efecto de la adición conjunta de MJ y CD sobre la producción de *t*-R no se debe a un efecto aditivo sino a un efecto sinérgico de ambos elicitores.

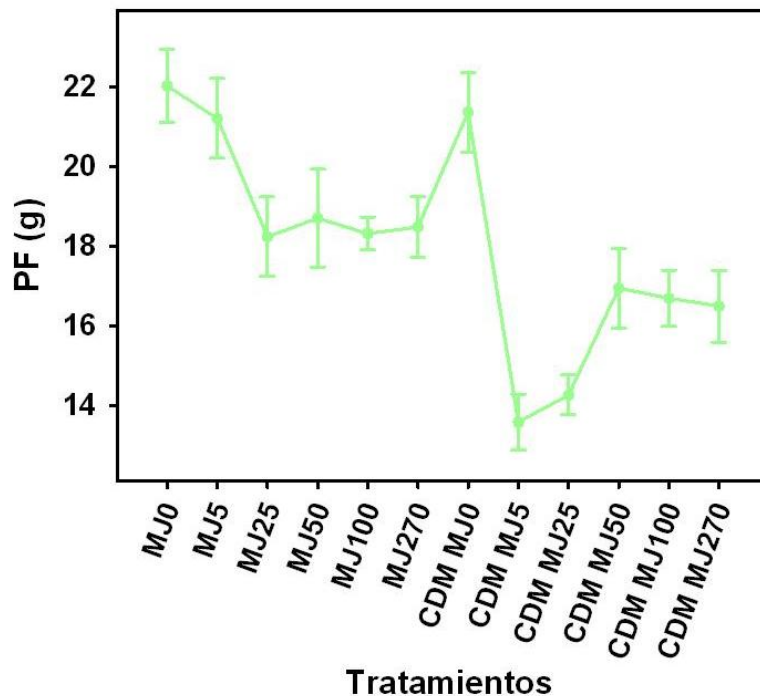


**Figura 4.5** Producción de *t*-R en suspensiones celulares de *Monastrell albina* elicitadas con CDM y diferentes concentraciones de MJ. Las barras blancas representan la producción (mg/L) y en barras violetas la productividad (mg/g PF) de *t*-R.

#### 4.1.2.5 Efecto de la adición de ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo sobre la biomasa celular

Para determinar el efecto que produce la adición de los elicitores ensayados sobre el crecimiento celular se partió de un peso fresco inicial de 20 g de células en 100 mL de medio de cultivo. Transcurridas 96 horas, las células se pesaron y se observó un aumento del crecimiento, expresado en PF, tanto en las células control como en las tratadas con MJ, a la concentración más baja (5  $\mu$ M) así como en aquellas tratadas sólo con CDM, no existiendo diferencias significativas entre estos tratamientos. En los tratamientos con MJ a las concentraciones de 25 y 50  $\mu$ M no se produjo aumento del crecimiento pero tampoco disminución del PF. Sin embargo, cuando se utilizan concentraciones superiores de 100  $\mu$ M MJ se producía una disminución del PF. Por

último, en todos los tratamientos combinados de CDM y MJ se produjo un descenso muy brusco del PF, incluso a las concentraciones más bajas de MJ.



**Figura 4.6** Efecto de la adición de distintas concentraciones de MJ sobre el crecimiento de suspensiones celulares de Monastrell en presencia y ausencia de 50 mM de CDM.

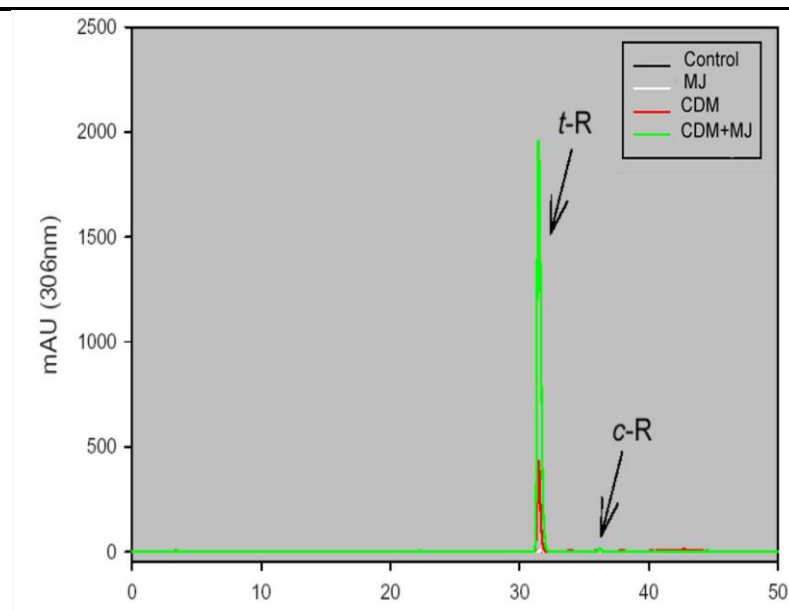
#### 4.1.2.6 Estudio temporal de la producción de *trans-resveratrol* en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo

El análisis de la producción de *t*-R a lo largo del tiempo se realizó tomando muestras periódicamente hasta las 288 h. En la Figura 4.7 se muestra el cromatograma de los estilbenoides procedentes del medio extracelular a tiempo final (288 h) de suspensiones celulares de Monastrell, tanto en condiciones control como elicidadas. En la Tabla 4.3 sólo se muestran los resultados de los tratamientos de las suspensiones celulares elicidadas con CDM y con la combinación de éstas con MJ, ya que ni en los tratamientos control ni en los de MJ se observó producción de *t*-R. Sin embargo, Donnez et al. (2011) obtuvieron 150 mg/L de *t*-R utilizando la línea celular 41B elicitada durante 96 h con 200  $\mu$ M MJ. En los tratamientos con CDM solas o en combinación con MJ se observó una acumulación continua de *t*-R incrementándose en el tiempo hasta hasta el final del experimento. La producción máxima de *t*-R observada a las 168 h fue 4 veces superior a la producida en presencia de CDM solas en ese

mismo tiempo. La productividad (mg/L/día) de *t*-R más elevada en ambos tratamientos (CDM solas o en combinación con MJ) se produjo a las 72 h, coincidiendo con la máxima expresión del gen de la estilbeno sintasa 1 (Lijavetzky et al. 2008).

**Tabla 4.3** Acumulación de *t*-R en el medio de cultivo a lo largo del tiempo en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas en medio GB5 con CDM en presencia y/o ausencia de MJ

Duración del tratamiento (Horas)	CDM	CDM+MJ	CDM	CDM+MJ
	Producción <i>t</i> -R (mg/L)		Productividad <i>t</i> -R (mg/L/día)	
4	2.1 ± 0.3	9.0 ± 0.1	-	-
24	127.6 ± 0.1	325.2 ± 3.9	127.6 ± 0.1	325.2 ± 3.9
72	499.5 ± 9.9	1403.9 ± 3.1	166.5 ± 3.3	467.9 ± 1.0
96	539.3 ± 9.7	1542.7 ± 8.1	134.8 ± 2.4	385.7 ± 2.0
120	522.2 ± 8.1	2032.9 ± 8.8	104.4 ± 1.6	406.6 ± 1.8
144	646.9 ± 2.1	2686.4 ± 9.5	107.8 ± 0.4	447.7 ± 1.6
168	737.0 ± 4.6	3047.6 ± 9.4	105.3 ± 0.7	435.4 ± 1.3



**Figura 4.7** Cromatograma de los estilbenoides procedentes del medio extracelular de suspensiones celulares de *Monastrell*. Se ha representado tanto el tratamiento control (negro) como en las elicidadas con MJ (blanco), CDM (rojo) y CDM+MJ (verde), transcurridas 168 h de tratamiento.

Zamboni et al. (2006) analizaron las variaciones en los niveles de *t*-R en cuatro genotipos diferentes de *Vitis*, en respuesta a la elicitación con CDM. De este modo, los cultivos celulares obtenidos del cruce entre *V. riparia* x *V. berlandieri* y *V. amurensis*

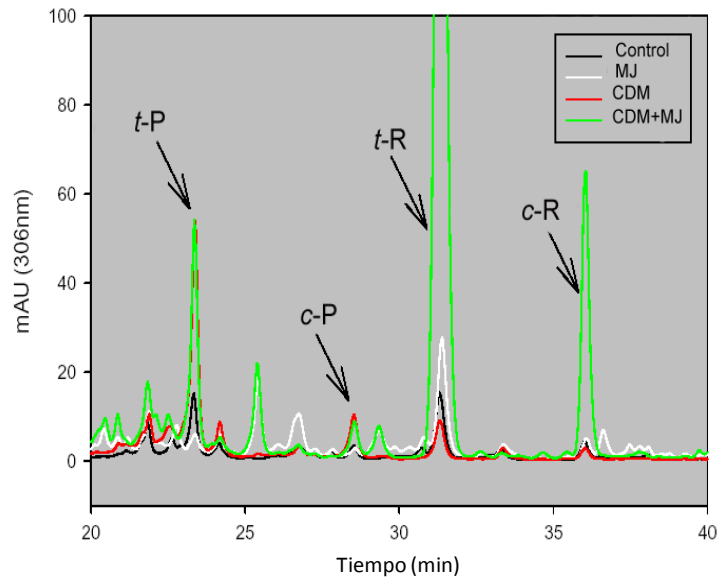
producían niveles de *t*-R superiores (911.3 y 225.2 mg/L, respectivamente) que los obtenidos en Pinot noir (0.51 mg/L) o Merzling (4.3 mg/L) tras 48 h de tratamiento. Los resultados obtenidos por estos autores fueron similares a los obtenidos en Monastrell ya que, la productividad de *t*-R en cultivos celulares de *V. riparia* x *V. berlandieri* fue de 455.6 mg/L/día y en Monastrell fue de 467.9 mg/L/día de *t*-R. Las diferencias en los niveles de *t*-R en los diferentes genotipos de *Vitis* podrían estar relacionadas con los diferentes niveles de respuestas de defensa. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la selección de líneas celulares altamente productoras.

#### 4.1.2.6.1 Caracterización de la producción intracelular de estilbenoides en cultivos celulares de Monastrell elicitados con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo

En la Figura 4.8 se muestran los estilbenos presentes en el interior de las células de Monastrell tanto control como elicitados durante el máximo tiempo ensayados (168 h). El análisis cromatográfico de las muestras reveló que la concentración intracelular de *t*- y *c*-R fue considerablemente menor (Tabla 4.4) que la detectada en el medio extracelular (Tabla 4.3). Sin embargo, en ambos casos el estilbeno mayoritario detectado fue *t*-R y el tratamiento que condujo a un mayor incremento fue la combinación de CDM+MJ.

**Tabla 4.4** Producción de estilbenos (expresado en  $\mu\text{g/g}$  PF) en células de *V. vinifera* elicitadas con CDM (50 mM) y MJ (100  $\mu\text{M}$ ) solas o en combinación, transcurridas 168 horas de tratamiento. Los valores representados son las medias  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

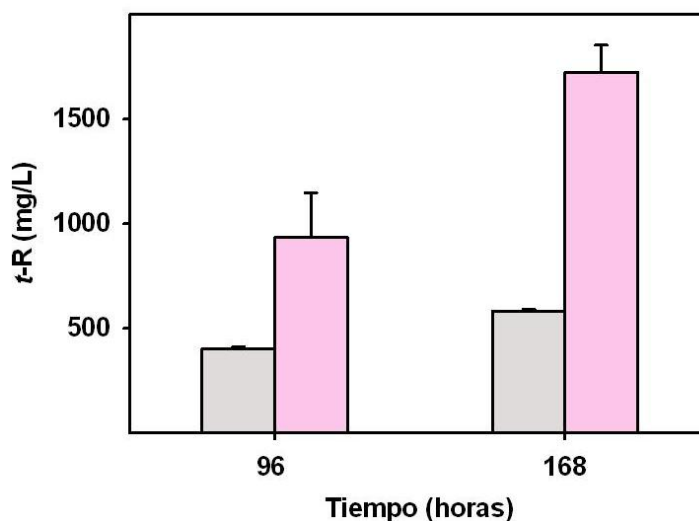
	CONTROL	MJ	CDM	CDM+MJ
<i>trans</i> -piceída	1.170 $\pm$ 0.210	0.488 $\pm$ 0.058	5.188 $\pm$ 1.794	4.135 $\pm$ 0.546
<i>cis</i> -piceída	0.330 $\pm$ 0.058	0.273 $\pm$ 0.058	1.404 $\pm$ 0.274	0.799 $\pm$ 0.175
<i>trans</i> -resveratrol	0.456 $\pm$ 0.125	1.015 $\pm$ 0.465	0.319 $\pm$ 0.205	24.624 $\pm$ 8.322
<i>cis</i> -resveratrol	0.114 $\pm$ 0.159	0.194 $\pm$ 0.068	0.148 $\pm$ 0.011	3.328 $\pm$ 0.239



**Figura 4.8** Cromatograma de los estilbenoides intracelulares de *Monastrell* tanto en células control (negro) como en las elicidadas con MJ (blanco), CDM (rojo) y CDM+MJ (verde), transcurridas 168 horas de tratamiento.

#### 4.1.2.7 Efecto del medio mineral basal sobre la producción de *trans-resveratrol* en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo

En la Figura 4.9 se muestra la producción de *t-R* acumulada en el medio de cultivo por suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM solas o en combinación con MJ después de 96 y 168 h de estimulación utilizando el medio MS, como medio mineral basal para la elicitación. La producción de *t-R* detectada en el medio MS de los cultivos elicidados durante 96 h con CDM ( $400 \pm 10$  mg/L) fue similar a la obtenida en el medio GB5 ( $540 \pm 20$  mg/L, Tabla 4.3). Esta similitud se mantiene a las 168 h aunque la producción de *t-R* ligeramente superior en el medio MS ( $737 \pm 5$  mg/L) que en el GB5 ( $539 \pm 10$  mg/L, Tabla 4.3). Sin embargo, en los tratamientos combinados se observaron valores de producción de *t-R* superiores en el medio GB5 ( $1542 \pm 8$  mg/L, Tabla 4.3) que en el MS ( $933 \pm 212$  mg/L) a las 96 h de tratamiento. Esta diferencia en la producción de *t-R* se mantiene a las 168 h de tratamiento ya que dicha producción en medio MS fue de  $1720 \pm 130$  mg/L, mientras que en el medio GB5 alcanzó los  $3050 \pm 10$  mg/L (Tabla 4.3).

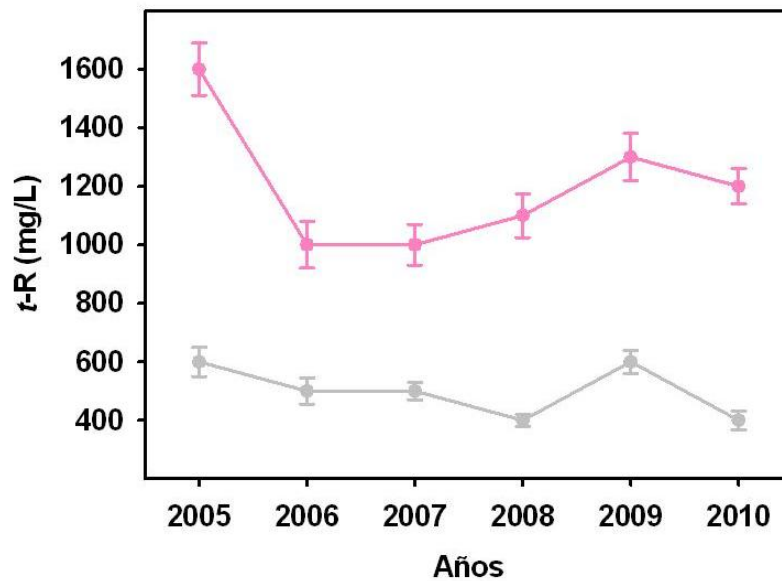


**Figura 4.9** Producción de *t*-R en suspensiones celulares de Monastrell elicidas en medio de cultivo MS con CDM solas (gris) o en combinación con MJ (rosa).

#### 4.1.2.8 Variación anual de la producción de *trans-resveratrol* en suspensiones celulares de Monastrell elicidas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo

La línea celular Monastrell establecida en cultivo *in vitro* desde 1990 (Apartado 3.1.1 de Materiales y Métodos), a pesar de ser una línea altamente productora de *t*-R ha sufrido variaciones en la producción extracelular de este metabolito a lo largo de los años.

Como se observa en la Figura 4.10 entre los años 2005 y 2006 se produjo el mayor descenso en la producción de *t*-R siendo 1.6 veces en el tratamiento con CDM y de 2.5 veces en el de CDM+MJ. Entre los años 2006 y 2008 se observó una leve tendencia al aumento de la producción pero que no llegó a ser significativamente diferente entre estos. La producción media de *t*-R en el año 2009 fue la mayor registrada desde 2006, siendo significativamente diferente a los años 2006 y 2007 y no observándose diferencias con los años 2008 y 2010. Se ha observado una tendencia a la estabilización de la producción anual de *t*-R siempre que se renueven las suspensiones celulares cada año y se mantengan constantes las condiciones de elicitación.



**Figura 4.10** Variación anual de la producción de *t-R* en suspensiones celulares elicidadas durante 96 horas con CDM separadamente (gris) o en combinación con MJ (rosa).

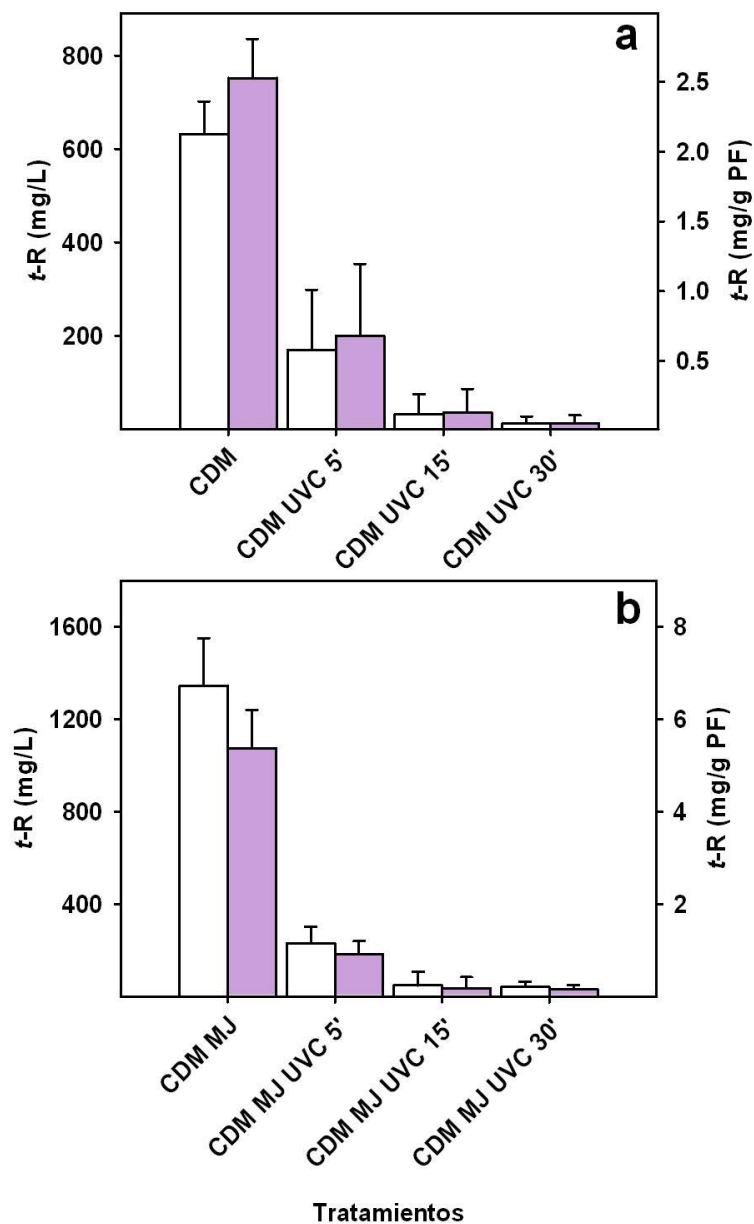
#### 4.1.2.9 Efecto de la luz UV-C y UV-A sobre la producción de *trans-resveratrol* en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo

La luz UV se ha considerado un elicitor físico que induce la biosíntesis de estilbenos en vid (Douillet-Breuil et al. 1999; González-Barrio et al. 2006). Por este motivo, se estudió el efecto de la exposición de las suspensiones celulares de *Monastrell* a la luz UV-A y C en presencia de CDM solas o en combinación con MJ.

Las suspensiones celulares expuestas a la luz UV-C en presencia o ausencia de MJ dieron lugar a una acumulación extracelular de *t-R* insignificante (prácticamente cero, datos no mostrados) en comparación con la acumulación producida en los tratamientos que contenían CDM.

Las suspensiones celulares tratadas con CDM y MJ seguidas de exposiciones cortas o largas a la luz UV-C dieron lugar a niveles más bajos de *t-R* (5 y 30 min,  $1.14 \pm 0.36$  y  $0.20 \pm 0.03$  mg/g PF, respectivamente) que las no expuestas a luz UV-C ( $6.72 \pm 1.03$  mg/g PF), por lo que el efecto de la luz UV-C era claramente perjudicial para la producción de *t-R*. De hecho, exposiciones prolongadas a la luz UV-C de 15 y 30 min o incluso 120 min (datos no mostrados) daban lugar a una reducción drástica de la acumulación extracelular de *t-R* aunque no se observó pardeamiento de los cultivos en ninguno de estos tratamientos. Datos muy similares se observaron cuando las suspensiones celulares tratados con CDM solas fueron expuestas a la luz UV-C. Solo

el tratamiento CDM no irradiado con luz UV-C mostró diferencias significativas (3.1 mg/g PF), respecto a su homólogo no expuesto (CDM+MJ).

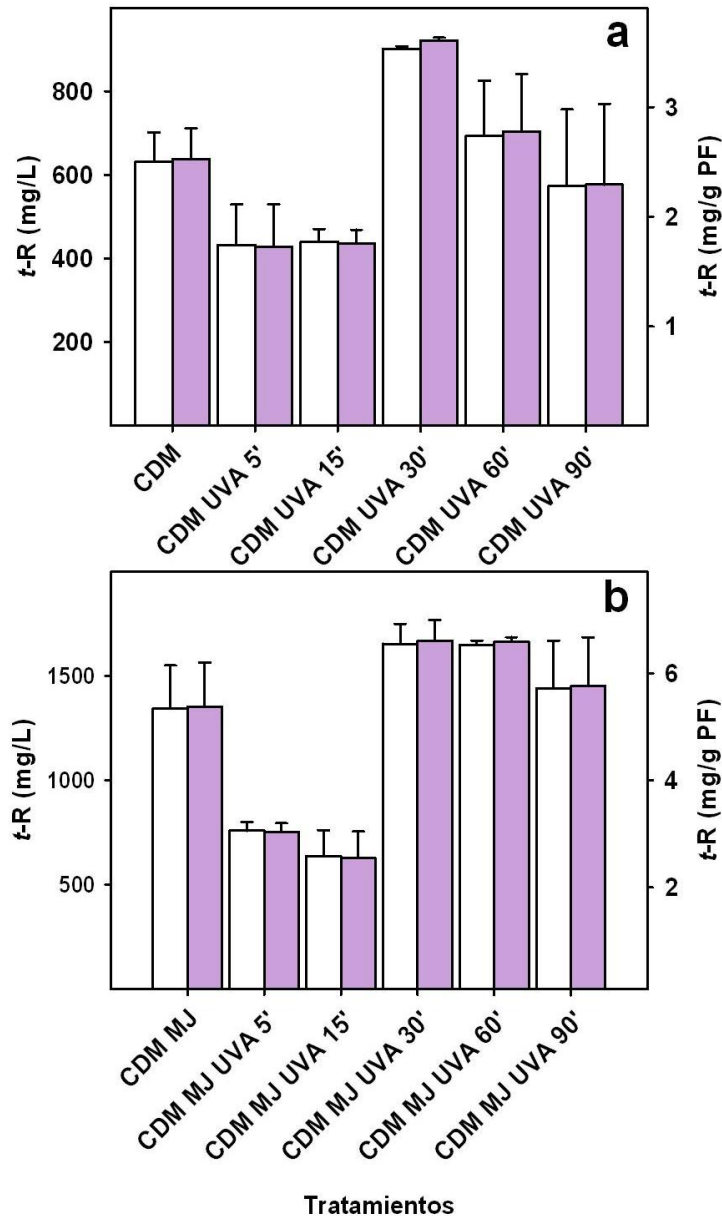


**Figura 4.11** Efecto del tiempo de exposición a la luz UV-C (254 nm, 10  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ), sobre suspensiones celulares de *Monastrell* elicitadas durante 96 h, en presencia de CDM (a) o CDM+MJ (b).

Sin embargo, cuando las suspensiones celulares se elicitaron con CDM y MJ y se expusieron a la luz UV-A, se obtuvieron los máximos niveles de *t-R* a tiempos largos (30 y 90 min,  $8.26 \pm 0.48$  y  $7.20 \pm 1.14$  mg/g PF, respectivamente), aunque no se observaron diferencias significativas entre éstas y las no expuestas tratadas con los elicitores (CDM y MJ,  $6.72 \pm 1.03$  mg/g PF).



Las exposiciones cortas a la luz UV-A dieron lugar a una caída en la producción de *t*-R, en comparación con los cultivos celulares no expuestos. Esta disminución fue más drástica cuando las células se elicitaron con CDM+MJ (15 min,  $3.18 \pm 0.62$  mg/g PF) que con CDM solas ( $2.20 \pm 0.15$  mg/g PF). Además, se observó que cuando las suspensiones celulares elicitadas con CDM eran expuestas a luz UV-A durante 30 min, se producía un ligero incremento en la producción de *t*-R ( $4.50 \pm 0.30$  mg/g PF) en comparación con las no expuestas ( $3.15 \pm 0.35$  mg/g PF).



**Figura 4.12** Efecto del tiempo de exposición a la luz UV-A ( $360 \text{ nm}$ ,  $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ), sobre suspensiones celulares de Monastrell, elicitadas durante 96 h, en presencia de CDM (a) o CDM+MJ (b).

Estos resultados sugerían que las exposiciones prolongadas a luz UV-A (30 y 60 min) sólo incrementaban ligeramente los niveles de *t*-R cuando las células eran elicitadas con CDM, pero no incrementaban la producción de *t*-R cuando MJ también estaba presente, lo que sugiere un efecto antagónico entre MJ y luz UV-A ya que durante las exposiciones cortas se producía un descenso brusco de la producción de *t*-R en presencia de MJ.

Al igual que en el caso de la luz UV-C, cuando las suspensiones celulares se irradiaron con luz UV-A en presencia o ausencia de MJ (sin CDM) no dieron lugar a producción de *t*-R ni se observó pardeamiento a 15 y 30 min (datos no mostrados). En este sentido, la luz UV aunque no es beneficiosa para la producción de este metabolito no resulta perjudicial para el cultivo celular.

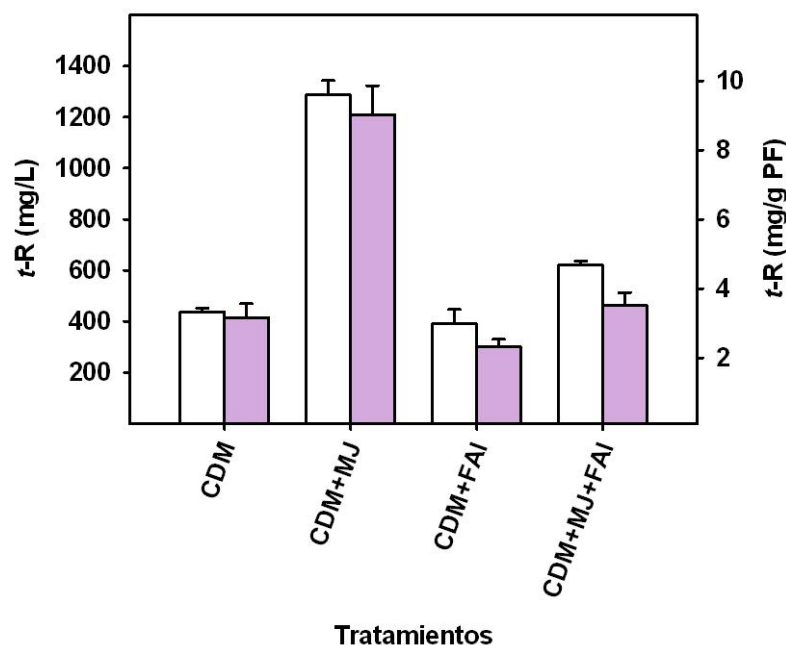
Son escasos los artículos que se pueden encontrar en los que se muestren los efectos de la luz UV-C sobre la producción de *t*-R en cultivos celulares de vid y la mayoría de las investigaciones realizadas están dirigidas al aumento del contenido de estilbenos en uvas (Adrian et al. 2000; Versari et al. 2001; Cantos et al. 2003; González-Barrio et al. 2006), hojas (Douillet-Breuil et al. 1999; Pezet et al. 2003) y callos (Keller et al. 2000; Keskin & Kunter 2008).

Keller et al. (2000) observaron que sólo eran capaces de producir estilbenos los callos cv Cabernet-Sauvignon irradiados con luz UV-C que se encontraban en crecimiento activo, mientras que los callos más viejos habían perdido esta capacidad. Keskin y Kunter (2008) obtuvieron resultados similares en callos de Cabernet-Sauvignon irradiados con luz UV-C. Estos autores observaron que el efecto de la luz UV-C sobre la producción de *t*-R dependía de la edad del callo, ya que la mayor producción de *t*-R se encontró en los callos de 12 días ( $62.66 \pm 0.40 \mu\text{g/g PF}$ ) en comparación con los valores que obtuvieron con los callos de 15 días ( $18.12 \pm 0.10 \mu\text{g/g PF}$ ) a un mismo tiempo de exposición a la luz UV (15 min). Los resultados obtenidos por Keskin y Kunter (2008) podrían explicar los bajos niveles de *t*-R obtenidos cuando los cultivos de Monastrell se irradiaron con luz UV-C (15 min) y se elicitaron con CDM solas ( $0.16 \pm 0.21 \text{ mg/g PF}$ ) o en combinación con MJ ( $0.24 \pm 0.29 \text{ mg/g PF}$ ) ya que estos experimentos de elicitación se realizaron utilizando cultivos de Monastrell de 12-14 días, los cuales están entrando en fase estacionaria.

#### 4.1.2.10 Efecto de la adición de fosetil de aluminio sobre la producción de *trans-resveratrol* en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo

FAI, es un compuesto químico que se utiliza como fungicida sistémico contra el mildiú de la vid, ya que actúa reprimiendo el desarrollo de *P. viticola* (causante de dicha enfermedad) en los lugares de la planta en donde se ha producido la infección por el hongo. Aunque el FAI (1.5 mM) o sus productos de hidrólisis no son capaces de provocar la activación de las reacciones de defensa típicas en las células de vid cultivadas *in vitro* (producción de *t-R* y derivados), se trata de un compuesto que disminuye la presencia de ciertas peroxidases extracelulares ácidas ( $A_2$  y  $A_3$ ) y básicas ( $B_2$  y  $B_3$ ) (López-Serrano et al. 1997) a la concentración antes mencionada. Las peroxidases son las responsables del acoplamiento oxidativo de las unidades de *t-R* para la síntesis de viniferinas (Langcake y Pryce 1977), por lo que una disminución de las isoenzimas extracelulares podría resultar en un aumento de la concentración del *t-R* en el medio de cultivo que a su vez se encuentra fuertemente inducido por la elicitación conjunta con CDM y MJ.

Por este motivo se estudió el efecto de este compuesto sobre las suspensiones celulares de *Monastrell* en presencia de CDM separadamente o en combinación con MJ.



**Figura 4.13** Producción de *t-R* en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM solas o en combinación con MJ y/o fosetil de aluminio. En barras blancas se ha representado la producción (mg/L) y en barras violetas la productividad de *t-R* (mg/g PF).

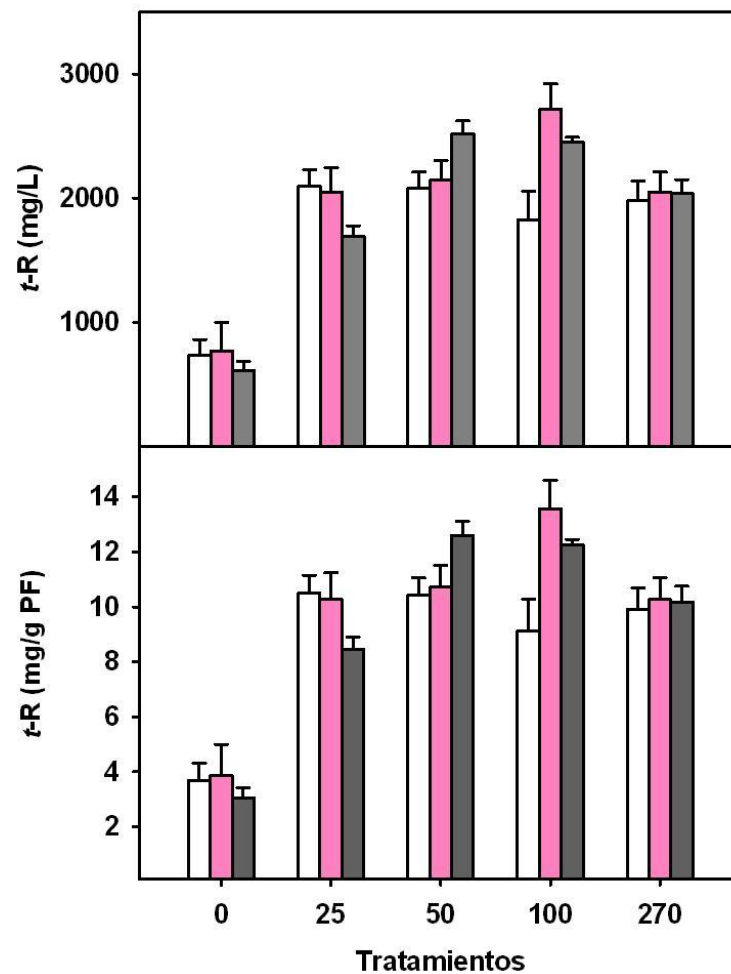
En la Figura 4.13 se muestra la producción extracelular de *t*-R en suspensiones celulares elicítadas con CDM solas o en combinación con MJ y/o FAI. Los tratamientos con MJ o FAI solos, así como la combinación de ambos, no dio lugar a la producción de *t*-R por lo que no se han representado en la Figura 4.13. Cuando se utilizó FAI en combinación con CDM se produjo una disminución de la producción de *t*-R que no fue significativamente diferente del tratamiento con CDM solas. Siguiendo la misma tendencia, el tratamiento combinado de CDM con MJ y FAI condujo a una caída drástica de la producción extracelular de *t*-R ( $620 \pm 20$  mg/L) con respecto al tratamiento homólogo, sin FAI ( $1280 \pm 60$  mg/L).

#### **4.1.2.11 Efecto de distintas concentraciones de sacarosa y jasmonato de metilo sobre la producción de *trans-resveratrol* en suspensiones celulares de Monastrell elicítadas con ciclodextrinas metiladas al azar**

Para estudiar el efecto de distintas concentraciones de sacarosa y MJ sobre la producción extracelular de *t*-R, las suspensiones celulares de Monastrell se elicitaron en medios que contenían 10, 20 y 30 g/L de sacarosa y concentraciones variables de MJ (25, 50, 100 y 270  $\mu$ M), manteniendo la misma concentración de CDM (50 mM) en todos los experimentos. Como puede observarse en la Figura 4.14, la concentración de MJ más apropiada para incrementar la producción de *t*-R depende de los niveles de sacarosa en el medio de cultivo ya que cuando las suspensiones celulares se elicitaron en presencia de CDM y MJ en medios suplementados con 10 g/L de sacarosa, la producción máxima de *t*-R se observó en los tratamientos que contenían 25  $\mu$ M de MJ, alcanzando un valor de  $2097.6 \pm 132,3$  mg/L, que se mantiene constante conforme la concentración de MJ aumenta en estos medios (10 g/L).

Cuando las suspensiones celulares se elicitaron en medios de cultivo suplementados con 20 g/L de sacarosa, los niveles máximos de *t*-R ( $2714.9 \pm 205.2$  mg/L) se alcanzaron en los tratamientos combinados de CDM y 100  $\mu$ M MJ, no observándose diferencias significativas entre estas condiciones y las suspensiones celulares elicítadas en medios suplementados con 30 g/L de sacarosa y tratadas con CDM 50  $\mu$ M MJ ( $2518.5 \pm 105.8$ ).

Como se aprecia en la Figura 4.14, la producción más baja de *t*-R se obtuvo en los tratamientos que contenían solo CDM (613-772 mg/L), no observándose diferencias significativas al suplementar los medios de cultivo con las diferentes concentraciones de sacarosa.



**Figura 4.14** Producción de *t-R* por suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM solas o en combinación con MJ en medios de cultivo con distintas concentraciones de sacarosa. Se ha representado la producción (mg/L) y productividad (mg/g PF) de *t-R* de los medios que contenían 10 g/L (blanco), 20 g/L (rosa) y 30 g/L (gris) de sacarosa.

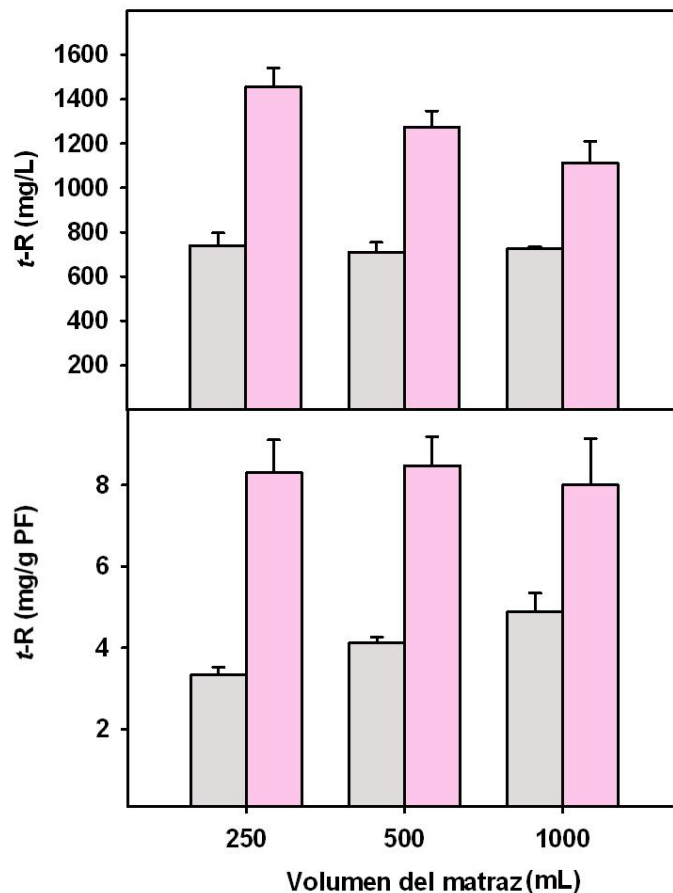
La tendencia de la productividad de *t-R* en mg/g PF o en mg/g PF/día fue similar a los datos de producción descritos. Sin embargo, cuando se analiza la productividad de *t-R* en relación a la sacarosa consumida (mg/g PF/g de sacarosa) se observó que con 10 g/L y 25  $\mu$ M MJ la productividad era de 1.0 mg/g PF/g sacarosa mientras que para los medios suplementados con 20 y 30 g/L de sacarosa eran de 0.7 y 0.4 mg/g PF/g sacarosa, respectivamente. Aunque el crecimiento celular no se vio afectado por la elicitación en los medios de cultivo con las diferentes concentraciones de sacarosa, este nutriente podría ser un factor limitante de la producción de *t-R* en las suspensiones celulares elicidadas en concentraciones bajas de sacarosa (10 g/L). Los resultados obtenidos por Larronde et al. (1998) podrían apoyar este comportamiento de las suspensiones celulares ya que cuando analizó el efecto de la adición de distintas concentraciones de sacarosa (34-68 g/L) sobre el contenido de polifenoles en

suspensiones celulares de Gamay Fréaux, observaron que la sacarosa producía una fuerte estimulación de la acumulación de antocianinas mientras que apenas se producía acumulación de estilbenos. Asimismo, Belhadj et al. (2008) estudiaron el efecto de MJ (20  $\mu$ M) en combinación con un suplemento de sacarosa (27 g/L) sobre la producción de estilbenos. En estos ensayos, la acumulación máxima de *t*-R en los medios de cultivo, después de 18 h de tratamiento, fue de 52 nmol/g PF. En condiciones similares de elicitación (25  $\mu$ M MJ y 20 g/L de sacarosa) y en presencia de CDM, las suspensiones celulares de Monastrell produjeron 45  $\mu$ mol de *t*-R/g PF (1026 mg/L), lo que supone unas 865 veces más que los niveles alcanzados por Belhadj et al. (2008). Estos resultados muestran la dependencia de la concentración de la fuente carbonada ya que, solo cuando ésta constituye un factor limitante (10 g/L) afecta a la producción de *t*-R. Sin embargo, cuando la sacarosa se encuentra en el medio de cultivo a concentraciones mayores, conforme esta concentración es mayor, menor es el requerimiento de MJ.

#### **4.1.2.12 Efecto de la aireación del medio de cultivo sobre la producción de *trans-resveratrol* por suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

La determinación del efecto del volumen de aire de matraces de diferente capacidad sobre la producción de *t*-R en suspensiones celulares de vid, se realizó con matraces de 250, 500 y 1000 mL de capacidad, a los que se añadió 100 mL de suspensión celular a una densidad celular de 200 g PF /L.

A pesar de que la superficie de aireación en el matraz de 1000 mL es 2.4 y 1.5 veces mayor que en los matraces de 250 y 500 mL respectivamente, no se encontraron diferencias significativas entre los tres volúmenes ensayados a igualdad de tratamiento. Como se observa en la Figura 4.15, en los tratamientos que contenían sólo CDM, los valores máximos de producción alcanzados se situaron sobre los 700 mg/L de *t*-R en todos los volúmenes ensayados. Además, no se observaron diferencias significativas en la producción de *t*-R relacionadas con la superficie de aireación en cada uno de los tamaños de matraz ensayados. Sin embargo la productividad de *t*-R observada en matraces de 250 mL (3.33 mg/g PF) fue significativamente diferente a la observada en 500 y 1000 mL (4.11 y 4.88 mg/g PF, respectivamente).



**Figura 4.15** Efecto de la aireación del medio de cultivo sobre la producción de *t-R* (mg/L) y la productividad (mg/g PF) en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM solas o en combinación con MJ. Se ha representado tanto la producción (mg/L) como la productividad (mg/g PF). Los tratamientos con CDM se representan en barras grises y los de CDM+MJ en rosa.

En los tratamientos combinados de CDM y MJ se observó una ligera disminución en la producción de *t-R* conforme aumentaba la capacidad del matraz que contenía la suspensión celular. La producción de *t-R* encontrada en los matraces de 250 mL (1450 mg/L) resultó ser significativamente diferente a la analizada en los matraces de 1000 mL (1110 mg/L), no apreciándose diferencias significativas entre la producción de *t-R* en matraces de 500 mL (1270 mg/L) y la de los otros dos volúmenes. Sin embargo, en los valores de productividad, no se aprecian diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Esta tendencia de la productividad en los tratamientos combinados de CDM y MJ con el aumento del volumen del matraz podría ser debida a mayor evaporación del MJ conforme aumenta la superficie de contacto entre la suspensión celular y la atmósfera interna del matraz. Por lo tanto, la producción de *t-R* no se ve afectada por la disponibilidad de oxígeno determinada por la aireación y agitación de la suspensión celular en los matraces de diferente capacidad analizados.

El contenido gaseoso de los cultivos celulares vegetales es un factor importante para la producción de biomasa y de metabolitos secundarios. El intercambio de gases entre la fase líquida y gaseosa es especialmente importante para el escalado de los cultivos celulares (Thanh et al. 2006). Sin embargo, en matraces agitados no se puede controlar el aporte de oxígeno, por lo que se optimiza la superficie de contacto entre suspensión celular y atmósfera interna en la que el oxígeno se encuentra disuelto en un 20%. En estas condiciones, no se ha encontrado un efecto significativo del oxígeno sobre la producción ni sobre la productividad, por lo que el aumento del volumen del matraz podría interferir en la disponibilidad de MJ. Estudios realizados en biorreactores con cultivos celulares y de raíces de *P. ginseng* para la producción tanto de biomasa como de saponina (Thanh et al. 2006; Cheol-Seung et al. 2006) mostraron que la tasa óptima de oxígeno era del 40%, mientras que en un porcentaje demasiado bajo (20.8 y 30%) o elevado (50%) resultaban perjudiciales tanto para el crecimiento como para la producción de saponina.

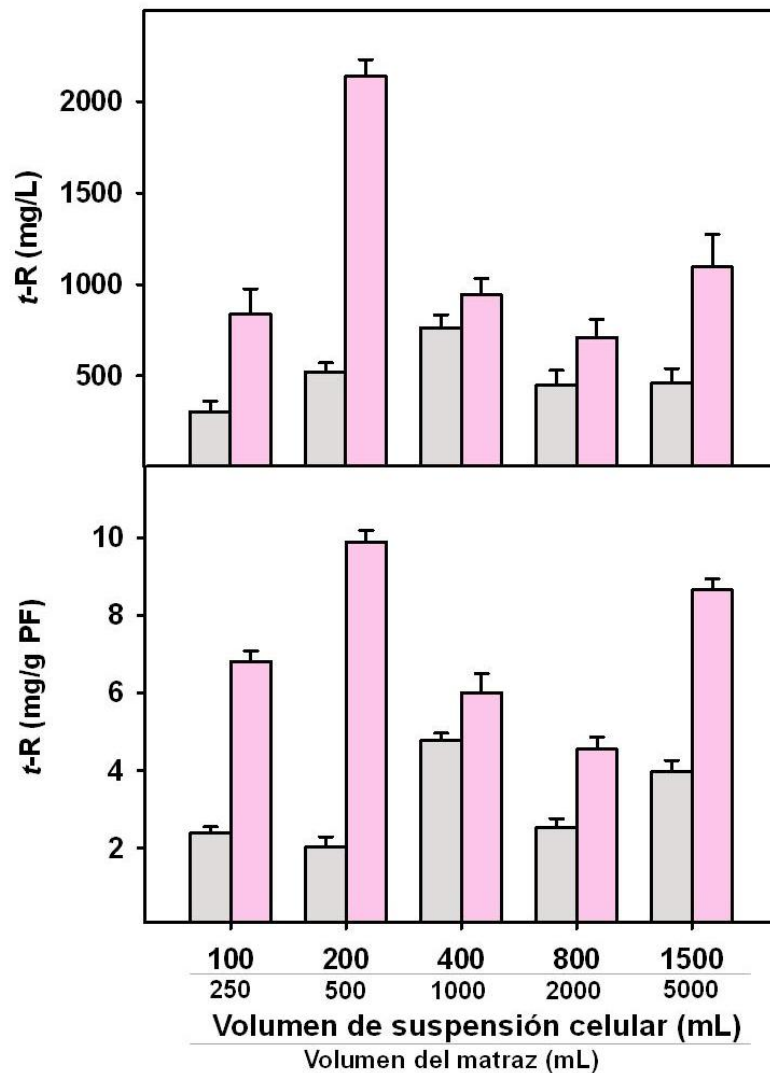
#### **4.1.2.13 Efecto del escalado sobre la producción de *trans-resveratrol* por suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

Para realizar estos ensayos se utilizaron matraces de 250, 500, 1000, 2000 y 5000 mL de capacidad a los que se adicionaron 100, 200, 400, 800 y 1500 mL de suspensión celular, respectivamente. Para evitar el estrés que supone para el cultivo, el aumento del volumen del matraz, el paso de las suspensiones celulares a matraces de mayor tamaño se hizo de forma progresiva, manteniendo la suspensión celular en el nuevo volumen durante, al menos tres subcultivos, antes de comenzar los experimentos.

En la Figura 4.16 se observa que los cultivos elicitados con CDM solas proporcionan un ligero aumento de la producción y de la productividad conforme aumenta el tamaño del matraz hasta 1 L (400 mL de suspensión celular), donde se obtuvieron los mejores resultados de producción ( $762 \pm 71$  mg/L) y de productividad ( $4.5 \pm 0.3$  mg/g PF) de *t*-R con este tratamiento. A continuación se observó una ligera caída de la producción y de la productividad conforme aumentaba la capacidad del matraz. Por otra parte, las suspensiones celulares elicidadas con CDM y MJ en matraces de 500 mL (200 mL de suspensión celular) dieron lugar a los mayores niveles de producción de *t*-R ( $2140 \pm 90$  mg/L) siendo significativamente diferente al resto de volúmenes, cuya producción osciló entre  $941 \pm 90$  y  $1094 \pm 180$  mg/g PF en matraces de 1 y 5 L respectivamente. Sin embargo, estas diferencias disminuyen cuando se observan los datos de



productividad ya que se obtuvieron  $9.9 \pm 0.3$  y  $8.6 \pm 0.3$  mg/g PF en matraces de 500 mL y 5 L, respectivamente.



**Figura 4.16** Efecto del escalado sobre la producción (mg/L) y la productividad (mg/g PF) de *t-R* por suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas solas o en combinación con MJ. El tratamiento con CDM se representa en barras grises y el tratamiento combinado de CDM+MJ en barras rosa.

En la bibliografía, no se recogen artículos en donde se analice el efecto del escalado en matraces de diferente capacidad ya que lo que se analiza fundamentalmente es la producción de metabolitos en biorreactores. Ferri et al. (2011) realizaron el escalado de suspensiones celulares de *V. vinifera* cv Barbera en biorreactores de 1 L con 800 mL de suspensión celular consistente en biomasa celular con cultivos celulares de 14 días al 50% (v/v, inóculo/medio fresco). Esto autores realizaron la elicitación con quitosán (50 y 100 mg/L) (Ferri et al. 2009) y en sus mejores condiciones de elicitación en ese volumen de suspensión celular, obtuvieron una mezcla de estilbenoides entre

los que se encontraba *t*- y *c*-R, tanto en el interior como en el exterior celular y cuyos valores máximos fueron obtenidos el día 15 tras la elicitación (6  $\mu\text{M/g}$  PS, de la mezcla de isómeros *t*- y *c*-R). En nuestro sistema en discontinuo, trabajando con el mismo volumen de suspensión celular en matraces de 2 L se obtuvieron 197  $\mu\text{M/g}$  PS (450 mg/L) de *t*-R en el tratamiento con CDM y 310  $\mu\text{M/g}$  PS (710 mg/L) de *t*-R con CDM+MJ en 96 h y sin aparición de derivados de resveratrol ni detección de la forma *cis*. Sin embargo, a pesar de trabajar en el mismo volumen y densidad celular, estos sistemas no son comparables ya que en nuestro caso trabajamos con matraces (sistema discontinuo), mientras que un biorreactor es un sistema continuo que permite controlar todas las variables que puedan afectar al cultivo, además del aprovechamiento de las células durante varios ciclos de elicitación. Por este motivo, se decidió ensayar la capacidad de las células de Monastrell para producir *t*-R durante ciclos de elicitación continuos en matraces de 500 mL ya que fue donde se observaron los valores más altos de producción y productividad.

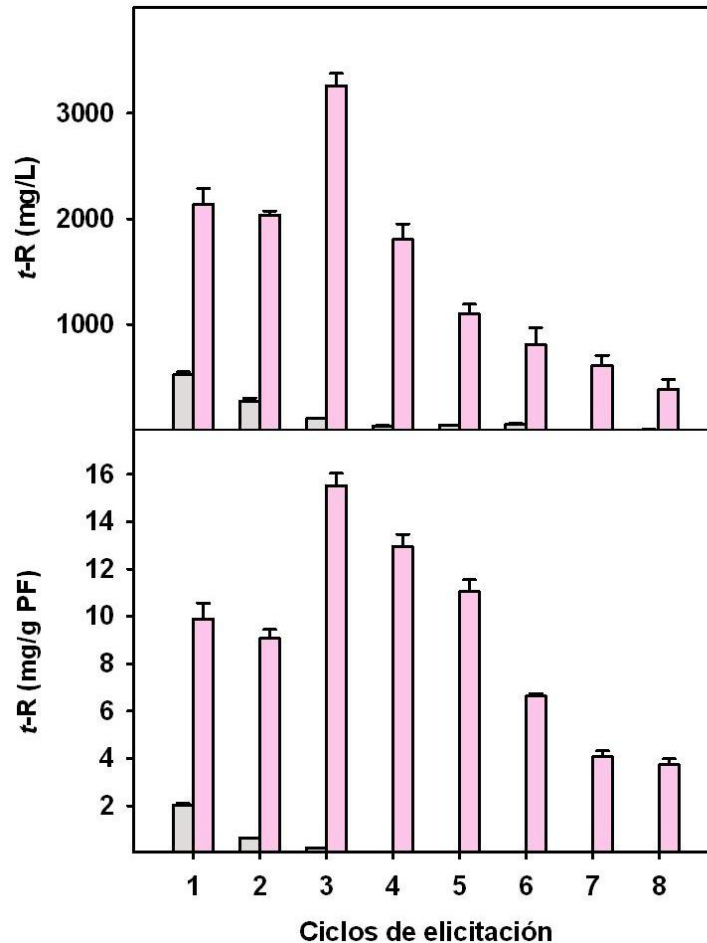
#### **4.1.2.14 Efecto de ciclos de elicitación continua sobre la producción de *trans*-resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicítadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

La capacidad de las suspensiones para producir *t*-R a lo largo de sucesivos ciclos de elicitación se ensayó mediante la recogida de células, lavado y transferencia de las mismas a nuevos medios de elicitación idénticos al de procedencia. La duración de cada ciclo de elicitación fue de 96 horas.

Como se observa en la Figura 4.17, en presencia sólo de CDM tras el primer ciclo de elicitación la producción de *t*-R fue de 520 mg/L, observándose en el siguiente ciclo una disminución de la producción de un 47.0% con respecto al primero. Asimismo, en el tercer ciclo, esta disminución ya alcanzaba el 78.8% respecto al primero. A partir del cuarto ciclo la producción ya es del orden de 13 veces menor que en el primero (reducción del 92.3%). En cada uno de los ciclos las diferencias eran significativamente diferentes respecto al tratamiento anterior.

En el caso de los tratamientos combinados de CDM y MJ se observó que la producción en el primer y segundo ciclo era de 2130 y 2030 mg/L de *t*-R, respectivamente, no observándose diferencias significativas entre ellos. En el tercer ciclo de elicitación se produjo un aumento considerable de *t*-R (3260 mg/L), volviendo a los niveles de partida en el cuarto ciclo (1800 mg/L de *t*-R). En los ciclos 5 y 6 se observó una producción de *t*-R de 1100 y 810 mg/L, respectivamente, producción que

disminuyó hasta 610 y 390 mg/L en los ciclos 7 y 8, respectivamente. Tanto en los tratamientos con CDM solas como en los combinados con MJ, la productividad y la significancia de los datos siguen la misma tendencia que en el caso de la producción.



**Figura 4.17** Efecto de ciclos de elicitación continuos sobre la producción de *t-R* (mg/L) y productividad (mg/g PF) en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM solas o en combinación con MJ. El tratamiento con CDM se representa en barras grises y el de CDM+MJ en barras rosa.

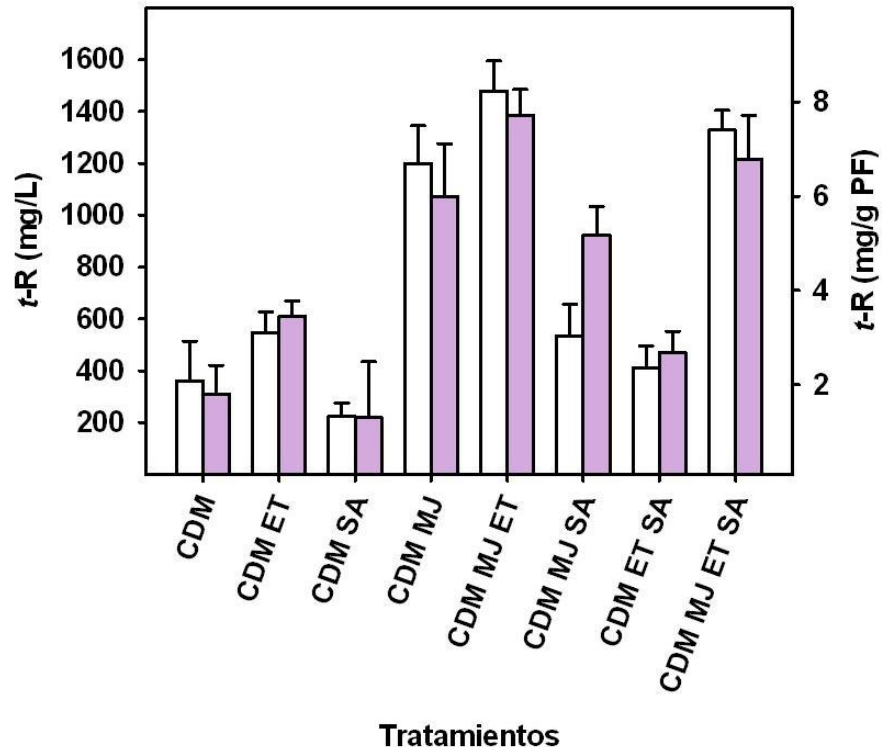
La re-elicitación de los cultivos celulares puede realizarse de distintas formas, así Wang y Zhong (2002) consiguieron aumentar la producción de taxol en matraces hasta un 60% tras una segunda adición de MJ (sin cambiar el medio de cultivo). Asimismo, la re-elicitación de cultivos celulares de *Escholtzia californica*, con cambio de medio de cultivo, resultó ser un método efectivo para aumentar la producción de alcaloides (Byun 2000). Sin embargo, la re-elicitación de cultivos celulares de *S. marianum* con MJ parece no ser la solución más adecuada para aumentar la producción de silimarina (Sánchez-Sampedro et al. 2009). Por el contrario, cuando la re-elicitación de estos cultivos iba acompañada de un cambio de medio fresco, se conseguían evitar los efectos tóxicos causados por la acumulación de altas concentraciones de MJ en el

medio pero a las 48 horas no se observaban diferencias significativas entre los que habían recibido una o más dosis de MJ. Para evitar los efectos negativos o la insensibilidad de los cultivos de *S. marianum* a la exposición repetida de MJ, Sánchez-Sampedro et al. (2009) llevó a cabo un método semi-continuo en el cual los ciclos de elicitación iban seguidos de ciclos de descanso, en los que sólo se añadía medio fresco (sin MJ). Este sistema permitió una alta producción de silimarina a lo largo del tiempo y sin pérdida de productividad. Por el contrario, en el caso de Monastrell, el cambio de medio de cultivo por otro con una nueva dosis de elicitores (CDM+MJ) permite continuar la producción de *t*-R, aunque se observó un ligero pardeamiento de las células en el tratamiento combinado de CDM+MJ a partir del ciclo 4, sin embargo no se observó esta respuesta de las suspensiones celulares en el tratamiento de CDM solas.

#### **4.1.2.15 Efecto de la adición de compuestos implicados en respuestas de defensa (ácido salicílico y etileno) sobre la producción de *trans-resveratrol* en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

El efecto que tienen determinados compuestos tales como SA y ET sobre la producción de *t*-R se determinó mediante la adición de estas moléculas a cultivos celulares elicitados con CDM solas o en combinación con MJ (Figura 4.18). Como se observa en la figura, los tratamientos combinados con CDM y ET dieron lugar a un aumento de la acumulación extracelular de *t*-R aunque éste no llegó a ser significativamente diferente de los tratamientos que contenían CDM solas. En las suspensiones celulares tratadas con CDM y SA se producía una disminución de la producción de *t*-R que tampoco fue significativamente diferente de los tratamientos sólo con CDM. Además, las suspensiones celulares tratadas con CDM y MJ tanto en presencia como ausencia de ET, dieron lugar a los valores más elevados de producción. En contraste con estos resultados, la combinación de CDM con SA en presencia de MJ y/o ET produjo una disminución de la producción de *t*-R respecto a su correspondiente tratamiento sin SA. Finalmente, en los tratamientos que contenían los cuatro compuestos simultáneamente se observaron niveles de *t*-R similares a los obtenidos en los tratamientos con CDM y MJ en presencia y ausencia de ET. Los tratamientos que no contenían CDM no se han representado en la figura por los bajos niveles de *t*-R observados en ellos.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede deducir que SA ejerce un efecto negativo y antagónico con MJ/ET sobre la producción de *t*-R en suspensiones de *Monastrell* elicidadas con CDM.



**Figura 4.18** Efecto de la adición de compuestos relacionados con la defensa sobre la producción de *t*-R (mg/L, barras blancas) y productividad (mg/g PF, barras violetas) en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM y/o MJ. SA y ET se adicionaron a 100 y 500  $\mu$ M, respectivamente.

Los jasmonatos actúan como transductores de señales de los elicitores para la producción de metabolitos secundarios (Farmer et al. 2003). La aplicación exógena de jasmonatos tanto a cultivos celulares como a plantas completas es capaz de estimular la biosíntesis de terpenoides, flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos (Gundlach et al. 1992; Mueller et al. 1993; Tamogami et al. 1997).

El ET es un compuesto que produce la liberación de la hormona volátil, etileno, que regula un amplio rango de procesos en las plantas, que abarcan desde el crecimiento y el desarrollo a respuestas de defensa. Sin embargo, no es una señal común en la inducción del metabolismo secundario. A pesar de esto, existen evidencias de acumulación de metabolitos secundarios debido al ET, aunque en algunos casos puede afectar también de forma negativa (Zhao et al. 2005). El ET es capaz de aumentar la producción de flavonoides, antocianinas y estilbenoides en cultivos

celulares de *V. vinifera* mediante la sobre-expresión de los genes implicados en su ruta biosintética (Chung et al. 2001; El-Kereamy et al. 2003). La producción inducida de algunos metabolitos secundarios por elicitores requiere la presencia de ET como señal, aunque la optimización de su concentración en el cultivo es crucial para que resulte eficaz. De esta manera, altas concentraciones de ET pueden inhibir la biosíntesis de metabolitos secundarios, mientras que concentraciones bajas son capaces de promover la producción de los mismos (Pan et al. 2000; Zhao et al. 2004a). Linden y Phisalaphong (2000), observaron que la adición de oligosacáridos potenciaba la producción de taxol inducida por jasmonato de metilo en *T. canadensis*. El efecto sinérgico de estos dos compuestos sobre la producción de taxol estaba regulado por ET, el cual era producido por el cultivo como respuesta a la elicitación. Por otra parte, SA actúa como inductor de SAR en la interacción planta-patógeno. Sin embargo, no es un inductor universal de la biosíntesis de metabolitos de defensa en plantas. SA se acumula en el lugar de la infección durante ataques de patógenos o como respuesta hipersensible. Asimismo, los elicitores fúngicos también estimulan la acumulación de SA en algunos cultivos celulares pero, generalmente la inducción de los metabolitos secundarios por elicitores fúngicos son independientes de SA (Zhao et al. 2005). Sin embargo, SA induce la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de determinados metabolitos secundarios en plantas (Taguchi et al. 2001), como es el caso de los alcaloides indólicos en *C. roseus* (Zhao et al. 2000) y pilocarpina en hojas de *Pilocarpus jaborandi* (Avancini et al. 2003). Li et al. (2008) observaron un aumento de la producción de *t*-R en frutos de vid de distintos cultivares rociados con 100 mg/L de SA sin embargo, no existen muchas evidencias que nos ayuden a interpretar el mecanismo por el cual la aplicación exógena de SA es capaz de inducir la síntesis y acumulación de *t*-R en frutos de vid. Estudios realizados en tabaco y *Arabidopsis* mostraron que la adición exógena de SA inducía la expresión de genes relacionados con la patogénesis así como el aumento de la resistencia a enfermedades (Yang et al. 1997; Ryals et al. 1996). En cultivos celulares de *E. californica*, la adición de SA (1.5 mg/L) daba lugar a valores inferiores ( $396.8 \pm 15.0$  mg/L) de dihidrosanguinarina que los tratamientos con MJ (100  $\mu$ M) ( $509.0 \pm 7.4$  mg/L). Por otro lado, Spoel et al. (2003) observaron que las respuestas desencadenadas por ET, SA y jasmonatos podían inhibirse entre sí, lo que sugería la existencia de interferencias entre sus rutas biosintéticas, permitiendo de este modo, que la planta adapte el tipo de respuesta en función del patógeno que la ataque.

4.2 Señalización de la producción de *trans*-resveratrol en suspensiones celulares elicidadas de *Vitis vinifera* cv Monastrell





### **4.2.1 Implicación del calcio en la producción de *trans*-resveratrol desencadenada por ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

Durante el proceso de elicitación se desencadenan eventos de señalización que conducen a la inducción o aumento de la producción de metabolitos secundarios. Por esta razón se estudió el mecanismo molecular implicado en el proceso de elicitación de suspensiones celulares de Monastrell, en el cual se incluyen los eventos tempranos de la ruta de señalización y su relación con eventos tardíos, en particular con la biosíntesis y acumulación de *t*-R.

La implicación del  $\text{Ca}^{2+}$  y el origen del mismo en la vía de señalización desencadenada por CDM en presencia y ausencia de MJ se estudió mediante el uso de compuestos que regulan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  así como la utilización de medios de cultivo que no contenían  $\text{Ca}^{2+}$ . Para averiguar si el origen del  $\text{Ca}^{2+}$  es extracelular, las suspensiones celulares de Monastrell se elicitaron en medios de cultivo carentes de  $\text{Ca}^{2+}$  o se trataron con compuestos que inhibían la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio de cultivo específicamente, un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA y un bloqueante de  $\text{Ca}^{2+}$ , concretamente  $\text{La}^{+3}$  que es un inhibidor competitivo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática. Para averiguar si el origen del  $\text{Ca}^{2+}$  es intracelular, las suspensiones celulares de Monastrell se trataron con compuestos que inhiben la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes internos, concretamente RR y Neo que inhiben los canales  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de rianodina y de  $\text{IP}_3$ , respectivamente.

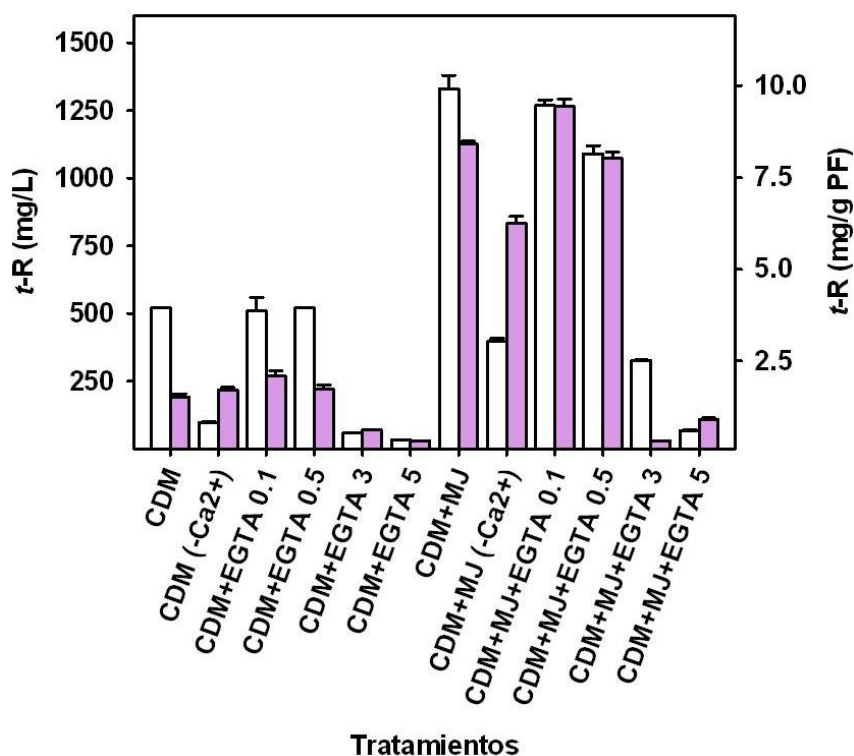
#### **4.2.1.1 Efecto de la carencia de calcio y de la presencia de EGTA sobre la producción de *trans*-resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

Para realizar el estudio de la implicación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la producción de *t*-R se utilizaron medios de cultivo carentes de  $\text{Ca}^{2+}$  y medios de cultivo completos a los que se añadieron distintas concentraciones de EGTA (0.1, 0.5, 3.0 y 5.0 mM), en presencia y ausencia de CDM y/o MJ.

En la Figura 4.19 se observa que la producción de *t*-R a las 96 horas de elicitación con CDM solas o en combinación con MJ de suspensiones celulares de Monastrell (alrededor de 500 y 1300 mg/L, respectivamente) no fue significativamente diferente de la producción obtenida con los elicitors combinados con 0.1 y 0.5 mM de EGTA. Cuando se utilizan concentraciones de EGTA de 0.1 y 0.5 mM y el pH del medio de

cultivo se ajusta a 6.0, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el medio es de 904 y 534  $\mu\text{M}$ , respectivamente, por lo que estas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  resultan suficientes para que se desencadene la señal que induce la producción de  $t\text{-R}$ . En medios carentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , las suspensiones celulares elicítadas con CDM solas o en combinación con MJ secretan  $t\text{-R}$  a los medios de cultivo alcanzando bajos niveles de producción ( $97.9 \pm 2.8$  y  $397.4 \pm 10.1$  mg/L, respectivamente) similares a los que se alcanzan en medios de elicitación a los que se adicionaron 3 mM de EGTA ( $59.0 \pm 0.8$  y  $327.4 \pm 1.8$  mg/L, respectivamente). Sin embargo, esta disminución en la producción de  $t\text{-R}$  fue más drástica cuando las suspensiones celulares se elicitaron con CDM separadamente o en combinación con MJ y 5 mM de EGTA ( $35.2 \pm 2.0$  y  $68.0 \pm 2.1$  mg/L, respectivamente). Esta concentración de EGTA (5 mM) deja libre en el medio de cultivo una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 10  $\mu\text{M}$ , lo que sugiere que esta mínima concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  podría dirigir la escasa producción de  $t\text{-R}$  observada.

Los tratamientos control con/sin distintas concentraciones de EGTA y en presencia/ ausencia de MJ no dieron lugar a producción alguna de  $t\text{-R}$ .

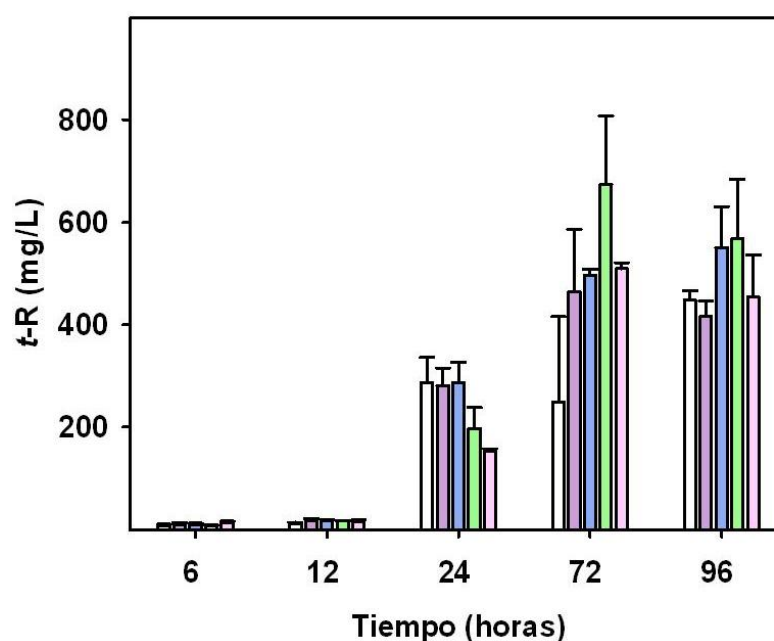


**Figura 4.19** Efecto de la carencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (-Ca<sup>2+</sup>) y de la adición de distintas concentraciones de EGTA (0.1, 0.5, 3.0 y 5.0 mM) sobre la producción de  $t\text{-R}$  (mg/L, barras blancas) y productividad (mg/g PF, barras violetas) en suspensiones celulares de *Monastrell* elicítadas con CDM y/o MJ durante 96 horas.

Estos resultados, aunque se realizaron a tiempo final de 96 h, ponen de manifiesto la existencia de una dependencia parcial de la producción de *t*-R del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ya que se observa un fuerte descenso de la producción cuando en el medio de cultivo no hay  $\text{Ca}^{2+}$  (o se encuentra en cantidades traza). De hecho, la producción de *t*-R en suspensiones celulares tratadas con CDM o con CDM+MJ en medios carentes de  $\text{Ca}^{2+}$  fue del 18.4% y del 29.2%, respectivamente, en comparación con suspensiones celulares tratadas con CDM o CDM y MJ en medios completos. Estas diferencias en la producción de *t*-R podrían deberse al equilibrio homeostático alcanzado por el  $\text{Ca}^{2+}$ , transcurridas 96 h, por lo que sería importante determinar el tiempo mínimo de elicitación necesario que permitiese observar la producción de *t*-R, antes de que se produzca dicho equilibrio.

#### 4.2.1.2 Estudio temporal de la producción de *trans*-resveratrol en presencia de distintas concentraciones de calcio en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar

Debido a la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular para la producción de *t*-R, se realizaron ensayos adicionando distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (0.0, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mM) al medio de cultivo y analizando la producción de *t*-R a diferentes tiempos de elicitación (6, 12, 24, 72 y 96 h).



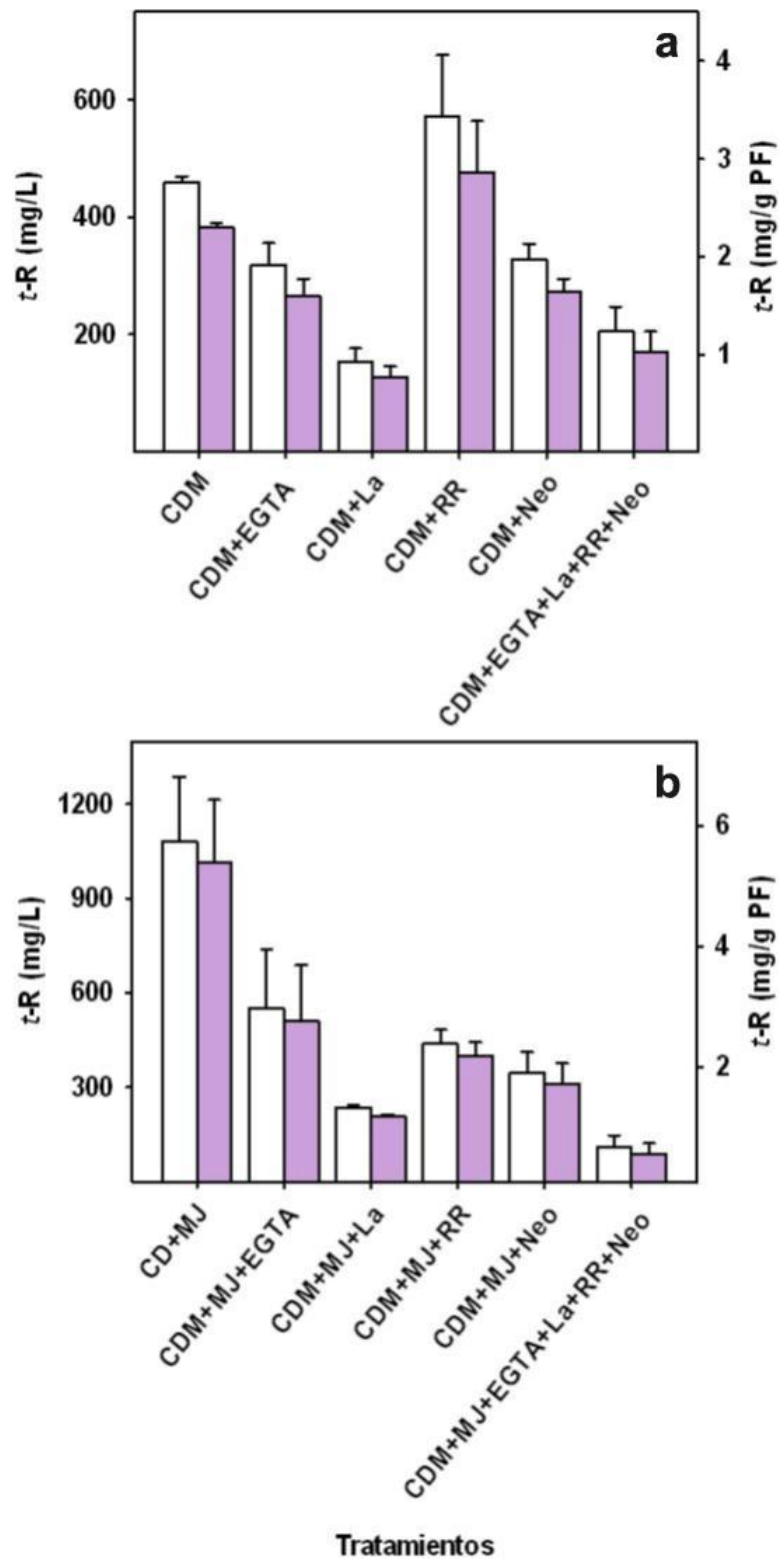
**Figura 4.20** Efecto de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la producción de *t*-R (mg/L) en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con CDM. Las distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se han representado en barras blancas (0 mM), violetas (0.5 mM), azules (1 mM), verdes (2.5 mM) y rosas (5 mM).

En la Figura 4.20 se observa que la producción de *t*-R comienza a detectarse a partir de las 24 h. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en la producción de *t*-R a este tiempo cuando se adicionan distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el rango de 0-1 mM alcanzando valores próximos a 400 mg/L. Cuando se analizó la producción de *t*-R a tiempos superiores, el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio de cultivo no modificó significativamente la producción de *t*-R manteniéndose ésta constante y con valores próximos a 600 mg/L. Por todo ello, para el estudio de los eventos tempranos de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se seleccionó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM y el tiempo de 24 horas de elicitación para realizar los siguientes ensayos.

#### **4.2.1.3 Efecto de antagonistas y bloqueadores de los flujos de calcio intra y extracelular sobre la producción de *trans*-resveratrol en suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

Para averiguar si la producción de *t*-R depende de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y/o intracelular se realizó la elicitación de suspensiones celulares de Monastrell, durante 24 horas, en medios de cultivo completos a los que se añadieron un secuestrante de  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA (5 mM) y/o un inhibidor de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular,  $\text{La}^{3+}$  (500  $\mu\text{M}$ , Lecourieux et al. 2006) y como inhibidores de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular RR (10  $\mu\text{M}$ , Allen et al. 1995) y/o Neo (100  $\mu\text{M}$ , Lecourieux et al. 2005), en presencia de CDM solas o en combinación con MJ.

Como se muestra en las Figuras 4.21 a y b, la producción y acumulación extracelular de *t*-R cuando las suspensiones celulares se elicitan en presencia de CDM solas o en combinación con MJ durante 24 horas se reducía cuando se añadía EGTA o  $\text{La}^{3+}$ . Este descenso en la producción de *t*-R era más drástico en presencia del competidor por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que por la presencia del agente quelante. Este hecho puede deberse a la pequeña cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ) que queda libre en el medio de cultivo cuando se adiciona 5 mM de EGTA. Estos resultados sugieren que la producción de *t*-R inducida por la presencia de CDM solas o en combinación con MJ es dependiente del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  procedente del medio de cultivo.



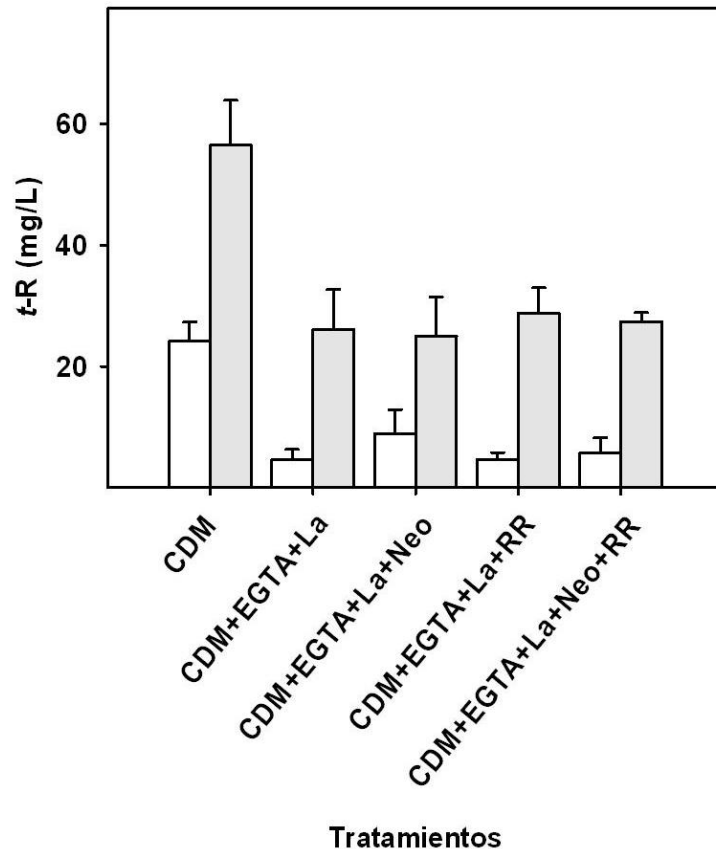
**Figura 4.21** Efecto de diferentes bloqueadores y antagonistas de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e intracelular en la acumulación extracelular de *t-R* en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM (a) o CDM+MJ (b) durante 24 h.

También se ensayó el efecto de antagonistas implicados en la inhibición de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  procedente de los almacenes internos en particular RR, un inhibidor de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares dependientes de rianodina y Neo, un inhibidor de fosfolipasa-C específica de la vía de los inosítidos fosfato.

Como puede observarse en la Figura 4.21 b, la producción de *t*-R fue parcialmente dependiente de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes internos cuando las suspensiones celulares de Monastrell se elicitaron con CDM y MJ ya que la presencia de Neo o RR provocó un descenso de la producción de *t*-R. Sin embargo, no se observó un descenso en la producción de *t*-R en células pre-tratadas con RR y elicitadas con CDM (Figura 4.21 a), lo cual sugiere que la ruta de señalización dirigida por MJ, podría estar implicada la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de rianodina. Estos resultados sugieren que se debe producir un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico para que tenga lugar la producción de *t*-R inducida por CDM solas o en combinación con MJ, y que dicha producción depende de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular y/o de la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  desde los orgánulos intracelulares. Sin embargo, esta dependencia no fue total ya que cuando se adicionaron todos los bloqueadores específicos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y EGTA a suspensiones celulares de Monastrell elicitadas con CDM solas o en combinación con MJ se observó una baja producción de *t*-R a las 24 horas de tratamiento (Figuras 4.21 a y b).

Para averiguar si esta baja producción de *t*-R se debe al  $\text{Ca}^{2+}$  que contiene el medio de cultivo, las elicitaciones se realizaron en medios de cultivo carentes de  $\text{Ca}^{2+}$  añadiendo EGTA y los bloqueadores y antagonistas mencionados anteriormente.

En la Figura 4.22 se observa que la producción de *t*-R en suspensiones celulares elicitadas durante 24 h con CDM en medios carentes de  $\text{Ca}^{2+}$  es de 24 mg/L lo que significa una disminución de 17 veces en la producción de *t*-R en suspensiones celulares elicitadas con CDM en medios completos. Esta producción disminuye de manera similar, en suspensiones celulares elicitadas durante 24 h con CDM en medios carentes de  $\text{Ca}^{2+}$  y en presencia de EGTA y bloqueadores específicos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  llegando a valores de *t*-R de 5 mg/L. Estos valores de *t*-R tan bajos podrían indicar la existencia de una ruta de biosíntesis de *t*-R independiente de la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Además, la producción de *t*-R a tiempos más largos (96 h) se incrementa alcanzándose valores de 58 mg/L en suspensiones celulares elicitadas con CDM en medios carentes de  $\text{Ca}^{2+}$  y valores de 24 mg/L cuando la elicitación se realiza en presencia de EGTA y bloqueadores específicos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 4.22** Efecto de diferentes bloqueadores y antagonistas de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e intracelular, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de cultivo, sobre la acumulación extracelular de  $t\text{-R}$  (mg/L) en suspensiones celulares de *Monastrell* elicitadas con CDM durante 24 y 96 h (barras blancas y grises, respectivamente).

Se han utilizado una serie de compuestos que actúan sobre las rutas de señalización con el fin de analizar la secuencia de respuestas celulares activadas por los elicitores. Se demuestra que el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel esencial en la producción de  $t\text{-R}$  al igual que han sugerido otros autores (García-Brugger et al. 2006; Lecourieux et al. 2006). Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan evidencias de la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  como mediador en la producción de  $t\text{-R}$  inducida por elicitores en suspensiones celulares de *Monastrell*. Se sugiere que la biosíntesis de  $t\text{-R}$  depende de un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que proviene de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los orgánulos ya que el tratamiento con secuestrantes y bloqueadores específicos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 4.21 a y b) que inhiben el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  del pool intracelular y su entrada desde el medio de cultivo disminuyen los niveles de  $t\text{-R}$ . Sin embargo, en contraste con los resultados obtenidos por Faurie et al. (2009), la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular vía canales dependientes de receptores de rianodina, parece estar relacionada con la vía que dirige la producción de  $t\text{-R}$  en suspensiones celulares tratadas con MJ, ya que la acumulación extracelular

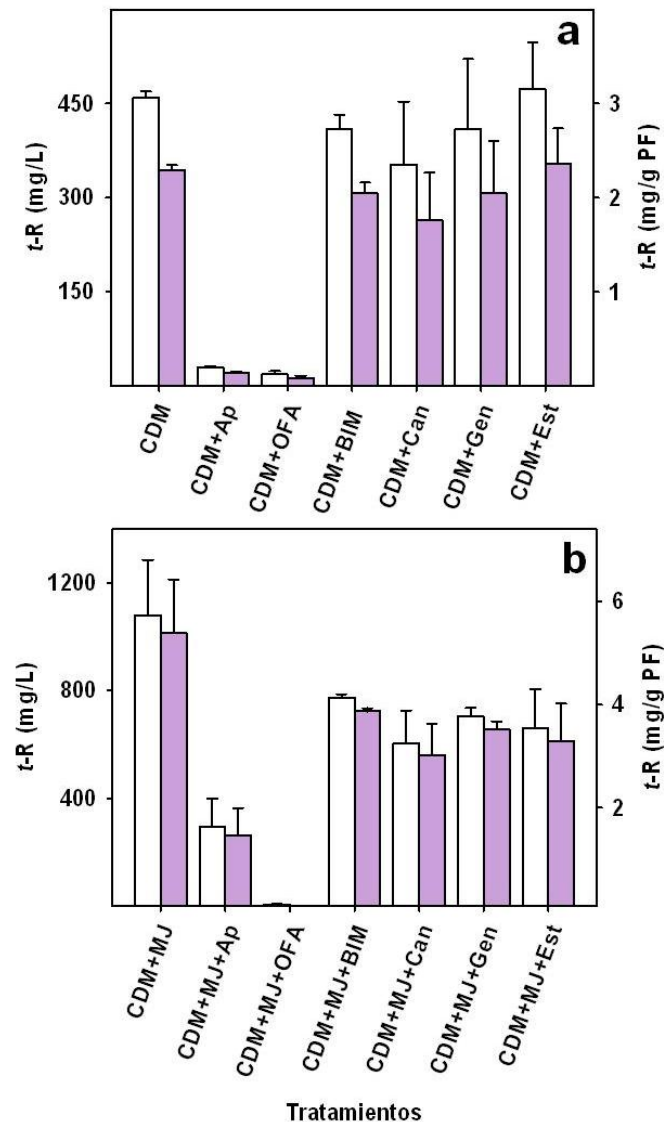
de *t*-R no se vio afectada cuando las suspensiones celulares de Monastrell se elicitaron con CDM (Figura 4.21 a y b).

#### **4.2.2 Implicación de eventos de fosforilación/defosforilación en la producción de *trans*-resveratrol dirigida por ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo**

Para determinar la posible implicación de eventos de fosforilación/defosforilación en la ruta de señalización dirigida hacia la producción de *t*-R en suspensiones celulares de Monastrell elicitadas con CDM o CDM y MJ se realizaron experimentos en presencia de inhibidores de PK tales como genisteína (Gen), estaurosporina (Est), bisindolilmaleimida (BIM) y apigenina (Ap). También se estudió el efecto de inhibidores de PP como óxido de fenilarsina (OFA) y cantaridina (Can). Como puede observarse en la Figura 4.23, la producción de *t*-R dirigida por CDM separadamente o en combinación con MJ fue fuertemente dependiente de eventos de defosforilación de tirosin-proteínas ya que la acumulación de *t*-R se redujo drásticamente cuando las suspensiones celulares de Monastrell pre-tratadas con OFA se elicitaron con CDM solas o en combinación con MJ, mientras que el pre-tratamiento de los cultivos elicitados con inhibidores de serin/treonin PK y PP (Est, BIM y Can) no dieron lugar a un descenso significativo de la producción de *t*-R (Figura 4.23 a y b). Además, Ap provocó un descenso del estado de fosforilación de algunas proteínas, a través de MAPK lo que dio lugar a un descenso importante en la producción de *t*-R en suspensiones celulares de Monastrell elicitadas con CDM o CDM y MJ.

El proceso de fosforilación y defosforilación de proteínas no sólo está implicado en las vías de transducción de señales desencadenadas por elicitores sino que también participa directamente en la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios, aunque la identidad de la mayoría de las PK y la función de fosforilación de proteínas está por resolver (Zhao et al. 2005). En este estudio, los eventos de fosforilación/defosforilación parecen estar implicados en las rutas de señalización desencadenadas por CDM solas o en combinación con MJ (Figura 4.23 a y b). Sin embargo, mientras que los eventos de defosforilación de Tyr-proteínas y MAPK parecen estar implicados en la producción de *t*-R, no se observa una dependencia clara de Ser/Thr PK y PP en la producción de *t*-R dirigida por CDM y se requieren estudios más profundos para asignar una posible implicación de estas PK y PP en la producción de *t*-R dirigida por CDM y MJ (Figura 4.23 a y b).



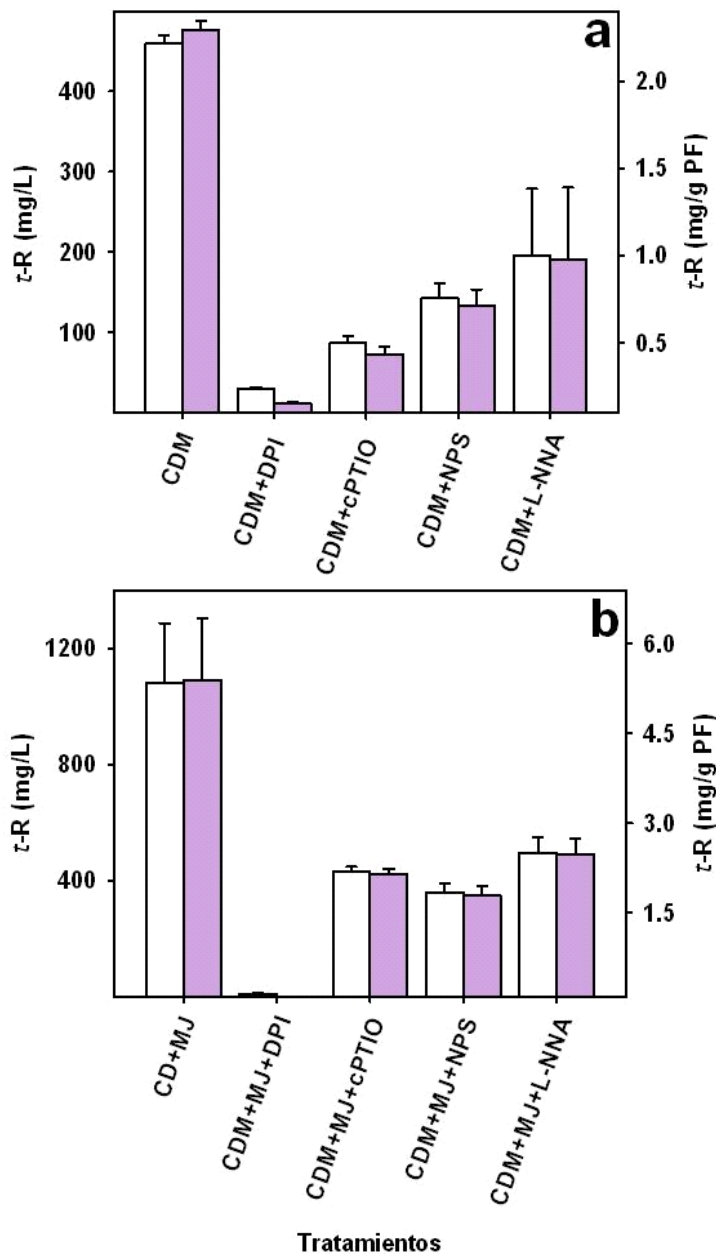


**Figura 4.23** Efecto de diferentes inhibidores de PK y PP en la producción (mg/L, barras blancas) y productividad (mg/g PF, barras violetas) de *t*-R extracelular en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidas con CDM (a) o CDM+MJ (b).

#### 4.2.3 Implicación $H_2O_2$ y NO en la producción de *trans*-resveratrol desencadenada por ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo

Las reacciones de defensa incluyen la producción de  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  que están mediadas por una NADPH oxidasa y superóxido dismutasa de membrana. Además, el  $H_2O_2$  es una molécula clave implicada en la cascada de señalización dirigida por elicitores (Lecourieux et al. 2006). La producción de estas especies reactivas es inhibida por DPI tal como describe Desikan et al. (1996). Cuando se estudió el efecto de este inhibidor para determinar el papel del  $H_2O_2$  en la producción de *t*-R inducido por CDM solas o

en combinación con MJ en suspensiones celulares de *Monastrell*, se observó un descenso drástico en los niveles de *t*-R debido al pre-tratamiento con DPI. Estos resultados sugieren que la biosíntesis de  $H_2O_2$  tiene una participación importante en la ruta de señalización para la producción de *t*-R (Figura 4.24 a y b).



**Figura 4.24** Efecto de diferentes efectores en la producción extracelular de *t*-R en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM (A) o CDM+MJ (B).

También existen evidencias de la producción de NO en células vegetales (Wendehenne et al. 2004). Para estudiar la posible implicación del NO en la ruta de señalización dirigida por CDM solas o en combinación con MJ para la producción de *t*-R, las suspensiones celulares de *Monastrell* se pre-trataron con compuestos que

actuaban inhibiendo la NO sintetasa (L-NNA), secuestrando NO (cPTiO) o donando NO (NPS). En la Figura 4.24 a y b se observa que la producción de *t*-R es parcialmente dependiente de NO ya que se observó un descenso de la producción de *t*-R cuando se añade cPTiO. Además, una óxido nítrico sintasa es responsable de la biosíntesis de NO ya que el pre-tratamiento con L-NNA de las suspensiones celulares dio lugar a un descenso significativo de la producción de *t*-R. Asimismo, el pre-tratamiento de los cultivos con NPS, daba lugar a un descenso de la biosíntesis de *t*-R, lo cual sugiere que altas concentraciones de NO inhiben dicha producción.



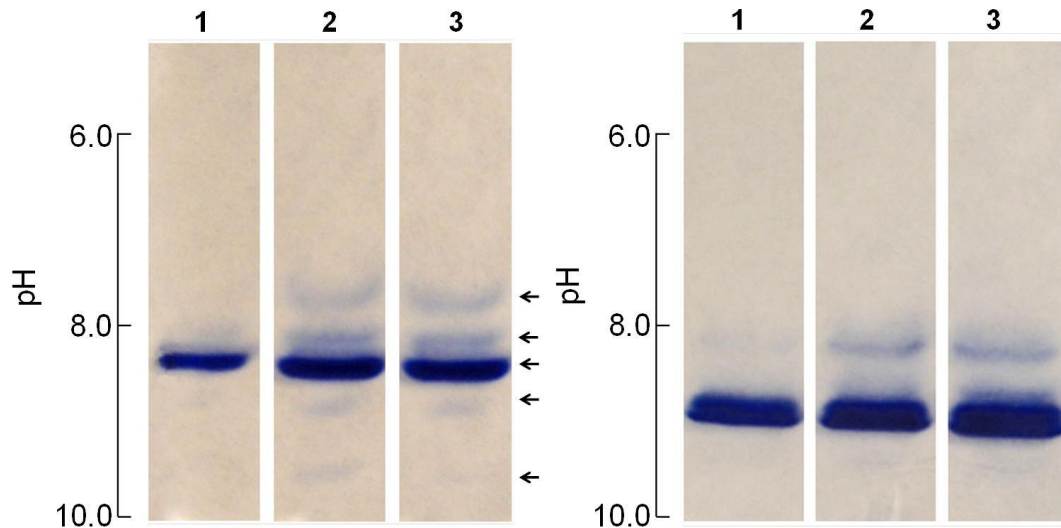
4.3 Protéínas extracelulares expresadas en  
suspensiones celulares elicidadas de *Vitis vinifera* cv  
Monastrell



### 4.3.1 Características de la peroxidasa de Monastrell en presencia de elicitores

#### 4.3.1.1 Patrón isoenzimático de peroxidasas extracelulares de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar

El análisis isoenzimático de la peroxidasa extracelular realizado mediante isoelectroenfoque analítico reveló la presencia de cinco bandas detectadas en los medios de cultivo de suspensiones celulares con distintos VEC elicidadas con CDM. Como puede apreciarse en la Figura 4.25, el patrón de isoenzimas de peroxidasa extracelular prácticamente no varía a las diferentes densidades celulares ensayadas, si bien, disminuye la intensidad de las bandas dependiendo del VEC. Con la finalidad de observar las isoenzimas de elevado pI, los patrones isoenzimáticos se determinaron tanto en condiciones de equilibrio como de no equilibrio, una vez establecido el gradiente de pH. De esta manera, en la zona más básica del gel obtenido en condiciones de no equilibrio, se detectó una banda de  $pI > 9$  que no aparece en condiciones de equilibrio, debido a su naturaleza fuertemente básica.



**Figura 4.25** Patrón de isoenzimas de peroxidasa básica extracelular de suspensiones celulares de Monastrell revelado por IEF en no equilibrio (izquierda) y en equilibrio (derecha). Células tratadas con CDM en todos los casos, siendo la densidad de las suspensiones celulares baja en la calle 1, media en la 2 y alta en la 3.

Estos resultados están de acuerdo con los patrones de isoenzimas de peroxidasa descritos por otros autores (Calderón et al. 1992a; Ros Barceló et al. 2003; Bru et al. 2006) que detectan la presencia de las bandas tercera y quinta como isoenzimas de peroxidasa de naturaleza básica constitutivas ya que se encuentran

en los medios de cultivo tanto de suspensiones celulares control, como de las elicidadas, siendo sus pls próximos a 8.2 y 9.4, respectivamente. Por tanto, la banda que presenta mayor actividad, de pl aproximado a 8.2, se correspondería, según la nomenclatura utilizada por Calderón et al. (1992b), con la isoenzima básica de peroxidasa, B4. Esta isoenzima de peroxidasa resultó ser la mayoritaria en los cultivos celulares de Monastrell.

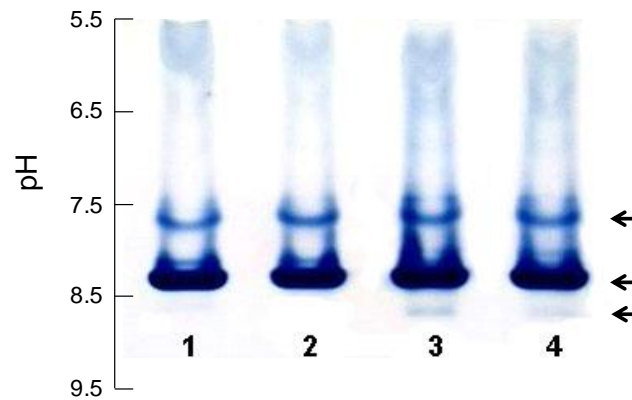
Además, el patrón de isoenzimas correspondiente a los cultivos elicitados mostró una banda de pl superior a la B4, descrita por Ros Barceló et al. (2003) inducible en variedades sensibles a *P. viticola*, como el cv. Monastrell y, constitutiva en variedades resistentes a este hongo, tales como cruces entre *V. viticola* y *V. rupestris*. Esta isoenzima también se observó tanto en hojas como en tallos de los cultivares resistentes, sin embargo no aparecía ni en tallos ni en hojas de las variedades susceptibles, por lo que se concluye que los genes de resistencia que codifican esta isoenzima de peroxidasa se encuentran presentes tanto en los cultivares resistentes como en los sensibles, con la diferencia de que, en estos últimos, están quiescentes en ausencia de elicitor.

#### **4.3.1.2 Patrón isoenzimático de peroxidasas extracelulares de suspensiones celulares de Monastrell elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o luz UV-C**

Como se observa en la Figura 4.26, el patrón de isoenzimas de peroxidasa extracelular correspondiente a los ensayos de elicitación con CDs y UV, mostró la presencia de, al menos, dos isoenzimas comunes a todos los tratamientos. Los pls de dichas isoformas de peroxidasa estaban próximos a 7.6 y 8.2. Este hecho permitió su identificación como las isoenzimas de peroxidasa básicas B2 y B4 respectivamente según la nomenclatura de Calderón et al. (1992b). A la vista de los resultados y debido a la presencia de la isoenzima B2 tanto en controles como en las suspensiones elicidadas, esta isoenzima, también es constitutiva al igual que la B4 descrita en el apartado anterior. Estos resultados coinciden con los obtenidos en suspensiones celulares de la variedad Gamay no sometidas a ningún tratamiento (García JJ 2006).

Por otra parte, en la Figura 4.26 también se observa una tercera banda de pl superior a 8.5, también observada por Calderón et al. (1992a) y detectada solo en el patrón isoenzimático de la peroxidasa extracelular en presencia de CDM solas o en combinación con luz UV. Sin embargo esta isoenzima de peroxidasa no se ha





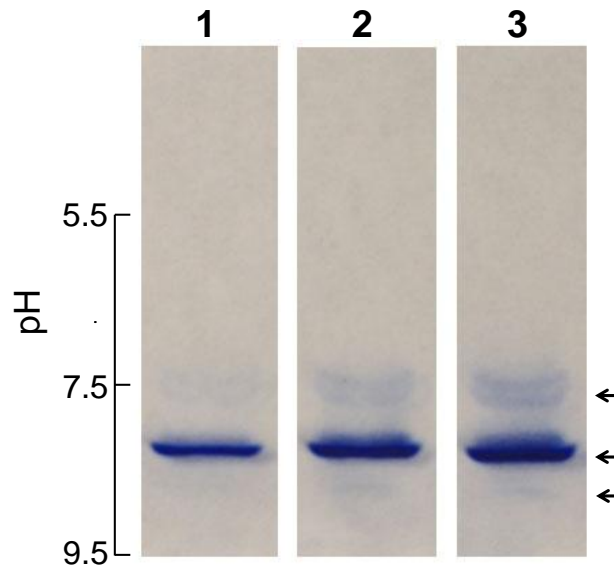
**Figura 4.26** Isoelectroenfoque analítico del patrón de isoenzimas de peroxidasa del medio de cultivo de suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM y luz UV-C. En la calle 1 el tratamiento control, en la 2 luz UV, en la 3 CDM y en la 4 CDM y luz UV.

detectado en el medio de cultivo de suspensiones celulares control, ni en el tratamiento sólo con luz UV. Estos datos sugieren que la síntesis de esta isoforma de peroxidasa está inducida por elicitores de naturaleza biótica tales como las CDM, pero no es estimulada por la presencia de elicitores abióticos como la luz UV-C, ya que, en estas condiciones de tratamiento con luz UV no se detecta su presencia. Por lo tanto, esta isoenzima inducible se define como un marcador de resistencia, presente en los cultivos celulares de *Monastrell* tal como indica Ros Barceló et al. (2003).

#### 4.3.1.3 Patrón isoenzimático de peroxidases extracelulares de suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo

El patrón de isoenzimas de peroxidasa correspondiente a los ensayos de elicitación conjunta con CDM y MJ a diferentes densidades celulares reveló la presencia de cuatro bandas observándose mayor actividad cuanto mayor es el inóculo inicial de células utilizado en la elicitación. Entre las bandas observadas, destaca la presencia de la isoenzima de peroxidasa mayoritaria de pH 8.2, constitutiva denominada B4 (Calderón et al. 1992a y 1992b) presente tanto en controles como en tratamientos con CDM, luz UV-C y/o MJ. Asimismo la primera banda, con pl próximo a 7.6, constitutiva e identificada como isoenzima B2 por Calderón et al. (1992b), aunque presenta menor actividad se ha detectado en todos los tratamientos mencionados anteriormente. Estos resultados también coinciden con los descritos en suspensiones celulares de otras variedades como Gamay (García JJ 2006) en los que coincide el patrón de isoenzimas de peroxidasa extracelular

con el de Monastrell. Por otro lado y presentando la menor actividad, se observó una banda de  $pI > 8.5$  que ha sido identificada por Ros Barceló et al. (2003) como marcadora de resistencia e inducible en especies sensibles como es el caso de Monastrell (Figura 4.27).



**Figura 4.27** Isoelectroenfoque analítico del medio de cultivo de suspensiones celulares elicitadas con CDM y MJ a distintas densidades celulares: baja densidad (1), densidad media (2), alta densidad (3).

#### 4.3.1.4 Actividad peroxidasa y producción de $H_2O_2$ en suspensiones celulares de Monastrell elicitadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo

La actividad peroxidasa y la concentración de  $H_2O_2$  se determinó en el medio de cultivo de suspensiones celulares de Monastrell que habían sido elicitadas con CDM y MJ.

Como se aprecia en la Tabla 4.5, la elicitación con CDM y/o MJ produce una disminución de la actividad peroxidasa extracelular. Por otra parte, la elicitación con CDM solas da lugar a una producción similar de  $H_2O_2$  que el control siendo a su vez semejante a los niveles alcanzados en suspensiones celulares de otras variedades como Gamay ( $1.71 \mu M$ ; García JJ 2006) por lo que las CDM podrían estar actuando como protectoras frente a estas ROS. Sin embargo, la presencia de MJ produce un aumento del  $H_2O_2$  aunque vaya acompañado de CDM, probablemente porque el posible efecto protector de las CDM no sea suficiente. En cualquier caso, la concentración de  $H_2O_2$ , analizada en los medios de cultivo para detectar la existencia de estrés celular, es baja (de orden  $\mu M$ ), por lo que en principio no

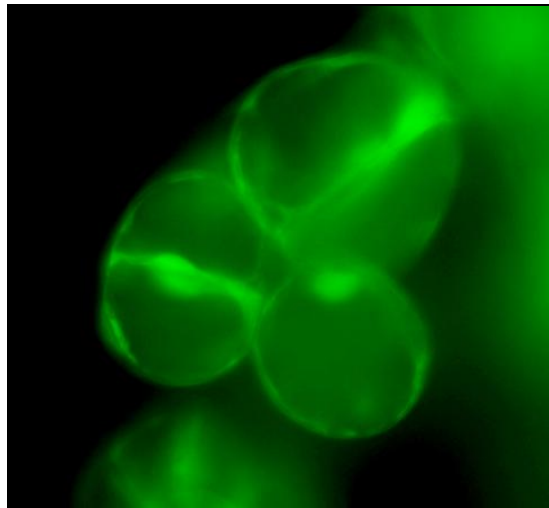
representa ningún riesgo para la supervivencia de las células en suspensión y, por lo tanto, para la producción de *t*-R.

**Tabla 4.5** Actividad enzimática y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM (50 mM) y/o MJ (100  $\mu$ M).

Tratamiento	Actividad (nKat/mL)	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] ( $\mu$ M)
Control	129	1.77
MJ	-	2.04
CDM	27.51	1.42
CDM+MJ	28.49	3.91

Además, esta suposición se corrobora mediante la observación de las células al microscopio de fluorescencia utilizando como marcador de viabilidad 3',6'-diacetilfluoresceína (DAF), según el protocolo establecido por Huang et al. (1986). Una vez que el fluoróforo penetra en la células, los grupos acetilo se hidrolizan por hidrolasas ligadas a la membrana (Stubberfield y Shaw 1990), y por las esterasas citoplasmáticas (Steward et al. 1999). La fluoresceína queda libre, emitiendo fluorescencia verde a 490 nm cuando se ilumina con luz UV.

El tratamiento de las células con DAF ha permitido observar que la actividad celular se concentra principalmente, alrededor de la membrana plasmática y en los anillos de división celular, presentando mayor intensidad durante la fase exponencial.

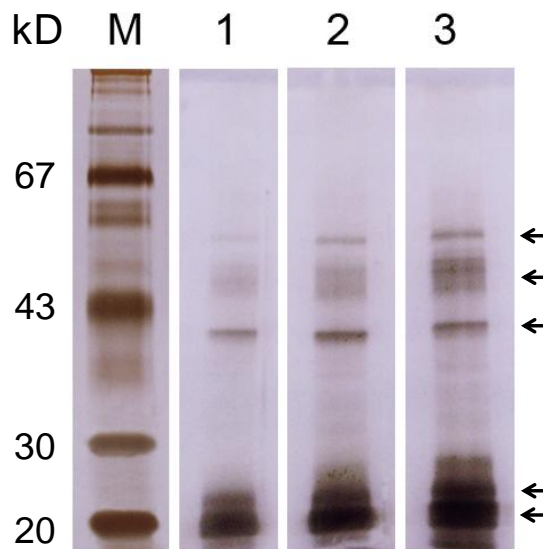


**Figura 4.28** Células de *Monastrell* teñidas con el marcador fluorescente 3',6'-diacetilfluoresceína (DAF), según el protocolo establecido por Huang et al. (1986).

### 4.3.2 Patrón de proteínas extracelulares totales de suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas.

#### 4.3.2.1 Elicitadas con ciclodextrinas metiladas al azar y jasmonato de metilo

La determinación de proteínas extracelulares presentes en el medio de cultivo de suspensiones celulares elicidadas con CDM en presencia y ausencia de distintas concentraciones de MJ, se realizó mediante electroforesis desnaturalizante sobre geles de poliacrilamida reveladas posteriormente con tinción de plata. En la Figura 4.29 se observan cinco bandas de proteínas que muestran unos pesos moleculares aproximados de 22, 25, 40, 49 y 56 kDa.



**Figura 4.29** Patrón de proteínas totales del medio extracelular de suspensiones celulares de *Monastrell* realizado mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y teñido con tinción de plata. La calle M se corresponde con el marcador de peso molecular, y las otras con los distintos tratamientos, siendo: (1) CDM+MJ 450  $\mu$ M, (2) CDM+MJ 270  $\mu$ M, (3) CDM.

Como se observa en la Figura 4.29, las proteínas mayoritarias que presentan pesos moleculares de 22 y 25 kDa, podrían corresponderse con las identificadas por Hayasaka et al. (2001), como proteínas solubles del tipo taumatina y quitinasas, presentes en distintas variedades de *V. vinifera*, con masas moleculares de 21 y 26 kDa, respectivamente. La diferencia entre las masas moleculares obtenidas para una misma proteína en estos dos casos, podría deberse a pequeñas diferencias encontradas en su patrón de glicosilación, aunque no se descarta que estas diferencias se deban a los métodos utilizados para obtener las masas moleculares, como ha sucedido en otros trabajos (Pocock et al. 2000). Estas proteínas están relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas frente a infecciones,

heridas y situaciones de estrés (Boller 1987; Linthorst 1991; Stintzi et al. 1993), no estando su síntesis necesariamente ligada a la presencia de factores inductores (Clendennen y May 1997; Fils-Lycaon et al. 1996; McCollum 1997; Pressey 1997). Aunque se haya encontrado coincidencia entre los pesos moleculares de las proteínas descritas por Hayasaka et al. (2001) y las encontradas en los geles de la Figura 4.29 no se descarta que pueda tratarse de dos quitinasas, dada la gran variabilidad de pesos moleculares de este tipo de proteínas dentro del género *Vitis* (Salzman et al. 1998; Pocock et al. 2000; Hayasaka et al. 2001; Pastorello et al. 2003).

Las peroxidasas vegetales de secreción son glicoproteínas cuyo peso molecular generalmente está comprendido entre 40 y 45 kDa, rango en el que se incluyen algunas de las peroxidasas, entre las que se encuentran las isoenzimas de cacahuete (42 y 40 kDa, Chibbar et al. 1984), de tomate (46 kDa, Jen et al. 1980), o de tabaco (36 kDa, Gazaryan y Lagrimini 1995), aunque en ocasiones, se han determinado pesos moleculares aparentes, que quedan fuera de este intervalo, variando entre 33 y 70 kDa como es el caso de las peroxidasas del fruto de fresa (58.1 y 65.5 kDa, Civello et al. 1995), del pimiento (59 kDa, Pomar et al. 1997) o de una isoenzima ácida de aguacate (60 kDa, Sánchez-Romero 1995). Por este motivo, la banda de 40 kDa podría corresponderse a una isoforma de peroxidasa, debido a la proximidad de su peso molecular con el de otras isoformas descritas en la bibliografía. La glicosilación de esta enzima varía entre el 0 y el 25%, siendo los principales azúcares que presenta la N-acetilglucosamina, la manosa, la fucosa y la xilosa. La glicosilación es uno de los factores principales que determinan la inusual estabilidad térmica de las peroxidasas vegetales de secreción (McEldoon y Dordrick 1996) ya que la eliminación de estos oligosacáridos normalmente afecta la cinética de las peroxidasas, su estabilidad térmica, su resistencia a las proteasas (por ejemplo tripsina), su estructura secundaria, y sus propiedades inmunológicas (Sánchez-Romero et al. 1994; Tams y Welinder 1995; Duarte-Vázquez et al. 2003). Asimismo, esta gran variabilidad en el patrón de glicosilación da lugar a isoformas con distintos pesos moleculares por lo que las bandas de 49 y 56 kDa también podrían corresponderse con isoformas de peroxidasa con distinto grado de glicosilación.

### **4.3.3 Identificación del proteoma extracelular de suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o jasmonato de metilo mediante la técnica label-free**

En general, un único gen, puede dar lugar a múltiples proteínas debido a fenómenos de procesamiento alternativo del mRNA y a modificaciones post-traduccionales, además, para una misma especie, los polimorfismos en las secuencias, generan también variantes alélicas de las proteínas. Por ello, si bien las bases de datos de proteínas generadas a partir del genoma de un organismo son una herramienta fundamental para la identificación de proteínas a partir de espectros de masas (MS) de péptidos, sin embargo éstas no constituyen un reflejo exacto del complemento proteico de ese organismo (Patel et al. 2009).

Una de las maneras de abordar el estudio del proteoma se basa en la separación de proteínas en geles de poliacrilamida mediante electroforesis mono- o bidimensional. Posteriormente se realiza la digestión de las proteínas del gel y las MS de los péptidos extraídos se utilizan para interrogar las bases de datos e identificar las proteínas. Sin embargo, estas técnicas presentan una serie de inconvenientes asociadas al uso del gel, tales como el corto rango dinámico de los métodos de detección, la limitada resolución del gel y el rendimiento limitado de las muestras (Ong et al. 2001).

Por otro lado, se han desarrollado una serie de técnicas, no basadas en gel, para el análisis de muestras complejas de proteínas, también llamadas experimentos "shotgun", donde todo el proteoma es digerido sin separación previa (Patel et al. 2009) y posteriormente, el peptidoma resultante es sometido a separación cromatográfica simple (fase reversa) u ortogonal (intercambio catiónico-fase reversa) y analizado en línea en un espectrómetro de masas. La interrogación de las bases de datos con el paquete de MS genera listas de péptidos que han de ser ensamblados en proteínas mediante inferencia dando como resultado una lista de proteínas en la muestra (Nesvizhskii y Aebersold 2005). En proteómica cuantitativa no basada en geles, se han desarrollado técnicas que usan marcaje isotópico estable: de aminoácidos (SILAC) (Ong et al. 2002), péptidos marcados con isótopos estables (Kuhn 2004), péptidos sintetizados químicamente (Gerber 2003), marcaje de masas en tándem (TMT) (Thompson 2003) y marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) (Ross 2004), entre otras. Sin embargo, también presentan algunas limitaciones como la compleja preparación de las

muestras, la necesidad de una mayor concentración de la muestra y el marcaje incompleto (Patel et al. 2009).

Para resolver estos problemas, en los últimos años se han desarrollado unas técnicas que no requieren marcaje isotópico y se les denomina "label-free". La cuantificación puede basarse en diferentes atributos, tales como la suma de scores de péptidos idénticos (PMSS) (Allet 2004) y el muestreo de espectros (SpS) (Liu 2004). Estas técnicas pueden combinarse con la evaluación estadística para detectar proteínas que se están expresando de forma diferencial (Colinge 2005). Asimismo, se ha observado que las técnicas ESI proporcionan señales cuya intensidad se correlaciona linealmente con el incremento de la concentración (Chelius et al. 2002). Últimamente, se ha publicado una metodología que se basa en los cambios de señal de cada masa y su correspondiente  $R_t$  (AMRT) para reflejar las concentraciones relativas de una muestra respecto a otra (Silva 2005); además, esta metodología ya se ha desarrollado para realizar cuantificación relativa y absoluta (Silva 2006a y 2006b).

En este caso, se ha utilizado la aproximación label-free, para la identificación del proteoma extracelular de suspensiones celulares de vid y las variaciones que sufre debido a la elicitación con CDM y/o MJ. Para el análisis de los datos se ha utilizado el software Progenesis LC-MS (NonLinear Dynamics) que permite la cuantificación de proteínas en base a las señales de intensidad de los precursores en barridos MS y su identificación mediante el uso de sus correspondientes barridos MS/MS. En este software se han subido las carreras LC-MS de cada una de las muestras y se ha seleccionado la carrera más representativa como referencia para el alineamiento de las otras con respecto a ésta. El alineamiento de las carreras se lleva a cabo para corregir la variabilidad que se produce de una inyección a otra en el tiempo de retención por la elución de los péptidos durante la separación cromatográfica. Para ello, se realizó un alineamiento manual seguido del alineamiento automático para conseguir el resto de vectores y así lograr mejores resultados.

Se seleccionaron 2266 posibles precursores peptídicos (features) por su carga (+2 o +3) y su  $R_t$  (20-60 min). Dado que la velocidad de barrido del espectrómetro no permite aislar y fragmentar todos los precursores que coeluyen en un pico cromatográfico, sólo un porcentaje de ellos lleva asociado espectros de MS/MS que hacen posible su identificación (ver método de adquisición en el apartado 3.5.8.2 de Materiales y Métodos). Los precursores cuyas variaciones de intensidad entre los diferentes grupos de muestras tenían un valor  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  en un test ANOVA

se etiquetaron específicamente, así como aquellos de los que se disponía de su espectro de MS/MS. En total, el conjunto de espectros MS/MS permitió la identificación mediante búsqueda en Mascot contra NCBI nr de 343 secuencias peptídicas únicas con un score igual o mayor que 25, que representan un 15% de los precursores seleccionados. Tras ensamblar los péptidos en proteínas, los conflictos de asignación definitiva de péptidos a proteínas se resolvieron priorizando *Vitis* frente a otras especies, la secuencia de score más alto y la homogeneidad de los perfiles de abundancia entre los grupos de muestras. En la tabla 4.6 se muestran las identificaciones cuyo umbral de score era igual o superior a 60.



**Tabla 4.6** Proteínas con score superior a 60

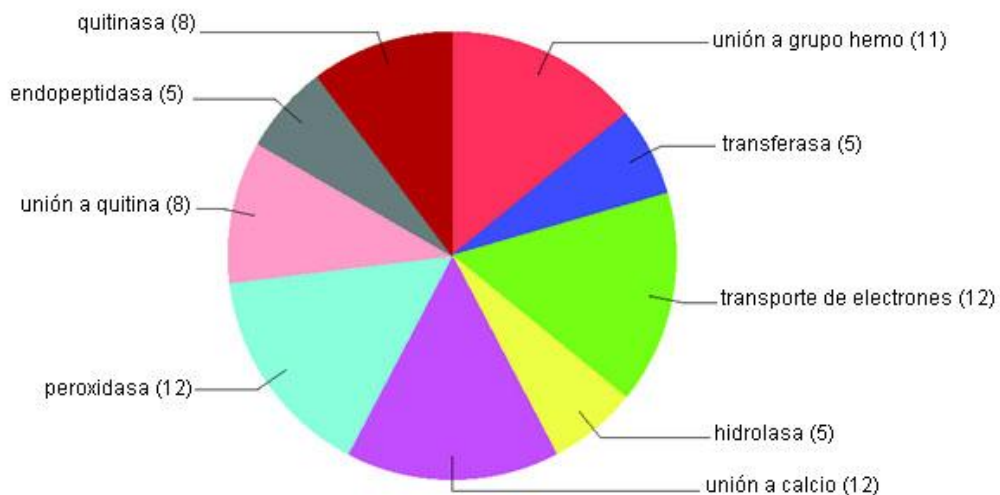
Nº Acceso	Nº péptidos	Score	Nombre*
gi 225455195	28	1528.79	Peroxidasa 5 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 225459180	18	1064.61	Peroxidasa catiónica 1 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
gi 147811111	14	809.77	Familia de proteínas glicerosforil diéster fosfodiesterasa [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]
gi 2254	9	533.55	Peroxidasa catiónica 1 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
gi 225439623	11	486.13	Peroxidasa catiónica 1 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
gi 225453022	9	421.87	Proteína PR-4 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 147838866	8	382.11	Peroxidasa de clase III GvPx2b [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 225439625	7	353.94	Peroxidasa catiónica 1 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
gi 225430555	8	325.23	Familia de proteínas aspartil proteasas [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
gi 147846526	8	323.39	Precursor de reticulina oxidasa
gi 225434078	5	291.98	Quitinasa de clase IV [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 3511147	4	280.44	Proteína PR-4 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 37992763	9	276.81	$\beta$ -1,3-glucanasa [ <i>Vitis riparia</i> ]
gi 225441373	8	260.67	$\beta$ -1,3-glucanasa
gi 225434381	5	230.16	Peroxidasa 4 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 225429117	2	225.79	Proteína relacionada con la patogénesis 1
gi 147814943	3	206.84	Alfa-amilasa
gi 2306811	6	182.45	Quitinasa de clase IV [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 6273385	3	178.63	Proteína tipo taumatina 1SCULTL2 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 225434050	3	172.20	Quitinasa de clase IV
gi 225432965	5	167.36	Inhibidor de proteasas [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 1839046	3	156.66	Proteína tipo osmotina [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 147860594	2	155.29	Peroxidasa de clase III GvPx2b [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 147823287	2	142.92	Factor de tipo inhibidor de tripsina
gi 225432971	2	137.06	Inhibidor de proteasa 2 [[ <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i> ]
gi 2306813	6	133.60	Endoquitinasa de clase IV [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 147784683	2	132.07	Proteína de secreción básica de tipo NtPRp27
gi 225457600	3	131.48	$\beta$ -1,3-glucanasa [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 225459538	3	128.86	Proteína que contiene un dominio de unión LysM a peptidoglicano
gi 225439627	3	127.74	Peroxidasa de clase III
gi 225466091	2	127.57	Proteína SKU5 de tipo oxidasa de cobre I [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]

gi 225427492	2	123.57	Proteína de union a Acyl-CoA
gi 225428879	3	112.3	Granulina; Peptidasa C1A, papaína [ <i>Medicago trunculata</i> ]
gi 225453525	2	111.77	Precursor similar a beta expansina 1
gi 225429131	6	111.35	Proteína PR-1
gi 225470066	3	106.52	Inhibidor bifuncional de la transferencia de lípidos /proteína similar a albúmina de almacenamiento en semillas 2s
gi 147805839	2	98.57	Quitinasa extracelularde clase I [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 225441645	3	85.32	<b>β-1,3-glucanasa ácida</b> [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 225462505	1	78.14	Endotransglicosilasa de xiloglucano/precursor de hidrolasa XTH-14 [ <i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i> ]
gi 225451467	1	72.91	Proteína similar a peroxidasa 55 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
gi 225447360	2	72.69	Similar a proteína de secreción 38 rica en repeticiones de cisteína [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
gi 225456525	2	70.15	Proteína similar a la protein de tipo MtN19 [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 225445051	1	64.87	Familia de proteínas a las fosfatasa ácidas de clase B [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]
gi 1549400	1	64.59	β-1,3-glucanasa [ <i>Vitis vinifera</i> ]
gi 225448120	2	62.27	Inhibidor de endopeptidasa tipo serina
gi 147862366	2	59.83	Proteína 3 tipo heparanasa [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]

Se han resaltado en amarillo las proteínas encontradas en los análisis label free y microsecuenciación.

#### 4.3.3.1 Anotación y análisis de ontología

Como puede observarse en la distribución de la función molecular para las secuencias encontradas (Figura 4.30), la mayor parte de las anotaciones se corresponden con proteínas de tipo peroxidasa (y proteínas unidas a grupos hemo), así como proteínas aceptoras/donadoras de electrones. En otro grupo podrían incluirse las anotaciones que hacen referencia a las PRp inducidas como respuesta de defensa contra patógenos así como estreses naturales causados por frío, sequía, estrés osmótico, luz UV, toxicidad causada por metales, etc. Entre estas proteínas se encuentran aquellas con actividad quitinasa así como las de unión a quitina, también las que tienen actividad endopeptidasa, transferasa e hidrolasa, todas ellas con características de respuestas de defensa. También se ha encontrado un grupo de anotación bastante numeroso de proteínas de unión a calcio, las cuales están relacionadas con eventos de señalización desencadenados durante los estados de estrés descritos anteriormente.

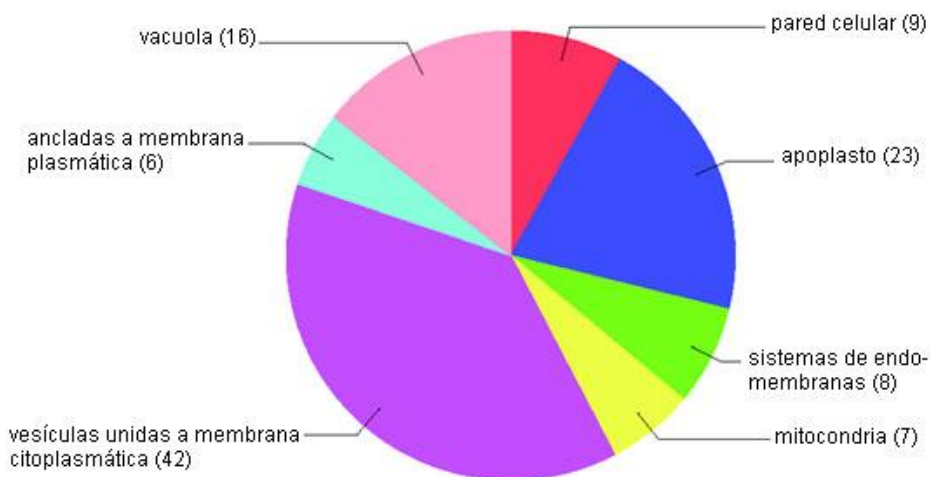


**Figura 4.30** Distribución de secuencias según su función molecular. Los datos se han filtrado utilizando un cutoff=5.0, por lo que el gráfico se ha realizado utilizando las anotaciones en términos GO presentes al menos en 5 secuencias.

En la gráfica de distribución de las secuencias según su pertenencia a los distintos componentes celulares (Figura 4.31), la mayoría se correspondían a proteínas relacionadas con el sistema de endomembranas, como vesículas citoplásmicas delimitadas por membrana y proteínas presentes en la vacuola así como otras proteínas ancladas a la membrana plasmática. Otro grupo de anotaciones bastante numeroso es el de las proteínas presentes en la pared celular vegetal y el apoplasto.

También se encontraron algunas anotaciones como proteínas mitocondriales siendo las que presentaron menor abundancia de anotaciones.

Estos resultados apoyarían la identificación de las proteínas en términos de función y localización característicos de pared celular y apoplasto ya que las muestras procedían de medio extracelular de suspensiones celulares de *Monastrell* correspondiéndose con la mayoría de las anotaciones asignadas a estos productos génicos. El hecho de que aparezcan anotaciones de vacuola, vesículas citoplásmicas y mitocondria puede explicarse en base a la múltiple localización de una proteína durante su biogénesis o a la existencia de isoformas localizadas en diferentes compartimentos celulares. Dado que las anotaciones han sido capturadas de secuencias homólogas, esta multiplicidad de ubicaciones subcelulares es asumible como “artefacto” del mecanismo de anotación empleado. No obstante, el origen de la muestra proteómica, medio extracelular del cultivo, queda perfectamente reflejado en el resultado de la anotación.

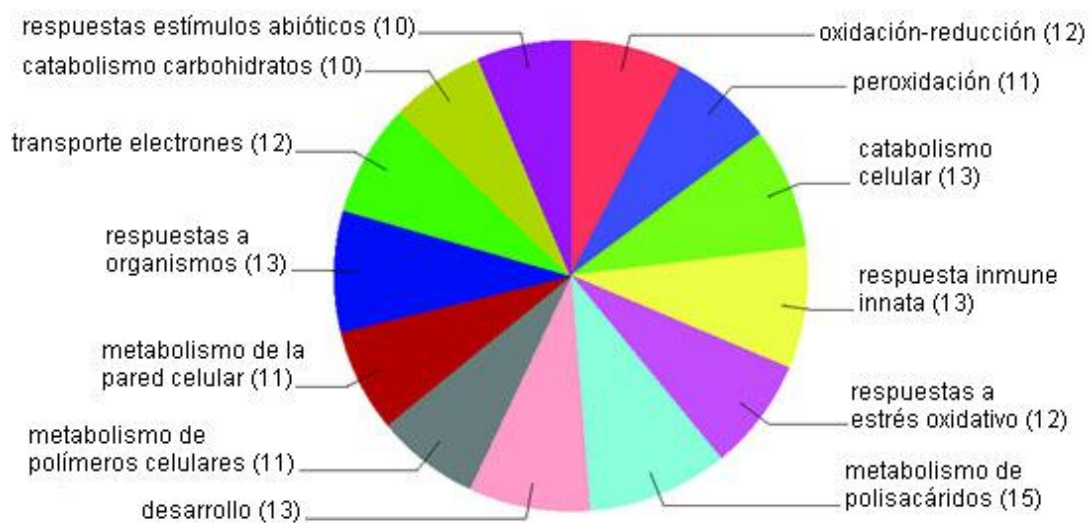


**Figura 4.31** Distribución de secuencias por componente celular. Los datos se han filtrado utilizando un cutoff=6.0, por lo que el gráfico se ha realizado utilizando las anotaciones en términos GO presentes en al menos 6 secuencias.

En la Figura 4.32 se muestra la distribución de secuencias según el proceso biológico en el que participan potencialmente. Como puede observarse, la mayoría de las anotaciones hacen referencia a respuestas de defensa frente a estímulos abióticos, otros organismos, respuesta inmune innata y estrés oxidativo (oxidación-reducción, transporte electrónico, reacciones de peroxidasas). En otro grupo de anotaciones se encontrarían las relacionadas con procesos catabólicos generales y del catabolismo de carbohidratos, así como otros procesos metabólicos relacionados con la pared celular, biopolímeros y polisacáridos; considerando el gráfico de funciones

moleculares, el tipo de carbohidrato es quitina y beta-glucanos, que esta estrechamente relacionado con la respuesta de defensa. El último grupo de anotaciones se correspondería con procesos relacionados con el desarrollo.

Estos resultados indican que el metabolismo celular se encuentra desviado hacia procesos relacionados con la defensa, caracterizando el equivalente al espacio apoplástico como un entorno especializado en respuesta inmune y defensa a través de diferentes proteínas, como peroxidadas, quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, proteasas, PRp y proteínas inhibidoras de proteasas, las cuales podrían neutralizar la acción de proteasas liberadas por hongos o controlar la actividad de proteasas propias.

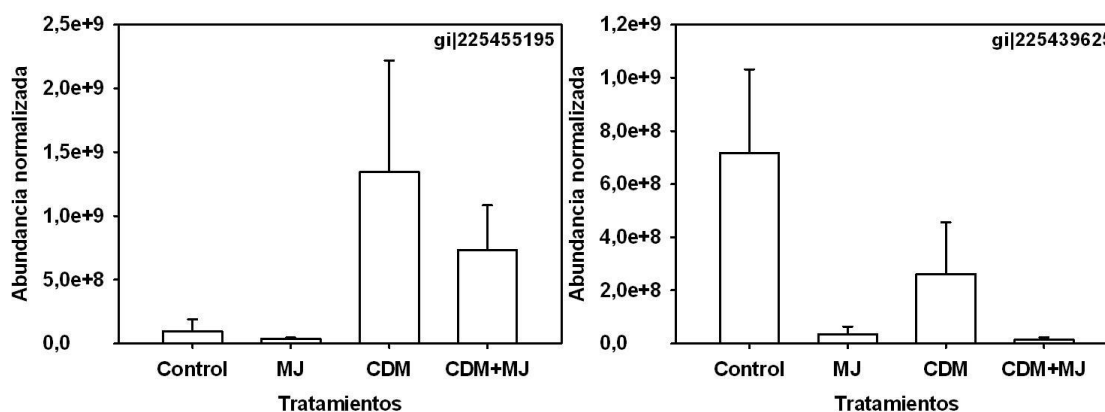


**Figura 4.32** Distribución de secuencias por proceso biológico. Los datos se han filtrado utilizando un cutoff=10, por lo que el gráfico se ha realizado utilizando las anotaciones en términos GO de al menos un 10% del conjunto de secuencias.

#### 4.3.3.2 Análisis diferencial

Para determinar los cambios significativos en la expresión de proteínas se han tomado aquellas identificaciones con ANOVA  $p < 0.05$  o próximo a éste, por lo que la lista ha quedado reducida a 11 proteínas (Figuras desde 4.33 a 4.38). El tratamiento de las suspensiones celulares con MJ provocó una disminución de los niveles de proteínas diferenciales con respecto al tratamiento control en la mitad de estas proteínas mientras que en la otra mitad, los tratamientos con CDM solas o en combinación con MJ provocaron una acumulación. Este fenómeno también se observó igualmente en los análisis electroforéticos bidimensionales de los medios de cultivo elicitados de la variedad Gamay (Martinez-Esteso et al. 2009). La proteína que resultó ser más abundante fue la peroxidasa 5 de *V. vinifera* (Figura 4.33; gj|225455195) mostrando su mayor expresión en los tratamientos con CDM solas o en combinación con MJ, no

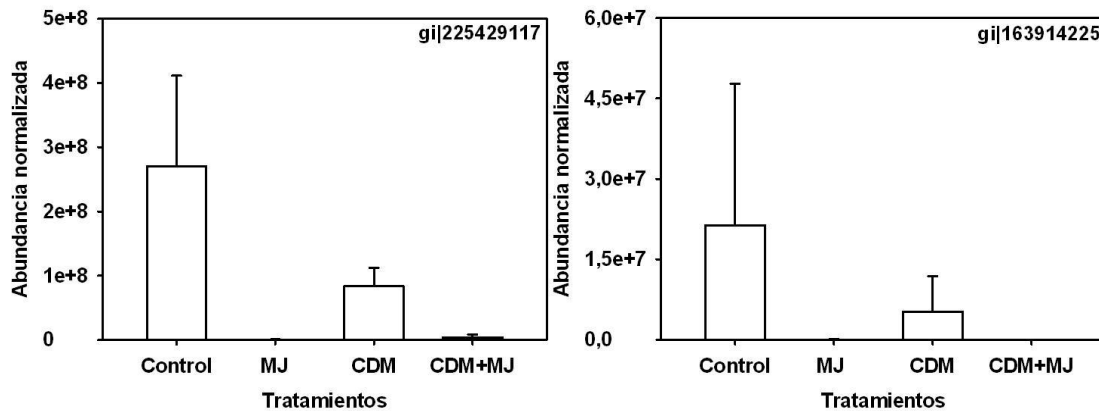
existiendo diferencias significativas entre estos tratamientos. La mayor expresión de esta peroxidasa fue de 14 y 35 veces más que en el tratamiento con CDM. Esta peroxidasa pertenece al grupo de peroxidases de secreción de clase III. Dentro del mismo orden de magnitud encontramos una proteína similar a la peroxidasa catiónica 1 de *A. thaliana* (Figura 4.33; gi|225439625), la cual se expresó fuertemente en el tratamiento control y en menor medida, en CDM (2.7 veces menos que en el control). Sin embargo, esta expresión se redujo con respecto a los tratamientos control, 20 y 53 veces en los tratamientos que contenían MJ solo o en combinación con CDM, respectivamente. Este tipo de proteínas pertenecientes a las peroxidases secretoras de clase III se inducen en respuesta a estrés, heridas o ataques de patógenos. Las peroxidases pertenecen a la subfamilia de proteínas PR-9 según la clasificación de van Loon et al. (2006) y una de sus funciones consiste en limitar la expansión de la infección mediante el establecimiento de barreras estructurales o mediante la producción de ROS y/o especies reactivas de nitrógeno (Passardi et al. 2004). Además, las peroxidases son capaces de producir la oxidación del t-R en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno. De hecho, cuando se adiciona t-R a un extracto enzimático procedente de un medio de cultivo elicitado, se produce la formación de dímeros del t-R (Martinez-Esteso et al. 2009). Estos dímeros (viniferinas) manifiestan una actividad antifúngica más elevada que el t-R.



**Figura 4.33** Abundancia normalizada ( $p < 0.05$ ) de la peroxidasa 5 de *V. vinifera* (gi|225455195) y la peroxidasa catiónica de *A. thaliana* (gi|225439625) a la derecha, encontradas en los distintos tratamientos

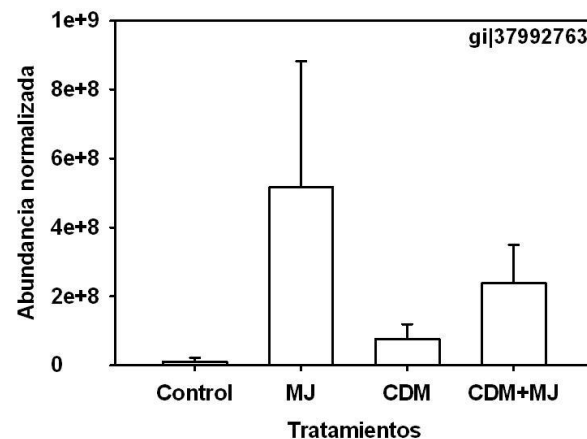
La reducción de la expresión de proteínas causada por MJ también la encontramos en las proteínas PR-1 (Figura 4.34; gi|225429117 y gi|163914225, esta última con un valor  $p \sim 0.05$ ), cuya expresión es constitutiva ya que se detectaron en los tratamientos control aunque también se expresó en menor medida, en los tratamientos con CDM.

Sin embargo, su expresión estuvo fuertemente reprimida en presencia de MJ solo o en combinación con CDM (Figura 4.34). Estas proteínas PR-1 se han descrito en tomate (Niderman et al. 1995) y tabaco (Kiba et al. 2003) y se caracterizan por poseer una elevada actividad antifúngica (Niderman et al. 1995). Aunque estas proteínas son constitutivas se inducen en presencia de patógenos o SA por lo que se utilizan como marcador en SAR (Tornero et al. 1994).



**Figura 4.34** Abundancia normalizada de las PR-1 gi|225429117 ( $p < 0.05$ ) a la izquierda y gi|163914225 ( $p \sim 0.05$ ) a la derecha, encontradas en los distintos tratamientos.

Entre las proteínas relacionadas con la defensa y el estrés también se identificó una  $\beta$ -1,3-glucanasa de *V. riparia* (Figura 4.35; gi|37992763), la cual era fuertemente inducida por MJ. Además, su expresión se incrementó, en menor medida, en presencia de CDM. Sin embargo, la combinación de ambos elicitors no provocó un efecto aditivo ni sinérgico ya que los niveles de expresión de esta proteína se redujeron a la mitad con respecto al tratamiento con MJ. Martínez-Esteso et al. (2009) detectaron la presencia de estas proteínas en suspensiones celulares de *V. vinifera* cv Gamay tanto en los tratamientos control como elicitados con CDM, lo cual puede estar relacionado con la diferente resistencia de los cultivares a patógenos, a la vez que indica que los tratamientos aplicados pueden potencialmente mejorar la resistencia en Monastrell. Estas proteínas PR también se han encontrado en suspensiones celulares control y elicitadas con MJ de *C. annuum* (Sabater-Jara et al. 2010) así como en medios de cultivo de suspensiones celulares de *Zinnia elegans*, *Cycas revoluta* y *T. baccata* lo que sugiere que su expresión es constitutiva ya que están implicadas en crecimiento, desarrollo y respuestas de defensa (Novo Uzal et al. 2009).

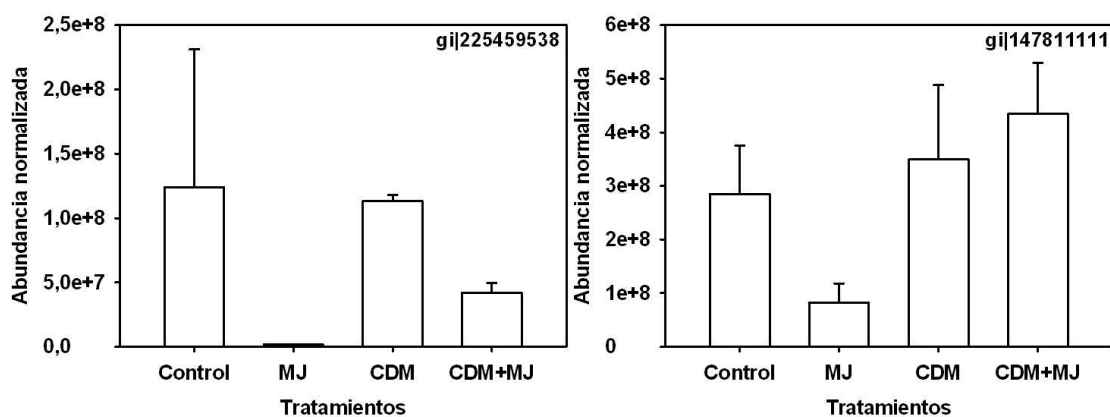


**Figura 4.35** Abundancia normalizada ( $p < 0.05$ ) de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *V. riparia* (gi|37992763), encontradas en los distintos tratamientos.

El efecto inhibitor de MJ se observó en la expresión de determinadas proteínas apoplásticas tales como aquellas que contienen dominios de unión LysM a peptidoglicano (Figura 4.36; gi|225459538). Así, la presencia de MJ disminuyó su expresión en 67 veces con respecto al tratamiento control mientras que en el tratamiento combinado se redujo su expresión casi tres veces con respecto al control (Figura 4.36). En el reino vegetal, las proteínas que contienen dominios LysM actúan como receptores que se unen a quitina y, a su vez, pueden tener o no actividad quitinasa. La quitina es el mayor componente de la pared celular de los hongos por lo que estas proteínas con dominios LysM se han asociado a respuestas de defensa contra hongos. Aunque las proteínas LysM se unen a oligómeros de N-acetil glucosamina y peptidoglicano, también pueden encontrarse asociados a carbohidratos (Zhang et al. 2009). Además, se encontraron secuencias que presentaban homologías con las de la familia de las glicerofosforil diéster fosfodiesterasas de *Nicotiana tabacum* (Figura 4.36; gi|147811111), que se expresaba de forma constitutiva ya que se observó en tratamientos control. En este caso, MJ también ejerce efecto inhibitor de su expresión aunque éste es contrarrestado cuando se adicionan CDM, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos en presencia de CDM solas y en combinación con MJ con respecto al control (Figura 4.36). Glicerofosforil diéster fosfodiesterasa se encuentra en una gran diversidad de organismos en los que se observa la presencia de dominios altamente conservados entre especies que podrían contener residuos esenciales para su actividad enzimática (van der Rest et al. 2004). En este sentido, los estudios del péptido señal de esta proteína realizados en *Daucus* y *A. thaliana* mostraron la existencia de una alta similaridad. Además, cuando



se analizaron EST en otras especies vegetales (*Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Zea mays*, *Medicago truncatula*, *Hordeum vulgare* y *Oryza sativa*) se observó la existencia de este péptido por lo que se trata de una familia de proteínas altamente conservada entre especies. Esta enzima parece estar implicada en el metabolismo de fosfolípidos y se localiza en la superficie de las células actuando en la remodelación de la matriz extracelular y en la señalización celular (Borner et al. 2002 y 2003). Además, existen evidencias de que esta proteína participa en numerosos procesos fisiológicos (Borner et al. 2003) encontrándose localizada en diferentes compartimentos celulares (Choi y Sano 2007).



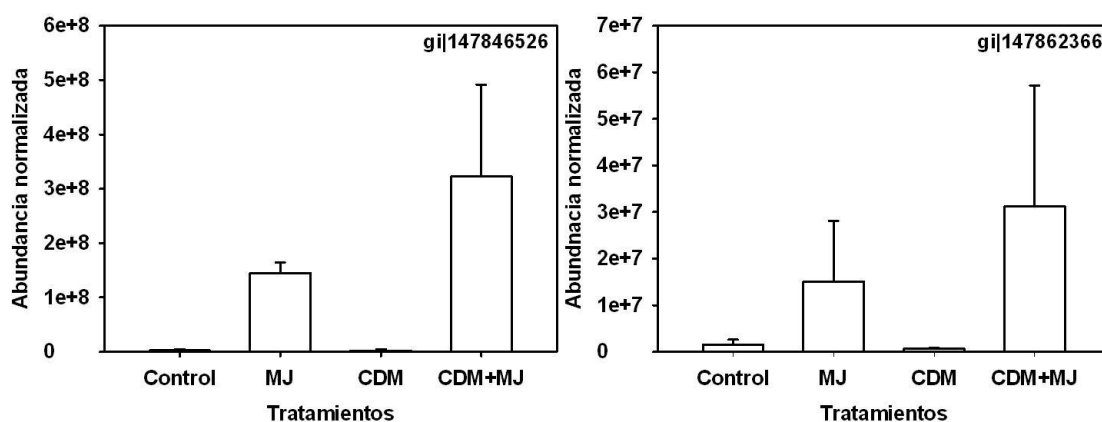
**Figura 4.36** Abundancia normalizada ( $p < 0.05$ ) de las proteínas apoplásticas LysM (gi|225459538) a la izquierda y glicerofosforil diéster fosfodiesterasa (gi|147811111) a la derecha, encontradas en los distintos tratamientos.

Por otra parte, entre las proteínas diferenciales también destacan dos grupos de proteínas que se inducen en presencia de MJ, una reticulina oxidasa (gi|147846526) y una proteína similar a heparanasa (gi|147862366) (Figura 4.37). Ambas presentaban un patrón de expresión similar ya que ni en el tratamiento control ni en el de CDM se observa un efecto estimulador de su expresión.

La reticulina oxidasa (Berberine bridge enzyme) cataliza la formación de (S)-esculerina a partir de (S)-reticulina, dirigiéndose a la formación de alcaloides de benzofenantridina. Estos compuestos son citotóxicos y se encuentran ampliamente distribuidos en algunas especies de la familia Papaveraceae y Fumariaceae aumentando en respuesta a ataques patógenos (Dittrich y Kutchan 1991; Dixon 2001). En este sentido, Custers et al. (2004) observaron que la adición de SA sobre hojas de lechuga y girasol inducía la expresión de una fracción proteica que presentaba actividad antifúngica. Además, estas proteínas contenían secuencias que presentaban alta homología con la reticulina oxidasa de *E. californica* y *P. somniferum*. Estos autores también observaron que se producía la activación de los genes que

codificaban para esta proteína cuando se producía una infección fúngica. La reticulina oxidasa puede usar una gran variedad de azúcares reducidos, sobre todo hexosas que se acumulan en la planta, tras la infección por patógenos, dando lugar a la producción de  $H_2O_2$ .

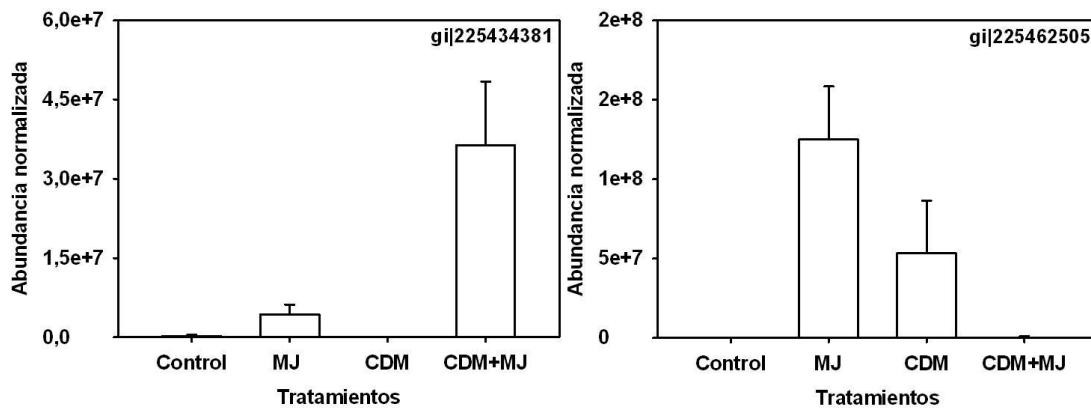
Asimismo se encontraron secuencias que presentaban homologías con la proteína 3 similar a heparanasa de *A. thaliana* la cual se sintetiza en el Aparato de Golgi en forma de proenzima y se transfiere a los endosomas/lisosomas para su transporte a la superficie celular donde ejerce su actividad glucuronidasa, participando en el metabolismo y remodelado de la pared celular (UniProt KB 2012).



**Figura 4.37** Abundancia normalizada ( $p < 0.05$ ) de las proteínas apoplásticas reticulina oxidasa (gi|147846526) a la izquierda y heparanasa (gi|147862366) a la derecha, encontradas en los distintos tratamientos

Por último, se identificaron otras dos proteínas diferenciales con un valor  $p \sim 0.05$  (gi|147846526 y gi|147862366) que eran inducidas por MJ y se encontraban ausentes los tratamientos control (Figura 4.38). La primera pertenece a las peroxidases secretoras de clase III que se caracterizan por presentar un gran número de isoenzimas, siendo algunas de ellas inducidas por patógenos y heridas. Así, se identificó una peroxidasa 4 de *V. vinifera* (gi|225434381) que se expresó en el tratamiento con MJ y no se detectó con CDM. Sin embargo, presentó una abundancia 8 veces superior en el tratamiento con CDM y MJ respecto a MJ solo. Es una PR-9 (Van Loon et al. 2006) que participa en numerosos procesos fisiológicos como lignificación, suberización, cicatrización de heridas y defensa contra patógenos (Hiraga et al. 2001). La segunda proteína presentó coincidencia con una xiloglucano endotransglucosilasa de *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (gi|225462505). Esta proteína está implicada en el metabolismo de la pared celular catalizando la ruptura y unión de xiloglucano, uno de los componentes mayoritarios de las hemicelulosas de paredes celulares vegetales (Song et al. 2011) y por lo tanto es una enzima

responsable de la modificación de la arquitectura de la pared celular durante el crecimiento del cultivo (Briceño et al. 2012).



**Figura 4.39** Abundancia normalizada ( $p < 0.05$ ) de una peroxidasa 4 de *V. vinífera* (gi|225434381) a la izquierda y de una xiloglucano endotransglicosilasa de *Populus tremula* x *Populus tremuloides* (gi|225462505) a la derecha, encontradas en los distintos tratamientos.

Por otra parte, además de estas proteínas que se expresan de forma diferencial en los distintos tratamientos identificamos por homología de secuencias peptídicas, otras proteínas que, con un elevado score, presentaban un valor  $p$  superior a 0.05 lo que se interpreta como proteínas constitutivas cuyos niveles de expresión no sufren cambios con los distintos tratamientos. Entre estas proteínas se encuentran ciertas peroxidases de clase III, proteínas de tipo PR-4, PR-5, NtPRp-27, quitinasas y endoquitinasas de clase IV.

Las PR-4 tienen en común un dominio C-terminal Barwin. Este término procede de “proteína básica de semilla de cebada que es capaz de unir débilmente un análogo de quitina” es decir, un oligosacárido tetramérico  $\beta$ -1,4 de N-acetilglucosamina (Svensson & Svendsen 1992). Estas proteínas se clasifican como endoquitinasas (Neuhaus et al. 1996) debido a que en una de ellas se encontró una débil actividad quitinasa (Brunner et al. 1998). Estas proteínas se inducen por ataques de patógenos y etileno en *Arabidopsis* y melocotonero (Gu et al. 2002; Ruperti et al. 2002) así como por ozono en plantas de *Arabidopsis* (Rao et al. 2002). PR-4 también se ha encontrado en el néctar extrafloral de la acacia donde tenía un efecto protector frente a infecciones fúngicas (González-Teuber et al. 2009). La presencia de esta proteína en el medio de cultivo está de acuerdo con los resultados obtenidos por Guevara-Morato et al. (2010) que sugieren una localización apoplástica debido a que PR-4 se sintetiza en forma de preproteína y posteriormente pierde un péptido señal en el extremo C-terminal.

Asimismo, Linhorst et al. (1991) observaron otras PR-4 como las PR-P2 de tomate y PR-4 de tabaco en el apoplasto.

NtPRp-27 se ha descrito en suspensiones celulares de *C. annuum* y *C. chinense* (Sabater-Jara et al. 2010 y 2011) así como de *N. tabacum* y *S. tuberosum*. Estas proteínas se expresan en respuesta a infecciones por hongos o virus, lesiones mecánicas así como moléculas señal como SA, ET y MJ coincidiendo con lo que ocurre con muchas PRp que acumulan transcritos en respuesta a estos compuestos (Okushima et al. 2000; Zhen-Dong et al. 2003; Elvira et al. 2008).

La mayoría de las PR-5 conocidas desempeñan una importante función en la defensa contra hongos patógenos (Cheong et al. 1997; Vu y Huynh 1994; Koiwa et al. 1997). Entre las proteínas pertenecientes a este grupo se encuentra la osmotina. La actividad antifúngica de esta proteína está correlacionada con la permeabilización de la membrana plasmática como se ha observado con la zeamatina en maíz (Roberts y Selitrennikoff 1990). La osmotina proporciona un aumento de la resistencia contra patógenos (SAR) por lo que ha sido ampliamente utilizada en la producción de cultivos transgénicos de patatas (Bengyella et al. 2010). La actividad antifúngica de la osmotina se ha demostrado en diversos ensayos *in vitro* contra *Phytophthora infestans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* y *T. reesei* (Woloshuk et al. 1991; Vigers et al. 1992). Entre las principales condiciones de estrés que inducen la síntesis de esta proteína se encuentran el NaCl, deshidratación, etileno, heridas, ácido abscísico, virus del mosaico del tabaco, hongos y luz UV (LaRosa et al. 1992). Esta proteína puede inducirse de forma constitutiva en condiciones de campo dando lugar a un aumento de la resistencia del cultivo a las plagas (Liu et al. 1993). En este sentido, la osmotina induce la lisis de esporas, inhibe su germinación o reduce la viabilidad en siete especies de hongos (Abada et al. 1996).

Dentro del grupo de las PR-5 también se encuentra la proteína similar a taumatina (TLP). Estas proteínas se dividen en básicas (vacuolares) y ácidas (apoplásticas) (Stintzi et al. 1993; Fils-Lycaon et al. 1996). Las TLP presentan diversas funciones entre las que destacan su actividad antifúngica, protección frente a la congelación y están implicadas en la maduración del fruto. TLP se encuentra localizada fundamentalmente en frutos y semillas (Neale et al. 1990; Jayasankar et al. 2003) y se acumula en determinadas especies entre las que se encuentra *Vitis* (Tattershall et al. 1997). Asimismo, Fagoaga et al. (2001) encontraron una PRp (PR23) inducida en tomate cuando se infectaba con el viroide de la exocortis de los cítricos. Esta PR23 pertenece a la familia de las TLP y mostraba homología con una secuencia peptídica

casi completa de una proteína NP24 de tomate inducida por salinidad, la cual pertenece a la familia de las osmotinas (Rodrigo et al. 1993). Estas dos proteínas presentaban una actividad muy alta frente algunos hongos fitopatógenos lo que sugiere que estas dos proteínas, codificadas por genes diferentes, se inducen en diferentes situaciones de estrés (Briceño et al. 2012).

Además de participar en respuestas de defensa, las PR-5 participan en procesos de crecimiento y desarrollo por lo que pueden encontrarse en forma constitutiva y aumentar sus niveles en presencia de elicitores (Tornero et al. 1994; Zhu et al. 1995; Kim y Hwang 2000).

Las quitinasas vegetales son proteínas monoméricas de entre 25-40 KDa. En una primera clasificación se consideran glicosil hidrolasas. Henrissat (1993) incluye las quitinasas vegetales junto con las fúngicas y bacterianas. Otros autores proponen cuatro clases de quitinasas vegetales, basadas en la secuencia de aminoácidos, algunas de las cuales pueden estar presentes en la misma planta (Shinshi et al. 1995; Collinge et al. 1993). Las quitinasas de clase I, II y IV tienen dominios catalíticos homólogos. Este dominio es homólogo a la aglutinina del germen de trigo y es responsable de unir la enzima a quitina (Hart et al. 1995). Los diferentes tipos de quitinasas se diferencian por su estructura, propiedades enzimológicas, localización espacial y temporal, regulación y función (Kasprzewska 2003). Estas enzimas pueden estar implicadas en crecimiento y desarrollo así como en respuestas de defensa. Las quitinasas difieren en la especificidad de sustrato (Brunner et al. 1998) y muchas de estas enzimas no muestran propiedades antifúngicas en ensayos "in vitro" (Shinya et al. 2007). Estos autores observaron un aumento de la inducción de la expresión del gen de la quitinasa de clase IV de *N. tabacum*, el cual era inducido por elicitores fúngicos. Tanto las características transcripcionales como post-traduccionales de su producto génico (NtChitIV) indicaban que están implicadas en respuestas a infección frente a patógenos. En este sentido, Ott et al. (2006) observaron la inducción de quitinasas extracelulares en respuesta a elicitores bacterianos. Estas NtChitIV sufren la escisión proteolítica de la región N-terminal lo que reduce su actividad antifúngica y su especificidad de sustrato. Sin embargo, estas enzimas carentes del extremo N-terminal pueden degradar las paredes celulares del patógeno dando lugar a la amplificación de la señal desencadenada por el elicitor mediante la liberación de un elicitor secundario procedente de las paredes del patógeno favoreciendo la transmisión de esta señal a las zonas que rodean al lugar de la infección (Shinya et al. 2007).

Las endoquitinasas son enzimas capaces hidrolizar internamente polímeros de N-acetil glucosamina (quitina) de la pared celular de los hongos liberando polisacáridos (Hart et al. 1995). En este sentido, Hengel et al. (1998) observaron la presencia de la proteína EP3 (endoquitinasa de clase IV), en suspensiones celulares de zanahoria, la cual se encontraba presente tanto en los controles como en los elicitados con quitosan, *P. infestans* o *B. cinerea*.

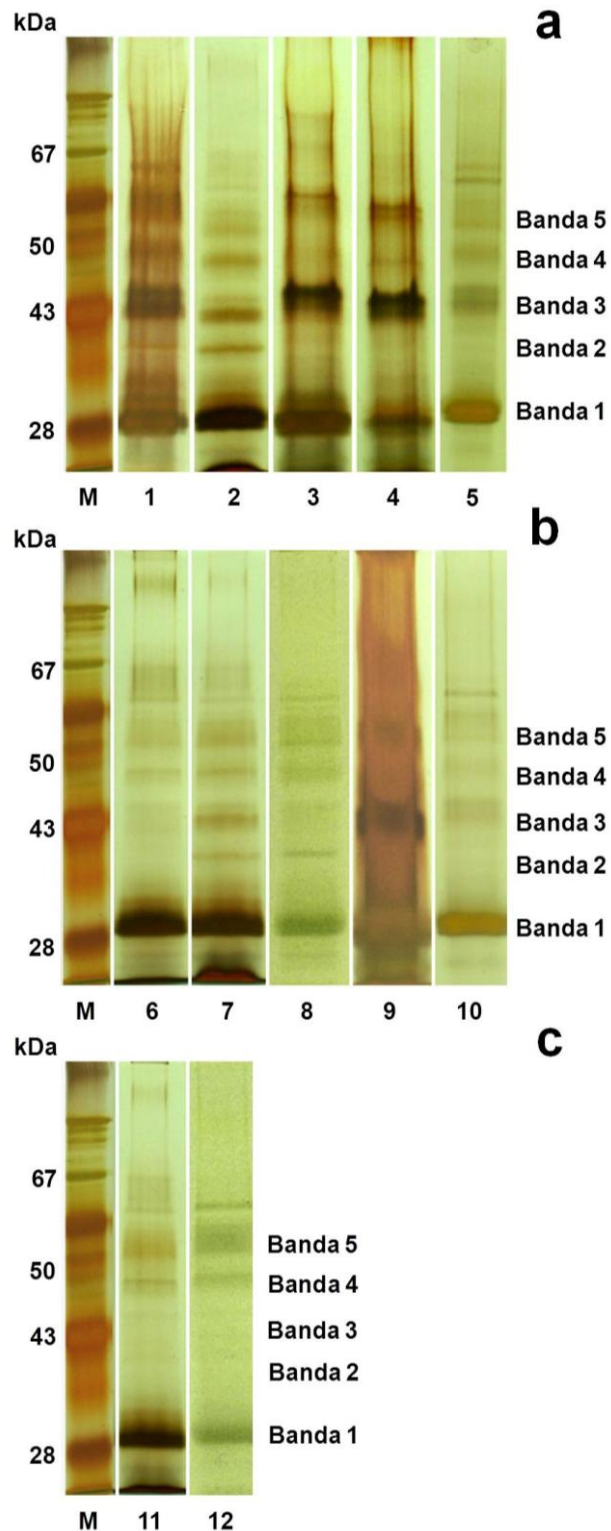
Harfouche et al. (2008) observaron que durante el estado de SAR de nódulos de *Castanea sativa* se producía un aumento de la expresión de los genes que codifican para endoquitinasas. Sin embargo, también encontraron estas enzimas en cultivos control por lo que propusieron que este hecho podía explicarse tanto por las condiciones de cultivo, las cuales pueden influir en la expresión de los genes, como por las pequeñas concentraciones de etileno que se generan en el interior de los matraces, afectando así a la expresión de los genes de las endoquitinasas. Transcurridos siete días no observaron un aumento en la expresión de estos genes por lo que su expresión está limitada a un nivel umbral.

#### **4.3.4 Identificación del proteoma extracelular de suspensiones celulares de *Monastrell* elicitadas con ciclodextrinas metiladas al azar y/o moléculas señal (jasmonato de metilo, ácido salicílico) y etileno mediante microsecuenciación**

Las respuestas de defensa inducidas están reguladas a través de una red de transducción de señales mediada por pequeñas moléculas que actúan como segundos mensajeros, tales como SA, JA y ET. Estos reguladores, dirigen la expresión de una serie de genes que codifican proteínas antimicrobianas o enzimas que catalizan la producción de metabolitos de defensa (Chong et al. 2008).

El perfil proteómico extracelular de suspensiones celulares de *Monastrell* se realizó en condiciones control y de elicitación con CDM solas o combinadas con MJ, en presencia de SA y ET. Como se muestra en la Figura 4.39, el patrón de proteínas extracelular de suspensiones celulares elicitadas con CDM solas o combinadas con moléculas señal fue más complejo que cuando se analizó el perfil proteómico de los tratamientos que no contenían CDM, siendo el perfil más sencillo el mostrado en presencia de SA. Por este motivo se seleccionaron los tratamientos control, CDM y SA como tratamientos representativos del patrón de proteínas totales encontradas en presencia de estas moléculas en cualquiera de sus combinaciones, para la

microsecuenciación de bandas de proteínas tanto constitutivas como expresadas de forma diferencial.



**Figura 4.39** Patrón de proteínas totales del medio extracelular de suspensiones celulares de *Monastrell* realizado mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. M: marcador de peso molecular; 1: control; 2: CDM; 3: MJ; 4: ET; 5: SA; 6: CDM+MJ; 7: CDM+ET; 8: DCM+SA; 9: MJ+ET; 10: MJ+SA; 11: CDM+MJ+ET; 12: CDM+MJ+SA.

Aquí, como se observa en la Tabla 4.7 a, los péptidos trípticos inducidos por SA se encontraron exclusivamente en la banda 1, la cual tenía un peso molecular aparente de 28 KDa. Estos contenían secuencias de aminoácidos que presentaban homologías con peroxidasas de clase III tales como una peroxidasa 73 de *V. vinifera* (gi|225438962), la peroxidasa ATP9a de *A. thaliana* (gi|1546708) así como otras dos que presentaban homologías con las de *Gossypium hirsutum* (gi|19698446) y *M. truncatula* (gi|357452877), encontrándose todas ellas incluidas dentro del grupo de proteínas PR-9. Además se encontraron fragmentos trípticos que presentaron homología con una  $\beta$ -1,3-glucosidasa (glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidasa) de *V. vinifera* (gi|225441645), perteneciente a las proteínas PR-2. Estos resultados muestran que la aplicación exógena de SA induce la acumulación extracelular de PRp, lo cual sugiere la posible implicación de SA como mediador de la expresión de productos génicos relacionados con respuestas de defensa.

Por otra parte, se encontraron fragmentos trípticos inducidos por CDM (Tabla 4.7 b), en las bandas 1 (28 KDa) y 2 (37 KDa), siendo esta última inducida íntegramente por la presencia de CDM en los cultivos celulares. Los péptidos trípticos correspondientes a la banda 1, presentaron homología con una peroxidasa 5 de *V. vinifera* (gi|359490769) coincidente con la descrita en el análisis proteómico del label free y observada, casi exclusivamente, en los tratamientos que contenían CDM. En la banda 2, se identificaron cinco fragmentos trípticos que se correspondían con una mananasa (manan endo-1,4-beta-manosidasa) 7 de *V. vinifera* (gi|225458217).

Además de las proteínas inducidas por SA y CDM se observó la presencia de peroxidasas, proteínas PR y proteínas apoplásticas, en las bandas 1, 3, 4 y 5, tanto en los tratamientos control como en los que contenían SA o CDM por lo que su expresión es constitutiva (Tabla 4.7 c). En la banda 1, destacó la presencia de dos peroxidasas de *V. vinifera*, así como una peroxidasa 67 de *A. thaliana* (gi|15237187) y un producto similar al precursor de la peroxidasa 12 de *V. vinifera* (gi|7453849). En esta misma banda también se observó la presencia de otras proteínas PR tales como una quitinasa de clase IV de *V. vinifera* (gi|33413754) y una  $\beta$ -1,3-glucanasa de *V. riparia* (gi|37992763). Esta última, (gi|225457600) también se encontró en la banda 3, de peso molecular aparente 41 KDa.

En la banda 4 (peso molecular aparente 49.3 KDa), se observó la presencia de una proteína inhibidora de poligalacturonasa de *V. vinifera* (gi|13172312) (PR-6) y en la banda 5, de peso molecular aparente 54.2 KDa, se detectaron trece fragmentos



peptídicos que presentaban homología con una proteína apoplástica similar a la reticulina oxidasa de *V. vinifera* (gi|225444139).

Todas las peroxidasas se encontraron en la banda 1 y fueron las proteínas más abundantes detectadas en el medio extracelular tanto de suspensiones celulares control como en las tratadas con elicitor o moléculas señal. Las peroxidasas están implicadas en una gran variedad de procesos fisiológicos debido al gran número de isoformas y a la versatilidad para catalizar un gran número de reacciones enzimáticas (Passardi et al. 2004). Debido a la importancia que tienen las peroxidasas en el crecimiento y defensa de las plantas, durante la evolución se ha producido repetidamente la amplificación y modificación estructural de los genes que las expresan, para evitar su pérdida y garantizar su continuidad (Hiraga et al. 2001). Entre los procesos fisiológicos en los que están implicadas destacan las reacciones de endurecimiento e impermeabilización de la pared celular en respuesta a factores externos como heridas, pérdida de agua o invasión por patógenos (Veitch 2004). Mei et al. (2009) estudiaron la peroxidasa de *G. hirsutum* (GhPOX1) y observaron que la adición de inhibidores de la producción de ROS reducían significativamente la elongación de las fibras en cultivos de óvulos de *G. hirsutum*. Estos resultados coincidían con los de Dunand et al. (2007) que observaron que para la elongación de las células de la raíz en *Arabidopsis* era necesaria la presencia de  $O_2^{\cdot-}$ . Estos resultados sugieren que esta peroxidasa se induce en respuesta a estrés oxidativo causado por la presencia de SA. En contraste con estos resultados Hiraga et al. (2001) mostraron que la infección por patógenos o las heridas en tomate inducen la síntesis de una serie de proteínas ácidas y básicas relacionadas con la defensa en las que ni SA, ni ET ni JA estaban implicados.

Entre los fragmentos inducidos por SA encontramos algunos que presentaban homología con las secuencias de aminoácidos de la peroxidasa ATP9a concretamente con los péptidos señal característicos de las peroxidasas secretoras de clase III. Las peroxidasas más relacionadas con la ATP9a muestran una homología del 70 % en su secuencia de aminoácidos con otras especies tales como *M. sativa* y *Spinacea oleracea*, implicadas en respuestas de defensa contra patógenos (El-Turk et al. 1996). Las peroxidasas de origen ortólogo en especies vegetales distantes como *Arabidopsis* y *G. hirsutum* presentan homologías del 85 % en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, no se puede concluir que éstas tengan funciones biológicas equivalentes a las de *M. sativa*. En general, se encontraron secuencias de regiones altamente

conservadas de peroxidasas de clase III tales como GEIR, VAL y GGP (Passardi et al. 2004).

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas encontradas tanto en el tratamiento con SA como en el control, son hidrolasas implicadas en reacciones de defensa de las plantas contra patógenos. Estas enzimas están reguladas por auxinas, citoquininas y etileno y se expresan en respuesta a infección viral, bacteriana y fúngica (Sperisen et al. 1991).

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas catalizan la hidrólisis de  $\beta$ -1,3-glucano, un polímero formado por unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1-3. Este polímero es un componente estructural de las paredes celulares de muchos hongos patógenos, así como de las paredes de ciertos tipos de células vegetales en determinados estados del desarrollo (Shi et al. 2006). Estas enzimas digieren las paredes celulares dando lugar a la liberación de elicitores de naturaleza oligosacáridica, que promueven la producción de otras PRp y de fitoalexinas. Además de su papel en la defensa de las plantas, estas enzimas también están implicadas en otras funciones biológicas tales como la división celular, germinación de semillas, dormancia de las yemas, formación de flores y maduración de frutos (Morohashi y Matsushima 2000; Buchner et al. 2002; Akiyama et al. 2004). Estas proteínas se dividen en cuatro clases:  $\beta$ -1,3-glucanasas I, II, III y IV. Las de tipo I son básicas y se encuentran en la vacuola y contienen una secuencia señal en el extremo C-terminal responsable de su localización intracelular (Shinshi et al. 1988). Las de clase II, III y IV son ácidas y no tienen la secuencia señal en el extremo C-terminal, por lo que se secretan al apoplasto y podrían ser las detectadas en los cultivos celulares de Monastrell. Shi et al. (2006) compararon la secuencia de FaBG2-3 (una  $\beta$ -1,3-glucanasa clonada a partir de tejidos de fresa) con las  $\beta$ -1,3-glucanasas de clase II de otras especies vegetales y observaron que esta proteína mostraba una alta homología con las enzimas de *Glycine max*, *Cicer arietinum* y *V. riparia* (AAR06588; gi|37992763) (63% identidad y 79% de similitud) la cual también se detectó como proteína constitutiva en los medios extracelulares de Monastrell. Estos autores observaron que al inocular con dos hongos distintos se producía la inducción de estas proteínas después de 48 h de incubación y que el nivel de inducción dependía de la velocidad de invasión del patógeno. En cualquier caso, la presencia de estas enzimas en tratamientos control estaría justificada debido a que también intervienen en procesos de desarrollo celular.

Las quitinasas vegetales se inducen en respuesta a una infección por patógenos y al tratamiento con elicitores. Estas proteínas juegan un importante papel en el sistema de defensa de las plantas y son consideradas marcadores de resistencia en las plantas.

Debido a que las quitinasas hidrolizan los enlaces internos  $\beta$ -1,4-glicosídicos de la quitina es de esperar que estén implicados en la liberación de elicitores de tipo quitinolisacáridicos de las paredes celulares durante una infección fúngica (Shinya et al. 2007). Benhamou et al. (1990) y Mauch et al. (1988) demostraron los efectos antifúngicos de algunas quitinasas, especialmente cuando se encontraban acompañadas de  $\beta$ -1,3-glucanasas. Se han descrito distintos tipos de quitinasas en plantas (Kasprzewska 2003) por lo que además de participar en respuestas de defensa, también intervienen en la resistencia frente a estrés abiótico y desarrollo de la planta (Minic et al. 1998, Wiweger et al 2003). Shinya et al. (2009) estudiaron la regulación de la transcripción de la quitinasa IV de *N. tabacum* y encontraron que el promotor contenía una secuencia W box (GGTAAAGTCAA). Las secuencias W box se encuentran situadas en los promotores de diversos genes relacionados con la defensa y actúan como elementos de respuesta a elicitores en plantas (Yamamoto et al. 2004) así como elementos *cis* responsables de la inducción de la expresión de estos genes. SA y MJ participan como mediadores en la regulación positiva o negativa de un gran número de genes relacionados con la defensa, incluidas las quitinasas (Kunkel y Brooks 2002). Asimismo pueden regular de forma antagónica la expresión de determinados genes relacionados con la defensa. En un estudio realizado por Shinya et al. (2007) se observó que SA o MJ por separado podían atenuar la expresión inducida por la elicitación de la quitinasa de clase IV de *N. tabacum*. En nuestro caso, esta enzima se ha localizado en los medios extracelulares control pero no se ha detectado en los elicitados ni con SA ni con CDM.

Las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas pertenecen a las proteínas PR-6. Estas proteínas interfieren en la infección fúngica inhibiendo la degradación de la pared celular vegetal causada por las poligalacturonasas fúngicas. Bézier et al. (2002) aislaron y caracterizaron el gen que codificaba para la proteína inhibidora de poligalacturonasa en *V. vinifera*. Estos genes se inducían durante la infección con *B. cinerea* como respuesta de defensa temprana. Las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas inhiben la actividad de poligalacturonasas secretadas por hongos fitopatógenos e incrementan la estabilidad *in vitro* de los oligogalacturónidos activados por elicitores (Cervone et al 1989).

Las manan endo-(1,4)- $\beta$ -manosidasas son las enzimas responsables de la escisión enzimática de los galactomananos hasta sus unidades monoméricas. En *V. vinifera* se han identificado 15 genes para esta enzima (F-IPCfG, 2007). Los mananos son

polisacáridos de hemicelulosa presentes en las paredes celulares primarias de las plantas. Estos polímeros tienen dos funciones principales; como polisacáridos de reserva que proporcionan energía para las semillas en crecimiento y como componentes estructurales del entramado hemicelulosa-celulosa. En relación a sus funciones, estas enzimas se activan durante la germinación de las semillas y los procesos de crecimiento o senescencia (Schröder et al. 2009). Parece ser que las manan endo-(1,4)- $\beta$ -manosidasas realizan un papel similar a las xiloglucan endotransglucosilasas/hidrolasas en la remodelación de la pared celular. Asimismo, la presencia de estas enzimas es necesaria como ocurre durante la síntesis de celulosa en la que se requiere la presencia de las celulasas para el correcto ensamblaje de sus unidades en la pared celular (Hrmova et al. 2006). Las endo- $\beta$ -mananasas son poco específicas en cuanto al sustrato que hidrolizan (Schröder et al. 2009), esto podría explicar su presencia exclusivamente en el tratamiento con CDM, lo cual puede deberse a la estructura oligosacáridica similar a la de los mananos que hidrolizan.

La reticulina oxidasa, también denominada enzima de unión a berberina, pertenece a la familia de las oxidorreductasas unidas a FAD dependientes de oxígeno. Esta enzima es la responsable de la biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolina y cataliza la oxidación estereoespecífica así como la formación de enlaces C-C de la reticulina, siendo ésta un precursor de la morfina (Winkler et al. 2009). Custers et al. (2004) identificaron reticulina oxidasa en hojas de dos miembros de la familia de las compuestas tratadas con SA. Además, esta enzima es común en la familia de las Papaveráceas. En estudios realizados en girasol, Dittrich y Kutchan (1991) observaron que la expresión de los genes que codificaban para esta proteína se activaban en caso de infección fúngica. Esta proteína puede usar una gran variedad de azúcares reducidos, sobre todo hexosas que se acumulan en la planta tras una infección por patógenos, dando lugar a producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Asimismo, Custers et al. (2004) al añadir SA a hojas de *Lactuca sativa* y girasol observaron que la fracción de proteínas que tenía actividad antifúngica contenía secuencias que presentaban una alta homología a la reticulina oxidasa de *E. californica* y *P. somniferum*. La reticulina oxidasa cataliza la formación de alcaloides de benzofenantridina que se sintetizan en ciertas especies de plantas de las familias de las Papaveráceas y las Fumaráceas en respuesta a ataques patógenos, actuando así como fitoalexinas (Dittrich y Kutchan 1991; Dixon 2001).

**Tabla 4.7 a** Péptidos trípticos inducidos por SA

Bandas de proteína	Péptidos trípticos inducidos por SA	Número de acceso	Proteína	Masa nominal	Scores <sup>a</sup>
28 kDa (banda 1)	FYNGLLPR	CAN83571 gi 225441645	Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa <i>V. vinifera</i>	52210	161
	DHPDNLSLAGDGFDTVIK VSCADILTMATR	XP_002284278 gi 225438962	Peroxidasa 73 (Peroxidasa de clase III) <i>V. vinifera</i>	35826	203
	DSV <u>V</u> ILGGPDWDVK	AAL93151 gi 19698446	Peroxidasa de clase III <i>Gossypium hirsutum</i>	34830	99
	QFDNVYYKNLQQGK VSCADILTMATR	CAA67362 gi 1546708	Peroxidasa ATP9a (Peroxidasa de clase III) <i>Arabidopsis thaliana</i>	34642	188
	ISPLTGT <u>N</u> GEIR	XP_00359671.1 gi 357452877	Peroxidasa <i>Medicago truncatula</i>	34432	72

Se han subrayado las secuencias consenso de las peroxidasas.

<sup>a</sup>Mascot Scores

**Tabla 4.7 b** Péptidos trípticos inducidos por CDM

<b>Bandas de proteína</b>	<b>Péptidos trípticos inducidos por CDM</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Proteína</b>	<b>Masa nominal</b>	<b>Scores<sup>a</sup></b>
28 kDa (banda 1)	DSVEITGGLGYDVPAG GLFTSDQTLTDTTTATQVR	XP_003634164 gi 359490769	Peroxidasa 5 <i>V. vinifera</i>	35394	158
37 kDa (banda 2)	ISSAFAEAAGHGLTIAR LVLSLANNYESFGGK QYVDWAR GQGQYLTSDDDFFR NHIQDAQNVLR	CBI19729 gi 225458217	Mannan endo-1,4-beta- manosidasa 7 <i>V. vinifera</i>	48835	386

**Tabla 4.7 c** Péptidos trípticos constitutivos

Bandas de proteína	Péptidos trípticos constitutivos	Número de acceso	Proteína	Masa nominal	Scores <sup>a</sup>
28 kDa (banda 1)	MGASILR	XP_002269918	Peroxidasa	33929	161
	DM <u>V</u> AL <u>S</u> GAHTIGQAR	gi 225434381	<i>V. vinifera</i>		
	FKAQGLSTR	NP_200647 gi 15237187	Peroxidasa <i>Arabidopsis thaliana</i>	35142	104
	GFEVIDSAK	AAF63024 gi 7453849	Precursor de peroxidasa 12 ( <i>Spinacia oleracea</i> )	36813	93
	GYEVIDTIK MGNLSPLTGT <u>N</u> GEIR DSV <u>V</u> ALGGPTWTLQLGR SQVESL <u>C</u> PGVV <u>S</u> CADIVAVAAR DSTTASLSTANSDLPGPASDLSTLISR	XP_002285723 gi 225459180	Peroxidasa catiónica <i>V. vinifera</i>	33659	511
<b>NVQSAITSAGLQGQIK</b>	AAR06588 gi 37992763	$\beta$ -1,3-glucanasa <i>V. riparia</i>	36776	68	
FGTEGSTDDSLR AAFLDALNSYPR AINSIECDGGNTAAVNAR	AAM95447 gi 33413754	Quitinasa de clase IV <i>V. vinifera</i>		243	
41kDa (banda 3)	NFGILNGDGSK VAQLLQSTLIDK	XP_002272900 gi 225457600	Glucan endo-1,3-beta-glucosidasa <i>V. vinifera</i>	49405	134

49.3 kDa (banda 4)	STQIVDFSR <b>SLTSLDLSHNK</b>	AAK14075 gi 13172312	Proteína inhibidora de poligalacturonasa <i>V. vinifera</i>	37522	106
54.2 kDa (banda 5)	DVDIGVTK IDNDFIR NEQSIPPLK VLLQPVTVNK SDYVQTPISK TAVDPTNFFR TGLVFNPYGGR KSDYVQTPISK YGLSIDQLVDAK LVAVPETVTVFR LYSYMTPFVSK KYGLSIDQLVDAK MSEIPSETAFPHR	XP_002268606.1 gi 225444139	Proteína similar a reticulina oxidasa <i>V. vinifera</i>	59382	860

Se han subrayado las secuencias consenso de las peroxidases. En negrita se han representado las regiones altamente conservadas de la  $\beta$ -1,3-glucanasa y de la proteína inhibidora de poligalacturonasa.

<sup>a</sup> Mascot Scores



## 5. Conclusions



1. El crecimiento de las suspensiones celulares de Monastrell en dos medios minerales (GB5 y MS) no mostró diferencias significativas a pesar de que GB5 es más pobre en fuente nitrogenada que el MS, por lo que se decidió continuar con el medio mineral GB5 ya que al ser más pobre en nutrientes lo hacen más adecuado para la producción de *t*-R. Asimismo, de entre las distintas concentraciones de sacarosa utilizadas se seleccionó la de 20 g/L con el fin de compatibilizar un buen crecimiento celular con la máxima producción de *t*-R. Utilizando esta concentración de fuente carbonada se calcularon los parámetros  $V_{exp}$  igual a 2.9 y  $T_a$  de 16 días.
2. Se estudió la producción de *t*-R con CD de distinta naturaleza observándose diferencias significativas entre el uso de CDM y el resto por lo que se seleccionó ésta para la realización de los experimentos posteriores. Asimismo el uso de CDM a distintas concentraciones a lo largo del tiempo reveló que 50 mM de CDM y 96 h de tratamiento eran las condiciones más adecuadas para la producción de *t*-R con este elicitor.
3. La elicitación de suspensiones celulares de Monastrell a distintas densidades celulares mostraron que la mayor producción de *t*-R tenía lugar a densidad celular baja lo cual hace inviable su paso a biorreactor. Sin embargo, el uso de un segundo elicitor biótico como MJ, a distintas concentraciones y a distintas densidades celulares reveló que se producía un efecto sinérgico en la producción de *t*-R cuando MJ se usaba a una concentración de 100  $\mu$ M, haciendo posible el uso de densidades celulares mayores. Se seleccionó una densidad celular intermedia por no presentar diferencias significativas con la densidad celular baja.
4. La adición de MJ en combinación con CDM alarga la fase de producción de *t*-R hasta las 168 h. Los compuestos producidos por las células de Monastrell son secretados al medio de cultivo siendo el *t*-R el compuesto mayoritario, detectándose trazas de *c*-R en el medio extracelular. En el interior de las células el contenido de estilbenoides fue del orden de 1000 veces menor detectándose *t*-R, *c*-R, *t*-P y *c*-P.
5. El uso del medio mineral MS para la elicitación de las suspensiones celulares de Monastrell con CDM y MJ tampoco condujo al aumento de la producción de *t*-R no existiendo diferencias significativas respecto al medio mineral GB5 a las 96 h y reduciéndose a la mitad a las 168 h, por lo que se corrobora la mayor eficiencia del medio mineral GB5 para la producción de *t*-R en estas condiciones.
6. El uso de CDM solas o en combinación con MJ con un elicitor abiótico como la luz UV-A o C no dio lugar a un aumento significativo de la producción de *t*-R a ninguno de

los tiempos de irradiación ensayados. En el caso de las irradiaciones con luz UV-A, se observó un descenso en la producción en los tiempos de exposición cortos (5 y 15 min) mientras que a partir de 30 min la producción se recupera hasta los niveles alcanzados con los tratamientos con CDM solas o en combinación con MJ. En el caso de las irradiaciones con luz UV-C resultaron ser muy perjudiciales para la producción de *t*-R tanto si se hacían en presencia de CDM solas o en combinación con MJ y a cualquiera de los tiempos de exposición ensayados.

**7.** El uso de un fungicida sistémico como el FAI no produjo el aumento de la producción de *t*-R cuando se combinó con CDM solas y resultó tener un efecto antagónico con MJ cuando se ensayó en combinación con CDM y MJ.

**8.** El uso de distintas concentraciones de sacarosa (10, 20 y 30 g/L) en suspensiones celulares elicítadas con CDM solas o en combinación con distintas concentraciones de MJ (25, 50, 100, 270  $\mu$ M) mostró que la concentración óptima de MJ varía dependiendo de la concentración de sacarosa usada. Los niveles de *t*-R más elevados se alcanzan cuando se utilizan 20 g/L de sacarosa y 100  $\mu$ M de MJ y con 30 g/L de sacarosa y 50  $\mu$ M de MJ no observándose diferencias significativas entre estos valores.

**9.** El aumento de la superficie de aireación de los cultivos en matraces agitados no dio lugar a diferencias significativas en la producción de *t*-R en los elicítados solo con CDM o en combinación con MJ, aunque sí se observaron diferencias significativas entre la productividad de los matraces de 250 y 1000 mL. En relación al escalado los niveles de producción más elevados se encuentran en los matraces de 1000 y 5000 mL aunque los valores de productividad máxima se observaron en matraces de 500 y 5000 mL.

**10.** La reutilización de las suspensiones celulares de *Monastrell* durante varios ciclos de elicitación continuos para la producción de *t*-R es posible cuando se utiliza CDM en combinación con MJ, obteniéndose altos niveles de producción hasta cuatro ciclos seguidos. Sin embargo cuando se utilizan solo CDM la producción comienza a descender bruscamente en el segundo ciclo de elicitación.

**11.** El uso de SA y/o ET en suspensiones celulares de *Monastrell* elicítadas con CDM solas o en combinación con MJ mostró un efecto aditivo en la producción de *t*-R cuando se utilizó ET, sin embargo SA tenía un efecto antagónico que producía la disminución de la producción de *t*-R en cualquiera de los tratamientos.

**12.** El uso de bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e intracelulares disminuye la producción de *t*-R, lo cual indica una dependencia de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El uso de inhibidores de PK y PP en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM solas o en combinación con MJ produjo un descenso significativo de la producción de *t*-R cuando se utilizó un inhibidor de MAPK (Ap) y un inhibidor de PP (OFA), por lo que la producción es parcialmente dependiente de eventos de fosforilación y desfosforilación. El uso de un inhibidor de la NADPH oxidasa (DPI) en suspensiones celulares de *Monastrell* elicidadas con CDM solas o en combinación con MJ provocó una inhibición de la producción de *t*-R con lo cual ésta es dependiente de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo el uso de un inhibidor de NO sintasa (L-NNA) y un secuestrador de NO (cPTiO) produjeron un descenso significativo de la producción de *t*-R pero no su inhibición total por lo que la producción es parcialmente dependiente de NO.

**13.** El análisis mediante label-free y microsecuenciación del proteoma extracelular de suspensiones celulares elicidadas mostró la presencia de PRp cuyas secuencias de aminoácidos eran homólogas a  $\beta$ -1,3-glucanasas, peroxidasas de clase III y una  $\beta$ -1,4-mananasa, sugiriendo que las moléculas que han desencadenado su síntesis podrían mediar la expresión de los productos génicos relacionados con la defensa en *Monastrell*. Aparte de las proteínas inducidas por la elicitación se identificaron otras proteínas que se encontraban presentes en tratamientos control y elicitados. Entre estas proteínas se incluían quitinasas, proteínas inhibidoras de poligalacturonasa y proteínas similares a reticulina oxidasa las cuales están implicadas en la remodelación de la pared celular durante el crecimiento y la prevención de ataques patógenos.



## 6. Bibliografía







- Abada LR, D'Urzo MP, Liua D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhua JK** (1996). Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci.* 118: 11-23
- Adrian M, Jeandet P, Bessis R, Joubert JM** (1996). Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>). *J Agr Food Chem.* 44: 1979-1981
- Adrian M, Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Tesson L, Bessis R** (2000). Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J Agr Food Chem.* 48: 6103-6105
- Aerts RJ, Gisi D, De Carolis E, De Luca V, Baumann TW** (1994). Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J.* 5: 635-643
- Agrawal GK, Rakwal VR, Iwahashi H** (2002). Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, OsMSRMMK2, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. *Biochem Biophys Res Commun.* 294: 1009-1016
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G** (2006). Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 72: 1605–1621
- Akiyama T, Pillai MA, Sentoku N** (2004). Cloning, characterization and expression of OsGLN2, a rice endo-1,3-βglucanase gene regulated developmentally in flowers and hormonally in germinating seeds. *Planta.* 220:129-39
- Alfermann AW, Schuller I, Reinhard E** (1980) Biotransformation of cardiac glycosides by immobilized cells of *Digitalis lanata*. *Planta Med.* 40: 218-223
- Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S, Berkowitz GA** (2007). Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* cyclic nucleotide gated channel and innate immunity. *Plant Cell.* 19: 1081-1095
- Allen R** (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107:1049-1054
- Allet N** (2004). In vitro and in silico processes to identify differentially expressed proteins. *Proteomics.* 4: 2333-2351.
- Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS, Van Loon LC** (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J Gen Virol.* 47: 79-87
- Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi M** (1982). Effect of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum*. Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull.* 30: 1766-1770
- Armero J, Tena M** (2001). Possible role of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the elicitation of phytoalexin and related isoflavone root secretion in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings. *Plant Sci.* 161: 791-798
- Asada M.; Shuler ML** (1988). Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: Effects of in situ adsorption, elicitors and alginate immobilization. En:ACS Annual Meeting, Los Angeles, CA. 25-30
- Avalos I** (1990). Biotecnología e industria: un ensayo de interpretación teórica. IICA (Serie Documentos de Programas 18), San José, Costa Rica
- Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL** (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharm.* 224: 274-283
- Aumont V, Larronde F, Richard T, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Krisa S, Merillon JM** (2004) Production of highly C<sup>13</sup>-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *J Biotechnol.* 109: 287-294

- Bach M, Schnitzler JP, Seitz HU** (1993). Elicitor-induced changes in Ca<sup>2+</sup> influx, K<sup>+</sup> efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplast of *Daucus carota* L. *Plant Physiol.* 103: 407-412
- Banci L** (1997). Structural properties of peroxidases. *J Biotechnol.* 53: 253-263
- Barz W, Koster J** (1980). Turnover and degradation of secondary (natural) products. En: *The Biochemistry of Plants*. Conn EE (Ed.). Academic Press, New York, London. 7: 35-84
- Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R** (2000). Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide toxicity in cultured hippocampal neurons. *Brit J Clin Pharmacol.* 131: 711-720
- Bavaresco L, Fregoni C** (2001). Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds. En: *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*. K.A. Roubelakis-Angelakis (Ed.). Kluwer academic Publishers, Netherlands. 153-182
- Bengyella L, Pranab R** (2010). Engineered pathogenesis related and antimicrobial proteins weaponry against *Phytophthora infestans* in potato plant: A review. *Biotech Mol Biol Rev.* 5: 61-66
- Belhadj A, Saigne C, Telef N, Cluzet S, Bouscaut J, Corio-Costet MF, Merillon JM** (2006). Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *J Agric Food Chem.* 54: 9119-9125
- Belhadj A, Telef N, Cluzet S, Bouscaut J, Corio-Costet MF, Merillon JM** (2008). Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *J Agric Food Chem* 56: 5781-5787
- Bellincampi D, Dipierro N, Salvi G, Cervone F, De Lorenzo G** (2000). Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol* 122:1379-1385
- Benhamou N** (1996). Elicitor-induced plant defense pathway. *Trends Plant Sci.* 1: 233-240
- Berlin J, Sasse F** (1985). Selection and screening techniques for plant cell cultures. *Adv Biochem Eng.* 31: 99-132
- Berlin J, Slag S, Strack D, Bokem M, Harms H** (1986). Production of betalainins by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Cell Tiss Org.* 5: 163-174
- Besson-Bard A, Pugin A and Wendehenne D** (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 59: 21-39
- Bézier A, Lambert B and Baillieul F** (2002). Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European J Plant Pathol.* 108: 111-120
- Bhuiyan Md NH, Adachi T** (2002). Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension cultured cells of *Portulaca*. *J Plant Physiol.* 160: 1117-1124
- Binns AN, Tomashow JV** (1988). Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annu Rev Microbiol.* 42: 575-606.
- Boller T** (1987). Hydrolytic enzymes in plant disease. En: *Plant-microbe interactions, molecular and genetic perspectives*; Kosuge T, Nester EW (Ed.) Macmillan: New York, 2: 385-413
- Boller T** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 46: 189-214
- Bolwell GP, Buti VS, Davies DR, Zimmerlin A** (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res.* 23: 517-532
- Bordone L, Guarente L** (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nature Reviews. Mol Cell Biol.* 6: 298-305

- Borner GH, Sherrier DJ, Stevens TJ, Arkin IT, Dupree P** (2002). Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis. *Plant Physiol.* 129: 486-499
- Borner GH, Lilley KS, Stevens TJ, Dupree P** (2003). Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.* 132: 568-577
- Boyd MG** (1991). Studies on carotenoid production in cultures of *Bixa orellana*. Ph. D Thesis. University of Edinburgh, UK.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248-254
- Brehm I, Preisig-Müller R, Kindl H** (1999). Grapevine protoplasts as a transient expression system for comparison of stilbene synthase genes containing cGMP-responsive promoter elements. *Z Naturforsch.* 54: 220-229
- Briceño Z, Almagro L, Sabater-Jara AB, Calderón AA, Pedreño MA, Ferrer MA** (2012). Enhancement of phytosterols, taraxasterol and induction of extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *J Plant Physiol.* 169: 1050-1058
- Brodelius P** (1990). Transport and accumulation of secondary metabolites. En: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (Ed.) Kluwer. The Netherlands: 567-576
- Bru R, Sellés S, Casado-Vela J, Belchí-Navarro S, Pedreño MA** (2006). Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J Agric Food Chem.* 54: 65-71
- Brunner F, Stintzi A, Fritig B, Legrand M** (1998). Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant J.* 14: 225-234
- Buchner P, Rochat C, Wulleme S, Boutin JP** (2002). Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated  $\beta$ -1,3-glucanase gene in pea (*Pisum sativum*). *Plant Mol Biol.* 49: 171-186
- Bulgakov VP, Khodakovskaya MV, Labetskaya NV, Chernoded GK, Zhuravlev YN** (1998). The impact of plant *rol C* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry.* 49: 1929-1934
- Byun SY** (2000). Re-elicitation with methyl jasmonate in *Escholtzia californica* cell suspension cultures. *J Microbiol Biotechnol.* 10: 107-110
- Calderón AA, García-Florenciano E, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1992b). The vacuolar localization of grapevine peroxidase isoenzymes capable of oxidizing 4-hydroxystilbenes. *Z Naturforsch.* 47: 215-221
- Calderón AA, Zapata JM, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1992a). Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance in *in vitro*-cultured grapevine. *Plant Cell Tiss Org.* 29: 63-70
- Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R, Ros Barceló A** (1992c). On the presence of peroxidase in grapes (*Vitis vinifera* var. Monastrell and Airen). *Agrochimica.* 36: 212-223
- Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R, Pedreño MA, Ros Barceló A** (1993a). Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *New Phytol.* 124: 455-463
- Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R, Ros Barceló A** (1993b). Localization of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. *Hort Sci.* 28: 38-40
- Calderón AA, Zapata JM, Pedreño MA, Ros Barceló A** (1994a). Constitutive expression of extracellular peroxidase isoenzymes capable of oxidizing 4-hydroxystilbenes during the growth cycle of grapevine suspensions cell cultures. *Biol Plant.* 36: 161-166

- Calderón AA, Zapata JM, Ros Barceló A** (1994b). Peroxidase-mediated formation of resveratrol oxidation products during the hypersensitive-like reaction of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viridae*. *Physiol Mol Plant P.* 44: 289-299
- Cantos E, Espin JC, Fernandez MJ, Oliva J, Tomas-Barberan FA** (2003). Postharvest UV-C irradiated grapes as potential source for producing stilbene-enriched red wines. *J Agric Food Chem.* 51: 1208-1210
- Carlson PS, Smith HH, Dearing DR** (1972). Parasexual interspecific plant hybridization. *P Natl Acad Sci USA.* 69: 2292-2294
- Castañeda P y Perez LM** (1996). Calcium ions promote the response of citrus limon against fungal elicitors or wounding. *Phytochemistry.* 42: 595-598
- Castilla P, Echarri R, Dávalos A, Cerrato Ortega H, Teruel JL, Lucas MF, Gómez-Coronado D, Ortuño J, Lasunción MA** (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 84: 252-62
- Cervone F, Hahn M, De Lorenzo G, Darvill A, Albersheim P** (1989). Host-Pathogen interactions XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiol.* 90: 542-548
- Chelius D, Bondarenko PV** (2002). Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Proteome Res.* 1: 317-323
- Chen J, Hall DE, Murata J, De Luca V** (2006). L-Alanine induces programmed cell death in *V. labrusca* cell suspension cultures. *Plant Sci.* 171: 734-744
- Cheong NE, Choi YO, Kim WY, Bae IS, Cho MJ, Hwang I, Kim JW, Lee SY** (1997). Purification and characterization of an antifungal PR-5 protein from pumpkin leaves. *Mol Cells.* 7: 214-219
- Chibbar RN, Cella R, Van Huystee RB** (1984). The heme moiety in peanut peroxidase. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62: 1046-1050
- Choi CS, Sano H** (2007). Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics.* 277:589-600
- Chong J, Henanff GL, Bertsch C, Walter B** (2008). Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiol Bioch.* 46: 469-481
- Chung IM, Park MR, Rehman S, Yun SJ** (2001). Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants. *Mol Cell.* 12: 353-359
- Cocking EC** (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature.* 187: 927-929
- Civello PM, Martínez GA, Chaves AR, Añón MC** (1995). Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria annasa* Duch.): partial purification and determination of some properties. *J Agric Food Chem.* 43: 2596-2601
- Clendennen SK, May GD** (1997). Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol.* 115: 463-469
- Cormier F, Crevier HA, Do CB** (1990). Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Can J Bot.* 68: 1822-1825
- Cohen Y** (1994). 3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 44: 273-288
- Colinge J** (2005). Differential proteomics via probabilistic peptide identification scores. *Anal Chem.* 77: 596-606
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K** (1993). Plant chitinases. *Plant J.* 3: 31-40
- Converso DA, Fernández ME** (1996). Ca<sup>2+</sup> activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control. *Arch Biochem Biophys.* 333: 59-65

- Cormack RS, Eulgem T, Rushton PJ, Köchner P, Hahlbrock K, Somssich IE** (2002). Leucine Zipper containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochem Biophys Acta*. 1576: 92-100
- Creasy LL, Coffee M** (1988). Phytoalexin production potential of grape berries. *J Am Soc Hort Sci*. 113: 230-234
- Creelman RA, Mullet JE** (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48: 335-381
- Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H, Penel C** (1997). Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochem*. 99: 177-186
- Crossway A, Oakes JV, Irvine JM, Ward B, Knauf VC, Shewmaker CK** (1985). Integration of foreign DNA following micro-injection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol Gen Genet*. 202: 179-185
- Courtois C, Besson A, Dahan J, Bourque S, Dobrowolska G, Pugin A, Wendehenne D** (2008). Nitric oxide signalling in plants: interplays with  $Ca^{2+}$  and protein kinases. *J Exp Bot*. 59: 155-163
- Cuenca J, García-Florenciano E, Ros Barceló A, Muñoz R** (1989). Sequential release of both basic and acidic isoperoxidases to the media of suspension cultured cells of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Rep*. 8: 471-474
- Cui G, Zhang Y, Liu C, Skinner S, Qin Y** (2008). Pancreatic cancer suppression by natural polyphenols. *Scholarship Research Exchange*. doi:10.3814/2008/540872
- Cusidó RM, Palazón J, Navia-Osorio A, Mallol A, Bonfill M, Morales C, Piñol T** (1999). Production of Taxol<sup>®</sup> and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Sci*. 146: 101-107
- Custers JHHV, Harrison SJ, Sela-Buurlage MB, van Deventer E, Lageweg W, Howe PW, van der Meijs J, Ponstein AS, Simons BH, Melchers LS, Stuiver MH** 2004. Isolation and characterization of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *Plant J*. 39: 147-160
- Czaninski Y** (1978). Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les parois du xyleme du ble pendant leur différentiation. *C R Acad Sci Paris*. 286: 957-959
- Czaninski Y, Catesson AM** (1969). Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les tissus conducteurs végétaux au cours du cycle annuel. *J Microscopie*. 8: 875-888
- Dai GH, Andary C, Mondolot-Cosson L, Boubals D** (1995a). Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopora viticola*. *Physiol Mol Plant P*. 46: 177-188
- Dai GH, Andary C, Mondolot-Cosson L, Boubals D** (1995b). Histochemical responses of leaves of in vitro plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopora viticola*. *Phytopathology*. 85: 149-154
- Darwin C** (1880). En: "The power of movement in plants" (assisted by F. Darwin). John Murray (Ed.) London
- Davies ME** (1972). Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Planta*. 104: 50-65
- Decendit A, Ramawat KG, Waffo-Teguo P, Defieux G, Badoc A, Merillon JM** (1996). Anthocyanins, catechins, condensed tannins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Biotechnol Lett*. 18: 659-662
- Dekeyser RA, Claes B, De Rycke, RMU, Habets, ME, Van Montagu MC, Caplan AB** (1990). Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *Plant Cell*. 2: 591-602
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA and Lamb C** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. 394: 585-588

- Delledonne M, Murgia I, Ederle D, Sbicego PF, Biondani A, Polverari A, Lamb** (2002). Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signalling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiol Biochem.* 40: 605-610
- Dercks W, Creasy LL** (1989a). The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol Mol Plant P.* 34: 189-202
- Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ, Neill SJ** (1996). Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH-oxidase like enzyme. *FEBS Lett.* 382: 213-217
- Deus-Newmann B, Zenk MH** (1984). Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Med.* 50: 427-431
- DiCosmo F, Misawa M** (1995). Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnol Adv.* 13: 425-453
- Dittrich H, Kutchan TM** (1991). Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 9969-9973
- Dix PJ** (1986). Cell line selection. En: *Plant Cell Culture Technology.* Botanical Monographs 23. Yeoman MM (Ed.) Oxford: Black-well Scientific Publications. 143-201
- Dix PJ** (1990). *Plant cell line selection: procedures and applications.* New York, Basel, Cambridge: VCH Weinheim
- Dixon RA** (1985). *Plant Cell Culture: A practical Approach.* IRC Press. Oxford-Washington DC. USA. 226.
- Dixon RA, Jennings AC, Davies LA, Gerrish G, Murphy DL** (1989). Elicitor-active components from French beans hypocotyls. *Physiol Mol Plant P.* 34: 99-115
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ** (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol.* 32: 479-501
- Dixon RA** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 411: 843-847
- Do CB, Cormier F** (1991). Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera*) cell suspensions. *Plant Cell Rep.* 9: 500-504
- Dodds JH, Roberts LW** (1982). *Experiments in plant tissue culture.* Cambridge University Press
- Donnez D, Kim KH, Antoine S, Conreux A, De Luca V, Jeandet P, Clement C, Courrot E** (2011). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochem.* 46:1056-1062
- Dougall DK** (1987). Cell cloning and the selection of high yielding strains. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.* 4. Cell Culture in Phytochemistry. Vasil IK, Constabel F (Ed.) New York: Academic Press. 117-123
- Dörnenburg H, Knorr D** (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb Tech.* 17: 674-684
- Dornenburg H, Knorr D** (1996). Semicontinuous processes for anthraquinone production with immobilized *Cruciata glabra* cell cultures in a three-phase system. *J Biotechnol.* 50: 55-62
- Douillet-Breuil AC, Jeandet P, Adrian M, Bessis R** (1999). Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. *J Agric Food Chem.* 47:4456-4461
- Droillard MJ, Thibivillers S, Cazalé AC, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2000). Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP-kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. *FEBS Lett.* 474: 217-222

- Duarte-Vázquez MA, García-Almendárez BE, Rojo-Dominguez A, Whitaker JR, Arroyave-Hernández C y Regalado C** (2003). Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isoenzyme. *Phytochemistry*. 62: 5-11
- Duke JA** (1985). *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton, FL: CRC Press. 424-425
- Dunand C, Crevecoeur M, Penel C** (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: Possible interaction with peroxidases. *New Phytol*. 174: 332-341
- Dunford HB, Stillman JS** (1976). *Coord Chem Rev*. 19: 107-251
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 10328-10333
- Duroux L, Welinder KG** (2003). The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J Mol Evol*. 57: 397-407
- Ehrlich PR, Raven PH** (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608
- Eisenreich W, Bacher A** (2000). Elucidation of biosynthetic pathways by retrodictive/predictive comparison of isotopomer patterns determined by MNR spectroscopy. En: *Genetic Engineering, Principles and Method*. Setlow JK (Ed.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 22: 121-153
- Ei-Kereamy A, Chervin C, Roustan JP, Cheynier V, Souquet JM, Moutounet M, et al.** (2003). Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiol Plant*. 119: 175-182
- Ellis BE** (1985). Characterization of clonal cultures of *Anchusa officinalis* derived from single cells of known productivity. *J Plant Physiol*. 112: 183-192
- Ei-Mansouri I, MA Quesada** (1996). Una visión general sobre la biotecnología de plantas. *Encuentros en la Biología* 30
- Ei-Turk J, Asemota O, Leymarie J, Sallaud C, Mesnage S, Breda C, Buard D, Kondorosi A, Esnault R** (1996). Nucleotide sequences of four pathogen-induced alfalfa peroxidase-encoding cDNAs. *Gene*. 170: 213-216.
- Elvira MI, Galdeano MM, Gilardi P, Garcia-Luque I, Serra MT** (2008). Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *J Exp Bot*. 59:1253-65
- Epple P, Apel K, Bohlmann H** (1995). An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol*. 109: 813-820
- Evans W, Partridge M** (1953). Alkaloid biogenesis. Part 1. The site of synthesis of alkaloids in *Datura*. *J Pharm Pharmacol*. 5: 293-300
- Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J et al.** (2001). Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Mol Breed*. 7: 175-185
- Farmer EE, Alméras E, Krishnamurthy V** (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol*. 6: 372-378
- Farmer EE, Ryan CA** (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell*. 4:129-134
- Faurie B, Cluzet S, Mérillon JM** (2009). Implication of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures. *J Plant Physiol*. 166:1863-1877



- Felix G and Boller T** (2003). Molecular sensing of bacteria in plants the highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem.* 278: 6201-6208
- Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Boller T** (1991). Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 8831-8834
- Ferrer MA, Ros Barceló A** (1994). Genistein as an endogenous natural substrate of acidic peroxidases in lupin hypocotyls. *Ann Appl Biol.* 125: 173-178
- Ferrer MA, Calderón AA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1990). 4-methoxy- $\alpha$ -naftol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidases activities. *Phytochem Anal.* 1: 63-69
- Ferrandiz ML, Alcaraz MJ** (1991). Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions.* 32: 283–288
- Ferri M, Tassoni A, Franceschetti M, Righetti L, Naldrett MJ, Bagni N** (2009). Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics.* 9: 610-624
- Ferri M, Dipalo SCF, Bagni N, Tassoni A** (2011). Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. *Food Chem.* 124: 1473-1479
- Fils-Lycaon BR, Wiersma PA, Eastwell KC, Sautiere P** (1996). A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. *Plant Physiol.* 111: 269-273
- F-IPCfG** (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature.* 449: 463-467.
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG** (1993). Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol.* 265: 774-778
- Fowler MW** (1986). Process strategies for plant cell cultures. *Trends Biotechnol.* 4: 214-219
- Fowler MW** (1988). Problems in commercial exploitation of plant cell cultures. En: *Applications of Plant Cell and Tissue Culture.* Bock, Marsh J (Ed.) John Wiley & Sons, Chichester, UK: CIBA Foundation Symposium. 154: 157-70
- Fraenkel G** (1959). The Raison d'être of secondary plant substances. *Science.* 129: 1466–1470
- Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE** (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet.* 341: 1103-1104
- Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL** (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J Sci Food Agric.* 43: 890-894
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol.* 9: 436-442
- Furmanova M, Syklovska BK** (2000). Hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaocatin III. *Biotechnol Lett.* 22: 606-616
- Furuya T, Ikuta A, Syono K** (1972). Alkaloids from callus cultures of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry.* 11: 3041-3044
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 50: 151-158
- Gao SL, Zhu DN, Cai ZH, Jiang Y, Xu DR** (2004). Organ culture of a precious Chinese medicinal plant – *Fritillaria unibracteata*. *Plant Cell Tiss Org.* 59: 197-201

- García-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D and Pugin A** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 711-724
- García-Florenciano E, Calderón AA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1992). The decarboxylative pathway of indole-3-acetic acid catabolism is not functional in grapevine protoplasts. *J Exp Bot.* 43: 715-721
- García-Florenciano E, Calderón AA, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1991). The vacuolar localization of basic isoperoxidases in grapevine suspension cell cultures and its significance in indole-3-acetic acid catabolism. *Plant Growth Regul.* 10: 125-138
- García-Florenciano E, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1990). The specific expression of isoperoxidases in grapevine cells cultured in suspension in relation to vacuolar development. *Vitis.* 29: 189-198
- García JJ** (2006). Caracterización del crecimiento de suspensiones celulares de *Vitis vinifera* L. cv. Gamay en matraces como etapa previa a su elicitación y cultivo previo en biorreactor. Tesis de Licenciatura.
- García-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M** (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* 3: 72-74
- García-Pineda E, Benezer-Benezer M, Gutierrez Segundo A, Rangel-Sanchez G, Arreol Cortes A, Castro-Mercado E** (2010). Regulation of defence responses in avocado roots infected with *Phytophthora cinnamomi* (Rands). *Plant Soil.* 331: 45-56
- Gaspar T, Penel C, Thorpe T, Greppin H** (1982). Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Universite de Geneve. Centre de Botanique. Geneve. 89-123
- Gaspar T, Penel C, Castillo F, Greppin H** (1985). A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol Plant.* 64: 418-423
- Gautheret RJ** (1939). Sur la possibilité de réaliser la cultura indéfinie des tissus tubercules de carrote. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'Academie des Sciences (Paris).* 118: 121-220
- Gavetta B, Fuzzati N, Griffino A, Lolla E, Pace R, Ruffilli T, Peterlongo F** (2000). Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. *Fitoterapia.* 71: 162-175
- Gazaryan IG, Lagrimini LM** (1995). Purification and unusual kinetic properties of tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry.* 41: 1029-1034
- Gelli A, Higgins VJ, Blumwald E** (1997). Activation of plant plasma membrane calcium-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* 113: 269-279
- Gerber SA** (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 6940-6945
- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 43: 205-227
- Goldberg R, Liberman M, Mathieu C, Pierron M, Catesson AM** (1987). Development of epidermal cell wall peroxidase along the mung bean hypocotyl: possible involvement in the cell wall stiffening process. *J Exp Bot.* 38: 1378-1390
- Gonzalez-Barrio R, Beltran D, Cantos E, Gil MI, Espin JC, TomasBarberan FA** (2006). Comparison of ozone and UV-C treatments on the postharvest stilbenoid monomers, dimers and trimers induction in var. 'Superior' white table grapes. *J Agr Food Chem.* 54: 4222-4228
- Gonzalez-Teuber M, Eilmus S, Muck A, Svatos A, Heil M** (2009). Pathogenesis-related proteins protect extrafloral nectar from microbial infestation. *Plant J.* 58: 464-473
- Gould K, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D** (2003). Nitric oxide production by tobacco leaves: a general stress response?. *Plant Cell Environ.* 26: 1851-1862

- Grant JJ, Loake GJ** (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124: 21-29
- Green BN, Oliver RWA** (1991). The study of intact proteins and glycoproteins by electrospray mass spectrometry. *Biochem Soc Trans.* 19: 929-935
- Green TR, Ryan CA** (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777
- Griffith DW, Bender ML** (1973). Cycloamilases as catalyts. *Advan. Catal. Related Subjs.* 23: 309- 361
- Gu YQ, Wildermuth MC, Chakravarthy S, Loh YT, Yang C, He X, Han Y, Martin GB** (2002). Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 14: 817-831
- Guevara-Morato MA, Garcia de Lacoba M, Garcia-Luque I, Serra MT** (2010). Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities. *J Exp Bot.* 61: 3259-3271
- Gundalch H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 2389-2393
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM** (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science.* 302: 100-103
- Gupta R and Luan S** (2003). Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiol.* 132: 1149-1152
- Haberlandt G** (1902). Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Kais. Akad. Wiss. - Math. Naturw. Klasse, Wien Bd.* 111: 69-92
- Harding SA, Oh SH, Roberts DM** (1997). Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO Journal.* 16: 1137-1144
- Harfouche Antoine L, Rugini E, Mencarelli F, Botondi R, Muleo R** (2008). Salicylic acid induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and endochitinase gene expression but not ethylene biosynthesis in *Castanea sativa* in vitro model system. *J Plant Physiol.* 165 734-744
- Hart PJ, Pfluger HD, Monzingo AF, Hollis T, Robertus JD** (1995). The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 248: 402-413
- Hartmann T** (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry.* 68: 2831-2846
- Hayasaka Y, Adams KS, Pocock KF, Baldock GA, Waters EJ, Hoj PB** (2001). Use of electrospray mass spectrometry for mass determination of grape (*Vitis vinifera*) juice pathogenesis-related proteins: a potential tool for varietal differentiation. *J Agr Food Chem.* 49: 1830-1839
- Hendriks T, Van Loon LC** (1990). Petunia preoxidase is localized in the epidermis of aerial plant organs. *J Plant Physiol.* 136: 519-525
- Henrissat B, Bairoch A** (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 293: 781-788
- Hepler PK, Rice RM, Terranova WA** (1972). Cytochemical localization of peroxidase in wound vessel members of *Coleus*. *Can J Bot.* 50: 977-983
- Herrmann K** (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic acid and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci.* 28: 315-347
- Hiraga S, Sasaki K, Yamakawa H, Mitsuhara I, Toshima H, Matsui H, Homma M, Ohashi Y** (2000). Wound-induced expression of tobacco peroxidase is not enhanced by ethephon and suppressed by methyl jasmonate and coronatine. *Plant Cell Physiol.* 41: 165-170
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H** (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42: 462-468

- Hobbs MC, Yeoman MM** (1991). Effect of light on alkaloid accumulation in cell cultures of *Nicotiana* sp. *J Exp Bot.* 22: 1371-1378
- Holmes-McNary M, Baldwin AS** (2000). Chemopreventive properties of *trans*-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I $\kappa$ B kinase. *Cancer Res.* 60: 3477-3483
- Hoos G, Blaich R** (1988). Metabolisme of stilbene phytoalexins in grapevines: oxidation of resveratrol in single-cell cultures. *Vitis.* 27: 1-12
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA** (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425: 191–196
- Hrmova M, Burton RA, Biely P, Lahnstein J, Fincher GB** (2006). Hydrolysis of (1,4)- $\beta$ -D-mannans in barley (*Hordeum vulgare* L.) is mediated by the concerted action of (1,4)- $\beta$ -D-mannan endohydrolase and  $\beta$ -D-mannosidase. *Biochem J.* 399:77-90
- Huang CN, Cornejo MJ, Bush DS, Jones RL** (1986). Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma.* 135: 80-87
- Huang X, von Rad U, Durner J** (2002). Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta.* 215: 914-23
- Ingham JL** (1976). 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry.* 15: 1791-1793
- Iriti M, Faoro F** (2006). Grape phytochemicals: A bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Med Hypotheses.* 67: 833-838
- Iriti M, Faoro F** (2010). Bioactive chemicals and health benefits of grapevine products. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables.* (Ed.) Elsevier: 38: 581-620
- Iriti M, Rossoni M, Borgo M, Faoro F** (2004). Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *J Agric Food Chem.* 52: 4406-4413
- Ivashikina N, Becker D, Ache P, Meyerhoff O, Felle HH, Hedrich R** (2001). K<sup>+</sup> channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Lett.* 508: 463-469
- Iwashina T** (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J Plant Res.* 113: 287-299
- Jackson PAP, Galinha CIR, Pereira CS, Fortunato A, Soares NC, Amâncio SBQ, Pinto-Ricardo CP** (2001). Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiol.* 127: 1065-1076
- Jang MS, Cai EN, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HHS, Famworth NR, Kinghom AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM** (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 275: 218-220
- Jayasankar S, Li Z, Gray DJ** (2003). Constitutive expression of *Vitis vinifera* thaumatin-like protein after *in vitro* selection and its role in anthracnose resistance *Functional Plant Biology.* 30: 1105-1115
- Jen JJ, Seo A, Flurkey WH** (1980). Tomato peroxidase: purification via hydrophobic chromatography. *J Food Sci.* 45: 60-63
- Jeandet P, Bessis R** (1989). Une réflexion sur les mécanismes morphologiques et biochimiques de l'interaction vigne-*Botrytis*. *Bull OIV.* 62: 637-657
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M** (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem.* 50: 2731-2741

- Jeong CS, Chakrabarty D, Hahn EJ, Lee HL, Paek KY** (2006). Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochem Eng J.* 27: 252-263
- Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP** (1990). Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.* 268:69-71
- Jouanin L** (1984). Restriction map of an agropine-type Ri-plasmid and its homologies with Ti-plasmids. *Plasmid.* 12: 91-102
- Johnson TS, Ravishankar GA, Venkataraman LV** (1990). In vitro capsaicin production by immobilised cells and placental tissues of *Capsicum annum* L. grown in liquid medium. *Plant Sci.* 70: 223-229
- Jolicoeur M, Chavarie PJ, Cerreau PJ, Archambault J** (1992). Development of a helicoidal-ribbon impeller bioreactor for high density plant cell suspension culture. *Biotechnol Bioeng.* 39: 511-521
- Jonak C, Okresz L, Bögre L, Hirt H** (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 415-424
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, et al.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 11086-11091
- Kasprzewska A** (2003). Plant chitinases-regulation and function. *Cell Mol Biol Lett.* 8: 809–824
- Karppinen K, Hokkanen J, Tolonen A, Maltila S, Hohtola A** (2007). Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry.* 68: 1038-1045
- Karuppusami S** (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res.* 3: 122-1239
- Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML** (1999). The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol Bioeng.* 62: 97-105
- Kusumawati L, Imin N, Djordjevic A** (2008). Characterization of the secretome of suspension cultures of *Medicago* species reveals proteins important for defense and development. *J Proteome Res.* 7: 4508-4520
- Kauss H, Jeblick W, Domard A** (1989). The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta.* 178: 385-392
- Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Umemura K, Umezawa T, Shimamoto K** (2006). Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 230-235
- Keller M, Steel CC, Creasy GL** (2000). Stilbene accumulation in grapevine tissues: developmental and environmental effects. *Acta Hort.* 514:275–286
- Kelly WK, Esser JE, Schroeder JI** (1995). Effects of cytosolic calcium and limited, possible dual, effects of G protein modulators on guard cell inward potassium channels. *The Plant J.* 8: 479-489
- Kerby K, Somerville S** (1989). Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* F. sp. hordei. *Physiol Mol Plant P.* 35: 323-337
- Keskin N, Kunter B** (2008). Production of *trans*-resveratrol in “Cabernet Sauvignon” (*Vitis vinifera* L.) callus culture in response to ultraviolet-C irradiation. *Vitis* 47:193–196
- Kessler A, Baldwin IT** (2002). Plant responses to insect herbivory. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 53: 299-232

- Kim JK, Hwang BK** (2000). Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiol Plant*. 108:51-60
- Kim SH, Terry ME, Hoops P, Dauwalder M, Roux SJ** (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to wall-localized peroxidases from corn seedlings. *Plant Physiol*. 88: 1446-1453
- Kimura Y, Ohminami H, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S** (1983). Effects of stilbene components of roots of *Polygonum* ssp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats. *Planta Med*. 49: 51-54
- Kimura Y, Okuda H, Arichi S** (1985). Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 834: 275-278
- Kiong AL, Mahmood M, Fodzillan NM, Daud SK** (2005). Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by *Centella asiatica* callus culture. *Pak J Biol Sci*. 8: 1160-1169
- Kiselev KV, Dubrovina AS, Veselova MV, Bulgakov VP, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN** (2007). The rolB gene-induced overproduction of *trans*-resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *J Biotechnol*. 128: 681-692
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, et al.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defenses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 8849-8855
- Knobloch KH, Berlin J** (1981). Phosphate mediated regulation of cinnamoyl putrescine biosynthesis in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta Med*. 42: 167-172.
- Kobayashi I, Murdoch LJ, Kunoh H, Hardham** (1995). Cell biology of early events in plant resistance response to infection by pathogenic fung. *Can J Bot*. 73: 418-425
- Kochhar S, Kochhar VK, Khanduja SD** (1979). Changes in the pattern of isoperoxidases during maturation of grape berries cv. Gulabi as affected by ethephon (2-chloroethyl) phosphonic acid. *Am J of Enol Viticult*. 30: 275-277
- Kögl F, Haagen-Smit AJ, Erxleben H** (1934). Über ein neues auxin ('Hetero-auxin') aus harn. *Zeitschrift fuer Physiologische Chemie*. 228: 90-103
- Koiwa H, Kato H, Nakatsu T, Oda J, Yamada Y, Sato F** (1997). Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. *Plant Cell Physiol*. 38: 783-791
- Kovacevik N, Grubisic D** (2005). In vitro cultures of plants from the rhamnaceae : Shoot propagation and anthraquinones production. *Pharm Biol*. 43: 420-424
- Kuhn E** (2004). Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and C<sup>13</sup>-labeled peptide standards. *Proteomics*. 4: 1175-1186
- Kumar D, Klessig DF** (2000). Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact*. 13: 347-351
- Kundu JK, Surh YJ** (2005). Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals. *Mutation Research*. 591: 123-146
- Kunkel B.N., D.M. Brooks** 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol*. 5:325-331
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothstein S** (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 7542-7546
- Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D** (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol*. 135: 516-529
- Langcake P, Cornford CA, Pryce RJ** (1979). Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*. 18: 1025-1027



- Langcake P, McCarthy WV** (1979). The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*. 18: 244-253
- Langcake P, Pryce RJ** (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*. 9: 77-86
- Langcake P, Pryce RJ** (1977a). A new class of phytoalexins from grapevines. *Specialia*. 33: 151-152
- Langcake P, Pryce RJ** (1977b). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiations. *Phytochemistry*. 16: 1193-1196
- Lanteri ML, Pagnussat GC and Lamattina L** (2006). Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *J Exp Bot*. 57: 1341-1351
- Larronde F, Krisa S, Decendit A, Cheze C, Merillon JM** (1998). Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Rep*. 17: 946-950
- LaRosa PC, Chen Z, Nelson DE, Singh NK, Hasegawa PM, Bressan RA** (1992). Osmotin gene expression is post-transcriptionally regulated. *Plant Physiol*. 100: 409-415
- Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hault JR, Halliwell B** (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol*. 42: 1673-1681
- Lebrun-García A, Bourque S, Binet MN, Ouaked F, Wendehenne D, Chiltz A, Schaffner A, Pugin A** (1999). Involvement of plasma membrane proteins in plant defense response. Analysis of cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie*. 81: 663-668
- Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, Wendehenne D, Mazars C, Ranjeva R, Pugin A** (2005). Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium*. 38: 527-538
- Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A** (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*. 14: 2627-2641
- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A** (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol*. 171: 249-269
- Lecourieux-Ouaked F, Pugin A, Lebrun-Garcia A** (2000). Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor on defense reactions in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact*. 13: 821-829
- Lee CY, Pennesi AP, Smith NL** (1983). Purification and some properties of peroxidase from de Chaunac grapes. *Am J Enol Viticult*. 34: 128-129
- Lee J, Vogt T, Hause B, Löbler M** (1997). Methyl jasmonate induces O-methyltransferase in barley. *Plant Cell Physiol*. 38: 851-862
- Lee SK, Zhang W, Sanderson BJS** (2008). Selective growth inhibition of human leukemia and human lymphoblastoid cells by resveratrol via cell cycle arrest and apoptosis induction. *J Agric Food Chem*. 56: 7572-7577
- Lesniewska E, Adrian M, Klinguer A, Pugin A** (2004). Cell wall modification in grapevine cells in response to UV stress investigated by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. 100: 171-178
- Leung AY, Foster S** (1996). *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics*. 2nd edition. John Wiley & Sons (Ed.) New York
- Li X, Zheng X, Yan S, Li S** (2008). Effects of salicylic acid (SA), ultraviolet radiation (UV-B and UV-C) on *trans*-resveratrol inducement in the skin of harvested grape berries. *Front Agric China*. 2: 77-81

- Liao XP, Zhu XC, He, PC** (1999). A cationic peroxidase from leaves of *Vitis pseudoreticulata*. *Phytochemistry*. 51: 143-145
- Lijavetzky D, Almagro L, Belchi-Navarro S, Martinez-Zapater JM, Bru R, Pedreño MA** (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Res Notes*. 1: 132–140
- Linden JC, Phisalaphong M** (2000). Oligosaccharides potentiate methyl jasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. *Plant Sci*. 158: 41-51.
- Lindsey K, Yeoman MM** (1984). The synthetic potential of immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. annum. *Planta*. 162: 495-501
- Linthorst H JM** (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit Rev Plant Sci*. 10: 123-150
- Liu D, Kashchandra GR, Hasegawa PM, Bressan RA** (1993). Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 1888-1892
- Liu H, Sadygov RG, Yates JR** (2004). A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*. 76: 4193-4201
- López-Nicolás JM, Bru R, Sánchez Ferrer A, García Carmona F** (1995). Use of soluble lipids for biochemical processes: Linoleic acid cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solutions. *Biochem J*. 308: 151-154
- López-Nicolás JM, Núñez-Delicado E, Pérez-López AJ, Carbonell A, Cuadra-Crespo P.** (2006). Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for  $\beta$ -cyclodextrin complexes of *trans*-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1135: 158-165
- López-Serrano M, Ferrer MA, Calderón AA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1994). Aluminum mediated fosetyl-Al effects on peroxidase secreted from grapevine cells. *Environ Exp Bot*. 24: 329-336
- López-Serrano M, Ros Barceló A** (1996). Effect of metal ions on peroxidase activity from grapevine cells. *Plant Physiol Biochem*. 34: 827-832
- López-Serrano M, Ferrer MA, Pedreño MA, Ros Barceló A** (1997).  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  ions counteract the reduction by fosetyl-Al (aluminum tris[ethyl phosphonate]) of peroxidase activity from suspension-cultured grapevine cells. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 47: 207-212
- Low PS, Merida JR** (1996). The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol Plant*. 96: 533-542
- Luan S** (1998). Protein phosphatases and plant signaling cascades. *Trends Plant Sci*. 3: 271-275
- Ma W, Smigel A, Tsai YC, Braam J, Berkowitz GA** (2008). Innate immunity signaling: cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol*. 148: 818-828
- McCollum TG, Doostdar H, Mayer RT, McDonald RE** (1997). Characterization of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases in grapefruit flavedo during fruit development. *Physiol. Plant*. 99: 486-494
- McEldoon JP, Dordick JS** (1996). Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol Progress*. 12: 555–558
- Mahady GB, Liu C, Beecher CWW** (1998). Involvement of protein kinase and G proteins in the signal transduction of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*. 48: 93-102
- Mallol A, Cusido RM, Palazon J, Bonfill M, Morales C, Pinol MT** (2002). Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed root. *Phytochemistry*. 57: 365-371
- Mantell SH, Smith** (1983). Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. En: *Plant Biotechnology*. Society for



- Experimental Biology Seminar Series 18. Mantell SH, Smith H (Ed.) Cambridge University Press. Cambridge. 75-108
- Marambaud P, Zhao H, Davies P** (2005). Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptides. *J Biol Chem.* 280: 37377-37382
- Martinez-Esteso MJ, Sellés-Marchart S, Vera-Urbina JC, Pedreño MA, Bru-Martinez R** (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors. *J Proteomics.* 73: 331-341
- Mathieu Y, Kurkdjian A, Xia H, Guern J, Koller A, Spiro MD, Spiro M, Neill MO, Albersheim P, Darvill A** (1991). Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J.* 1: 333-343
- Matile P** (1990). The toxic compartment of plant cells. En: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology.* Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (Ed.) Kluwer The Netherlands. 557-596
- Matsubara K, Shigekazu K, Yoshioka T, Fujita Y, Yamada Y** (1989). High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. *J Chem Technol Biot.* 46: 61-69
- Mattivi F, Reniero F, Korhammer S** (1995). Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J Sci Food Agric.* 43: 1820-1823
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T** (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue: II. inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942
- Mazza CA, Boccacandro HE, Giordano CV, Battista D, Scopel AL, Ballare CL** (2000). Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiol.* 122: 117-126
- McDonald KA, Jackman AP** (1989). Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in Alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 8: 455-458
- Mei Wenqian, Qin Y, Song W, Li J, Zhu Y** (2009). Cotton *GhPOX1* encoding plant class III peroxidase may be responsible for the high level of reactive oxygen species production that is related to cotton fiber elongation. *J Genet Genomics.* 36 141-150
- Melchers G, Lalib G** (1974). Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. *Mol Gen Genet.* 135: 277-294
- Melchers G, Sacristan MG, Holder AA** (1978). Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res Comm.* 43: 203-218
- Metraux JP** (2001). Systemic acquired and salicylic acid: current state of knowledge. *Eur J Plant Pathol.* 107: 13-18
- Melchers LS, M. Van der Groot A, Knaap JA, Ponstein AS, Sela-Buurlage MB, Bol JF, Cornelissen BJC, Van den Elzen PJM, Linthorst HJM** (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity, *Plant J.* 5: 469-480
- Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW** (2001). ORC Anization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trens Plant Sci.* 6: 212-219
- Métraux JP, Streit L, Staub T** (1988). A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiol Mol Plant Pathol.* 33: 1-9
- Miles GP, Samuel MA, Ellis BE** (2002). Suramin inhibits oxidant signaling in tobacco suspension-cultured cells. *Plant Cell Environ.* 25: 521-527
- Minic Z, Brown S, De Kouchkovsky Y, Schultze M, Staehelin C** (1998). Purification and characterization of a novel chitinase-lysozyme, of another chitinase, both hydrolysing *Rhizobium meliloti* Nod factors, and of a pathogenesis-related protein from *Medicago sativa* roots. *Biochem J.* 332: 329-335

- Miller CO, Skoog F, von Saltza MH, Strong FM** (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc.* 77: 1392
- Misawa M** (1985). Production of useful plant metabolites. En: *Adv Biochem Eng Biotechnol.* Fiechter A (Ed.) Springer-Verlag. Berlin. 59-88
- Mithofer A, Fliegmann J, Daxberger A, Ebel C, Neuhaus-Url G, Bhagwat AA, Keister DL, Ebel J** (2001). Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis by  $\beta$ -glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS Lett.* 508: 191-195
- Mizukami H, Tabira Y, Ellis BE** (1993). Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 12: 706-709
- Moncousin CH, Favre JM, Gaspar T** (1988). Changes in peroxidase activity and endogenous IAA levels during adventitious root formation in vine cuttings. En: *Physiology and Biochemistry of Auxins in Plants.* (Ed.) Kutacek M, Bandurski RS and Krekule J. Academia. Prague. 331-337
- Morales M, Ros Barceló A** (1997). A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry.* 45: 229-232
- Morales M, Alcantara J, Ros Barceló A** (1997). Oxidation of *trans*-resveratrol by a hypodermal peroxidase isoenzyme from Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. *Am Journal Enol and Viticult.* 48: 33-38
- Morales M, Bru R, García Carmona F, Ros Barceló A, Pedreño MA** (1998). Effect of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*. *Plant Cell Tiss Org.* 53: 179-187
- Morales M, Ros Barceló A, Pedreño MA** (2000). Plant stilbenes: recent advances in their chemistry and biology. En: *Advances in Plant Physiology.* (Ed.) Scientific Publishers. India. 3: 39-70
- Morel G, Martin C** (1952). Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'Académie des Sciences.* Paris. 235: 1324-1325
- Morel G, Wetmore RM** (1951). Fern callus tissue culture. *Am J Bot.* 38: 141-143
- Moreno PRH, Poulsen C, van der Heijden R, Verpoorte R** (1996). Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* L. Don, G. cell suspension cultures. *Enzyme Microb Technol.* 18: 99-107
- Morgan TH** (1902). Growth and regeneration in *Planaria lugubris*. *Arch Entw Chem Org.* 13: 179-212
- Morohashi Y, Matsushima H** (2000). Development of  $\beta$ -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *J Exp Bot.* 51:1381-1387
- Morris P** (1986). Kinetics of growth and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. En: *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures* (Ed.) Morris P, Scragg AH, Stafford A, Fowler MW. Cambridge University Press. 63-67
- Moskowitz AH, Hrazdina G** (1981). Vacuolar contents of fruit subepidermal cells from *Vitis* species. *Plant Physiol.* 68: 686-692
- Mueller MJ** (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol Plant.* 100: 653-663
- Mueller MJ, Brodschelm W, Spannagl E, Zenk MH** (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:7490-7494
- Murashige T, Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497
- Murgia I, de Pinto MC, Delledonne M, Soave C, De Gara L** (2004). Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. *J Plant Physiol.* 161: 777-783

- Neale AD, Wahleithner JA, Lund M, Bonnett HT, Kelly A, Meeks-Wagner DR, Peacock WJ, Dennis ES** (1990). Chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during  $\downarrow$ ower formation. *Plant Cell* 2: 673-684
- Negrel J, Javelle F** (1995). Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase or protease-elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiol Plant*. 95: 569-574
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT** (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiol*. 128: 13-16
- Nesvizhskii AI, Aebersold R** (2005). Interpretation of shotgun proteomic data. The protein interference problem. *Mol Cell Proteomics*. 4: 1419-1440
- Neuhaus JM, Fritig B, Linhorst HJM, Meins Jr F, Mikkelsen JD, Ryals J** (1996). A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mole Biol Rep*. 14: 102-104
- Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mosinger E** (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol*. 108: 17-27
- Niles RM, McFarland M, Weimer MB, Redkar A, Fu YM, Meadows GG** (2003). Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett*. 190: 157-163
- Nilsson K, Birnbaum S, Flygare S, Linse L, Schroder U, Jeppsson U, Larsson P, Mosbach K, Brodelius P** (1983). A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*. 17: 19-26
- Nobercourt P** (1939). Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *Comptes Rendus des Seances-Societe Biologie*. Paris. 130: 1270-1271
- Noguchi H, Sankawa U** (1982). Formation of germichryson by tissue cultures of *Cassia torosa*: induction of secondary metabolism in the lag phase. *Phytochemistry*. 21: 319-323
- Nojiri H, Sujimori M, Yamane H, Nishimura Y, Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Murofushi N, Omori T** (1996). Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiol*. 110: 387-392
- Novais J** (1988). Methods of immobilization of plant cells. En: *Plant cell cloning*. (Ed.) Pais M, Mavituna F, Novais J. NATO ASI Series. New York. 85-94
- Novo Uzal E, Gómez-Ros LV, Hernández JA, Pedreño MA, Cuello J, Ros Barceló A** (2009). Analysis of the soluble cell wall proteome of gymnosperms. *J Plant Physiol*. 166: 831-843
- Nühse TS, Boller T, Peck SC** (2003). A plasma membrane syntaxin is phosphorylated in response to the bacterial elicitor flagellin. *J Biol Chem*. 278: 45248-45254
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L** (2004). Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*. 198: 249-266
- Ogino T, Hiraoka N, Tabata M** (1978). Selection of high nicotine producing cell lines of tobacco callus by single cell cloning. *Phytochemicals*. 22: 2447-2450
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H** (2000). Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol*. 42: 479-488
- Ong SE, Pandey A** (2001). An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng*. 18: 195-205
- Ong SE** (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 1: 376-386

- Otha S, Yatazawa M** (1978). Effect of light on nicotine production in tobacco tissue culture. *Agricult Biol Chem.* 42: 873-877
- Ott PG, Varga GJ, Szatmari A, Bozso Z, Klement E, Medzihradzsky KF, Besenyei E, Czelleng A, Klement Z** (2006). Novel extracellular chitinases rapidly and specifically induced by general bacterial elicitors and suppressed by virulent bacteria as a marker of early basal resistance in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact.* 19: 161-172
- Outeiro TF, Marques O, Kazantsev A** (2008). Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta.* 1782: 363-369
- Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM** (1995). The red wine phenolics, *trans*-resveratrol and quercetin, block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart diseases. *Clinical Chimica Acta.* 236: 207–219
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L** (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129: 954-956
- Pajot E, Daniel Le Corre, Silué D** (2001). Phytogard® and DL- $\beta$ -amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L). *Eur J Plant Pathol.* 107: 861-869
- Palavan-Unsal N, Arisan D** (2009). Nitric oxide signalling in plants. *Bot Rev.* 75: 203-229
- Palazon J, Cusido RM, Gonzalo J, Bonfill M, Morales C, Pinol MT** (1998). Relation between the amount of *rol* C gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* transformed root cultures. *J Plant Physiol.* 153: 712-718
- Pan Z, Wang H, Zhong J** (2000). Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. *Enzyme Microb Technol.* 27:714-723.
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1999). The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* 121: 197-205
- Passardi F, Penel C, Dunand C** 2004. Performing the paradoxical: how plants peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 9: 534-540
- Pasqualini S, Meier S, Gehring C, Madeo L, Fornaciari M, Romano B, Ederli L** (2009). Ozone and nitric oxide induce cGMP-dependent and-independent transcription of defence genes in tobacco. *New Phytol.* 181: 860-870
- Patel VJ, Thalassinos K, Slade SE, Connolly JB, Crombie A, Murrell JC, Scrivens JH** (2009). A comparison of labelling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *Journal Proteome Res.* 8: 3752-3759
- Payne G, Bringi V, Prince C, Shuler M** (1991). *Plant cell and tissue culture in liquid systems.* (Ed.) Hanser Publishers. Munich, Vienna, New York and Barcelona.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG, Garoffo LP, Calamari AM, Brenna O, Conti A** (2003). Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol.* 111: 350-359
- Peach K** (1950). *Biochemie und physiologie der sekundären pflanzenstoffe.* (Ed.) Springer. Berlin Gottingen Heidelberg.
- Pearson WR** (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Method Enzymol.* 183:63-98
- Pedras MSC, Nycholat CM, Montaut S, Xu Y, Khan AQ** (2002). Chemical defenses of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. *Phytochemistry.* 59: 611-625
- Pedreño MA, Morales M, Calderón AA, Zapata JM, Ros Barceló A** (1996). A *trans*-resveratrol oxidizing basic peroxidase isoenzyme from *Vitis vinifera*. *Stress and*

- Disease. En: Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology. (Ed.) Obinger C, Burner U, Ebermann R, Penel C, Greppin H. Universidad de Ginebra. 338-344
- Perchepied L, Balague C, Riou C, Claudel-Renard C, Riviere N, Grezes-Besset B, Roby D** (2010). Nitric oxide participates in the complex interplay of defense related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Microbe Interact. 23: 846-860
- Pérez FJ, Villegas D, Mejía N** (2002). Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in grapevine leaves. Phytochemistry. 60: 573-580
- Pervaiz S** (2003). Resveratrol: From grapevines to mammalian biology. The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 17: 1975-1985
- Pezet R, Pont V** (1988). Mise en évidence de pterostilbene dans les grappes de *V. vinifera*. Plant Physiol Biochem. 26: 603-607
- Pezet R, Perret C, Jean-Denis JB, Tabacchi R, Gindro K, Viret O** (2003).  $\delta$ -Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. J Agric Food Chem. 51:5488-5492
- Pezzuto JM** (2008). Grapes and human health: A perspective. J Agr Food Chem. 56: 6777-6784
- Pressey R** (1997). Two isoforms of NP24-a thaumatin-like protein in tomato fruit. Phytochemistry. 44: 1241-1245
- Piel J, Atzorn R, Gäbler R, Kühnemann F, Boland W** (1997). Cellulysin from the plant parasitic fungus *Trichoderma viride* elicits volatile biosynthesis in higher plants via the octadecanoid signaling cascade. FEBS Lett. 416: 143-148
- Pierik RLM** (1987). In vitro culture of higher plants. (Ed.) Nijhoff M. Dordrecht. 183-230
- Pieur C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M** (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seed. Phytochemistry. 36: 781-784
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nat Chem Biol. 5: 308-316
- Pocock KF, Hayasaka Y, McCarthy MG, Waters EJ** (2000). Thaumatin-like proteins and chitinases: the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berries at maturity. J Agr Food Chem. 48: 1637-1643
- Poinssot B, Vandelle E, Bentéjac M, Adrian M, Levis C, Brygoo Y, Garin J, Sicilia F, Coutos-Thévenot P, Pugin A** (2003). The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defence reactions unrelated to its enzymatic activity. Mol Plant Microbe Interact. 16: 553-564
- Pomar F, Bernal MA, Díaz J, Merino F** (1997). Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. Phytochemistry. 46: 1313-1317
- Porat Y, Abramowitz A, Gazit E** (2006). Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. Chem Biol Drug Des. 67: 27-37
- Power JB, Cummins SE, Cocking EC** (1970). Fusion of isolated plant protoplasts. Nature. 225: 1016-1018
- Preisig-Müller R, Schwekendiek A, Brehm I, Reif HJ, Kindl H** (1999). Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. Plant Mol Biol. 39: 221-229
- Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, Guern J** (1997). Early events induced by elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of plasma membrane NADPH-oxidase and activation of glycolysis and pentose phosphate pathway. Plant Cell. 9: 2077-2091
- Radman R, Saéz T, Bucke C, Keshavarz** (2003). Elicitation of plants and microbial cell system. Biotechnol Appl Biochem. 37: 91-102



- Ramachandra RS, Tripathi U, Ravishankar GA** (1999). Biotransformation of codeine to morphine in freely suspended cells and immobilized cultures of *Spirulina platensis*. *World J Microb Biot.* 5: 465-469
- Rao MV, Lee H, Davis KR** (2002). Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant Cell.* 32: 447-456
- Rashid A** (1988). Cell physiology and genetics of higher plants. Vol. I. (Ed.) Boca Raton FL. CRC Pres. 1-38, 67-103.
- Ravishankar GA, Venkataraman LV** (1993). Role of plant cell culture in food biotechnology: current trends, limitations and future prospects. En: *Plant Biotechnology: commercial prospects and problems.* (Ed.) Prakash J, Pierik RLM. Oxford IBH Press. New Delhi. 255-274
- Reinert J** (1958). Morphogenesen und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. *Naturwissenschaften.* 45: 344-345
- Reichling J** (1999). 5 Plant-microbe interactions and secondary metabolites with antiviral, antibacterial and antifungal properties. *Ann Plant Rev.* 3: 187-273
- Reuveni M, Reuveni R** (1995). Efficacy of foliar application of phosphates in controlling powdery mildew fungus on field-grown winegrapes: effects on cluster yield and peroxidase activity in berries. *J Phytopathol.* 143: 21-25
- Reznik H** (1960). Vergleichende biochemie der phenylpropane. *Ergebnisse der Biologie.* 23: 14-46
- Roberts W, Selitrennikoff CP** (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J Gen Microbiol.* 136: 1771-1774
- Robinson T** (1974). Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science.* 184: 430-435
- Robinson DS, Bretherick MR, Donnelly JK** (1990). The heat stability and isoenzyme composition of peroxidases in ohane grapes. *Int J Food Sci Tech.* 24: 613-618
- Rodrigo I, Vera P, Tornero P, Hernandez-Yago J, Conejero V** (1993). cDNA cloning of viroid induced tomato pathogenesis-related protein P23: characterization as a vacuolar antifungal factor. *Plant Physiol.* 102: 939-45
- Roman V, Billard C, Kern C, Ferry-Dumazet H, Izard JC, Mohammad R, Mossalayi, DM, Kolb J** (2002). Analysis of resveratrol-induced apoptosis in human B-cell chronic leukaemia. *Brit J Haematol.* 117: 842-851
- Roos W, Dordschbal B, Steighardt J, Hieke M, Weiss D, Saalbach G** (1999). A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*. *Biochem Biophys Acta.* 1448: 390-402
- Ros Barceló A** (1995). Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma.* 186: 41-44
- Ros Barceló A, Ferrer MA, García-Florenciano E, Muñoz R** (1991). The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pl in *Lupinus*. *Bot Acta.* 104: 272-278
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS, Pedreño MA** (2003). Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution?. *Phytochemistry Rev.* 0: 1-18
- Ros Barceló A, Muñoz R, Sabater F** (1987). Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. *Physiol. Plant.* 71: 448-454
- Ros Barceló A, Pomar F, Ferrer MA, Martínez P, Ballesta MC, Pedreño MA** (2002). *In situ* characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiol Plantarum.* 114: 33-40
- Ros Barceló A, Zapata JM, Calderón AA** (1996). A basic peroxidase isoenzyme, marker of resistance against *Plasmopara viticola* in grapevines, is induced by an elicitor from *Trichoderma viride* in susceptible grapevines. *J Phytopathol.* 144: 309-313

- Rosevear J** (1984). *A Chem Tech Biotechnol.* 34B
- Ross PL** (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 3: 1154-1169
- Rossard S, Roblin G and Atanassova R** (2010). Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in *Beta vulgaris* leaf tissues. *J Exp Bot.* 61: 1807-1816
- Rudolf J R, Resurreccion A V A** (2005). Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. *J Agric Food Chem.* 53: 10186-10192
- Romeis T** (2001). Protein Kinases in the plant defence response. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 407-414
- Ruperti B, Cattivelli L, Pagni S, Ramina A** (2002). Ethylenesensitive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *J Exp Bot.* 53: 429-437
- Rupprich N, Kindl H** (1978). Stilbene synthases and stilbenecarboxylate synthases, I. Enzymatic synthesis of 3,5,4'-trihydroxystilbene from *p*-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem.* 359: 165-172
- Ryals JL, Neuenschwander UH, Willits MC, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 8: 1809-1819
- Sabater-Jara AB, Almagro L, Belchí-Navarro S, Ferrer MA, Ros Barceló A, Pedreño MA** (2010). Induction of sesquiterpenes, phytoesters and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited cell cultures of *Capsicum annum*. *J Plant Physiol.* 167:1273-1281
- Sabater-Jara AB, Almagro L, Belchí-Navarro S, Ros Barceló A, Pedreño MA** (2011). Methyl jasmonate induces extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Capsicum chinense*. *Plant Signaling & Behavior* 6: 440-442
- Sahai O, Knuth M** (1985). Commercializing plant tissue culture processes: economics, problems, and prospects. *Biotechnol Prog.* 1: 1-9
- Saigne-Soulard C, Richard T, Merillon JM, Monti JP** (2006). <sup>13</sup>C NMR analysis of polyphenol biosynthesis in grape cells: Impact of various inducing factors. *Anal Chim Acta.* 563: 137-144
- Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA** (1998). Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 117: 465-472
- Sánchez-Romero C, García-Gómez ML, Pliego-Alfaro F, Heredia A** (1994). Effect of partial deglycosylation on catalytic characteristics and stability of an avocado peroxidase. *Physiol Plantarum.* 92: 97-101
- Sánchez-Romero C, García-Gómez ML, Pliego-Alfaro F, Heredia A** (1995). One-step purification of an avocado peroxidase. *Plant Physiol Biochem.* 33: 531-537
- Sánchez-Sampedro MA, Fernández-Tárrago J, Corchete P** (2005). Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J Biotechnol.* 119: 60-69
- Sánchez-Sampedro MA** (2006). Producción de silimarina en cultivos celulares de *Silibum marianum* (L.) Gaertn. Tesis Doctoral.
- Sánchez-Sampedro MA, Fernández-Tárrago J, Corchete P** (2005). Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J Biotechnol.* 119: 60-69
- Sánchez-Sampedro MA, Fernández-Tárrago J, Corchete P** (2009). Elicitation of silymarin in cell cultures of *Silybum marianum*: effect of subculture and repeated addition of methyl jasmonate. *Biotechnol Lett.* 31: 1633-1637
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N** (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a microprojectile bombardment process. *J Particle Sci Tech.* 5: 27-37

- Santamaria AR, Mulinacci N, Valletta A, Innocenti M, Pasqua G** (2011). Effects of elicitors on the production of resveratrol and viniferins in cell cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia. *J Agric Food Chem.* 59: 9094-9101
- Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Tabata S** (2001). Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signalling pathways". *DNA Res.* 8: 153-161
- Schlatmann JE, Nuvtila AM, Van Gulik WM, Ten Hoopen HJG, Verpoorte R, Heijnen JJ** (1993). Scaleup of ajmalicine production by plant cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotech Bioeng.* 41: 253-262
- Schleiden MJ** (1838). Contributions of Phytogenesis. *Müller's Arch Anat Physiol Wissenschaftliche Med.* 136-176
- Schopfer CR, Kochs G, Lottspeich F, Ebel J** (1998). Molecular characterization and functional expression of dihydroxypterocarpan  $\alpha$ -hydroxylase, an enzyme specific for pterocarpanoid phytoalexin biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.). *FEBS Lett.* 432: 182-186
- Schröder J, Schröder G** (1990). Stilbene and chalcone synthases-related enzymes with key functions in plant specific pathways. *Z Naturforsch C.* 45: 1-8
- Schröder R, Atkinson RG, Redgwell RJ** (2009). Reinterpreting the role of endo- $\beta$ -mannanases as mannan endotransglycosylase/hydrolases in the plant cell wall. *Ann Bot-London.* 104:197-204
- Schwann FT** (1839). Microscopic researches on the conformity in structure and growth between animals and plants. (Ed.) Sander Berlin
- Sciancalepore V, Longone V, Alvitì FS** (1985). Partial purification and some properties of peroxidase from Malvasia grapes. *Ame J Enol Viticult.* 36: 105-110
- Scragg AH, Fowler MW** (1984). En: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. II. (Ed.) Vasil IK. Academic Press. 103-128
- Sekizawa Y, Haruyama T, Kano H, Urushizaki S, Saka H, Matsumoto K, Haga M** (1990). Dependence on ethylene of the induction of peroxidase and lipoxygenase activity in rice leaf infected with blast fungus. *Agric Biol Chem.* 54: 471-478
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC** (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem.* 46: 941-950
- Sembder G, Parthier B** (1993). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 44: 569-589
- Sevon N, Oksman-Caldentey KM** (2002). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med.* 68: 859-868
- Shan C, Yang S, He H, Shao S, Zhang P** (1990). Influence of 3,5,4'-trihydroxystilbene-3-D-monoglucoside on rabbit platelet aggregation and thromboxane B<sub>2</sub> products on *in vitro*". *Zhongguo Yaoli Xuebao.* 11: 524
- Siegel BZ** (1993). Plant peroxidases: anorganismic perspective. *Plant Growth Regul.* 12: 303-312
- Silva JC** (2006). Absolute quantification of proteins by LC-MSE: A virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics.* 5: 144-156
- Silva JC** (2006). Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome: a sweet tale. *Mol. Cell. Proteomics.* 5: 589-607
- Singh G, Gavrielli J, Oakey JS, Curtis WR** (1998). Interaction of methyl jasmonate, wounding, and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. *Plant Cell Rep.* 17: 391-395



- Sgarbi E, Fornasiero RB, Lins AP, Bonatti PM** (2003). Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Sci.* 165: 951-957
- Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova MV, Fatkhutdinova RA, Fatkhutdinova RD** (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164: 317-322
- Shi Yanlin, Yuhua Zhang, Ding S. Shih** (2006). Cloning and expression analysis of two  $\beta$ -1,3-glucanase genes from Strawberry. *J Plant Physiol.* 163: 956-967
- Shinshi H, Usami S, Ohme-Takagi M** (1995). Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol Biol.* 27: 923-932
- Shinshi H, Wenzler H, Neuhaus JM, Felix G, Hofsteenge J, Meins Jr F** (1988). Evidence of amino and carboxyl-terminal processing of a plant defense-related enzyme primary structure of tobacco  $\beta$ -1,3-glucanase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 5541-5546
- Shinya T, Hanai K, Gális I, Suzuki K, Matsuoka K, Matsuoka H, Saito M** (2007). Characterization of NtChitIV, a class IV chitinase induced by  $\beta$ -1,3-, 1,6-glucan elicitor from *Alternaria alternata* 102: Antagonistic effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the induction of NtChitIV. *Biochem Bioph Res Co.* 353: 311-317
- Skoog F, Miller CO** (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultures in vitro. Symposium of Society for Experimental Biology. 11: 118-131
- Smith CG, Rodgers MW, Zimmerlin A, Fernandez D, Bolwell GP** (1994). Tissue and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignin synthesis and differentiating and wounded hypocotyl tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta.* 192: 155-164
- Smith HO, Wilcox KW** (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. Purification and general properties. *J Mol Biol.* 51: 379-391
- Smith WL** (1989). The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *The Biochem J.* 259: 315-324
- Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K** (1986). Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83 2427-2430.
- Song Y, Zhang C, Ge W, Zhang Y, Burlingame AL, Guo Y** (2011). Identification of NaCl stress-responsive apoplastic proteins in rice shoot stems by 2D-DIGE. *J Proteomics.* 74: 1045-1067
- Sottomayor M, Ros Barceló A** (1997). What can we learn from  $\alpha$ -3',4'-anhydrovinblastine synthase?. *Recent Res. Develop. Phytochem. Vol 1.* (Ed.) Pandalai SG. Research Signpost. India. 1: 225-233
- Souquet JM, Cheynier V, Brossaud F, Moutounet M** (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry.* 43: 509-512
- Sperisen C, Ryals J, Meins F** (1991). Comparison of cloned genes provides evidence for intergenomic exchange of DNA in the evolution of a tobacco glucan endo-1,3-glucosidase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 1820-1824
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelijs JP, Van Pelt JA** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defence pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell.* 15: 760-770
- Stafford A, Morris P, Fowler MW** (1986). Plant cell biotechnology: a perspective. *Enzyme Microb Tech.* 8: 19-23
- Steele VE, Wargovich MJ, McKee K, Sharma S, Wilkinson BP, Wyatt GP, Gao P, Kelloff GJ** (1998). Cancer chemoprevention drug development strategies for resveratrol. *Pharm Biol.* 36: 62-68
- Steward N, Martín R, Engasser JM, Goergen JL** (1999). A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Rep.* 19: 171-176

- Stickland RG, Sunderland N** (1972). Photocontrol of growth and anthocyanin and chlorogenic acid production production in cultured callus tissues of *Haplopappus gracilis*. *Ann Bot.* 36: 671-685
- Stinzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kaufmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B** (1993). Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie.* 75: 687-706
- Stubberfield LCF, Shaw PJA** (1990). A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measurements of microbial activity. *J Microbiol Meth.* 12: 151-162
- Suárez de Castro F** (1993). *Agricultura, biotecnología y propiedad intelectual*. Pan American Books Inc. IICA 0534-5391. San José, Costa Rica
- Subbaramaiah K, Donnenberg AJ** (2003). Cyclooxygenase 2: A molecular target for chemoprevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci.* 24: 96–102
- Suzuki N and Mittler R** (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol Plant.* 126: 45-51
- Svensson B, Svendsen I** (1992). Primary structure of Barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. *Biochemistry.* 31: 8767-8770
- Tabata M, Fujita Y** (1985). En: *Biotechnology in Plant Science. Production of shikonin by plant cell cultures.* (Ed.) Zaitlin M, Day P, Hollaender A. Academic Press. Orlando. 207-218
- Tabata M, Hiraoka N** (1976). Variation in alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures. *Physiol. Plant.* 38: 19-23
- Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M** (2001). Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur J Biochem.* 268: 4086-4094
- Taiz L, Zeiger E** (2002). Secondary metabolites and plant defense. En: *Plant Physiology. Third edition.* (Ed.) Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. 283-308
- Tamogami S, Rakwal R, Kodama O** (1997). Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid. *FEBS Lett.* 412: 61–64
- Tams JW, Welinder KG** (1995). Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Anal Biochem.* 228: 48-55
- Tassoni A, Fornalè S, Franceschetti M, Musiani F, Michael AJ, Perry B, Bagni N** 2005. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol.* 166: 895-905
- Tattersall DB, van Heeswijck R, Hoj PB** (1997). Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiol.* 114: 759–769
- Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF** (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell.* 7: 573-588
- Thanh NT, Murthy HN, Yu KW, Jeong CS, Hahn EJ, Paek KY** (2006). Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. *J Plant Physiol.* 163: 1337-1341
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:15107-15111

- Thompson J, Higgins D, Gibson TJ** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680
- Thompson A** (2003). Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem.* 75: 1895-1904
- Thorpe TA** (1980). Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. *Int Rev Cytol Suppl.* 11A: 71-112
- Tornero P, Conejero V, Vera P** (1994). A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Mol Gen Genet.* 243: 47-53
- Tumova L, Rimakova J, Tuma J, Dusck J** (2006). *Silybum marianum* in vitro flavolignan production. *Plant Cell Environ.* 52 : 454-458
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell Suppl.* 14: 153-164
- Uchio Y, Tomosue K, Nakayama M, Yamamura A, Waki T** (1981). Constituents of the essential oils from three tetraploid species of *Chrysanthemum*. *Phytochemistry.* 20: 2691–2693
- Van der Fits L, Memelink J** (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science.* 289: 295-297
- Van der Rest B, Rolland N, Boisson AM, Ferro M, Bligny, Douce R** (2004). Identification and characterization of plant glycerophosphodiester phosphodiesterase. *Biochem J.* 379: 601-607
- Van Hengel, Arjon J, Guzzo F, Van Kammen A, de Vries SC** (1998). Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant Physiol.* 117: 43-53
- Van Loon LC** (1982). En: Active Defense Mechanisms in Plants. Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. (Ed.) Wood RKS. Plenum Press. New York. 247–273
- Van Loon LC, Van Strien EA** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol.* 55: 85-97
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 44: 135-162
- Veitch NC** (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* 65: 249-259
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J** (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Rev.* 1: 13-25
- Verpoorte R, Memelink J** (2002). Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr Opin Biotechnol.* 13: 181-187
- Vigers AJ, Wiedemann S, Roberts WK, Legrand M, Selitrennikoff C, Fritig B** (1992). Thaumatin-like pathogenesis related proteins are antifungal. *Plant Sci.* 83: 155-161
- Vinterhalter B, Jankovic T, Sovikin L, Nikolic R, Vinterhalter D** (2008). Propagation and xanthone content of *Gentianella austriaca* shoot cultures. *Plant Cell Tiss Org.* 94 : 329-335
- Vitrac X, Krisa S, Decendit A, Vercauteren J, Deffieux G, Merillon JM** (2002). Carbon-14 biolabeling stilbenes, anthocyanins and catechins in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *J Biotechnol.* 95: 49-56
- Vu L, Huynh QK** (1994). Isolation and characterization of a 27-kDa antifungal protein from the fruits of *Diospyros texana*. *Biochem Biophys Res Co.* 202: 666–672

- Waffo-Teguo P, Decendit A, Vercauteren J, Deffieux G, Merillon JM** (1996a). *Trans-resveratrol-3-O-β-glucoside* (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*. 42: 1591-1593
- Waffo-Teguo P, Decendit A, Krisa S, Deffieux G, Vercauteren J, Merillon JM** (1996b). The accumulation of stilbene glycosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *J Nat Prod*. 59: 1189-1191
- Waffo-Teguo P, Lee D, Cuendet M, Merillon JM, Pezzuto JM, Kinghorn AD** (2001). Two new stilbene dimmer glucosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *J Nat Prod*. 64: 136-138
- Wagley LM, Galdfelter HJ, Phillips GC** (1987). De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica in vitro*. II. Macro- and micro-photographic evidence of de novo regeneration. *Plant Cell Rep*. 6:167-171
- Wagner F, Vogelmann H** (1977). Cultivation of plant cell cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. En: *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*. (Ed.) Barz W, Reinhard E, Zenk MH. Springer. Verlag, Berlin, New York. 245-252
- Wang ZY, Zhong JJ** (2002). Repeated elicitation enhances taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors. *Biotechnol Lett*. 24: 445-448
- Watson JD, Crick FHC** (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 171: 737-738
- Wei Y, Zhang Z, Andersen CH, Schmelzer E, Gregersen PL, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V, Thordal-Christensen H** (1998). An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol*. 36: 101-112
- Welinder KG** (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol*. 2: 388-393
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF** (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defense responses. *Curr Opin Plant Biol*. 7: 449-455
- Went FW** (1926). On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc Ned Akad Wet*. 30: 10-19
- Westphal K** (1990). Large-scale production of new biologically active compounds in plant-cell cultures. En: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. (Ed.) Nijkamp HJJ, Van de Plas LHW, Van Aatrijk J: Kluwer. The Netherlands. 601-608
- White PR** (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. *Am J Bot*. 26: 59-64
- Whitehead IM, Threlfall DR** (1992). Production of phytoalexins by plant tissue cultures. *J Biotech*. 26: 63-81
- Wilson G** (1990). Procedures and Applications. Screening and selection of cultured plant cells for increased yields of secondary metabolites. En: *Plant cell line selection*: (Ed.) Dix PJ, Weinheim VCH. New York, Basel, Cambridge. 187-213
- Winkler A, Weber H, Kutchan TM, Gruber K, Macheroux P** (2009). Berberine bridge enzyme catalyzes the six electron oxidation of (S)-reticuline to dehydroscoulerine. *Phytochemistry*. 70: 1092-1097
- Wiweger M, Farbos I, Ingouff M, Lagercrantz U, Von Arnold S** (2003). Expression of Chia4-Pa chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. *J Exp Bot*. 54: 2691-2699
- Wojtaszek P** (2000). Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry*. 54: 1-4
- Xu L, Mabuchi T, Katano T, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Sakimura K, Mishinac M and Ito S** (2007). Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. *Nitric Oxide*. 17: 18-12

- Wolff SP** (1994). Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol.* 233:182-189
- Woloshuk CP, Muelenhoff JS, Sela-Buurlage M, Elzen PJM, Cornelissen BJC** (1991). Pathogen-induced proteins with inhibitory activity towards *Phytophthora infestans*. *Plant Cell.* 3: 619-628
- Yamada Y, Hashimoto T** (1990). Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Possibilities for improving yield of secondary metabolites in plant cell cultures. En: *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture.* (Ed.) Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J. Kluwer. The Netherlands: 547-556
- Yamakawa T, Kato S, Ishida K, Kodama T, Minoda Y** (1983). Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agr Biol Chem.* 47: 2185-2191
- Yamamoto A, Katou S, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K** (2003). Nitrate reductase, a nitric oxideproducing enzyme: induction by pathogen signals. *J Gen Plant Pathol.* 69: 218-229
- Yamamoto S, Nakano T, Suzuki K, Shinshi H** (2004). Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochim Biophys Acta.* 1679: 279–287
- Yang Y, Shah J, Klessig DF** 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11:1621-1639
- Yannarelli GG, Noriega GO, Batlle A, Tomaro ML** (2006). Heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species. *Planta.* 224: 1154-1162
- Yang J, January YN; January LY** (1997). Stabilization of ion selectivity filter by pore loop ion pairs in an inwardly rectifying potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 1568-1572
- Yano A, Suzuki K, Shinshi H** (1999). A signaling pathway, independent of the oxidative burst, that leads to hypersensitive cell death in cultured tobacco cells includes a serine protease. *Plant J.* 18: 105-109
- Yeoman MM** (1987). Bypassing the plant. *Ann Bot.* 60: 157-174
- Yoo SD, Cho Y, Sheen J** (2009). Emerging connections in the ethylene signalling network. *Cell.* 14: 270-279
- Ye XS, Pan SQ, Kuc J** (1990). Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*) and to tobacco mosaic virus. *Phytopathology.* 80: 1295-1299
- Yoshioka H, Asai S, Yoshioka M, Kobayashi M** (2009). Molecular mechanisms of generation for nitric oxide and reactive oxygen species, and role of the radical burst in plant immunity. *Mol Cells.* 4: 321-329
- Yue X, Zhang W, Deng M** (2011). Hyper-production of (<sup>13</sup>C)-labeled *trans*-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cell culture by elicitation and in situ adsorption. *Biochem Eng J.* 53: 292-296
- Zabetakis I, Edwards R, O'Hagan D** (1999). Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry.* 50: 53-56
- Zamboni A, Gatto P, Cestaro A, Pilati S, Viola R, Mattivi F, Moser C, Velasco R** (2009). Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. *BMC Genomics.* 10: 363-376
- Zamboni A, Vrhovsek U, Kassemeyer HH, Mattivi F, Velasco R** (2006). Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis spp.*). *Vitis.* 45:63–68
- Zapata JM, Calderón AA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1992). Oxidation of natural hydroxybenzoic acids by grapevine peroxidases: kinetic characteristics and substrate specificity. *Am J Enol Viticult.* 43: 134-138

- Zapata JM, Calderón AA, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1993). Restricted genetic expression of the enzymatic polymorphism of peroxidase in grapevines (*Vitis vinifera*). *Agrochimica*
- Zapata JM, Calderón AA, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1994). Effect of UV-C on peroxidase isoenzymes in axillary bud cultures of *Vitis* species differing in fungal resistance to *Plasmopara viticola*. *Biol Plantarum*. 36: 133-138
- Zapata JM, Calderón AA, Ros Barceló A** (1995). Peroxidase isoenzyme patterns in cell cultures derived from cotyledon, stem, leaf and fruit from grapevine (*Vitis vinifera* cv Monastrell). *Ann Bot*. 75: 443-448
- Zenk MH, El Shagi H, Arens H, Stockigt J, Weiler EW, Deus B** (1977). Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. En: *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*. (Ed.) Barz W, Reinard E, Zenk MH. Springer-Verlag. Berlin & New York. 27-43
- Zenk MH** (1991). 6. Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry*. 30: 3861-3863
- Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, Shachter NS, Fernandez ML** (2005). Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr*. 135: 1911-1917
- Zhang A, Jiang M, Zhang J, Ding H, Xu S, Hu X, Tan M** (2007). Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytol*. 175: 36-50
- Zhang W, Curtin C, Kikuchi M, Franco C** (2001). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Sci*. 162: 459-468
- Zhang XC, Cannon SB, Stacey G** (2009). Evolutionary genomics of Lys M genes in land plants. *BMC Evol Biol*. 9:183-196
- Zhang Z, Collinge DB, Thordal-Christensen H** (1995). Germin-like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J*. 8: 139-145
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R** (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23: 283-333
- Zhao J, Guo Y, Fujita K, Sakai K** (2004). Involvement of cAMP signaling pathway in elicitor-induced phytoalexin accumulation in *Cupressus lusitánica* cell cultures. *New Phytol*. 161: 723-733
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q, He XW** (2000). Improved indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnol Lett*. 22: 1221-1226
- Zhen DT, Jun L, Cong HX**. (2003). Cloning of a pathogenesis-related protein gene cDNA of potato using RACE methods combined with cDNA Library. *Acta Genet Sinica*. 30: 996-1002
- Zheng Z, Wu M** (2004). Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant Sci*. 166: 507-514
- Zhu B, Chen TH, Li PH** (1995). Activation of two osmotin like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. *Plant Physiol*. 108: 929-937
- Zimmermann S, Nürnberger T, Frachisse JM, Wirtz W, Guern J, Hedrich R, et al.** (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 2751-2755
- Zou J, Huang Y, Cao K** (2000). Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model. *Life Sci*. 68: 153-163













