



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

Estudio Metabolómico y Genómico de Cultivos  
Celulares de Zanahoria

**Dña. María Begoña Miras Moreno**  
**2017**





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

Facultad de Biología

Estudio metabolómico y genómico de  
cultivos celulares de zanahoria

**María Begoña Miras Moreno**

**2017**



## Artículos originales de investigación

**Almagro L, Tudela LR, Sabater-Jara AB, Miras-Moreno B, Pedreño MA** Cyclodextrins increase phytosterol and tocopherol levels in suspension cultured cells obtained from mung beans and safflower. *Biotechnology Progress*. Referencia: BTPR-16-0354.R2. (En revisión).

**Sánchez-Pujante PJ, Miras-Moreno B, Soluyanova P, Garre V, Pedreño MA, Almagro L** (2017) Production of fatty acid methyl esters and other bioactive compounds in elicited cultures of the fungus *Mucor circinelloides*. *Mycological Progress*, 16, 507-512.

**Miras-Moreno B, Sabater-Jara AB, Pedreño MA, Almagro L** (2016) Bioactivity of phytosterols and their production in plant *in vitro* cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 7049-7058.

**Miras-Moreno B, Almagro L, Pedreño MA, Sabater-Jara AB** (2016) Enhanced accumulation of phytosterols and phenolic compounds in cyclodextrin-elicited cell suspension culture of *Daucus carota*. *Plant Science*, 250, 154-164.

## Comunicaciones a congresos

**Miras-Moreno B, Borja-Martínez M, Almagro L, Pedreño MA, Sabater-Jara AB** (2017) Enhanced accumulation of phytosterols and phenolic compounds in cyclodextrin-elicited cell suspension cultures of *Daucus carota*. BIOTEC 2017. Murcia (España)

**Sánchez-Pujante PJ, Miras-Moreno PJ, Soluyanova P, Garre V, Pedreño MA, Almagro L** (2017) Production of fatty acid methyl esters and other bioactive compounds in elicited cultures of the fungus *Mucor circinelloides*. BIOTEC 2017. Murcia (España)

**Tudela-Sánchez LR, Sánchez-Pujante PJ, Miras-Moreno B, Di Patria L, Pedreño MA, Sabater-Jara AB** (2017) Production of phytosterols in *Helianthus annuus* elicited cell cultures (Póster). BIOTEC 2017. Murcia (España)

**Mendoza-Cabezas CI, Borja-Martínez M, Miras-Moreno B, Cruz-Ruiz RM, Sabater-Jara AB, Pedreño MA** (2017) Production of bioactive compounds in elicited cell suspension cultures of *Punica granatum*. BIOTEC 2017. Murcia (España)

**Miras-Moreno B, Sabater-Jara AB, Fraser PD, Pedreño MA** (2015) Different content of phytosterols and carotenoids in two carrot root cell lines. Final meeting FA1006-COST ACTION. Sorrento (Italia)

**Sánchez-Pujante PJ, Soluyanov P, García-Pérez P, Miras-Moreno B, Tudela LR, Almagro L, Pedreño MA** (2015) Production of phytosterols and tocopherols from elicited *Linum usitatissimum* cell cultures (Póster). Congreso: XIV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Toledo (España)

**Almagro L, Belchí-Navarro S, Miras-Moreno, Sánchez-Pujante PJ, Martínez-Márquez A, Riquelme-Riquelme C, Bru R, Pedreño MA** (2015) New strategies for the use of grapevine cell factories for the production of *trans*-resveratrol (Póster). Congreso: Resveratrol regional meeting 2015. Dijon (Francia)

**Miras Moreno, B, Tudela Sánchez LR, Mendoza Cabezas CI, Belchí Navarro S, Pedreño Garcia, MA, Sabater Jara AB** (2014) Production of phytosterols from plant stem cells and their use in cosmetic products. IFSCC Congress 2014, Paris (Francia)

**Pedreño MA, Belchi-Navarro S, Sabater-Jara AB, Tudela LR, Miras-Moreno B, Almagro L** (2013) Plant stem cells as biofactories that produce bioactive compounds. (Comunicación oral). Orleáns (France).

**Almagro L, Belchí Navarro S, Miras Moreno B, Pedreño, MA** (2013) Dissection of the transcriptional regulation of grapevine cell cultures in response to elicitation (Comunicación oral). XIII Congreso Hispano Luso De Fisiologia Vegetal, Lisboa (Portugal)

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Por fin ha llegado el momento de hacer balance de esta etapa. Son muchos los “agradecientos” que me vienen a la mente y algún que otro arrepentimiento. Espero poder acordarme de todos aquellos que me han ayudado de una manera u otra en la realización de la tesis.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tres directoras (creo que solo Star Wars me gana a directores) por llevar a cabo la difícil tarea de dirección entre prisas y plazos.

A la catedrática María Ángeles Pedreño, por darme la oportunidad de crecer en el laboratorio a nivel profesional y personal. Por estos años, que ya son muchos, por lo aprendido y sobre todo, por introducirme en el mundo de la ciencia y cambiar mi rumbo.

A la doctora Ana Belén Sabater, por confiar en mí y darme el relevo de la zanahoria, parece que fue ayer cuando montamos el laboratorio de venta al por mayor de zanahoria preparando litros y litros de medio en barreños... Por los ratos de fumar. Por las vueltas que le hemos dado al documento y a los experimentos, por ayudarme a terminar la tesis trabajando fuera. Por el apoyo. Gracias.

A la doctora Lorena Almagro, porque ya son años juntas desde que cultivamos nuestro propio vergel de collejas cádmicas. A pesar de tus idas y venidas me llevas en el currículum (soy tu primer Anales, no lo olvides). Teniendo en cuenta que soy “medio” ambientóloga tampoco te he salido tan mal, lo mismo valgo para una cerveza que para un subcultivo. Gracias por tus momentos de “ahora pongo voz de seria y te lo tacho todo en rojo y en arial 30 para que te sangren los ojos”. Por las prisas de última hora, por los ratos de ocio. Por no matarme durante las correcciones que ya sé lo cabezona que soy a veces...por todos los momentos que hemos compartido juntas durante tantos años.

Además de mis directoras, son muchos los que han estado conmigo estos años. Dos personas me ayudaron y estuvieron conmigo en los momentos más difíciles cuando estaba empezando y me encontraba perdida y sola, porque la tesis comienza con el primer experimento. Quiero agradecer a Fran y a Esther toda la ayuda y el apoyo recibido, gracias por animarme a continuar. Por el



Coliseo, el Vaticano, Fran corriendo por el aeropuerto, el café de las 8, Estambul y sus reliquias “untuosas”, *Senatus Populusque Romanus*, por los viernes alternativos.

En particular, muchas son las cosas que tengo que agradecerle a Esther (aunque no te lo mereces ya que ni me nombraste en tu tesis). Gracias por ser mi directora en la sombra sin esperar nada a cambio. Por estar siempre ahí y por aguantar mis innumerables parrafadas y por los “Esther, deja de hacer como que trabajas y mírame esta gráfica”. Por llevarme al cine y a Florencia y por madrugar para sentarnos a los pies del David. Por nuestras conversaciones a pie de tranvía. Por ejercer de amiga y de psicóloga. Gracias.

A Fran, por todo lo que me ha enseñado desde mi primer día en el labo. Por estar dispuesto a ayudar y, más importante, por ayudar de verdad. También por los raticos fuera (te debo una cerveza qPCRera) y por tu optimismo pase lo que pase. Por ser un ejemplo a seguir.

Otra persona a la que tengo mucho que agradecer es PJ. Gracias por tu disposición para todo, por los paseos al SACE, por las resuspensiones y los métodos no homologados, por las risas, por las conversaciones que me alegran los días. Porque si he estado menos perdida en la vida ha sido gracias a los horóscopos de la Cuore. Nos merecemos un Tempe de celebración.

A Sarai, por ser mi maestra Jedi. Por todas nuestras conversaciones entre lo material y lo musical. Por ser tan comprensiva, por tener siempre buenas palabras y estar dispuesta a echar una mano. Por ser un gran apoyo dentro del laboratorio desde el primer día.

A Pepita, por ser siempre tan agradable y por facilitarnos el trabajo. Por los matraces y los medios, y por reñirme menos de lo que me merecía.

A María, por las berenjenas y los tomates. Por estar siempre dispuesta a echar una mano. Por tener siempre una sonrisa.

A Pascual, por ser uno de los mejores compañeros que he tenido y por los “rapoh” con los que tanto me reía. ¡Qué pena que estés tan lejos!

A Rosa, gracias por ser mi primera maestra, porque compartimos muchos momentos entre zanahorias y granadas que me hicieron querer dedicarme a la investigación.

Liber, Marina, Laura, Luke, Cem y todos los compañeros que han pasado por aquí, porque me habéis aportado mucho.

A Paul Fraser y a su grupo de investigación por permitirme aprender en su laboratorio.

Al personal del SACE y CAID, en especial a Pepe, a Isabel y a M<sup>a</sup> del Mar, por facilitarnos tanto el trabajo.

A Radio 3, Quique González y LA y entre otros muchos que habéis evitado mi suicidio en las tardes de agonía.

A mis zanahorias. A la desequilibrada zanahoria verde por complicarme tanto la vida y a la todoterreno naranja por hacer que todo fuese tan fácil y no quejarse a pesar de todos los años que llevo estresándola. Porque sin vosotras no soy nada.

A mi Anita, por aguantarme al llegar al piso y por apoyarme este último año que no ha sido el más fácil. Por las cervecicas que nos salvan la vida y por no dejarme ir a First Dates. ¡Ya nos queda nada!

A mis amigos que me han oído quejarme tanto y amenazar con irme a Siberia a vivir. A Carmen porque a pesar de la distancia siempre estás ahí. A Lourdes y Elena porque después de tanto tiempo no ha cambiado nada. A Pedro (a ver cuando me llevas a excavar que quiero mi diente de rata muerta), a Marina, a la Morena, a la Queru, A Máximo. Gracias chicos.

A Nico, por apoyarme incondicionalmente durante la tesis.

A mi familia porque también habéis aguantado lo vuestro. A mis tías, a mis abuelos, a mi perra, porque ya veis las zanahorias con otros ojos.

A Julia, por los raticos y nuestras cosas tan nuestras, por el apoyo y las innumerables invitaciones a fiestas. A Javi, por aportar la parte racional al trío y por ser el solucionador de problemas.

A mis padres, por el apoyo incondicional y por aguantar estos años unos más agónicos que otros.



***“Find what you love and let it kill you”***

**Charles Bukowski**



# ÍNDICE



|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abreviaturas</b>   |           |
| <b>Summary</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>Introducción</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>1 Metabolitos secundarios en plantas</b> .....   | <b>7</b>  |
| 1.1 Terpenos o compuestos isoprenoides.....   | 8         |
| 1.2 Biosíntesis de los compuestos isoprenoides.....   | 9         |
| 1.2.1 Ruta del ácido mevalónico (MVA).....  | 12        |
| 1.2.2 Ruta del metileritritol 4-fosfato (MEP).....  | 12        |
| 1.2.3 Fitoesteroles.....  | 13        |
| 1.2.3.1 Biosíntesis de fitoesteroles.....   | 14        |
| 1.2.3.2 Funciones de los fitoesteroles en plantas.....  | 17        |
| 1.2.3.3 Funciones de los fitoesteroles en humanos.....  | 18        |
| 1.2.3.4 Producción de fitoesteroles a partir de materia prima vegetal.....                            | 18        |
| 1.2.4 Carotenoides.....   | 19        |
| 1.2.4.1 Biosíntesis de carotenoides.....  | 20        |
| 1.2.4.2 Función de los carotenoides en plantas.....   | 22        |
| 1.2.4.3 Función de los carotenoides en animales.....  | 23        |
| 1.2.4.4 Producción de carotenoides en animales.....   | 24        |
| 1.2.5 $\alpha$ -Tocoferol.....  | 24        |
| 1.2.5.1 Biosíntesis de $\alpha$ -Tocoferol.....   | 25        |
| 1.2.6 Compuestos fenólicos.....   | 29        |
| <b>2 Mejora de la producción de metabolitos secundarios mediante el cultivo <i>in vitro</i></b> ..... | <b>31</b> |
| 2.1 Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios: la elicitación.....        | 33        |
| 2.1.2 Elicitación con ciclodextrinas.....   | 35        |
| <b>3 Especie vegetal objeto de estudio: la zanahoria (<i>Daucus carota</i>)</b> .....                 | <b>38</b> |
| <b>Objetivos</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>Material y Métodos</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>1 Material vegetal y condiciones de cultivo</b> .....  | <b>47</b> |
| 1.1 Introducción y mantenimiento de callos de las líneas celulares de <i>D. carota</i> .....          | 47        |
| 1.2 Inicio y mantenimiento de suspensiones celulares.....   | 48        |
| <b>2 Medida del crecimiento celular</b> .....   | <b>48</b> |
| 2.1 Determinación de la curva de crecimiento.....   | 48        |
| 2.2 Determinación de la viabilidad celular.....   | 49        |
| <b>3 Elicitación</b> .....  | <b>50</b> |
| 3.1 Elicitación con ciclodextrinas.....   | 51        |
| 3.2 Elicitación con ciclodextrinas y jasmonato de metilo.....   | 51        |
| 3.3 Elicitación con ciclodextrinas en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa.....        | 51        |
| 3.4 Elicitación con ciclodextrinas y diferentes medios de cultivo.....                                | 52        |
| 3.5 Elicitación con ciclodextrinas, $\beta$ -glucano y hexenol separadamente o en combinación.....    | 52        |



|   |           |
|---|-----------|
| 3.6 Adición de elicitores.....  | 52        |
| <b>4 Extracción de metabolitos.....</b>   | <b>52</b> |
| 4.1 Extracción de metabolitos presentes en células.....   | 52        |
| 4.2 Extracción de metabolitos presentes en el medio de cultivo.....   | 53        |
| <b>5 Identificación y cuantificación de metabolitos.....</b>  | <b>53</b> |
| 5.1 Identificación y cuantificación de carotenoides y clorofilas.....   | 53        |
| 5.2 Identificación y cuantificación de fitosteroles, $\alpha$ -tocoferol y compuestos fenólicos.....  | 54        |
| <b>6 Análisis del perfil génico de cultivos celulares elicitados de zanahoria naranja.....</b>  | <b>54</b> |
| 6.1 Aislamiento y purificación de ARN.....  | 54        |
| 6.2 Síntesis de cDNA.....   | 55        |
| 6.3 Análisis con PCR cuantitativa en tiempo real.....   | 55        |
| <b>Resultados y discusión.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>Capítulo I: Caracterización metabolómica de una línea celular de zanahoria (<i>Daucus carota</i>) verde.....</b>                                     | <b>61</b> |
| <b>Hipótesis de partida.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>1 Caracterización metabolómica de los cultivos celulares de zanahoria verde.....</b>   | <b>61</b> |
| 1.1 Caracterización del crecimiento de los cultivos celulares de zanahoria verde .....  | 62        |
| 1.2 Caracterización de la producción de isoprenoides en cultivos celulares de zanahoria verde.....  | 64        |
| 1.3 Caracterización del crecimiento de los cultivos celulares de zanahoria verde elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo.....             | 67        |
| 1.4 Identificación y cuantificación de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria verde elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo..... | 69        |
| 1.5 Identificación y cuantificación de fitosteroles en cultivos celulares de zanahoria verde elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo..... | 72        |
| 1.6 Caracterización de la producción de compuestos isoprenoides en cultivos celulares de zanahoria verde elicitadas con ciclodextrinas.....             | 76        |
| 1.6.1 Efecto de las ciclodextrinas sobre el contenido total de fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria verde.....                              | 78        |
| 1.6.2 Efecto de las ciclodextrinas sobre el contenido de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria verde.....                                     | 82        |
| 1.6.3 Efecto de las ciclodextrinas sobre el contenido de $\alpha$ -tocoferol en cultivos celulares de zanahoria verde.....                              | 87        |
| 1.6.4 Efecto de las ciclodextrinas sobre el contenido de clorofilas en cultivos celulares de zanahoria verde.....                                       | 89        |
| 1.6.5 Efecto de las ciclodextrinas sobre el contenido total de isoprenoides en cultivos celulares de zanahoria verde.....                               | 90        |
| 1.6.6 Efecto de las ciclodextrinas sobre el contenido de compuestos fenólicos en cultivos celulares de zanahoria verde.....                             | 91        |

|  |            |
|--|------------|
| 1.7 Efecto de las ciclodextrinas separadamente o en combinación con hexenol y $\beta$ -glucano sobre el contenido de compuestos bioactivos en cultivos celulares de zanahoria verde..... | 94         |
| <b>Capítulo II: Caracterización metabolómica de una línea celular de zanahoria (<i>Daucus carota</i>) naranja.....</b>   | <b>101</b> |
| <b>Hipótesis de partida.....</b>   | <b>101</b> |
| <b>1 Caracterización metabolómica de los cultivos celulares de zanahoria naranja.....</b>  | <b>102</b> |
| 1.1 Producción de fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria naranja.....  | 102        |
| 1.1.1 Caracterización de la producción intracelular de fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria naranja elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo.....               | 103        |
| 1.1.2 Caracterización de la producción extracelular de fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria naranja elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo.....               | 108        |
| 1.2 Efecto de la terbinafina sobre la producción de escualeno y fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria naranja.....  | 111        |
| 1.3 Caracterización de la producción de compuestos fenólicos en cultivos celulares de zanahoria naranja elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo.....                       | 117        |
| 1.4 Caracterización de la producción de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja.....   | 120        |
| 1.4.1 Identificación y cuantificación de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja.....  | 121        |
| 1.4.2 Efecto de la cocentración de sacarosa y jasmonato de metilo sobre la producción de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja.....                                    | 122        |
| 1.4.3 Efecto de ciclodextrinas y jasmonato de metilo sobre la producción de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja.....   | 123        |
| 1.4.4 Efecto de la adición del inhibidor diflufenican sobre la producción de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja.....  | 131        |
| 1.4.4.1 Efecto de la densidad celular sobre la acumulación de fitoeno en cultivos celulares de zanahoria naranja.....  | 136        |
| 1.4.4.2 Efecto de la luz sobre la acumulación de fitoeno en cultivos celulares de zanahoria naranja.....   | 138        |
| 1.4.4.3 Efecto de diferentes concentraciones de azúcar sobre la acumulación de fitoeno en cultivos celulares de zanahoria naranja.....   | 141        |
| 1.4.4.4 Efecto de ciclodextrinas sobre la producción de fitoeno en cultivos celulares de zanahoria naranja.....  | 145        |
| 1.4.5 Efecto de diflufenican sobre la expresión de genes que codifican para las enzimas clave de la ruta de biosíntesis de los carotenoides.....   | 146        |
| <b>Conclusions.....</b>  | <b>153</b> |
| <b>Bibliografía.....</b>   | <b>157</b> |



**Abreviaturas**

CDs: ciclodextrinas

CoA: -Coenzima A

CRTISO: carotenoide isomerasa

DAF: diacetato de fluoresceína

DFF: diflufinican

DMAPP: dimetilalil pirofosfato

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

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

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

FPP: farnesilpirofosfato

GC/MS: cromatografía de gases-espectrometría de masas

GGPP: geranilgeranil pirofosfato

GPP: geranilpirofosfato

GPS: geranilgeranil pirofosfato sintasa

Hex: (Z).3-hexenol

HGA: ácido homogentísico

HMG: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA

HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril reductasa

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

HPT: homogentísico fitil transferasa

IP: yoduro de propidio

IPP: isopentenil pirofosfato

M6PBQ : 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinol

MEP: Metileritritol fosfato

MJ: jasmonato de metilo

MPBQMT: 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinol metil transferasa

MS: Murashige y Skoog

MVA: ácido mevalónico

PAL: fenilalanina amonio liasa

PDP: fitil difosfato

PDS: fitoeno desaturasa

PF: peso fresco

PS: peso seco

PSY: fitoeno sintasa

ROS: especies reactivas de oxígeno

SC: suspensiones celulares

SQO: escualeno epoxidasa

SQS: escualeno sintasa

T: terbinafina

Ta: tiempo de agotamiento

TC: tocoferol ciclasa

VEC: volumen de empaquetamiento celular

VECmax: volumen de empaquetamiento celular máximo

Vexp: velocidad de crecimiento en la fase exponencial

ZDS:  $\delta$ -caroteno desaturasa

ZISO: 15-cis-  $\delta$ -caroteno isomerasa

$\beta$ -glu:  $\beta$ -glucano

$\beta$ LCYB:  $\beta$ -licopeno ciclasa

$\epsilon$ LCYE:  $\epsilon$ -licopeno ciclasa

# **SUMMARY**



## Summary

Secondary metabolites are chemical compounds of low molecular weight produced by plants and can be classified on the basis of their chemical structure, composition, solubility, or the pathway by which they are synthesized. They are important for the survival of the plant because secondary metabolites are involved in plant defence reactions. In this sense, isoprenoid compounds are the most widely varied group of plant metabolites. Traditionally, these bioactive compounds have been used in agro alimentary and pharmaceutical industry due to their human health benefits.

A promising alternative to produce these compounds, that are difficult to be obtained by chemical synthesis or by extraction from plant raw materials, is the use of plant cell cultures. The main advantages of this alternative source are a sustainable production with independency of plant geographical localization, seasonal fluctuations and environmental factors and a defined production system, which ensures the continuous production of metabolites with uniform quality and yield.

Despite these advantages, the production of secondary metabolites by plant cell culture is still facing many biological and biotechnological limitations. Several strategies have been adopted for enhancing the levels of these metabolites and their production at industrial scale. One of these strategies is the use of elicitors. Elicitors are defined as molecules of abiotic and biotic origin able to trigger defence responses when introduced at low concentrations in a living system, by increasing the production of secondary metabolites. Elicitors have been widely used to increase secondary metabolite production in plant cell cultures. Among these, jasmonic acid and its more active derivative, methyl jasmonate (MJ), have been proposed as key compounds of the signal transduction pathway involved in the biosynthesis of secondary metabolites. Moreover, cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides formed by 7  $\beta$ -D-glucopyranose units produced from the enzymatic degradation of starch by the bacterial cyclodextrin glycosyl-transferase. These molecules are able to increase the production of several metabolites such as taxanes, stilbenes, indole alkaloids etc... in plant cell cultures, allowing their accumulation in the extracellular medium.  $\beta$ -glucans



( $\beta$ -glu) are also oligosaccharides derived from fungi which are generated from the fungal cell walls at the site of infection through the action of  $\beta$ -glucanases. These  $\beta$ -glu have been used as elicitors on a broad range of plant species. In fact,  $\beta$ -glu obtained from *Phytophthora megasperma* and *Pyricularia oryzae* induced phytoalexin biosynthesis in soybean and rice cells, respectively. On the other hand, green leaf C6-volatiles play important roles in ecological interaction between plants and their natural enemies, as well as triggering plant–plant communication to prevent further attacks. The most important green leaf C6-volatiles are (Z)-3-hexenal, (Z)-3-hexenyl acetate and (Z)-3-hexenol (Hex). The exposition of plants to this volatile compound usually induces phytoalexin biosynthesis as well as the expression of defense-related genes in several plant species.

Considering all of the above mentioned, we have analyzed the content of different secondary metabolites such as carotenoids, phytosterols, tocopherols and phenolic compounds in two different cell lines obtained from carrot roots: one photosynthetic green cell line and one orange cell line. The effect of elicitors (CDs, MJ, Hex,  $\beta$ -glu) on the production of these metabolites was also analyzed. In addition, the effect of one inhibitor of the biosynthetic pathway of carotenoids (diflufenican, DFF) and another inhibitor of biosynthetic pathway of phytosterols (terbinafine, T) on the production of isoprenoid compounds and the expression levels of genes involved in their biosynthetic pathways was studied in orange carrot cell line.

Firstly, the characterization of green carrot cell line was carried out in order to determine its metabolic profile. The results of these analysis showed that carotenoids were the mainly isoprenoid compounds found in green carrot cell line. Furthermore, the main carotenoid produced was lutein in carrot green cell line after 21 days of culture. Moreover, green carrot cell line was able to biosynthesize constitutively other bioactive compounds such as  $\alpha$ -tocoferol, the most powerful vitamin E, phytosterols, chlorophylls a and b, which were presumably responsible of the cell colour.

Taken into account the potential of green carrot cell line to produce different bioactive compounds, the levels of isoprenoid compounds were analyzed during

21 days in presence of elicitors. In addition, we also identified and quantified the levels of phenolic compounds under elicitation conditions.

The results showed that phytosterols and phenolic compounds were mainly accumulated in the extracellular medium (15100 µg/L and 477,5 µg/L, respectively) in the presence of CDs. However, β-carotene (1138,03 µg/L), lutein (25949,5 µg/L), α-tocopherol (8063,82 µg/L), and chlorophyll a (1625,1 µg/L) and b (9958,3 µg/L) were mainly accumulated inside the cells. The results also showed that β-glu provoked a high intracellular accumulation of α-tocopherol in green carrot cell line while β-glu and Hex did not affect on the levels of other compounds.

On the other hand, the elicitor effect of both CDs and MJ on orange carrot cell line was evaluated by carrying out a quantitative analysis of their role on isoprenoid compound production, and on the expression of genes involved in their biosynthetic pathways. The results of these analysis showed that carotenoids and phytosterols were the mainly isoprenoid compounds found in orange carrot cell line. In addition, the results indicated that CDs were able to induce a high accumulation of phytosterols in the culture medium. After that, T, an inhibitor of phytosterols biosynthetic pathway, was added to orange carrot cell line. The treatment with this compound provoked a high accumulation of squalene (5 mg/L) at 168h of treatment. This precursor of phytosterols is not usually accumulated in control condition. Moreover, T was also able to induce the expression levels of *squalene synthase (sqS)* gene, first key enzyme of phytosterols biosynthesis, at 24 h of treatment.

Additionally, phenolic compounds were studied under elicitation condition with CDs and MJ. The results showed an important increase of extracellular production of eugenol, isoeugenol and vanillin in the combined treatment suggesting a synergistic effect on phenolic compounds production in the presence of both elicitors.

The effect of DFF, an inhibitor of biosynthetic pathway of carotenoids, on the pigment production was also analyzed. Thus, the results showed that the presence of this inhibitor led to accumulating phytoene, colourless precursor of carotenoids which was not accumulated in control condition. In addition, the

results also suggested that the best concentration to obtain high levels of phytoene in orange carrot cell line was 10  $\mu$ M DFF, reaching levels over 500  $\mu$ g/g dry weight.

Finally, the expression levels of two key genes involved in biosynthetic pathway of carotenoids were studied. The expression levels of *phytoene synthase 1* (*psy1*) gene were lower than those found in the control cells in all treatments studied, which could explain the low accumulation levels of carotenoids. The results suggested that the expression levels of *phytoene desaturase* gene were not involved in carotenoid accumulation.

To sum up, carrot cell lines were an interesting biotechnology system to produce isoprenoid compounds. Additionally, the elicitation with CDs allowed the accumulation of isoprenoid compounds in the extracellular medium. On top of that, the elicitation with CDs and MJ was able to increase phenolic compounds. Finally, the use of inhibitors is an interesting system to increase the production of precursors like phytoene, which are not usually presents in great amounts.

# **INTRODUCCIÓN**



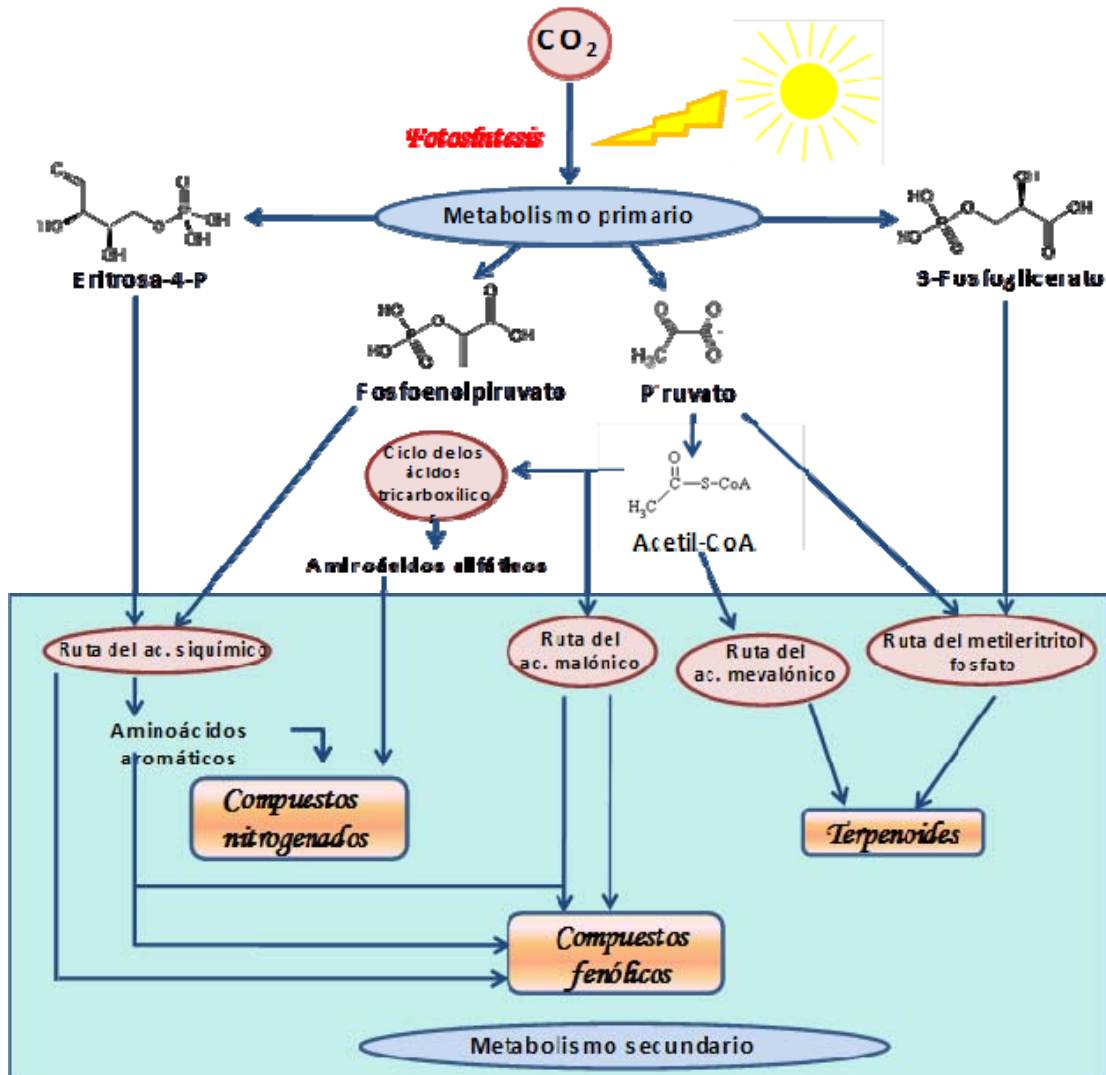
## 1. METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS

Todas las células vegetales tiene en común un metabolismo primario basado en una serie de reacciones para la producción de biomoléculas estructurales y energéticas que son necesarias para el normal crecimiento y desarrollo de las mismas, sin embargo, en las plantas existe además un metabolismo secundario a partir del cual se producen otra serie de compuestos (Croteau *et al.*, 2000) que si bien no son esenciales para su supervivencia, confieren a las plantas una ventaja evolutiva (O'Connor, 2015). Estos compuestos, denominados metabolitos secundarios, pueden actuar como moléculas señal dentro de la planta, entre la planta y los microorganismos, en la defensa frente a herbívoros, otras plantas y animales o frente a situaciones de estrés abiótico como la luz UV, salinidad, etc (Winkel-Shirley, 2002; Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

Existe una gran variedad de metabolitos secundarios cuya biosíntesis es característica de un grupo taxonómico concreto. 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. Así, los metabolitos secundarios se clasifican en tres grandes grupos según su origen biosintético y estructura: los compuestos fenólicos, los terpenos o isoprenoides y los compuestos nitrogenados o alcaloides (Figura 1). Los terpenos o isoprenoides se sintetizan a partir del acetyl-coenzima A (acetyl-CoA) producido en la ruta del ácido mevalónico (MVA) y del piruvato a través de la ruta del metileritritol fosfato (MEP). Los compuestos nitrogenados o alcaloides se sintetizan principalmente a partir de los aminoácidos aromáticos producidos en la ruta del ácido siquímico y de los 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 y de la ruta del ácido malónico.

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.



**Figura 1.** Esquema simplificado de las principales rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios en plantas y su relación con el metabolismo primario. Tomado de Almagro (2011).

### 1.1 TERPENOS O COMPUESTOS ISOPRENOIDES

Los terpenos o isoprenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios producidos por las plantas. De hecho, se han descrito más de 50000 compuestos de esta naturaleza (Morrone *et al.*, 2011). Estos compuestos desempeñan diferentes funciones en las plantas, desde la regulación del crecimiento hasta la protección frente a situaciones de estrés. Así, mediante la ruta de biosíntesis de los isoprenoides se obtienen numerosas

hormonas (ácido abscísico, giberelinas, citoquininas y brasinoesteroides), pigmentos fotosintéticos (carotenoides y clorofilas), transportadores de electrones (ubiquinona) o componentes esenciales de membrana (fitoesteroles) (Enfissi *et al.*, 2005; Falara *et al.*, 2011; James *et al.* 2013; Tholl, 2015). Además, muchos de ellos están implicados en las relaciones de la planta con el medio ambiente y forman parte de las respuestas de plantas frente a estreses bióticos y abióticos (Akram *et al.*, 2008; Bleeker *et al.*, 2011). Además, tradicionalmente estos compuestos se han usado principalmente en la industria agroalimentaria y farmacéutica (Ashour *et al.*, 2010) debido a sus propiedades biológicas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Ejemplos de algunos compuestos isoprenoides y su clasificación.

| CLASIFICACIÓN ISOPRENOIDES | CARBONOS        | COMPUESTO                  |
|----------------------------|-----------------|----------------------------|
| MONOTERPENOS               | C <sub>10</sub> | Limoneno, mentol, geraniol |
| SESQUITERPENOS             | C <sub>15</sub> | Capsidiol                  |
| DITERPERNOS                | C <sub>20</sub> | Tocoferoles                |
| TRITERPENOS                | C <sub>30</sub> | Fitoesteroles              |
| TETRATERPENOS              | C <sub>40</sub> | Carotenoides               |
| POLITERPENOS               | C <sub>x</sub>  | Ubiquinona                 |

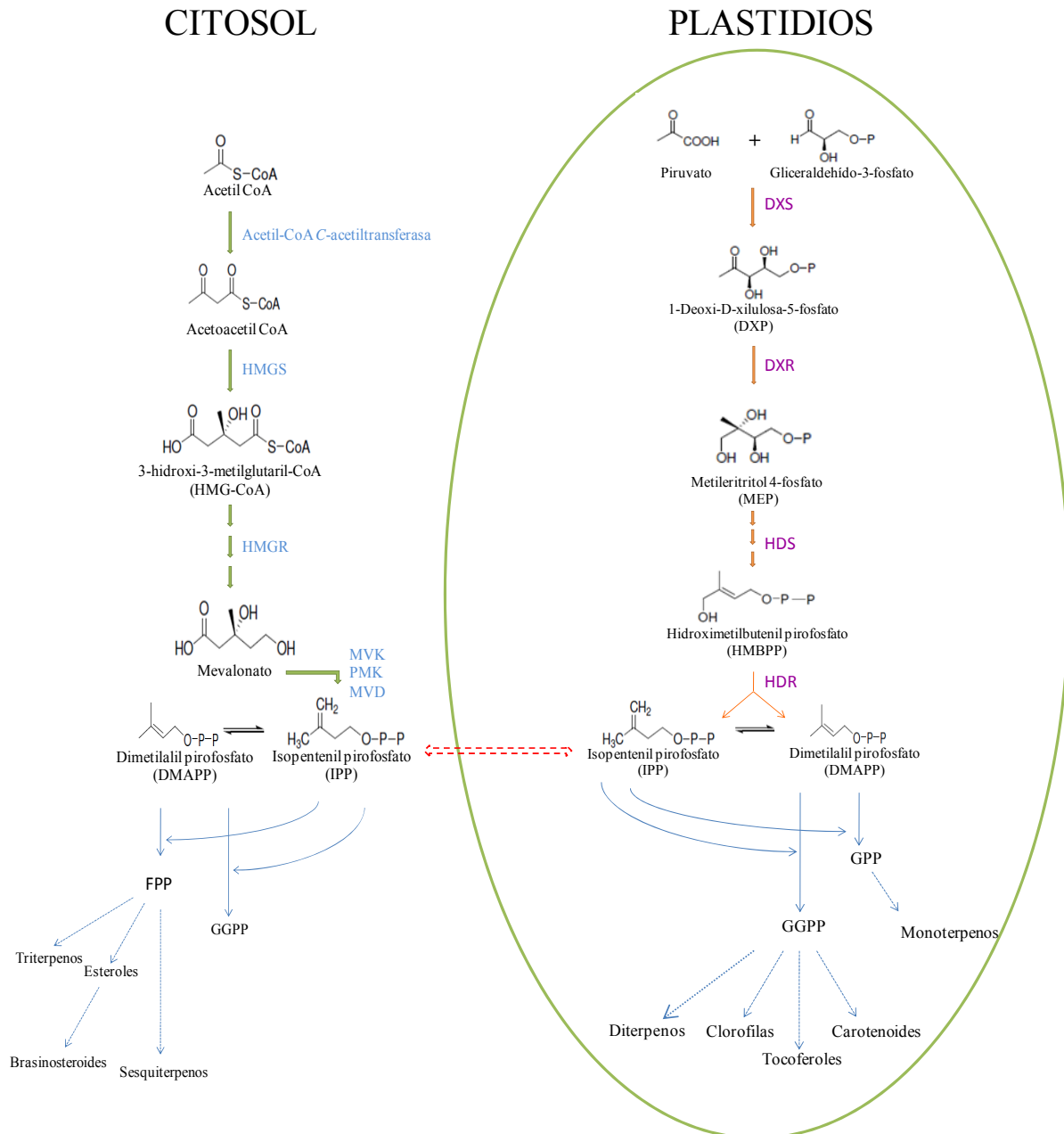
## 1.2. BIOSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS ISOPRENOIDES

Todos los compuestos isoprenoides derivan de dos moléculas de 5 carbonos: (isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Las plantas utilizan dos rutas de biosíntesis independientes para producir estos precursores: la ruta citosólica del MVA y la ruta plastidial del MEP (Figura 2). Ambas rutas de biosíntesis están fuertemente reguladas a diferentes niveles. Además de la regulación transcripcional de los genes, la biosíntesis de estos compuestos también está regulada a nivel post-transcripcional por factores externos (Vranova *et al.*, 2013, 2012).



El IPP producido por la ruta del MVA es usado para la biosíntesis de los compuestos isoprenoides en el citosol y en la mitocondria, mientras que IPP y DMAPP producidos por la ruta del MEP sirven para la síntesis de isoprenoides en los plastidios. La conversión de IPP a DMAPP (ruta del MVA) y el equilibrio entre IPP y DMAPP (ruta del MEP) es controlada por la enzima IPP isomerasa en una reacción reversible.

Tanto la ruta del MVA como la del MEP funcionan simultáneamente en las células vegetales, y a pesar de su localización en diferentes compartimentos subcelulares, existen numerosas evidencias de intercambio entre ellas, a través de la regulación coordinada de la biosíntesis de IPP y DMAPP. Así, los sesquiterpenos son normalmente sintetizados a partir de las unidades de isopreno derivadas de la ruta del MVA pero en algunos casos, son sintetizados en los plastidios por la ruta del MEP y transportados posteriormente al citosol (Dudareva *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Rutas biosintéticas de los compuestos isoprenoides en las células vegetales. Las enzimas de la ruta del MVA se muestran en azul y las enzimas de la ruta del MEP en violeta. HMGS, 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa; HMGR, HMG CoA reductasa; MVK, mevalonato quinasa; PMK, fosfomevalonato quinasa; MVD MVA pirofosfato descarboxilasa; DXS, 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa; DXR reductoisomerasa (DXR); HDS, hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa; HDR hidroximetilbutenil pirofosfato reductasa. Tomado de Sabater-Jara (2013).

### 1.2.1 RUTA DEL ÁCIDO MEVALÓNICO (MVA)

Para obtener el IPP a través de la ruta MVA en el citosol, inicialmente dos unidades de acetil-CoA se condensan formando acetoacetil-CoA por acción de la enzima acetil-CoA C-acetiltransferasa y acetoacetil-CoA tiolasa. La siguiente enzima, 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) CoA sintasa, cataliza la condensación aldólica de acetoacetil CoA con acetil CoA para dar lugar a (S)-HMG CoA, que es convertido en MVA a través de dos pasos de reducción que requieren NADPH, por acción de la enzima HMG CoA reductasa (HMGR). Esta enzima representa un paso crítico y limitante en la ruta de biosíntesis de los compuestos terpenoides, y su actividad se encuentra altamente regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional en plantas (Enjuto *et al.*, 1995; Leivar *et al.*, 2005). Las etapas siguientes que conducen a la formación de IPP comprenden dos reacciones de fosforilación para convertir el MVA a MVA 5-pirofosfato, reacción catalizada por las enzimas mevalonato quinasa y fosfomevalonato quinasa, seguido finalmente de la descarboxilación dependiente de ATP, para dar lugar a la formación de IPP, por la enzima MVA pirofosfato descarboxilasa. Este IPP por acción de la enzima IPP isomerasa será convertido en DMAPP y a partir de ellos tendrá lugar la formación de sesquiterpenos y triterpenos (Figura 2).

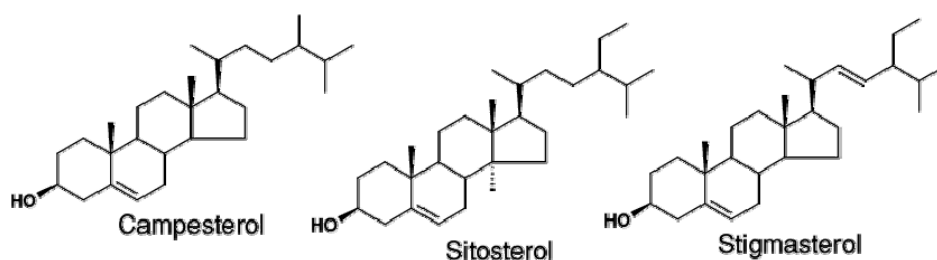
### 1.2.2 RUTA DEL METILERITRITOL 4-FOSFATO (MEP)

A diferencia de lo que ocurre en la ruta del MVA, en la ruta alternativa del MEP, se produce la formación de IPP y DMAPP en los plastidios, para dar lugar a los mono-, di- y tetraterpenos naturales. La ruta del MEP comienza con la condensación de piruvato y del gliceraldehído-3-fosfato por acción de la enzima 1-deoxi-D-xilulosa 5- fosfato (DXP) sintasa (DXS), obteniéndose el primer producto de la ruta, DXP. En un segundo paso, el reordenamiento intramolecular y la reducción de DXP por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) produce el MEP, considerado actualmente como el primer precursor limitante de los compuestos isoprenoides originados en los plastidios (Schwender *et al.*, 1999). A continuación, tiene lugar la transformación de MEP

en hidroximetilbutenil pirofosfato, mediante una reducción catalizada por la enzima hidroximetilbutenil pirofosfato sintasa, el cual finalmente es convertido en una mezcla de IPP y DMAPP por acción de la enzima hidroximetilbutenil pirofosfato reductasa (Figura 2).

### 1.2.3 FITOESTEROLES

Los fitoesteroles son un grupo de triterpenos policíclicos de 28 o 29 átomos de carbono. Se diferencian del colesterol por tener un grupo metil o etil en el C24 (Moreau *et al.*, 2002). Los fitoesteroles se encuentran en los tejidos vegetales como compuestos libres o formando glicósidos. Además, pueden formar ésteres combinándose con ácido ferúlico, ácidos grasos o ácido cumárico. Los fitoesteroles más importantes son el  $\beta$ - sitosterol (C29), campesterol (C28) y estigmasterol (C29) (Figura 3) constituyendo el 98% de todos los fitoesteroles encontrados en plantas.



**Figura 3.** Estructuras de los principales fitoesteroles encontrados en plantas.

Los fitoesteroles participan en procesos celulares esenciales modulando la permeabilidad y la fluidez de las membranas. Además, son precursores de hormonas esteroideas y están implicados en funciones de defensa de las plantas (Hartmann, 1998; Piironen *et al.*, 2000). Para los humanos, los fitoesteroles tienen efectos beneficiosos sobre la salud debido a su capacidad hipocolesterolémica, antidiabética, anticancerígena y antiinflamatoria (Santas *et al.*, 2013).

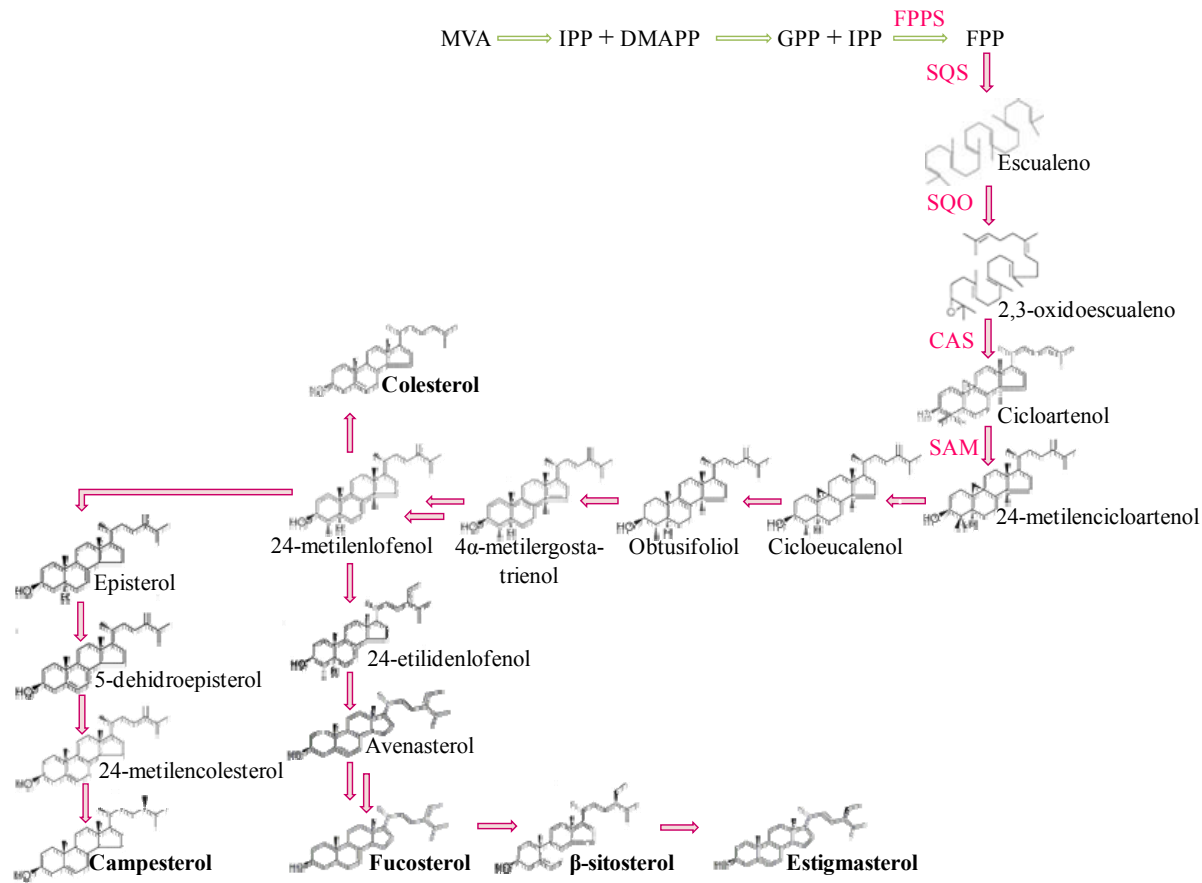
Los fitoesteroles están presentes en las plantas en cantidades que varían desde 0,01 al 0,1 % de peso fresco, (PF) que se corresponde con 100-1000 mg de esteroides totales/kg PF (Neelakandan *et al.*, 2012). Están presentes en

todas las frutas y verduras, y por lo tanto son incluidos regularmente en la dieta humana. En general, los aceites vegetales y los productos derivados de aceite se consideran las fuentes más ricas de esteroides, seguido de los cereales, productos a base de cereales y frutos secos (Piironen *et al.*, 2000).

### 1.2.3.1 BIOSÍNTESIS DE LOS FITOESTEROLES

Los fitoesteroides son compuestos isoprenoides sintetizados a partir de IPP que procede exclusivamente de la ruta biosintética del MVA que tiene lugar en el citosol. La conversión del IPP a DMAPP por la enzima IPP isomerasa y la siguiente condensación de estos compuestos da lugar a la formación de geranyl pirofosfato (GPP). A continuación, se produce la formación de farnesilpirofosfato (FPP), el cual sirve de punto de ramificación para la biosíntesis de sesquiterpenos y triterpenos (esteroides) mediante la adición de una segunda molécula de IPP a GPP, reacción catalizada por la enzima FPP sintasa. Tras la formación de FPP, la enzima escualeno sintasa (SQS) produce la condensación de dos moléculas de FPP formándose el escualeno, precursor de todos los esteroides y otros triterpenos en plantas (Abe *et al.*, 1993), por lo que SQS desempeña un papel regulador muy importante en la ruta de biosíntesis de estos compuestos (Devarenne *et al.*, 2002). La ciclación de escualeno a 2,3-oxidoescualeno es catalizada por la enzima escualeno epoxidasa (SQO). A continuación, 2,3-oxidoescualeno se cicla para formar cicloartenol mediante la actuación de la enzima cicloartenol sintasa. El cicloartenol, es el esteroide cíclico precursor de todos los productos finales de la ruta. A partir de él, la síntesis de los fitoesteroides tiene lugar en tres rutas paralelas que conducen a la formación de los esteroides C8 (colesterol), C9 (campesterol) y C10 (fucosterol, sitosterol y estigmasterol). En un paso inicial, S-adenosil-L-metionin-esteroide-C-metiltransferasa añade grupos metilo en la posición C24 dando lugar a 24-metilcicloartenol, el cual se modifica mediante una serie de reacciones de metilación/demetilación, oxidación/reducción en diferentes posiciones dando lugar al intermedio 24- metilfenol. En esta fase de la ruta, los compuestos intermediarios producidos a partir de éste pueden

ser metilados de nuevo en la posición C24 en una reacción enzimática que provoca una bifurcación biológicamente importante en la vía (Figura 3).



**Figura 4.** Ruta de biosíntesis de los esteroides vegetales. Las enzimas de la ruta específica que conducen a la biosíntesis de fitoesteroides se muestran en rosa. SQS, escualeno sintasa; SQO, escualeno epoxidasa; CAS, cicloartenol sintasa; SAM, S-adenosil-L-metionin-esterol-C-metiltransferasa. Tomado de Sabater-Jara (2013).

### 1.2.3.2 FUNCIONES DE LOS FITOESTEROLES EN PLANTAS

La principal función fisiológica de los fitoesteroles es modular las propiedades físico-químicas de las membranas vegetales. Esto se debe a que estos compuestos son componentes esenciales de las membranas influyendo en su fluidez y permeabilidad (Neelakandan., 2010). Los fitoesteroles son necesarios para el correcto funcionamiento del transporte de vesículas. Además, interactúan con proteínas integrales de membrana las cuales regulan las propiedades físicas de la bicapa lipídica y los fosfolípidos (Boutte y Grebe, 2009). En este sentido, diversos estudios sugieren la existencia de microdominios de membrana enriquecidos con esfingolípidos y fitoesteroles, los cuales serían clave en la incorporación de moléculas relacionadas con la señalización intracelular en situaciones de estrés. Igualmente, los fitoesteroles son capaces de regular la actividad de la H<sup>+</sup> ATPasa de membrana plasmática en raíces de maíz (Mongrand *et al.*, 2010). Otra función fisiológica clave de los fitoesteroles es su relación con la biosíntesis de hormonas vegetales. Así, el campesterol es el precursor de los brasinoesteroides, fitohormonas reguladoras del crecimiento e involucradas en respuestas de defensa (Asami *et al.*, 2005; Gudesblat y Russinova, 2011; Fridman y Savaldi-Goldstein, 2013).

Por otro lado, los fitoesteroles tienen un papel fundamental en las respuestas de defensa. De hecho, diferentes estudios muestran la relación de estos compuestos con la respuesta de las plantas frente a estreses biótico y abióticos (Devarenne *et al.*, 2002; Griebel y Zeier, 2010). En este sentido, Wang *et al.* (2012) observaron que la sobreexpresión de la enzima HMGR, la cual es responsable de la formación de los precursores de los fitoesteroles, podría estar relacionada con el incremento de la resistencia frente a *Botrytis cinerea* en plantas de *Arabidopsis*. Además, estos autores mostraron que el silenciamiento del gen SQS incrementaba el crecimiento de *Pseudomonas syringae* en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Wang *et al.*, 2012). Además, Griebel y Zeier (2010) también observaron un incremento en la expresión del citocromo P450, implicado en la desaturación del C22 y transformando el  $\beta$ -sitosterol en estigmasterol, en *Arabidopsis* en presencia de patógenos.



### **1.2.3.3 FUNCIONES DE LOS FITOESTEROLES EN HUMANOS**

Los efectos beneficiosos de los fitoesteroles sobre la salud humana han hecho incrementar el consumo de alimentos enriquecidos en esteroides vegetales. Una evidencia de este éxito es la existencia de más de 40 patentes sobre productos alimenticios que contienen fitoesteroides y la existencia de más de 15 productos comercializados que contienen esteroides vegetales (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011; Barchetti *et al.*, 2010; Pineda *et al.*, 2005).

Diversos estudios epidemiológicos muestran una estrecha relación entre el consumo de dietas ricas en frutas y hortalizas y la reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. Los fitoesteroides han recibido mucha atención durante las últimas décadas fundamentalmente por reducir los niveles de colesterol (Moreau *et al.*, 2002; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011; Derdemezis *et al.*, 2010) y por su actividad anti-aterosclerótica, anti-inflamatoria y anti-oxidante (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2009). Además, numerosos estudios evidencian el efecto positivo de los esteroides vegetales para frenar el riesgo de aparición de cáncer de pulmón, gástrico y de ovario, entre otros (Woyengo *et al.*, 2009). Sin embargo, la ingesta de esteroides a partir de fuentes naturales es demasiado baja como para producir efectos beneficiosos sobre la salud; por ello, se introducen en alimentos creando lo que se denomina alimentos funcionales. La adición de fitoesteroides a margarinas se encuentra entre los primeros ejemplos de alimentos funcionales con efectos hipocolesterolemicos (Piironen *et al.*, 2000). Los fitoesteroides se comercializan también como nutracéuticos en forma de cápsulas o tabletas y adicionados a diversos productos cosméticos por su acción humectante y regeneradora de la piel (Llamos *et al.*, 2008).

### **1.2.3.4 PRODUCCIÓN DE FITOESTEROLES A PARTIR DE MATERIA PRIMA VEGETAL**

Las frutas y hortalizas contienen un 0,05% de fitoesteroides (sobre la base de su porción comestible), algunas semillas también son fuentes abundantes de estos compuestos como las semillas de girasol y sésamo que tienen de 0,5 a

0,7 % y en algunas legumbres se puede alcanzar hasta el 22% de fitoesteroles (Llamos *et al.*, 2008). El aislamiento de fitoesteroles a gran escala está basado fundamentalmente en la extracción a partir de los aceites vegetales y los aceites de resinas también conocidos como *tall oil* (Coss *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2002; Quilez *et al.*, 2003). La fuente más común de fitoesteroles es una mezcla de aceites crudos comestibles constituidos, principalmente, por aceites de soja, maíz, germen de trigo y en menor cantidad, por otros aceites vegetales como cártamo y girasol, en proporciones variables. En algunos casos las semillas proceden de variedades genéticamente modificadas (Fernandes y Cabral, 2007). Otra posible fuente de fitoesteroles, de menor importancia, son los desechos producidos durante la fermentación de la caña de azúcar en fábricas de ron así como las cáscaras de cacao, subproducto de desecho en la producción de chocolate (Llamos *et al.*, 2008). Sin embargo, mediante los métodos citados anteriormente no se alcanzan las concentraciones de fitoesteroles necesarias para cubrir la creciente demanda que está experimentando el mercado de los fitoesteroles en los últimos años.

#### **1.2.4 CAROTENOIDES**

Los carotenoides son el grupo de pigmentos más extendido en la naturaleza ya que se han caracterizado hasta 600 estructuras diferentes. Son compuestos de naturaleza terpenoide formados por 40 átomos de carbono (tetraterpenos) cuya característica más notable es la presencia de una larga cadena de polieno, que se puede extender y que contiene de 3 a 15 dobles enlaces conjugados. Están presentes en todos los organismos fotosintéticos (Tabla 2) y en algunas bacterias y hongos. Son los responsables de la coloración de los frutos y las flores y debido a sus colores brillantes sirven como atrayentes para la polinización y dispersión de semillas. También proporcionan los colores característicos de muchas aves, insectos e invertebrados marinos y todos ellos proceden fundamentalmente de la dieta (Kessler y Baldwin, 2002).

**Tabla 2.** Contenido de carotenoides en diferentes especies vegetales. Modificado de Fraser y Bramley, (2004).

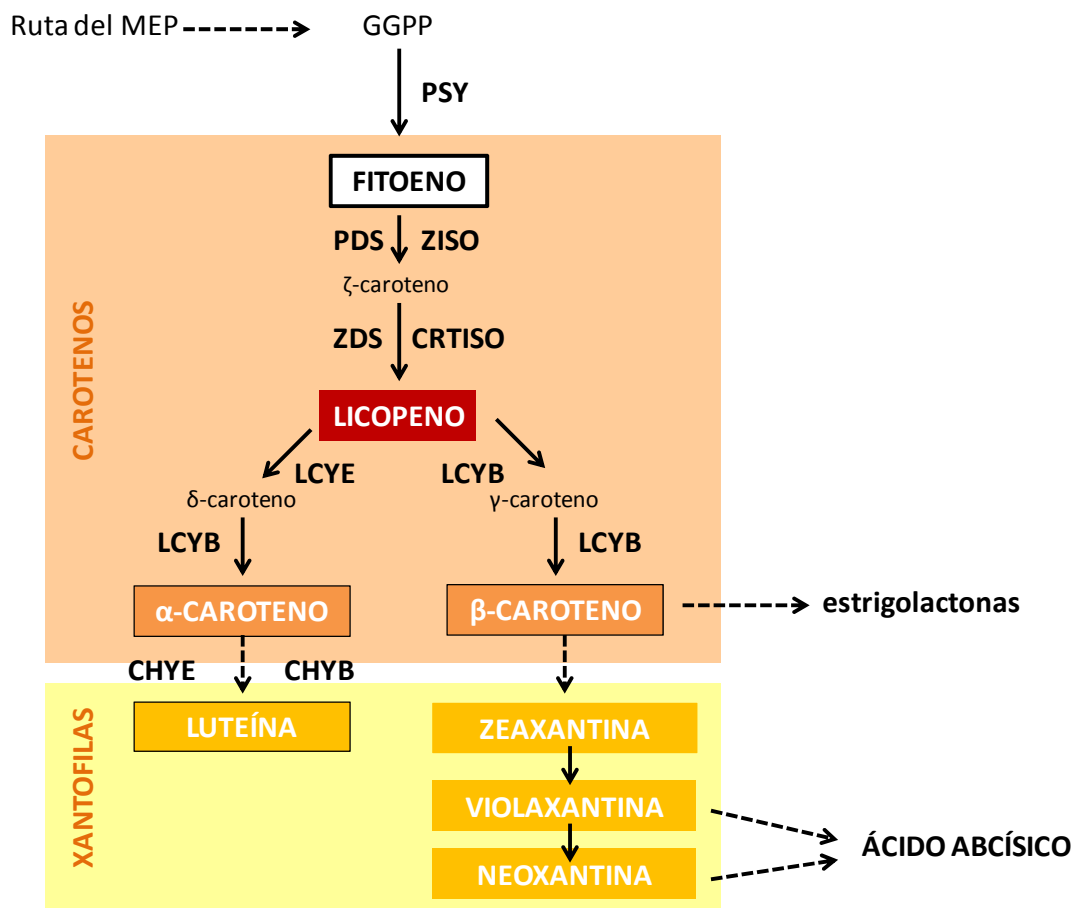
| <b>ESPECIE VEGETAL</b> | <b>CONTENIDO DE CAROTENOIDES<br/>(<math>\mu\text{g/g PF}</math>)</b> |
|------------------------|--|
| Coles de Bruselas      | 1163   |
| Lechuga                | 201  |
| Plátano                | 126  |
| Raíz de zanahoria      | 14693  |
| Melocotón              | 309  |
| Naranja                | 211  |
| Perejil                | 10335  |
| Tomate                 | 3454   |

Los carotenoides se clasifican en dos grupos: los carotenos, los cuales solo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el  $\beta$ -caroteno o el licopeno), y las xantofilas que además, contienen oxígeno (como la luteína). El caroteno más abundante es el  $\beta$ -caroteno, que constituye entre el 25-30 % del contenido total de carotenoides en las plantas. En el caso de las xantofilas, la luteína es la más abundante constituyendo entre un 40-45 % (Britton, 1995).

#### **1.2.4.1 BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES**

En las plantas, la biosíntesis de carotenoides se produce en los plastidios a partir de precursores generados principalmente por la ruta del MEP. Geranylgeranylpirofosfato (GGPP) sintasa (GPS) es la enzima responsable de la formación de GGPP. La unión de dos moléculas de GGPP dará la formación de fitoeno (C<sub>40</sub>, precursor incoloro de los carotenoides) a través de una reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) (Lange y Ghassemian, 2003; Joyard *et al.*, 2009). A partir de fitoeno (incoloro), por introducción de dobles enlaces conjugados mediante reacciones de desaturación se forman los

distintos carotenoides. Tras varias desaturaciones de fitoeno, debidas a la enzima fitoeno desaturasa (PDS) y  $\delta$ -caroteno desaturasa (ZDS), 15-cis- $\delta$ -caroteno isomerasa (Z-ISO) y carotenoide isomerasa (CRTISO), se genera licopeno. Para dar lugar al resto de carotenoides, el licopeno es ciclado dando lugar a dos ramas, la del  $\alpha$ -caroteno, catalizada por la  $\beta$ - ó  $\epsilon$ -licopeno ciclasa ( $\beta$ LCYB y  $\epsilon$ LCYE), y la rama del  $\beta$ -caroteno, mediada únicamente por la  $\beta$ LCYB. A continuación, la hidroxilación del  $\alpha$ -caroteno da lugar a la xantofila amarilla, luteína. Por otro lado, las hidroxilaciones del  $\beta$ -caroteno dan lugar a diferentes xantofilas (zeaxantina, violaxantina) (Fraser y Bramley, 2004; Rodríguez-Concepción y Stange, 2013). Las xantofilas son, además, precursoras de la fitohormona ácido abscísico, la cual interviene en la regulación del crecimiento vegetal y en la respuesta a estrés abiótico (Mauch-Mani y Mauch, 2005).



**Figura 5.** Ruta simplificada de la biosíntesis de los carotenoides en plantas. MEP, metileritritol 4- fosfato; GGPP, geranilgeranil pirofosfato. PSY, fitoeno sintasa; PDS,

fitoeno desaturasa; ZISO, 15-*cis*- $\delta$ -caroteno isomerasa; ZDS,  $\delta$ -caroteno desaturasa; CRTISO, caroteno *cis-trans* isomerasa; LCYB, licopeno  $\beta$ -ciclase; LCYE, licopeno  $\epsilon$ -ciclase; CHYB, caroteno  $\beta$  hidroxilase; CHYE, Modificado de Rodríguez-Concepción y Stange (2013).

#### **1.2.4.2 FUNCIÓN DE LOS CAROTENOIDES EN PLANTAS**

Los carotenoides realizan una serie de funciones esenciales para la supervivencia de las plantas como la fotoprotección durante el proceso de fotosíntesis. Sin embargo, también realizan otras funciones secundarias (Ubaldo-Suárez, 2007). Por un lado, los carotenoides son esenciales en la captación de energía solar en los organismos fotosintéticos. Además, son necesarios para el correcto funcionamiento de los fotosistemas, absorbiendo la luz en exceso (Cazzonelli, 2011). Estos compuestos detoxifican las especies reactivas de oxígeno (ROS) como oxígeno singlete (daña membranas y proteínas), comportándose como antioxidantes junto a otros compuestos como ascorbato y tocoferoles. Además, actúan como disipadores de la energía en exceso a través del ciclo de las xantofilas, también conocido como disipación no fotoquímica mediada por xantofilas (Cazzonelli, 2011). El ciclo de las xantofilas está formado por zeaxantina, violaxantina y anteraxantina, localizadas en los complejos colectores de luz de todos los organismos fotosintéticos, contribuyendo a captar y proteger contra el daño de la fotoinhibición causado por la luz. Zeaxantina puede recibir la energía directamente de la clorofila excitada, disipándola en forma de calor. Este proceso se invierte al disminuir la intensidad de luz, con lo que el ciclo queda cerrado (Manrique, 2003).

Por otro lado, los carotenoides actúan como pigmentos dando color a las flores y frutas, actuando como atrayentes visuales para aves e insectos, lo cual ayuda a la dispersión de polen y semillas favoreciendo la reproducción de las plantas. Además, son los responsables de aromas volátiles desprendidos por las plantas tales como acetona de geranilo y  $\beta$ -ionona, para atraer a los animales para la polinización y dispersión de las semillas. También sirven como sustratos para la producción de fitohormonas como el ácido abscísico (mediador en respuestas ambientales como el control de la apertura de los

estomas y transpiración durante la sequía, además de intervenir en la maduración y latencia de las semillas) y estrigolactona (con varias funciones, entre ellas la estimulación de la relación simbiótica entre raíces-hongos, inhibición de la ramificación por inhibición del brote, etc...) (Cazzonelli, 2011). Además, los carotenoides pueden actuar como moléculas señal en respuestas de defensa de las plantas mediante la producción de ROS (Havaux, 2014).

#### 1.2.4.3 FUNCIÓN DE LOS CAROTENOIDES EN ANIMALES

La función de los carotenoides en los animales es promover la salud y mejorar el comportamiento sexual y la reproducción. Para los seres humanos, estos pigmentos son importantes en diferentes campos como la agricultura, alimentación, salud e industria cosmética (Cazzonelli, 2011). Debido a que estos compuestos sólo son sintetizados en plantas, algas y bacterias, para que sean adquiridos por los animales, deben ingerirse a través de la dieta, aunque algunos parásitos protistas como *Plasmodium* y los áfidos son una excepción, pues poseen mecanismos para su producción (Cazzonelli, 2011). De los cincuenta carotenoides disponibles en la dieta humana que pueden ser absorbidos y metabolizados, sólo unos pocos, tales como  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína o zeaxantina, representan más del 95% de los carotenoides totales en sangre y son los estudiados en el contexto de la dieta y salud humana (Beltrán *et al.*, 2012). Una de las funciones más importantes que desempeñan los carotenoides en animales es actuar como provitamina A. Esta función está limitada a los carotenoides que poseen grupos de anillos- $\beta$ , tales como  $\beta$ -caroteno o  $\beta$ -criptoxantina, entre otros. La provitamina A es procesada en el organismo y convertida en vitamina A (retinol), la cual es esencial para la visión nocturna y necesaria para mantener la piel y los tejidos superficiales sanos. Además de su actividad como pro-vitamina A, actúan como antioxidantes mediante la desactivación de radicales libres y la captura de oxígeno singlete, protegiendo a la piel de los rayos UV, protección contra la degeneración macular y cataratas, potenciadores del sistema inmune, enfermedades cardiovasculares y actuando contra enfermedades degenerativas (Fraser y

Bramley, 2004). Además, experimentos realizados *in vitro* han demostrado que los carotenoides pueden actuar sobre diversos tipos de cáncer ya que son capaces de inhibir la proliferación celular así como modular la expresión de ciertos genes (Rock, 2009).

#### **1.2.4.4 PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES**

Debido a las propiedades beneficiosas de los carotenoides, existe una producción de estos compuestos a gran escala. Tradicionalmente, los carotenoides se han extraído directamente de la materia prima vegetal. Son muchas las especies que se han utilizado para su extracción como el tomate (*Solanum lycopersicum*), zanahoria (*Daucus carota*), clavelón (*Tagetes erecta*) o níspero (*Eriobotrya japonica*), entre otros. En la obtención de carotenoides, es muy importante el estado de la materia prima. Diversos estudios demuestran que la maduración provoca cambios importantes en la composición química y nutricional del fruto, produciéndose un aumento del contenido de carotenoides cuanto más maduro sea éste (Bramley, 2002). Según Thompson *et al.* (2000), la concentración aumenta desde 0'25 mg/Kg en tomates verdes hasta 40 mg/Kg en tomates maduros o incluso más. Sin embargo, existen diversas alternativas para su producción como son la mejora de su contenido en plantas (Croteau *et al.*, 2005) o su síntesis química. Actualmente estos procedimientos están siendo sustituidos por procesos biotecnológicos basados en la ingeniería genética y en el uso de microorganismos (Ye *et al.*, 2000; Ajikumar *et al.*, 2008).

#### **1.2.5 $\alpha$ -TOCOFEROL**

Los tococromanos son compuestos orgánicos constituidos por varios fenoles metilados, que forman una clase de compuestos químicos que actúan como Vitamina E. Se han identificado en la naturaleza distintas formas de vitamina E ya que existen cuatro isómeros de tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) y cuatro tocotrienoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) (Geipel *et al.*, 2014). De todas las formas isoméricas de la vitamina

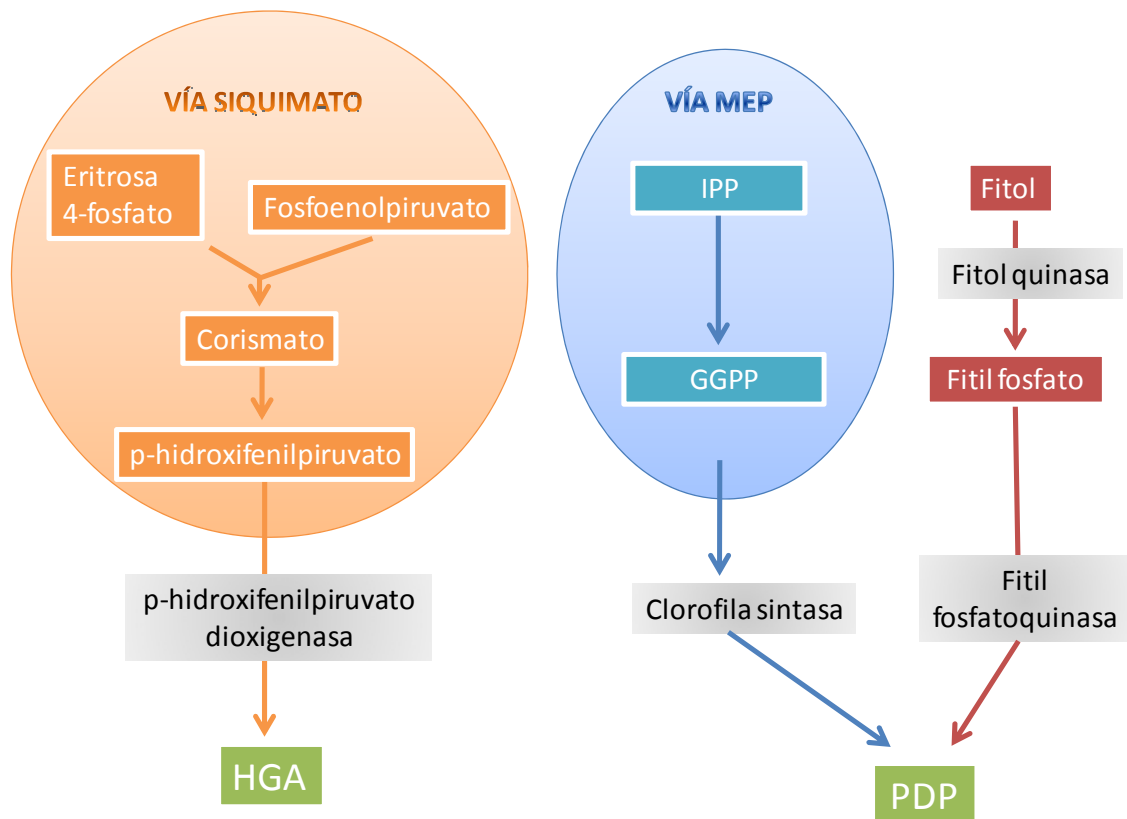
E, el  $\alpha$ -tocoferol es el compuesto que presenta una mayor actividad biológica. El sitio activo de la vitamina E se encuentra en el grupo 6-hidroxilo del anillo cromanol, el cual suele situarse en la membrana celular cerca de la superficie polar, mientras que la cadena hidrocarbonada del fitol se sitúa junto a los fosfolípidos, en la región no polar de las membranas. La diferencia entre los 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles radica en la posición de los grupos metilo unidos al anillo cromanol.

Las fuentes alimentarias más ricas en vitamina E son los aceites vegetales (soja, girasol y cártamo), el germen de trigo, frutos secos como las nueces y las verduras de color verde (Lushchak y Semchuk, 2012). También puede encontrarse en alimentos de origen animal como la yema de huevo. Algunos de los alimentos considerados como fuentes de vitamina E son los aceites como el aceite de girasol (50-62 mg/100 g), aceite de nueces (39 mg/100 g), aceite de sésamo (28 mg/100 g), aceite de soja (17-25 mg/100 g), aceite de palma (25 mg/100 g) y aceite de oliva (12 mg/100 g) y los frutos secos como las avellanas (27 mg/ 100 g), nueces (25 mg/100 g) y almendras (25 mg/100 g).

#### **1.2.5.1 BIOSÍNTESIS DE $\alpha$ -TOCOFEROL**

La biosíntesis de tocoferoles tiene lugar en los tejidos fotosintéticos de las plantas, concretamente en los plastos, donde se encuentran las dos enzimas principales de esta ruta, homogentísico fitil transferasa (HPT) y tocoferol ciclasa (TC) (Hussain *et al.*, 2013). Para que la síntesis de tocoferoles tenga lugar son necesarios dos precursores, fitil difosfato (PDP) y el ácido homogentísico (HGA), obtenidos a partir de la vía del MEP y del siquimato, respectivamente (Lushchak y Semchuk 2012, Figura 7). La vía del siquimato es la ruta metabólica por la cual se sintetiza el precursor común para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y otros compuestos de interés biológico. Esta vía se encuentra presente en plantas, hongos y bacterias pero no en animales.





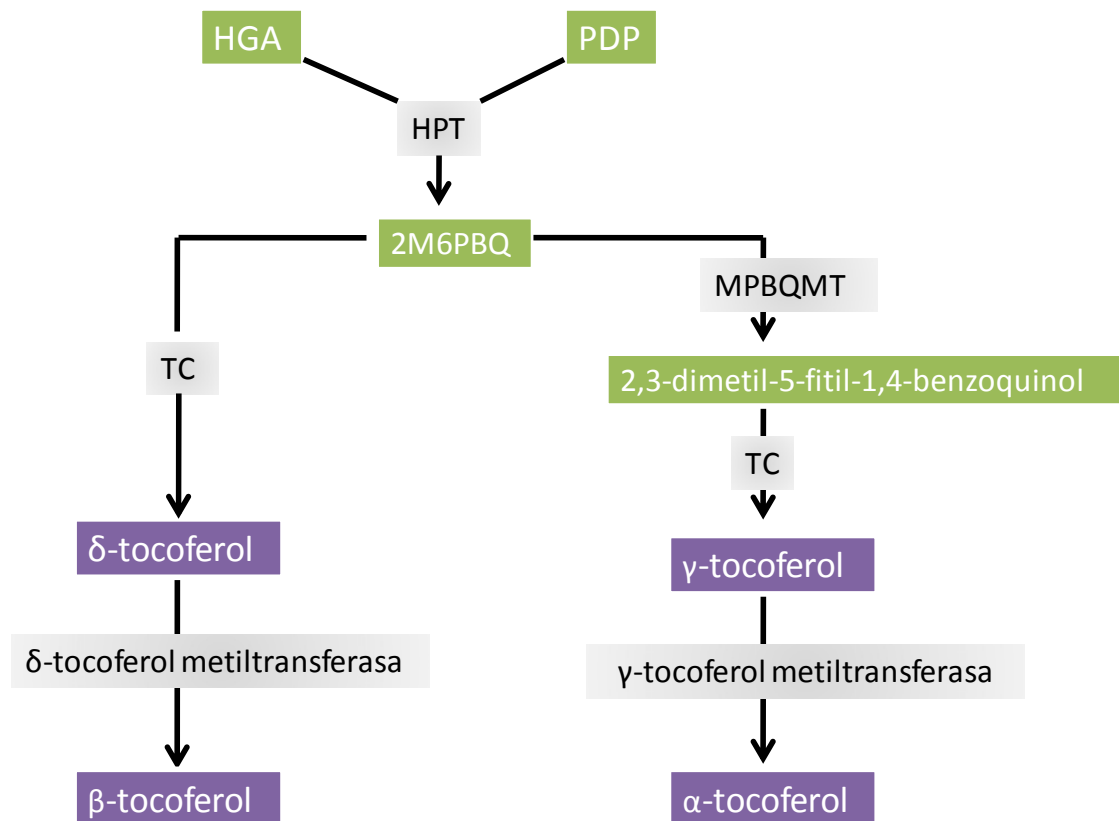
**Figura 7.** Ruta simplificada de la biosíntesis de los precursores de tocoferoles. IPP: isopentenil pirofosfato; GGPP: geranilgeranilpirofosfato; HGA: ácido homogentísico; PDP: fitil difosfato

En la ruta del siquimato se produce la transformación conjunta de eritrosa 4-fosfato (intermediario de la ruta de las pentosas fosfato) y fosfoenolpiruvato (intermediario de la glucólisis) a corismato a través de varias etapas enzimáticas (Lushchak y Semchuk, 2012). Mediante diversas reacciones, el corismato se transforma en *p*-hidroxifenilpiruvato y la enzima *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, lo hidroxila dando lugar a HGA, precursor necesario para la formación del anillo aromático del cromanol (Hussain *et al.*, 2013). El PDP puede obtenerse de dos formas diferentes (Hussain *et al.*, 2013), a través de la ruta del MEP mediante la unión de cuatro moléculas de IPP dando lugar al geranilgeranilpirofosfato (GGPP, intermediario de 20 carbonos) que a través de la enzima clorofila sintasa, da lugar a PDP. La otra forma de obtener PDP es mediante el fitol libre que se produce en el catabolismo de la clorofila en los organismos fotosintéticos (Lushchak y

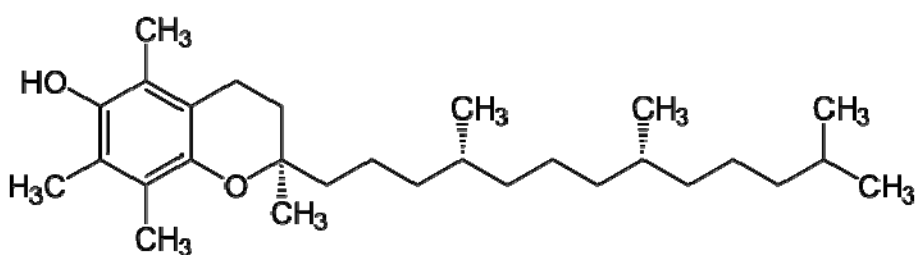
Semchuk, 2012). Este fitol es fosforilado por la fitol quinasa dando lugar a fitil fosfato, que es nuevamente fosforilado por la enzima fitil fosfatoquinasa para formar PDP (Hussain *et al.*, 2013). Este compuesto es necesario para la formación de la cadena lateral de isoprenilo que contienen los tocoferoles.

La primera reacción en la ruta de biosíntesis de los tocoferoles es la condensación de HGA con la cola hidrofóbica de PDP mediante la enzima HPT, que da como producto el 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinol (M6PBQ), precursor de todos los tocoferoles (Lushchak y Semchuk, 2012). A continuación, tienen lugar dos metilaciones y una ciclación, obteniéndose el grupo cromanol (Porfirova *et al.*, 2002). La M6PBQ metiltransferasa (MPBQMT) añade un grupo metilo al M6PBQ y forma el 2,3-dimetil-5-fetil-1,4-benzoquinol que seguido de la ciclación del anillo por la TC se obtiene el  $\gamma$ -tocoferol. En el último paso, se añade un grupo metilo al cromanol obteniéndose  $\alpha$ -tocoferol a través de la enzima  $\gamma$ -tocoferol metiltransferasa. Cuando la MPBQMT no añade el primer grupo metilo, la acción de la TC sobre el 2M6PBQ da lugar al  $\delta$ -tocoferol que puede convertirse en  $\beta$ -tocoferol por la enzima  $\delta$ -tocoferol metiltransferasa (Shintani y Dellapenna 1998, Figura 8).

En cuanto a sus funciones, estos compuestos actúan de forma coordinada con una serie de mecanismos biológicos de protección frente a la oxidación, lo que incluye su relación con otras vitaminas (vitamina A, vitamina C), con enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa e incluso con algunos antioxidantes naturales (Wenk *et al.*, 2000). Varios estudios han demostrado que la concentración de tocoferoles en plantas aumenta tras la exposición a determinados tipos de estreses como la alta intensidad lumínica, la sequía, la salinidad o las bajas temperaturas (Cela-Udaondo, 2012). La peculiaridad del  $\alpha$ -tocoferol (Figura 9) es que se localiza principalmente en el interior de las membranas celulares y previene específicamente la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que constituyen los fosfolípidos (Halliwell, 1994), neutralizando así los radicales libres y dando lugar a una forma oxidada ( $\alpha$ -tocoferil quinona).



**Figura 8.** Ruta simplificada de la biosíntesis de los tocoferoles. HGA: ácido homogentísico; PDP: fitil difosfato HPT: homogentísico fitil transferasa 2M6PBQ: 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinol MPBQMT: 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinol metil transferasa TC: tocoferol ciclasa



**Figura 9.** Estructura de la molécula de  $\alpha$ -tocoferol.

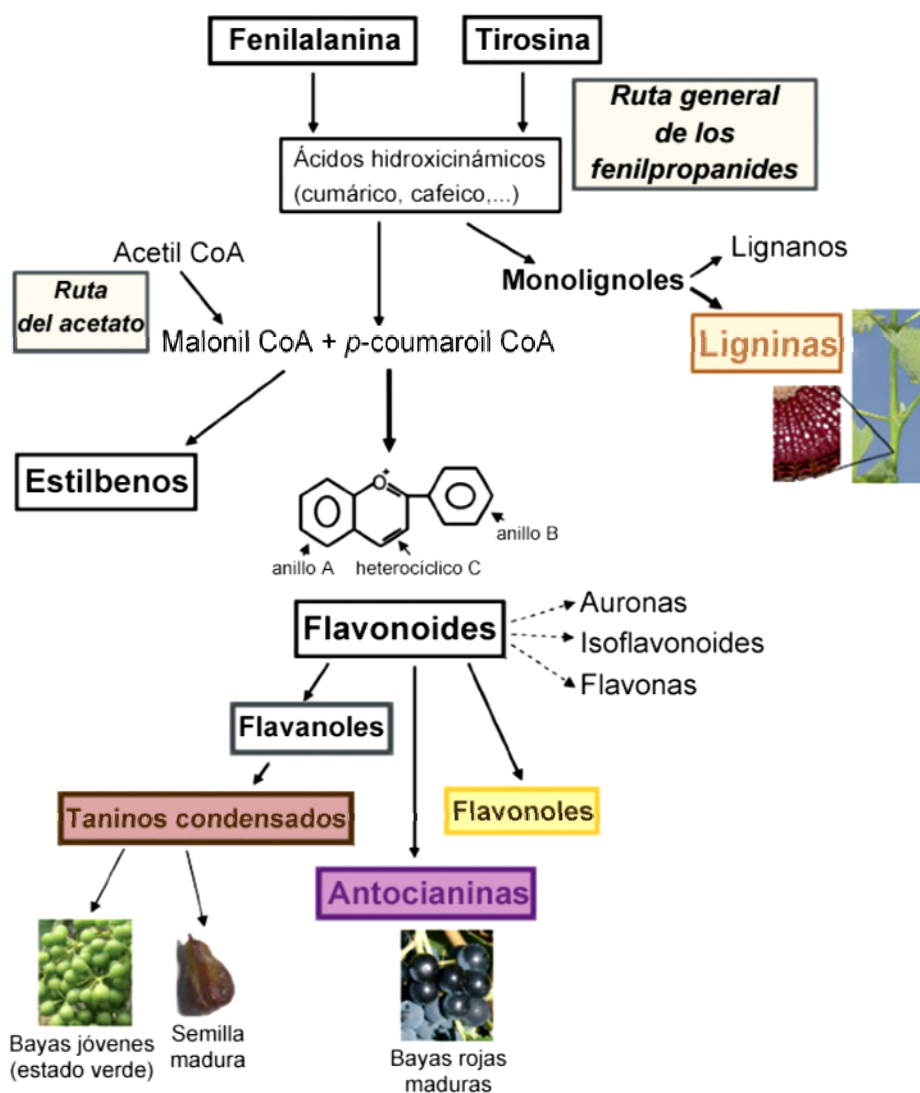
Por todas estas características, los tocoferoles presentan numerosos beneficios para la salud humana ya que protegen de la peroxidación y oxidación lipídica producida por radicales libres, activa el sistema inmune, tienen efectos beneficiosos sobre enfermedades neurodegenerativas, y disminuye el

colesterol y la presión arterial (Salinthonne *et al.*, 2013; Jain y Jain, 2012; Al-Okbi *et al.*, 2014).

### 1.2.6 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen uno de los principales grupos de metabolitos secundarios. Aunque, por definición, todos estos compuestos poseen, al menos, un anillo aromático sustituido con uno o varios grupos hidroxilo, se consideran compuestos fenólicos las sustancias derivadas de dos rutas principales: la ruta del ácido siquímico, que da lugar a la formación de fenilalanina y la ruta del acetatomalonato, que puede originar fenoles simples y quinonas (Harborne, 1999; Taiz y Zeiger, 2010). La combinación de ambas rutas principales da lugar a la formación de los flavonoides, que es el subgrupo de compuestos fenólicos que presenta mayor diversidad y distribución en el Reino Vegetal (Figura 10).

Por otro lado, la gran variedad estructural existente dentro de este grupo de metabolitos secundarios surge a partir de un número limitado de precursores biosintéticos como el fosfoenolpiruvato, piruvato, acetato, acetil-CoA y malonil-CoA (Vogt, 2010). Los compuestos fenólicos también pueden sufrir reacciones de condensación para dar lugar a oligómeros o polímeros, tales como lignanos, ligninas, etc.



**Figura 10.** Ruta biosintética general de los compuestos fenólicos y sus principales subgrupos. Tomada de Briceño (2014).

Por la importancia en este trabajo de investigación cabe a destacar tres compuestos fenólicos: eugenol, isoeugenol y vanillina. En relación a la biosíntesis de eugenol e isoeugenol, esos compuestos comparten las etapas iniciales de formación de las ligninas hasta la formación del alcohol coniferílico. Posteriormente, el alcohol coniferílico se transforma en coniferil acetato por acción de la coniferil alcohol acetiltransferasa antes de su reducción a eugenol e isoeugenol mediante la acción de eugenol sintasa o isoeugenol sintasa, respectivamente (Dudareva *et al.*, 2013). De manera similar, la vanillina es sintetizada a partir de precursores fenilpropanoides, para lo cual se han

propuesto varios modelos. Anwar (1963) indicaron que la vanillina podría ser sintetizada desde alcohol coniferílico, precursor de las ligninas, mientras que Zenk (1965) sugirió que la vanillina podría ser formada a partir del ácido ferúlico (Kundu, 2017). Sin embargo, la ruta biosintética completa de la vanillina a partir de compuestos fenilpropanoides aún no ha sido demostrada.

En relación a la producción biotecnológica de estos compuestos fenólicos, la vanillina ha sido tradicionalmente obtenida a partir de suspensiones celulares (SC), células inmovilizadas y cultivos de raíces pilosas (Scragg, 1997). La vanillina, es un compuesto fenólico obtenido de las vainas de *Vanilla planifolia*; es ampliamente utilizada para potenciar el sabor en alimentos y bebidas y como biopreservador debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Por otro lado, el isoeugenol es un isómero de eugenol, que a veces se utiliza como precursor para la producción de vanillina (Hopp y Mori, 1992). El eugenol también tiene varias propiedades farmacológicas ya que tiene actividad antioxidante, anti-inflamatoria y anticancerígena así como actividad antimicrobiana. Este versátil compuesto también se utiliza como un compuesto de alto valor añadido en perfumes y cosméticos.

## **2. MEJORA DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE EL CULTIVO *IN VITRO***

La obtención de metabolitos secundarios a partir de extractos de materia prima vegetal constituye la base de una actividad económica muy importante a nivel mundial, pero debido a la sobreexplotación de materiales silvestres, algunos de ellos en peligro de extinción, cada vez existen más inconvenientes para la continuidad de estos procedimientos que hoy por hoy no tienen una solución técnicamente viable. Una de las alternativas a la extracción a partir de la materia prima es la utilización de sistemas biotecnológicos basados en el cultivo *in vitro*.

Los callos originados en cultivo *in vitro* se forman al depositar un fragmento de tejido vegetal (explanto) en un medio de cultivo adecuado, de manera que sus células proliferan y comienzan a perder la estructura y organización que

mantenían en el tejido original (Thorpe, 1980; Wagley *et al.*, 1987) mediante el proceso conocido como desdiferenciación. A continuación, se puede obtener un cultivo celular en medio líquido, también denominado SC. Estas SC 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 el de células en suspensión se pueden emplear para la regeneración de plantas mediante organogénesis o embriogénesis somática. También se utilizan para la obtención de metabolitos secundarios. El uso de cultivos de órganos y células vegetales *in vitro* supone importantes novedades y ventajas tecnológicas en la producción de metabolitos secundarios ya que:

1. Los cultivos se pueden seleccionar para la producción específica del compuesto deseado y mantenerse indefinidamente.
2. La disponibilidad del material vegetal no está condicionada por las limitaciones estacionales, ni climáticas al que se encuentran sometidas las plantas cultivadas.
3. El proceso completo de producción, desde la generación de la biomasa hasta la purificación del compuesto se puede integrar en el mismo espacio físico, someter a control y adecuar a la demanda, sin necesidad del almacenamiento al que están obligados, los procedimientos extractivos debido a la estacionalidad de la producción de plantas.
4. La producción de metabolitos por métodos biológicos frente a métodos de extracción de materia prima vegetal o síntesis química mejora la aceptación por el consumidor, a la vez que es más respetuoso con el medio ambiente.
5. Las condiciones de producción no son demasiado severas, lo que implica reducción del coste de equipamiento y material.
6. Existe una mayor especificidad de transformación biológica que en la síntesis química, como por ejemplo, en la obtención de isómeros.

7. Permite la síntesis de compuestos que no se pueden obtener por otros métodos o por cultivos agronómicos.
8. Permite el desarrollo de programas de selección de líneas sobreproductoras.

La optimización de la producción de metabolitos incluye el establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo y el ajuste óptimo de los parámetros de crecimiento celular. Cuando también se quiere comercializar el producto a nivel industrial, es necesario realizar un escalado en sistemas que garanticen la producción elevada del metabolito de interés (utilizando biorreactores) para alcanzar niveles económicamente rentables. Entre los factores que incrementan la productividad destaca la elicitación o estimulación del cultivo celular.

## **2.1 ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS: LA ELICITACIÓN**

El proceso de elicitación se define como “*la inducción o aumento de la biosíntesis de metabolitos debido a la adición de pequeñas cantidades de elicitors*”, definidos como moléculas de diverso origen que, introducidas en pequeñas concentraciones en un sistema celular vivo, son capaces de alterar el metabolismo, consiguiendo incrementar la producción de un metabolito en particular. El empleo de elicitors es quizás hoy en día, el método más común para aumentar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de células vegetales. En este sentido, mientras que la planta responde a la presencia de elicitors, sintetizando metabolitos de forma localizada allá donde se produce la interacción, el cultivo celular responde globalmente ya que el elicitor entra en contacto con toda la biomasa celular. Por lo tanto, la cantidad total de metabolitos sintetizados es mucho mayor que en las plantas y está en función de la biomasa de células elicitada.



Entre los elicitores utilizados para la estimulación de células vegetales podemos diferenciar dos grandes grupos: elicitores abióticos entre los que se encuentran la luz UV (Langcake y Pryce, 1977; Adrian *et al.*, 2000; Lesniewska, 2004; Rudolf y Resurrección, 2005), benzotriazol (Iriti *et al.*, 2004), ozono (Sgarbi *et al.*, 2003), fosetil de aluminio (López-Serrano *et al.*, 1994), sales de metales pesados (Zheng y Wu, 2004) y elicitores de origen biótico como el extracto de levadura (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2005 y 2006), el ácido DL- $\beta$ -aminobutírico (Cohen, 1994; Pajot *et al.*, 2001), el ácido jasmónico y el jasmonato de metilo (MJ) (Zhang *et al.*, 2001; Bhuiyan y Adachi, 2002).

Uno de los elicitores usados habitualmente es el MJ, un derivado del ácido jasmónico. Este grupo de compuestos son moléculas señal sintetizadas de manera natural por las plantas que presentan una mayor actividad en tejidos de crecimiento como son los ápices de tallos, hojas jóvenes, frutos inmaduros y extremos de raíces. Numerosos estudios demuestran que el MJ regula muchos procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento, el desarrollo, la fertilidad y la senescencia (Wasternack, 2007; Reinbothe *et al.*, 2009) y están implicados en la señalización local y sistémica del estrés biótico y abiótico así como en la regulación de la expresión de genes relacionados con la defensa (Rao *et al.*, 2000; Howe y Jander, 2008; Frenkel *et al.*, 2009; Clarke *et al.*, 2009). Así, en cultivos celulares de tomate, tabaco y pimiento, la adición de MJ induce la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis como quitinasas, 1,3- $\beta$ -glucosidasas y peroxidasas (Sabater-Jara *et al.*, 2010). Asimismo, MJ es capaz de inducir la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos celulares, por ejemplo capsicinoides (Mandujano-Chávez *et al.*, 2000; Gutierrez-Carbajal *et al.*, 2010), solavetivona (Sabater-Jara *et al.*, 2010), astaxantina (Lu *et al.*, 2010) y ajmalicina (Lee-Parson *et al.*, 2005), entre otros. La adición de jasmonatos induce la transcripción coordinada de los genes que participan en las rutas de biosíntesis de estos metabolitos y su regulación se consigue mediante factores de transcripción que interaccionan con regiones promotoras del ADN y modulan la síntesis de ARNm por la polimerasa II. Las modificaciones proteicas posteriores o interacciones entre proteínas también son esenciales en la regulación de estos factores de transcripción y a ese nivel,

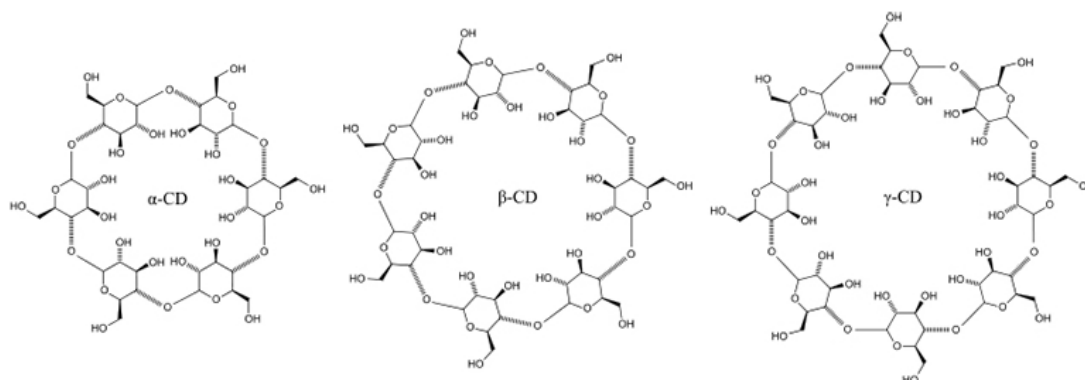
una vez más, la fosforilación de proteínas parece ser crucial (Sasaki *et al.*, 2001; Devoto *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007.; Dombrecht *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2007; Pauwels *et al.*, 2008.; Wang *et al.*, 2008; Wei, 2010).

Otros compuestos que juegan un papel importante en las respuestas de defensa de las plantas son los compuestos volátiles de hojas verdes también conocidos como compuestos volátiles de seis carbonos. Uno de los más importantes es el (Z)-3-hexenol (Hex). Se ha demostrado que cuando las plantas son expuestas a estos compuestos volátiles generalmente se induce la biosíntesis de fitoalexinas y los genes implicados en respuestas de defensa vegetal (Matsui, 2006; Almagro *et al.*, 2016).

Otro tipo de compuestos con potencial efecto elicitor son los  $\beta$ -glucanos ( $\beta$ -glu). Los  $\beta$ -glu son oligosacáridos derivados de las paredes celulares de los hongos (Okinaka *et al.*, 1995).  $\beta$ -glu desencadenan una amplia gama de respuestas de defensa en plantas como la producción de fitoalexinas en especies vegetales como soja y arroz (Cheong y Hahn, 1991; Yamaguchi *et al.*, 2000).

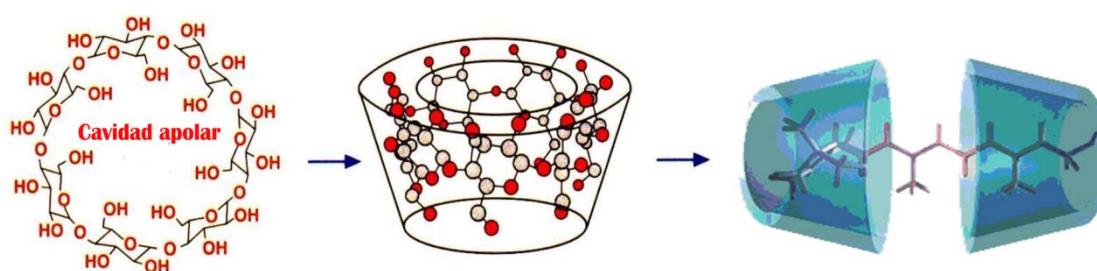
### **2.1.2 ELICITACIÓN CON CICLODEXTRINAS**

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos formados por 6, 7, 8 o 9 unidades de glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), que se denominan  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  CDs, respectivamente (Figura 11). Estos compuestos naturales se producen a partir de la degradación enzimática del almidón por acción de la enzima ciclodextrín-glicosil-transferasa (Szejtli, 1998) que son secretadas por distintos microorganismos del género *Bacillus* (Nakamura y Horikoshi, 1977).



**Figura 11.** Estructura de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs.

La CDs presentan una superficie exterior hidrofílica debido a los grupos hidroxilo y una cavidad interna hidrofóbica (Bru *et al.*, 2006). Como consecuencia de que los grupos hidroxilo libres están situados en la superficie de los anillos, las CDs son hidrófilas y su solubilidad es el resultado de la capacidad de interacción de dichos grupos hidroxilo con el medio acuoso. Además, debido a su cavidad hidrofóbica las CDs pueden formar complejos de inclusión con moléculas altamente apolares, incrementando su solubilidad en medios acuosos sin alterar las características químicas de la molécula huésped, ya que no se origina ningún enlace covalente durante la interacción entre las CDs y la molécula insoluble en agua (Belchí-Navarro *et al.*, 2010) (Figura 12).



**Figura 12.** Formación de complejos de inclusión con CDs.

Bru *et al.* (2006) demostraron que la incubación de SC de vid con CDs, a una concentración de 50 mM, resultó inocua para las células, salvo en el caso de la sulfo- $\beta$ -CD que resultó letal a dicha concentración, como se observó por

microscopía óptica y por el pardeamiento de las SC. Estos autores demostraron que las CDs actuaban como elicitores induciendo la biosíntesis de la fitoalexina característica de la vid (*trans*-resveratrol) ya que las CDs modificadas se parecen a los oligosacáridos pécticos alquil-derivados liberados de forma natural de las paredes celulares durante un ataque fúngico. Zamboni *et al.* (2009) estudiaron los perfiles génicos en SC de vid elicitados con CDs después de 2 y 6 horas de tratamiento y observaron que las CDs inducen respuestas de defensa temprana como la activación de proteínas quinasas y proteínas fosfatasa. Además, las CDs desencadenan una cascada de transducción de la señal que activa diferentes familias de factores de transcripción que modulan la expresión de genes relacionados con la ruta de biosíntesis del *trans*-resveratrol como la estilbeno sintasa ó la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis como quitinasas ó PR 10. Asimismo, Sabater-Jara *et al.* (2010) demostraron que las CDs estimulaban la biosíntesis de fitoalexinas de naturaleza sesquiterpénica como la solavetivona y compuestos terpenoides como los fitoesteroles. Sabater-Jara *et al.* (2014) y Almagro *et al.* (2014) también demostraron que CDs separadamente o en combinación con MJ incrementaron la producción de taxanos y alcaloides indólicos en SC de *Taxus media* y *Catharanthus roseus*, respectivamente. Además, un estudio de la expresión global de genes en SC de *V. vinifera* en presencia de CDs y MJ mostro que la adición ambos elicitores provocó un efecto sinérgico sobre la producción de *trans*-resveratrol ya que la suma de la producción individual de MJ y CDs fue inferior a la observada en presencia de ambos elicitores. Asimismo, el análisis del perfil de expresión génica mostró que CDs y MJ añadidos separadamente o en combinación estimularon la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la ruta biosintética de *trans*-resveratrol. El efecto sinérgico observado sobre la producción de *trans*-resveratrol fue el resultado del efecto sinérgico observado sobre la expresión de los genes de la ruta fenilpropanoide (Almagro *et al.*, 2014).

Por lo tanto, la elicitación con CDs separadamente o en combinación con MJ incrementa la producción de metabolitos secundarios en SC vegetales,

generando un sistema altamente productivo, sostenible y respetuoso con el medio ambiente.

### 3. ESPECIE VEGETAL OBJETO DE ESTUDIO: LA ZANAHORIA (*Daucus carota* L.)

La zanahoria (*Daucus carota* L.) es una planta angiosperma originaria del centro asiático y del mediterráneo, perteneciente a la familia de las Umbelíferas o Apiáceas, que cuenta con cerca de 250 géneros y más de 2500 especies, entre las que se incluyen otras muchas especies cultivadas de gran importancia para el hombre como el apio, el hinojo o el perejil. El sistema radicular consiste en una raíz primaria engrosada (Figura 13) que, incluyendo parte del hipocótilo, constituye el órgano de consumo de la especie. Además, está rodeado por numerosas raíces secundarias ramificadas y finas que sirven como órganos de absorción.



**Figura 13.** Inflorescencia de *D. carota* (izquierda) y raíces de *D. carota* (derecha).

Esta planta ha sido cultivada y consumida desde la antigüedad y utilizada en la medicina tradicional china para el tratamiento de diferentes enfermedades (Pant y Manandhar, 2007) ya que presenta una amplia gama de efectos beneficiosos, entre los que se incluyen su actividad antibacteriana (Rossi *et al.*, 2007), antifúngica y antihelmíntica (Tavares *et al.*, 2008), hepatoprotectora (Bishayee *et al.*, 1995) y actividad antitumoral (Jing *et al.*, 2008; Fu *et al.*,

2009). El término castellano “zanahoria” tiene su origen en la palabra árabe “isfannariya” ya que fueron verdaderamente los árabes los que introdujeron este cultivo desde el norte de África en España y, desde aquí, hasta Holanda y el resto del continente.

Muchas de estas propiedades beneficiosas de las raíces de zanahoria se deben a su metabolismo secundario. Se sabe que la ruta biosintética de isoprenoides es especialmente activa en raíces de zanahoria (Hampel *et al.*, 2005). Los terpenos volátiles son los principales responsables del aroma y sabor de este alimento, principalmente sesquiterpenos y monoterpenos (Alasalvar *et al.*, 2001; Kjeldsen *et al.*, 2001). Además, la principal característica de la zanahoria es la gran acumulación de carotenoides (que deben su nombre a esta especie) en sus raíces, hecho poco frecuente en plantas y que le dan junto a las antocianinas su color característico (Figura 14).



**Figura 14.** Diferentes raíces de zanahoria. Tomado de <http://keywordteam.net>.

Su apreciación como producto de gran valor nutricional se debe precisamente a estos altos niveles de carotenoides que tiene actividad como provitamina A que se degrada en retinol o vitamina A en el organismo humano. En el caso de la zanahoria, el contenido de carotenoides es de 10 hasta 1000 veces más elevado que en la mayoría de las hortalizas y este hecho aún puede ser superado con las líneas genéticas de mayor contenido que se han incorporado

recientemente en el mercado (Sabater-Jara, 2013). Además, numerosos estudios han demostrado que las SC de zanahoria sometidas a diferentes condiciones de estrés (infección fúngica, metales pesados o luz UV) son capaces de producir otros compuestos tales como antocianinas (Hirner *et al.*, 2001), cumarinas como 6-metoximeleína (Guo *et al.*, 1993) y compuestos derivados del ácido benzoico como el ácido *p*-hidroxibenzoico (Schnitzler *et al.*, 1992), por lo que la utilización de SC de zanahoria es una poderosa herramienta para la producción biotecnológica de numerosos compuestos bioactivos.

# **OBJETIVOS**





A la vista de los antecedentes descritos en la introducción, el objetivo general de la presente memoria se centra en el análisis de los metabolitos secundarios producidos por dos líneas celulares diferentes de *D. carota* (línea celular de zanahoria verde y línea celular de zanahoria naranja) tanto en condiciones control como en condiciones de elicitación. Además, se analizará el efecto de inhibidores sobre la producción de fitoesteroles y carotenoides.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos concretos:

- I. Caracterización de la producción de compuestos de naturaleza isoprenoide y compuestos fenólicos en SC de una línea celular verde de *D. carota* en condiciones control y en condiciones de elicitación con CDs, MJ, Hex y  $\beta$ -glu separadamente o en combinación.
- II. Caracterización de la producción de isoprenoides y compuestos fenólicos en SC de una línea celular naranja de *D. carota* en condiciones control y en condiciones de elicitación con CDs y MJ.
- III. Estudio de la producción de fitosteroles y carotenoides en SC de una línea celular naranja de *D. carota* en presencia de inhibidores de la ruta de biosíntesis de carotenoides y fitosteroles.
- IV. Estudio del perfil de expresión de los genes que codifican para las enzimas implicadas en la biosíntesis de los precursores de carotenoides y fitoesteroles en SC de una línea celular naranja de *D. carota* elicitada con CDs y/o en presencia del inhibidor de la ruta de biosíntesis correspondiente.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1 Material vegetal y condiciones de cultivo**

### **1.1 Inducción y mantenimiento de callos de las líneas celulares de *Daucus carota***

La inducción de los callos se realizó a partir de explantos que contenían células del cambium de la raíz de zanahoria. Para ello las raíces se desinfectaron por inmersión en etanol al 70% durante 1 minuto y a continuación en hipoclorito sódico al 20% durante 25 minutos. Los explantos desinfectados se cortaron y se depositaron sobre placas Petri que contenían un medio de cultivo consistente en medio basal (MS) (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con vitaminas, hormonas (1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético), hidrolizado de caseína (250 mg/L), sacarosa (3%) y agar, ajustándose el pH a 6,0 (Tabla 1). A partir de estas inducciones se obtuvieron dos líneas celulares claramente diferentes: línea celular de zanahoria verde y línea celular de zanahoria naranja (Figura 1).

Los callos friables que se obtuvieron de ambas líneas se mantuvieron en matraces de 250 mL de capacidad con 100 mL de medio de cultivo sólido bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a una irradiancia de 18,4 w/m<sup>2</sup> a 25 °C.

La línea celular de zanahoria naranja se mantuvo en el mismo medio de inducción. La línea celular de zanahoria verde se mantuvo en un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado con la mitad de macronutrientes y hormonas (0,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0,22 mg/L de 6-benciladenina) Los callos se subcultivaron periódicamente cada tres semanas y se utilizaron para la obtención de SC (Figura 1).



**Figura 1.** SC de la línea de zanahoria naranja y verde.

## **1.2 Iniciación y mantenimiento de suspensiones celulares**

Las SC se iniciaron mediante la transferencia de porciones de callo friable en matraces de 250 mL de capacidad, que contenían 100 mL del medio de cultivo líquido sin agar descrito anteriormente. Las SC de zanahoria verde y naranja se mantuvieron mediante subcultivos periódicos cada 14 y, 9 días, respectivamente.

## **2 Medida del crecimiento celular**

### **2.1 Determinación de la curva de crecimiento**

Para la obtención de la curva de crecimiento se partió de SC previamente establecidas. Posteriormente, 8 g de células filtradas en condiciones de esterilidad se transfirieron a matraces de 100 mL de capacidad que contenían 20 mL de medio de cultivo. Al día siguiente del inicio de la SC se recogieron muestras para los datos correspondientes al primer punto de la curva, considerando este como tiempo cero ( $t_0$ ). El resto de las muestras se recogieron cada 48 horas, durante un periodo de 25 días. La tasa de crecimiento se obtuvo mediante la determinación del volumen de empaquetamiento celular (VEC) y la conductividad, parámetros cuya medida se describe a continuación:

-VEC: indica el porcentaje de volumen celular en relación al volumen total de suspensión celular. Para su determinación se tomaron dos alícuotas de 3-5 mL de suspensión celular en agitación, por matraz y día de recogida, utilizando una pipeta estéril para cada muestra. A continuación, se centrifugaron a  $99\times g$ , durante 5 min a  $4^{\circ}C$ , en una centrifuga refrigerada Heraeus Sepatech.

-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  $60^{\circ}C$  durante 24 h. Pasado ese tiempo, se pesaron y se calculó el peso seco restando el peso de los filtros.

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

Volumen de empaquetamiento celular máximo ( $VEC_{max}$ ): es el umbral superior al que tiende el aumento de la biomasa.

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

## **2.2 Determinación de la viabilidad celular**

Para determinar la viabilidad celular, una alícuota de las SC se incubó durante 5 min en el medio de crecimiento, que contenía una disolución de diacetato de fluoresceína (DAF) y de ioduro de propidio (IP) ambos a la concentración de 0.01% (p/v). El DAF es un colorante vital que, al penetrar en las células, es hidrolizado por hidrolasas ligadas a la membrana (Stubberfield y Shaw, 1990) y



por las esterasas citoplasmáticas (Steward *et al.*, 1999) quedando la fluoresceína libre, la cual emite fluorescencia verde a 510 nm cuando se ilumina con luz azul de 493 nm. Por el contrario, el IP marca selectivamente las células muertas al intercalarse entre las bases del ADN, lo que permite visualizar los núcleos de las células muertas de color rojo ( $\lambda_{emisión} = 620 \text{ nm}$ ) cuando se excitan con una  $\lambda = 530 \text{ nm}$  (Duncan y Widholm, 1990). La fluorescencia se observó con un microscopio de fluorescencia Leica usando filtros específicos.

### **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, se utilizaron 4 g de PF de células en 20 mL de medio de cultivo en matraces de 100 mL de capacidad.

Las SC se incubaron durante el tiempo especificado para cada experimento con elicitores/inhibidores.

Transcurrido el tiempo de incubación, se recogieron muestras de cada tratamiento separando el medio de cultivo de las células en ausencia de esterilidad. Se recogieron igualmente los datos de pesos y volúmenes y se procedió a la liofilización de las células vegetales.

Los elicitores utilizados en este trabajo de investigación están descritos en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Elicitores utilizados para el tratamiento de SC de zanahoria.

| Elicitor      | Concentración | Casa comercial              |
|---------------|---------------|-----------------------------|
| $\beta$ -Gluc | 1 mg/L        | Sigma                       |
| Hex           | 40 $\mu$ M    | Sigma                       |
| CDs           | 50 mM         | Wacker Chemie<br>(Alemania) |
| MJ            | 100 mM        | Duchefa (España)            |

### 3.1 Elicitación con ciclodextrinas

Con la finalidad de encontrar la concentración de CDs óptima se realizaron experimentos de elicitación con distintas concentraciones: 50 mM y 70 mM ya que en estudios previos se observó que concentraciones inferiores no eran adecuadas. Para ello, distintas cantidades de CDs se añadieron a los medios de cultivo y se esterilizaron a 121°C durante 20 min antes de ser utilizados como medios de elicitación.

### 3.2 Elicitación con ciclodextrinas y jasmonato de metilo

El MJ se adicionó a los medios de cultivo una vez esterilizados, mediante filtración utilizando filtros de 0,22  $\mu$ m y realizando el proceso en la cabina de flujo laminar. La concentración elegida fue 100  $\mu$ M basada en estudios previos (Gunlach *et al.*, 1992; Mizukami *et al.*, 1993; Ketchum *et al.*, 1999; Sanchez-Sampedro *et al.*, 2005).

Todos los tratamientos con MJ se realizaron tanto en presencia como en ausencia de CDs. Además del tratamiento control sin elicitores y un tratamiento sólo con CDs se realizó un tratamiento que contenía etanol a la máxima concentración empleada en el experimento (1%) para corroborar que el efecto era debido al efecto de los elicitores y no a causa de una respuesta desencadenada por la presencia del etanol en el que esta disuelto el MJ.

### 3.3 Elicitación con MJ en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa

Para realizar estos experimentos se utilizó la línea celular naranja de *D. carota* crecida en presencia de 30 g/L de sacarosa. La elicitación se realizó

adicionando 100  $\mu\text{M}$  de MJ y utilizando un medio de cultivo suplementado con 10 o 30 g/L de sacarosa en el momento de la elicitación.

### **3.4 Elicitación con MJ y diferentes medios de cultivo**

La elicitación en presencia de MJ se llevó a cabo utilizando dos medios de cultivo diferentes, medio MS y medio de cultivo Gamborg con 10 y 30 g/L de sacarosa. Para ello, en el momento de la elicitación, las células fueron transferidas a este medio.

### **3.5 Elicitación con ciclodextrinas, $\beta$ -glucano y hexenol separadamente o en combinación**

Las SC de zanahoria verde fueron elicitadas con 1mg/L de  $\beta$ -gluc, 40  $\mu\text{M}$  de Hex en presencia o ausencia de CDs durante 7 días. Para ello los elicitores fueron aplicados al en condiciones de esterilidad después del autoclavado de medio de cultivo.

### **3.6 Adicción de Inhibidores**

Diferentes inhibidores fueron añadidos al medio de cultivo de SC de zanahoria naranja para evaluar su efecto sobre la producción de carotenoides y fitoesteroles. El Diflufenican (DFF) es un herbicida incluido dentro de las llamados "*bleachers*" que inhiben la acción de la enzima PDS y por tanto la biosíntesis de carotenoides. Por otro lado, la Terbinafina (T) inhibe la acción de la enzima SQO impidiendo la biosíntesis de fitoesteroles a partir de su precursor el escualeno.

Los herbicidas DFF (5, 10, y 20  $\mu\text{M}$ ) y T (0,2 mg/ml) fueron añadidos al medio al inicio de los experimentos de elicitación.

## **4 Extracción de metabolitos**

### **4.1 Extracción de metabolitos presentes en las células**

La extracción de los compuestos presentes en las células se realizó con el método descrito por Fraser *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Para ello, 100 mg de células liofilizadas de las dos líneas de fueron pulverizadas y homogeneizadas en un mortero. Las extracciones se realizaron en frío y en oscuridad, adicionando 500  $\mu\text{L}$  de metanol y 500  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl (50 mM, pH

7.5). Después de incubar durante 20 minutos a 4°C, se adicionó 1 mL de cloroformo (1:1, v/v) y se centrifugaron las muestras a 16110xg durante 5 minutos. La fase hidrofóbica fue recogida y la fase acuosa se volvió a extraer adicionando cloroformo. Las fases orgánicas fueron mezcladas y evaporadas en un rotavapor a 40°C. El residuo seco se conservó a -80°C hasta el momento de su análisis donde las muestras se resuspendieron en acetato de etilo.

#### **4.2 Extracción de metabolitos presentes en los medios de cultivo**

La extracción de los compuestos presentes en los medios extracelulares de zanahoria, se realizó mediante partición con fases con acetato de etilo (1:1). Transcurridas dos horas, la fase orgánica se recogió y se realizó una segunda extracción de la fase acuosa durante una hora con el fin de recoger todos los compuestos presentes en el medio extracelular. Pasado ese tiempo se recogió la fase orgánica (acetato de etilo) y se evaporó en un rotavapor a 40°C a vacío, el residuo seco se resuspendió en acetato de etilo para su posterior análisis cromatógrafo con un HPLC-DAD o GC/MS.

### **5 Identificación y cuantificación de metabolitos**

#### **5.1 Identificación y cuantificación de carotenoides y clorofilas**

Los primeros ensayos de identificación y cuantificación de carotenoides y clorofilas se realizaron en el laboratorio de Dr. Paul Fraser (Royal Holloway University of London, Inglaterra) usando un UPLC con una columna C18. Posteriormente, se optimizaron las condiciones de identificación y cuantificación de estos compuestos en la Universidad de Murcia, usando un HPLC (Sistema Waters conectado a un detector PDA 996). La columna utilizado fue una C18 de fase reversa (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4.6x150 mm) y el método usado fue el descrito por Fatimah *et al.* (2012) basado en el uso de acetonitrilo: agua (9:1) como solvente A y acetato de etilo como solvente B: 0-40% 40-60% solvente B (20-25 minutos), 60-100% solvente

B (25-25.1 minutos), 100% solvente B (25.1-35 minutos) y 100-0% solvente B (35-35.1 minutos) con un flujo de 1 mL/minuto.

## **5.2 Identificación y cuantificación de fitoesteroles, $\alpha$ -tocoferol y compuestos fenólicos**

Para la identificación y cuantificación de fitoesteroles,  $\alpha$ -tocoferol y compuestos fenólicos presente en las SC de zanahoria se utilizó un sistema cromatográfico Agilent Technologies 6890 Network GS System equipado con un detector de masas Agilent 5973. La separación de los compuestos se realizó sobre una columna capilar Agilent 19091 S-433 HP-5MS, con un flujo de 1,0 mL/ minuto de helio como gas portador. La temperatura del horno se programó desde 60°C hasta 310°C y el volumen de inyección fue de 1  $\mu$ L. El programa de análisis consistió en un inicio a 60°C con subida hasta 310°C alcanzando una temperatura máxima de 350°C. Los compuestos se detectaron con un grado de fiabilidad superior al 90% cuando se realizaron los análisis comparativos de los espectros de masas y el tiempo de retención experimentales y los obtenidos a partir de los patrones externos comerciales.

## **6 Análisis del perfil génico de cultivos celulares elicitados de zanahoria naranja**

### **6.1 Aislamiento y purificación de ARN**

Las SC de zanahoria naranja se sometieron a una elicitación con CDs y se incubaron los inidores de la ruta de carotenoides y fitoesteroles. El tratamiento control no contenía ningún elicitor ni inhibidor. Para realizar estos tratamientos se utilizó una densidad final de 200 g de PF de células/ L. Durante el periodo de elicitación, las SC se muestrearon a 24, 48 y 72 horas de tratamiento. El ARN total se extrajo a partir de células congeladas (0,50 g de PF) utilizando el reactivo Trizol y se trató con un kit de DNasa para eliminar las posibles contaminaciones de ADN genómico. A continuación, se realizó la purificación de ARN mediante el ARNeasy Mini Kit de acuerdo con los protocolos estándar

y se cuantificó la cantidad de ARN total con un espectrofotómetro NanodropND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, USA)

## 6.2 Síntesis de cDNA

El ARN purificado (0,50 µg) se utilizó para obtener cDNA a través de una reacción de transcripción reversa para la cual fue necesaria: 1X PCR Buffer II (Applied Biosystems), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 20 U inhibidor de RNasa, 50 U de transcriptasa reversa MuLV, 2,50 µM oligo d (T)<sub>18</sub> y agua DEPC-tratada. Las reacciones de cDNA se realizaron con un termociclador Mastercycler Gradiente de Eppendorf utilizando el siguiente programa: 60 minutos a 42°C y 5 minutos a 70°C.

## 6.3 Análisis con PCR cuantitativa en tiempo real

El estudio de la expresión diferencial de los genes que codifican las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de fitoesteroles (*sqs*) y carotenoides (*psy1* y *pds*) en SC de zanahoria elicidadas se realizó con ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR, equipo 7500 Fast Real Time PCR

System (Applied Biosystems). Las secuencias de genes utilizados para el análisis por qRT-PCR se diseñaron utilizando el software Oligo Explorer 1.2 en el caso de *sqs* mientras que *psy1* y *pds* fueron descritos por Cloutault et al., (2008) (Tabla 1). Para llevar a cabo las reacciones se utilizó un volumen final de 15 µl el cual contenía 7,50 µl de 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (incluyendo AmpliTaq Gold ADN polimerasa-LD, dNTPs y el colorante SYBR Green), 50 nM de cebadores específicos y una dilución de cDNA 1:10.

Para ello, después de una activación inicial de la polimerasa a 95°C durante 10 minutos, las muestras se sometieron a 40 ciclos de amplificación, cada uno comprendido por: desnaturalización (95°C durante 15 segundos), hibridación (60°C durante 1 minuto) y extensión (72°C durante 30 segundos), tras los cuales se realizó un paso de extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los niveles de transcritos se calcularon como expresión relativa según el manual de Giagen, teniendo como gen de referencia el factor de elongación de *D. carota*.

**Tabla 2.** Pares de cebadores utilizados para qRT-PCR en cultivos celulares de zanahoria.

| Gen         | Par de cebadores  | Tamaño<br>(pb) |
|-------------|---|----------------|
| <i>sqs</i>  | Sentido 5'→3': TGGATTAGGGTTGTCAAAGC<br>Antisentido 5'→3': CAAAACATGCGTGACTTTGGT   | 156            |
| <i>psy1</i> | Sentido 5'→3': TTGGGCAATCTATGTGTGGTGTAG<br>Antisentido 5'→3': GCCTTGGGCGTGATATGG  | 78             |
| <i>pds</i>  | Sentido 5'→3': TAACATGGCCTGAGAAAGTCAAGT<br>Antisentido 5'→3': CACGTAGGCTTGCCACCAA | 71             |

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





# **CAPÍTULO I**

***Caracterización metabólica de una línea celular  
de zanahoria (*Daucus carota*) verde***



## HIPÓTESIS DE PARTIDA

Los metabolitos secundarios pueden actuar como fitoalexinas formando parte de las defensas químicas contra el estrés biótico y abiótico. Una estrategia para la producción biotecnológica de estos compuestos por cultivos celulares consiste en el tratamiento con elicitores y moléculas señal que desencadenan respuestas de defensa en la célula vegetal (Yukimune *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2005). Aunque estos tratamientos promueven la producción de metabolitos secundarios, la productividad alcanzada no suele ser competitiva para su aplicación industrial. Actualmente sólo se ha llegado a este nivel con algunos cultivos celulares como los de *Lithospermum erythrorhizon* y *Taxus* para producir siconina (Fujita, 1988; Petersen-Mahrt *et al.*, 1994) y taxol (Son *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002), respectivamente.

Se sabe que la ruta de isoprenoides es especialmente activa en zanahoria. De hecho, una de las principales características de esta especie vegetal es la gran cantidad de carotenoides que acumula en su raíz. Además, otros isoprenoides de especial relevancia tanto para el ser humano como para la propia planta por su actividad biológica son los fitoesteroles. Hoy en día, la metodología clásica de extracción de fitoesteroles procedentes de materia prima vegetal es la destilación por desodorización de aceites vegetales (Llamos *et al.*, 2008). Además, la gran cantidad de material necesario para extraer una cantidad significativa de los fitoesteroles procedentes de fuentes naturales hace que el coste de estos productos y su impacto sobre el medio ambiente sean muy elevados. Con el objetivo de superar las limitaciones de los métodos clásicos de extracción de la materia prima vegetal, nuestro grupo de investigación desarrolló un método de producción y liberación de fitoesteroles basado en la adición de CDs al medio de crecimiento de las células vegetales *in vitro* (Sabater-Jara, 2008). La ventaja más importante de estos cultivos celulares frente a la utilización de plantas completas es la facilidad de aislamiento del producto y de su purificación, especialmente cuando el producto se secreta al medio de cultivo (Cai *et al.*, 2012). Así, el uso de compuestos que retiren los metabolitos de interés *in situ* incrementa la productividad del sistema, un factor clave para su producción biotecnológica. En este sentido, nuestro grupo de

investigación desarrolló una nueva estrategia para la producción de *trans*-resveratrol empleando cultivos celulares de vid elicitados con CDs (Bru *et al.*, 2006), consiguiendo altos rendimientos. Se ha observado que las CDs ponen en marcha mecanismos de secreción del *trans*-resveratrol que posibilitan su acumulación extracelular, que no se activan con otros elicitores utilizados en cultivos celulares de vid.

A la vista de los antecedentes descritos anteriormente, el objetivo general que se plantea en el presente capítulo es la caracterización de una línea celular procedente de raíz de zanahoria (línea celular de zanahoria verde) con el fin de determinar los niveles de producción de los diferentes metabolitos de interés.

## **1 Caracterización metabolómica de cultivos celulares de zanahoria verde**

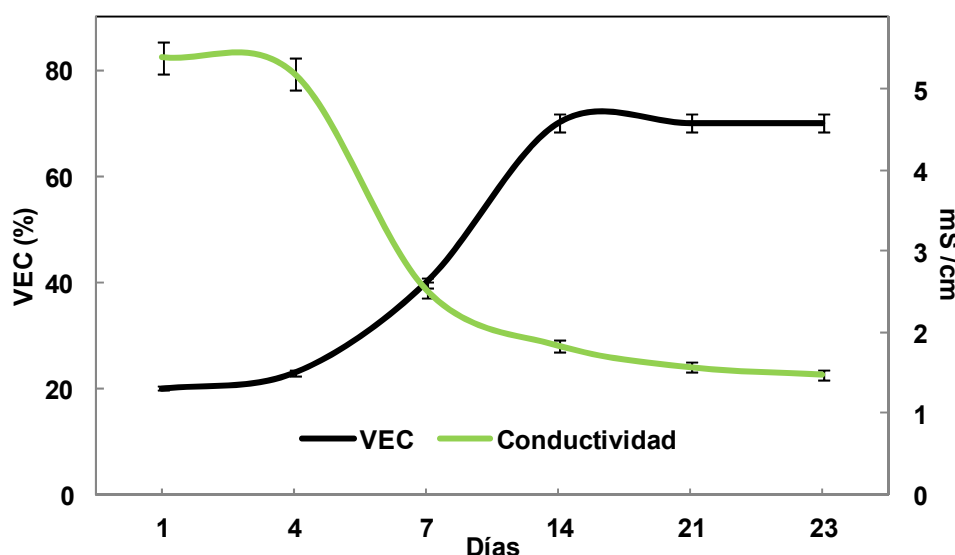
### **1.1 Caracterización del crecimiento de los cultivos celulares de zanahoria verde**

En primer lugar se realizó la caracterización del crecimiento de la línea celular de zanahoria verde. La determinación del perfil de crecimiento se realizó en SC previamente estabilizadas a lo largo de los subcultivos, con el fin de determinar con exactitud la duración de las distintas fases del crecimiento. En la bibliografía se describe que el tiempo considerado para realizar una curva de crecimiento difiere desde 10 hasta 100 días (Wakamatsu y Takahama 1993, López-Arnaldos *et al.*, 2002). Sin embargo, todos los autores coinciden en una primera fase de crecimiento lento, seguido de un crecimiento exponencial. Además, si el experimento se prolonga lo suficiente en el tiempo, se llega a una fase estacionaria o de senescencia. Para caracterizar el crecimiento celular, se tomaron muestras periódicas desde el inicio del cultivo hasta los 23 días, tiempo tras el cual las células empezaban a pardearse. Simultáneamente, se midieron algunos parámetros característicos del crecimiento como el VEC y la conductividad del medio del cultivo.

La Figura 1 muestra la curva de crecimiento expresada como VEC, es decir, como porcentaje de volumen celular en relación al volumen total de suspensión

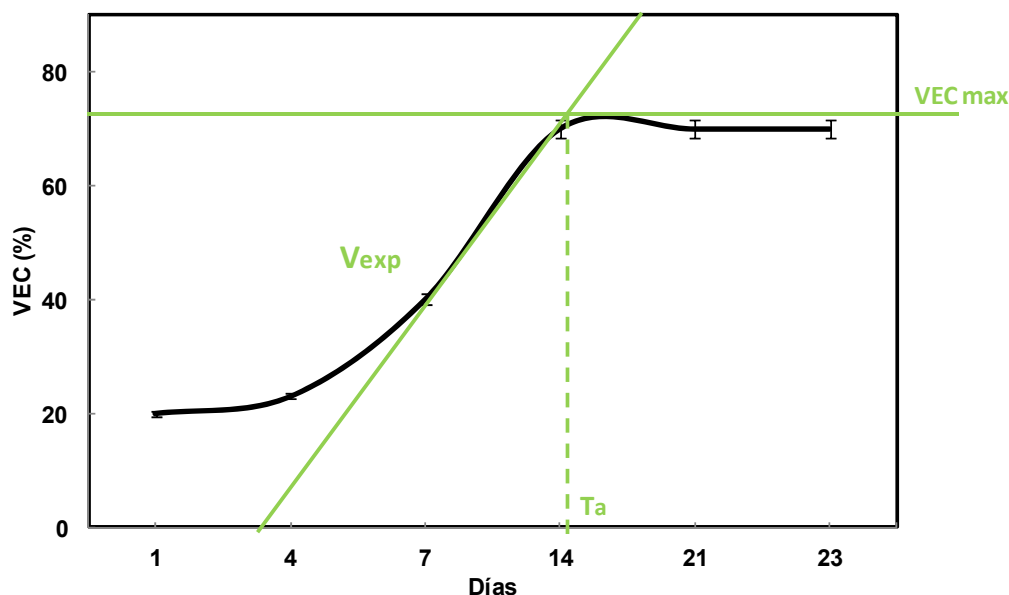
celular. Como se puede observar, esta curva de crecimiento fue típicamente sigmoideal distinguiéndose la fase de latencia o “lag” desde su inicio hasta el comienzo del crecimiento en fase exponencial (día 4); la fase “log”, que comprendió desde el comienzo de la fase de crecimiento exponencial hasta que se observó una disminución de la acumulación de biomasa (día 14) y la fase “estacionaria” que abarcó desde el día 14 hasta el final del cultivo.

Con el fin de caracterizar el crecimiento de las SC, la medida de VEC fue acompañada de la medida de conductividad del medio de cultivo en el que crecen las células (Figura 1). En relación a la conductividad del medio, se observó una variación inversamente proporcional a la curva de crecimiento. La conductividad del medio extracelular está directamente relacionada con la concentración de iones en el medio. Por lo tanto, cuando las células están en la fase de mayor actividad del metabolismo primario (fase exponencial), consumen una mayor cantidad de nutrientes minerales disminuyendo enormemente su concentración en el medio de cultivo. Durante la fase “lag” y “estacionaria”, la actividad del metabolismo primario es menor, por ello, las variaciones de la conductividad son también menores.



**Figura 1.** Representación de la curva de crecimiento (expresada como VEC) y de la conductividad durante el crecimiento de las SC de la línea de zanahoria verde. Los valores representados son las medias de tres réplicas independientes.

Por otro lado, se analizó la cinética de crecimiento de las SC de la línea de zanahoria verde. Para ello, se utilizaron las ecuaciones descritas en el apartado II de Material y Métodos. Dichos parámetros se muestran representados en la Figura 2. La caracterización de la curva de crecimiento se realizó en base a los parámetros cinéticos “velocidad de crecimiento en la fase exponencial” ( $V_{exp}$ ), “volumen de empaquetamiento celular máximo” o biomasa máxima generada ( $VEC_{m\acute{a}x}$ ) y “tiempo de agotamiento” ( $T_a$ ), obtenidos a partir de los datos cinéticos de la curva de crecimiento. Los valores de estos parámetros cinéticos fueron  $VEC_{m\acute{a}x}$  del 70%,  $V_{exp}$  3,57 gPF/día y  $T_a$  de 14 días (Figura 2).



**Figura 2.** Representación de los parámetros cinéticos de crecimiento de las SC de la línea de zanahoria verde. Los valores representados son las medias de tres réplicas independientes.

## 1.2 Caracterización de la producción de isoprenoides en cultivos celulares de zanahoria verde

La zanahoria es una importante planta cultivada en todo el mundo debido a las propiedades nutritivas de su raíz. La raíz de zanahoria ha sido usada en la medicina tradicional debido a sus efectos antibacterianos, antifúngicos y hepatoprotectores, entre otros (Rossi *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2008; Bishayee *et al.*, 1995). Además de ser una de las principales fuentes de

provitamina A, la zanahoria contiene numerosos compuestos de gran interés como las cumarinas (Mercier *et al.*, 2000) y el ácido hidroxibenzoico (Sircar *et al.*, 2009). También contiene terpenoides volátiles y otros compuestos isoprenoides como los carotenoides (Zeb *et al.*, 2004), fitosteroles (Sabater-Jara y Pedreño, 2013), clorofilas (Perrin *et al.*, 2016) y tocoferoles (Ombódi *et al.*, 2014). La producción de estos compuestos, además, se incrementa bajo condiciones de estrés. De hecho, se sabe que estos cultivos responden frente a severas condiciones de estrés produciendo compuestos fenólicos como ácidos cafeoilquínicos (Jacobo-Velázquez, 2005).

Por otro lado, se ha observado que cultivos celulares de zanahoria pueden producir ácido hidroxibenzoico en condiciones de elicitación (Schitzler *et al.*, 1992). Además, Sircar y Mitra (2009) mostraron que la presencia de quitosano aumentó la producción de ácido hidroxibenzoico en cultivo de raíces de zanahoria tras 36 h de tratamiento. Otros factores como la luz también influyen en el perfil metabolómico de cultivos de zanahoria variando, entre otros, la producción de terpenoides volátiles (Mukherjee *et al.*, 2016). Otros compuestos de interés sintetizados en las raíces de zanahoria son los compuestos isoprenoides. Entre ellos se encuentran los carotenoides, compuestos característicos de la zanahoria y que deben su nombre a esta especie (*Daucus carota*). Muchos de ellos son precursores de la vitamina A y tiene un gran poder antioxidante (Stahl y Sies, 2007). También se han descrito otros isoprenoides como los fitosteroles. Estos compuestos han tenido especial relevancia en las últimas décadas por su capacidad para reducir los niveles de colesterol (Derdemezis *et al.*, 2010; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011), por su actividad anticancerígena y por su actividad antioxidante (Delgado-Zamarreño *et al.*, 2009; Woyengo *et al.*, 2009). En zanahoria también se ha detectado  $\alpha$ -tocoferol, un potente agente antioxidante asociado a la prevención de problemas coronarios, problemas de visión y problemas asociados al sistema inmune (Stapmfer y Rimm, 1995; Ricciarelli *et al.*, 2001). Además,  $\alpha$ -tocoferol es la forma más activa de la vitamina E, la cual tiene una importante acción antioxidante frente a la oxidación lipídica. Otro tipo de compuestos de naturaleza isoprenoide analizados en este estudio son las clorofilas que



presentan actividad anticancerígena y antimutagénica. De hecho, ya en la década de los años 30 y 40 se realizaron estudios que sugerían que las clorofilas podían ser útiles en los tratamientos contra el cáncer (Dashwood, 1997). Además, se ha demostrado su efectividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo*, su efecto en la prevención de cáncer e incluso la inducción de eventos de apoptosis en líneas celulares cancerígenas (Ferruzzi, 2007).

Además de los compuestos isoprenoides, los compuestos fenólicos también tienen gran interés por su poder antibacteriano o su uso como aromas y aditivos. Así, compuestos como el eugenol o isoeugenol poseen propiedades antioxidantes y anticancerígenas y se han utilizado como antisépticos (Hopp y Mori, 1992).

Teniendo en cuenta los diferentes compuestos que la zanahoria es capaz de producir, se caracterizó la línea celular de zanahoria verde y se evaluó el efecto de diferentes elicitores para incrementar la producción de estos compuestos bioactivos.

Antes de realizar los experimentos de elicitación, se analizaron los metabolitos que las SC de zanahoria verde producen de manera constitutiva mediante cromatografía líquida (HPLC y UPLC con detector de diodo array, HPLC- y UPLC-DAD) y cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC/MS). Como se observa en la Tabla 1, los carotenoides son los isoprenoides predominantes en esta línea celular verde. En concreto la luteína fue el pigmento más característico del cultivo encontrándose una producción de  $240 \pm 3,50 \mu\text{g/g PS}$  a los 7 días de iniciar la SC. La luteína es una xantofila derivada del  $\alpha$ -caroteno que no posee actividad como provitamina A. Sin embargo, es de interés para el ser humano ya que su presencia en la mácula de la retina es esencial para su protección frente a la degeneración oxidativa (Chucair *et al.*, 2007). Además, se le atribuye la función de filtrar la luz azul en la retina humana (Kijlstra *et al.*, 2012). También se acumuló  $\beta$ -caroteno aunque a concentraciones más bajas ( $9,64 \pm 0,6 \mu\text{g/g PS}$ ) que la luteína y se identificaron otros carotenoides como violaxantina, anteraxantina y  $\alpha$ -caroteno (datos no mostrados).

Por otro lado, se identificó otro compuesto de gran interés, el  $\alpha$ -tocoferol, cuya acumulación a los 7 días de cultivo fue de  $86,2 \pm 6,0 \mu\text{g/g PS}$ . Finalmente, se identificaron y cuantificaron las clorofilas a y b, responsables del color verde de esta línea celular. Todos estos isoprenoides se forman a partir de GGPP mediante la unión de DMAPP y IPP, precursores sintetizados por la ruta plastidial del MEP. Sin embargo, también se identificaron otros compuestos isoprenoides, como los fitosteroles, que son biosintetizados a partir de la ruta citosólica del MVA. De hecho, a los 7 días de haberse iniciado la SC la acumulación de estos componentes esenciales de membrana fue de  $62,23 \pm 38,5 \mu\text{g/g PS}$ .

**Tabla 1.** Acumulación de los principales compuestos isoprenoides identificados a los 7 días del inicio de la SC de zanahoria verde. Los carotenoides y las clorofilas fueron analizadas por HPLC-DAD mientras que los tocoferoles y los fitosteroles fueron analizados por GC/MS.

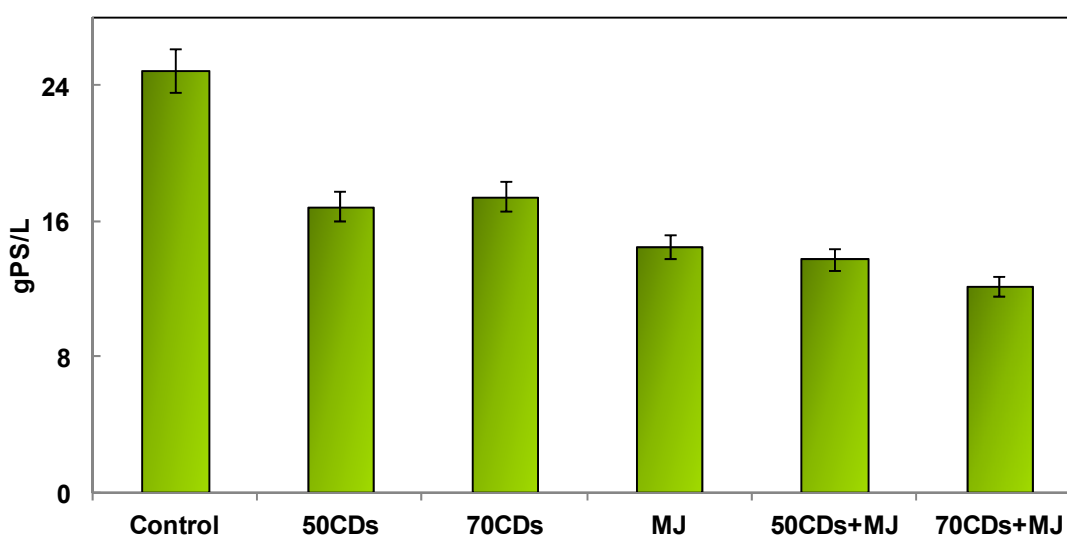
| Compuesto isoprenoide                | Producción ( $\mu\text{g/g PS}$ ) |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Luteína</b>                       | $240 \pm 3,5$                     |
| <b><math>\beta</math>-caroteno</b>   | $9,6 \pm 0,6$                     |
| <b><math>\alpha</math>-tocoferol</b> | $86,2 \pm 6,0$                    |
| <b>Clorofilas (a y b)</b>            | $51,9 \pm 2,7$                    |
| <b>Fitosteroles</b>                  | $62,23 \pm 38,5$                  |

### 1.3 Caracterización del crecimiento de los cultivos celulares de zanahoria verde elicitados con CDs y/o jasmonato de metilo

Los isoprenoides son metabolitos secundarios cuya función es actuar como defensa química de la planta frente a diferentes estreses. Así, una estrategia para la producción biotecnológica de estos compuestos por cultivos celulares consiste en el tratamiento con elicitores y moléculas señal que desencadenan respuestas de defensa en la célula vegetal (Yukimune *et al.*, 1996; Zhao *et al.*,

2005). Además, se han desarrollado estrategias no sólo para incrementar la producción de metabolitos secundarios sino también para aumentar su recuperación desde el medio de cultivo. Por ejemplo, nuestro grupo de investigación desarrolló una nueva estrategia para la producción de *trans*-resveratrol empleando cultivos celulares de vid elicitados con CDs y MJ (Belchí-Navarro *et al.*, 2012), consiguiendo altos rendimientos. Así, en presencia de CDs no solo se indujo la biosíntesis de *trans*-resveratrol sino que se incrementó su acumulación en medios acuosos y se facilitó su recuperación desde el medio de cultivo (Belchí-Navarro *et al.*, 2012).

Antes de realizar los experimentos de elicitación, se caracterizó el crecimiento celular de las SC de zanahoria verde en presencia de elicitores tal y como se describe en apartado 3.2 de Material y Métodos. Como se observa en la Figura 3, las células tratadas con 50 y 70 mM de CDs mostraron una disminución del crecimiento del 32% y del 30% respectivamente con respecto a los tratamientos control. Sin embargo, esta disminución del crecimiento no afectó a la viabilidad celular. El crecimiento celular en presencia de MJ fue significativamente menor (un 42% menor en comparación con los cultivos control). Esta reducción de la biomasa celular no se produjo como consecuencia de una lisis celular ya que durante todo el periodo de elicitación, las células se mantuvieron vivas. Además, en presencia de ambos elicitores se produjo una reducción drástica del crecimiento celular (45% y 51% para 50 mM CDs y MJ conjuntamente y 70 mM CDs y MJ conjuntamente, respectivamente).



**Figura 3.** Efecto de diferentes concentraciones de CDs (50 y 70 mM) y 100  $\mu$ M de MJ separadamente o en combinación sobre el crecimiento celular de SC de zanahoria verde transcurridos 7 días de elicitación (datos expresados en g PS/L). Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

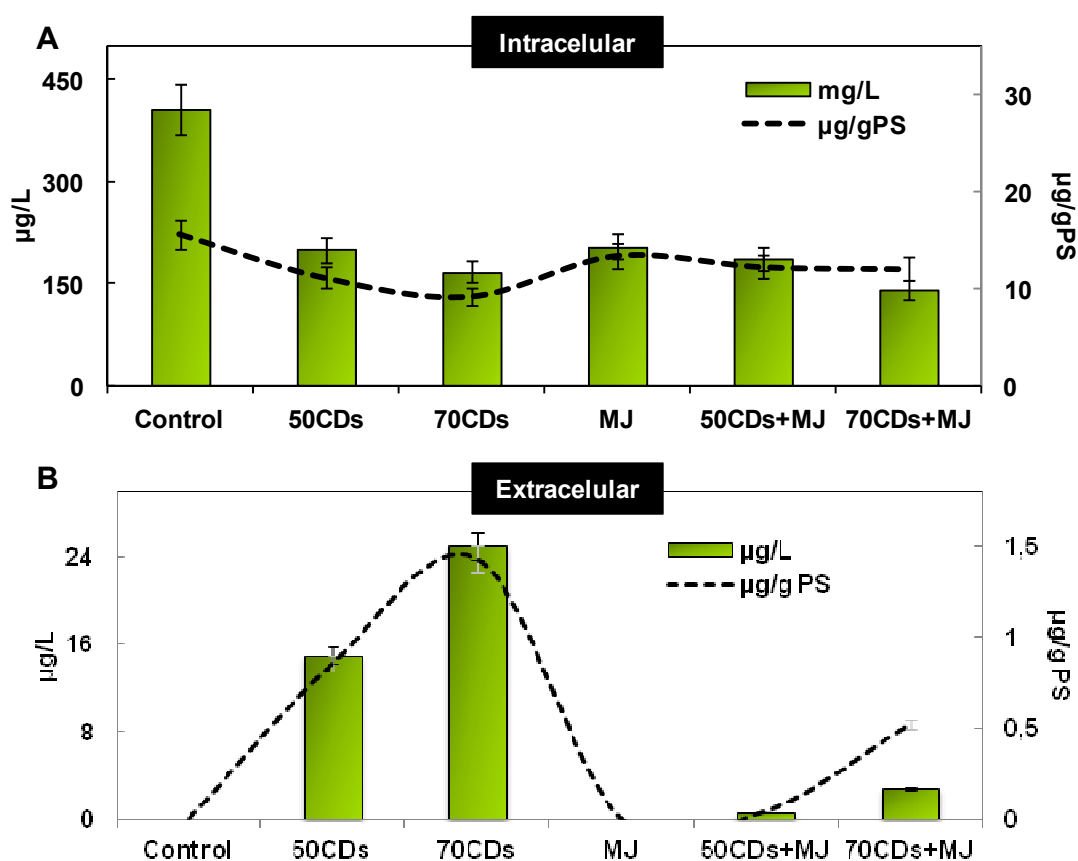
#### 1.4 Identificación y cuantificación de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria verde elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo

Tras los experimentos de elicitación de SC de zanahoria verde con 50 o 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ separadamente o en combinación, se realizó la extracción de los compuestos isoprenoides presentes tanto en el interior celular como en el medio de cultivo. A continuación, se analizó por HPLC-DAD y GC/MS, la posible presencia de compuestos de naturaleza terpenoide característicos del género *Daucus* como los carotenoides.

Uno de los carotenoides identificados en las SC de zanahoria verde fue el  $\beta$ -caroteno (Figura 4). Los resultados de la elicitación con CDs y MJ mostraron que el mayor contenido de este pigmento se encontró en el tratamiento control (15,6  $\pm$ 1,4  $\mu$ g/g PS) y en el tratamiento con MJ (16,1  $\pm$ 1,5  $\mu$ g/g PS). Sin embargo, la presencia de CDs provocó una ligera disminución de su producción alcanzándose valores de 12,4 y 9,2  $\mu$ g/g PS en los tratamientos con 50 y 70 mM de CDs, respectivamente. Además, la combinación de ambos

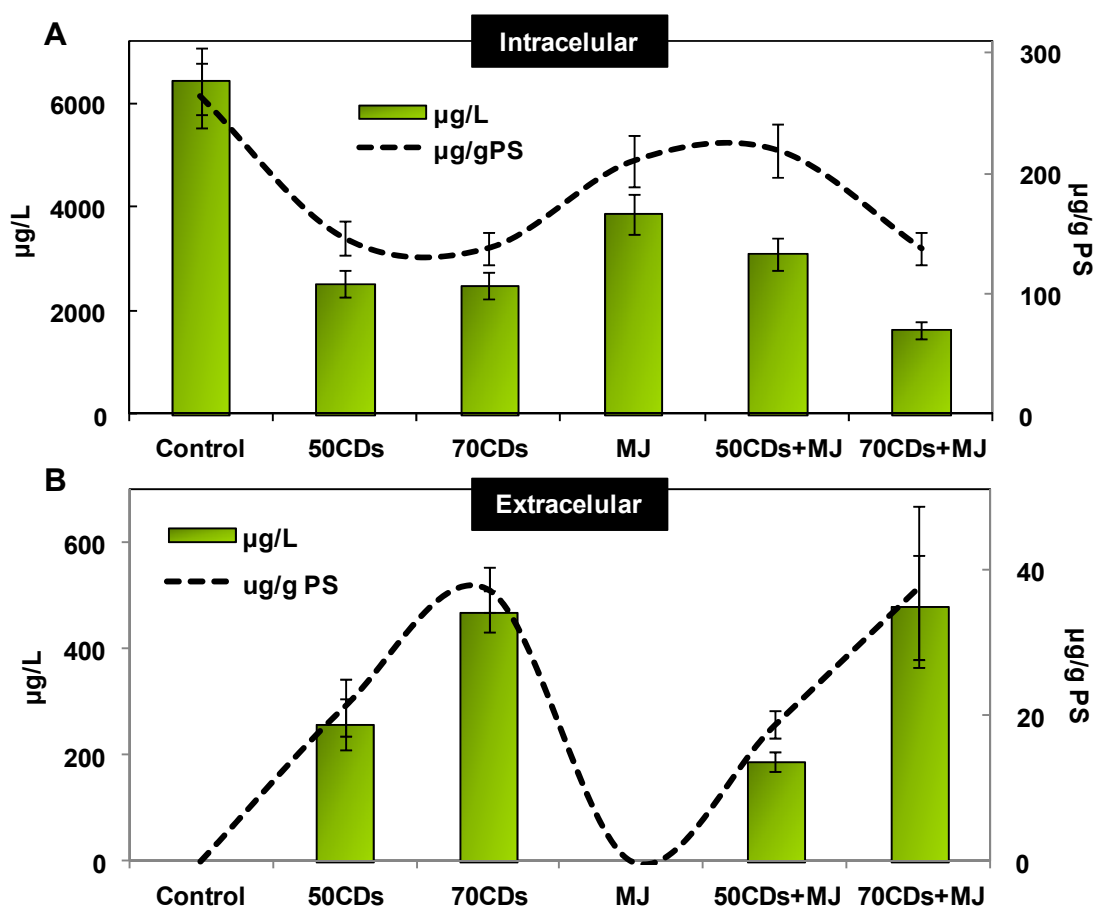
elicitores no alteró los niveles de producción de  $\beta$ -caroteno respecto al tratamiento con CDs solas (Figura 4A).

Por otro lado, los niveles de  $\beta$ -caroteno detectados en el medio extracelular fueron de un orden de magnitud inferiores a los encontrados en el interior celular (Figura 4B). Además, el tratamiento que provocó una mayor secreción de este compuesto al medio extracelular fue el de 70 mM de CDs, alcanzándose valores de  $25,1 \pm 1,2 \mu\text{g/L}$ . Por lo tanto, teniendo en consideración que tanto la producción de  $\beta$ -caroteno como el crecimiento celular fue mayor en el tratamiento control, la estrategia más efectiva para obtener este compuesto en grandes cantidades es su extracción directa a partir de células no elicitadas ( $406,9 \pm 37,8 \mu\text{g/L}$ ).



**Figura 4.** Efecto de 50 y 70 mM de CDs y 100  $\mu\text{M}$  de MJ solos o en combinación sobre la acumulación intracelular (A) y extracelular (B) de  $\beta$ -caroteno en SC de zanahoria verde tras 7 días de tratamiento. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 5A, el tratamiento control presentó el mayor contenido de luteína intracelular, alcanzándose valores de  $6434,8 \pm 641,4 \mu\text{g/L}$  (lo que equivale a  $264,61 \pm 24,5 \mu\text{g/g PS}$ ). Los tratamientos con 50 o 70 mM de CDs solos o en combinación con MJ presentaron un comportamiento similar, mostrando valores de luteína más bajos que el control (alrededor de un 45%). El tratamiento que indujo los niveles más bajos de luteína fue la combinación de 70 mM de CDs y MJ ( $137,7 \pm 12,9 \mu\text{g/g PS}$ ), mientras que la acumulación en presencia de MJ fue de  $210,53 \pm 19,9 \mu\text{g/g PS}$ , lo que equivale a  $3862,5 \mu\text{g/L}$ .



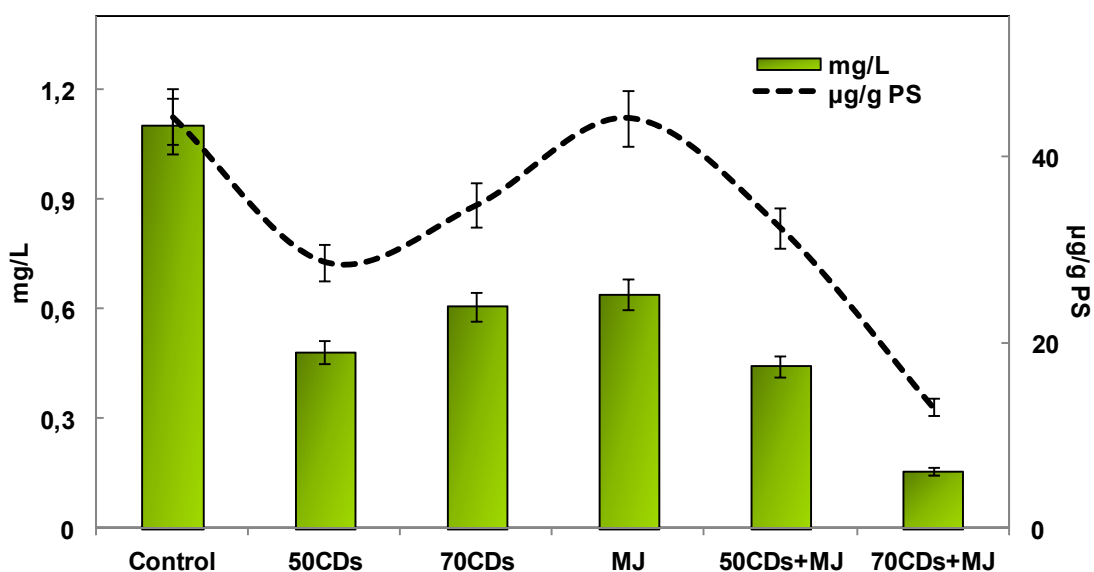
**Figura 5.** Efecto de 50 y 70 mM de CDs separadamente o en combinación con  $100 \mu\text{M}$  de MJ sobre la acumulación intracelular (A) y extracelular (B) de luteína en SC de zanahoria verde tras 7 días de elicitación. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Por otro lado, como se observa en la Figura 5B, sólo en aquellas SC tratadas con CDs se detectó luteína en el medio extracelular. Además, la concentración de 70 mM fue más efectiva para la extracción y acumulación de esta xantofila en el medio extracelular ( $471,5 \pm 39,0 \mu\text{g/L}$ ) y su combinación con MJ no incrementó la producción ( $480,5 \pm 98,1 \mu\text{g/L}$ ) (Figura 5B). Por tanto, estos resultados sugieren que las CDs son capaces de inducir la secreción de luteína al medio extracelular y formar complejos de inclusión con este compuesto incrementando su solubilidad en el medio acuoso. De manera similar, Rizello *et al.* (2014) también mostraron que CDs incrementaron el contenido extracelular de carotenoides, como luteína y  $\beta$ -caroteno, en SC de *Artemisia annua*.

Por otro lado, MJ parece disminuir la acumulación de luteína en estos cultivos celulares. Resultados similares fueron observados por Jung (2004) ya que la aplicación exógena de MJ provocó una disminución de las xantofilas como luteína y violaxantina en plantas de *Arabidopsis*. Este autor observó que la presencia de MJ inducía la conversión de violaxantina en zeaxantina y disminuía la acumulación de otros carotenoides como luteína y  $\beta$ -caroteno.

### **1.5 Identificación y cuantificación de fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria verde elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo**

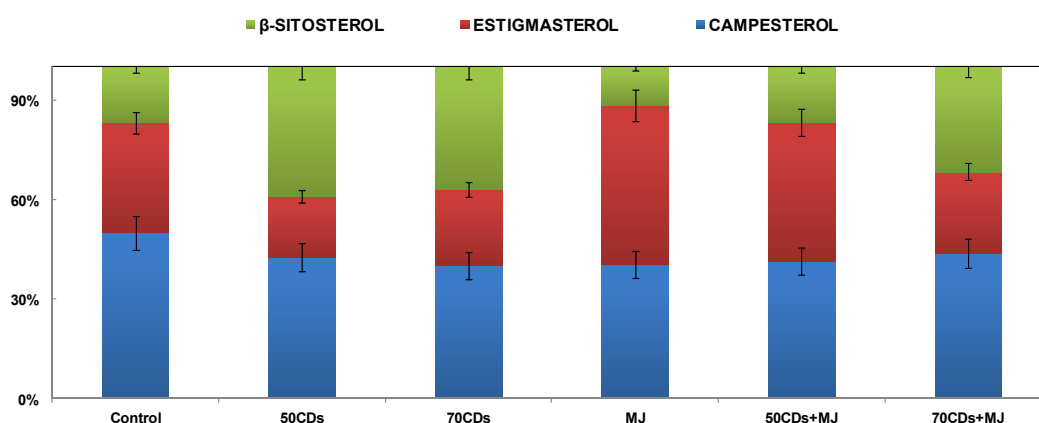
Los resultados mostrados en la Figura 6 indicaron que la presencia de CDs solas ( $0,6 \pm 0,04 \text{ mg/L}$ ) o en combinación con MJ ( $0,4 \pm 0,03 \text{ mg/L}$ ) disminuyó la producción intracelular de fitoesteroles expresados en mg/L respecto al control ( $1,1 \pm 0,06 \text{ mg/L}$ ), mientras que no se observaron diferencias significativas en la producción de estos compuestos entre control y MJ cuando la producción fue expresada en relación al PS ( $\mu\text{g/g PS}$ ).



**Figura 6.** Efecto de 50 y 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ solos o en combinación sobre la acumulación intracelular de fitoesteroles en SC de zanahoria verde tras 7 días de elicitación. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

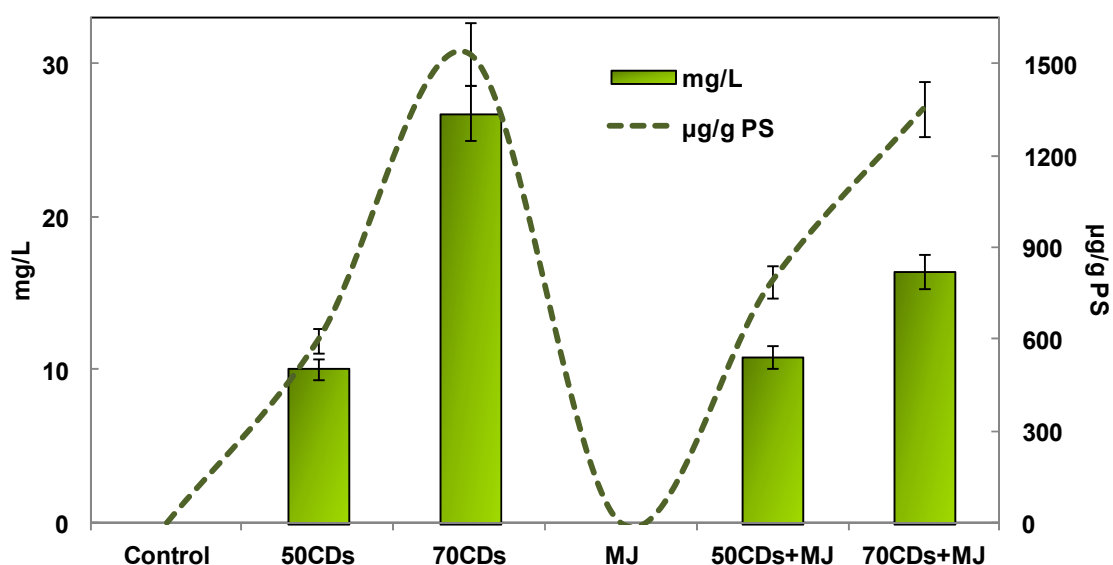
Asimismo se analizó la proporción de cada fitoesterol en cada tratamiento de elicitación (Figura 7). Los resultados mostraron que MJ estimuló la producción de estigmasterol frente a la producción de  $\beta$ -sitosterol mientras que las CDs indujeron un aumento en la biosíntesis de  $\beta$ -sitosterol. Fucosterol que es el precursor de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, no fue detectado en las células, posiblemente debido a que el fucosterol es transformado en  $\beta$ -sitosterol y este a su vez se convierte en estigmasterol.





**Figura 7.** Proporción de fitoesteroides en el interior celular en presencia de 50 y 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ solos o en combinación en SC de zanahoria verde tras 7 días de elicitación

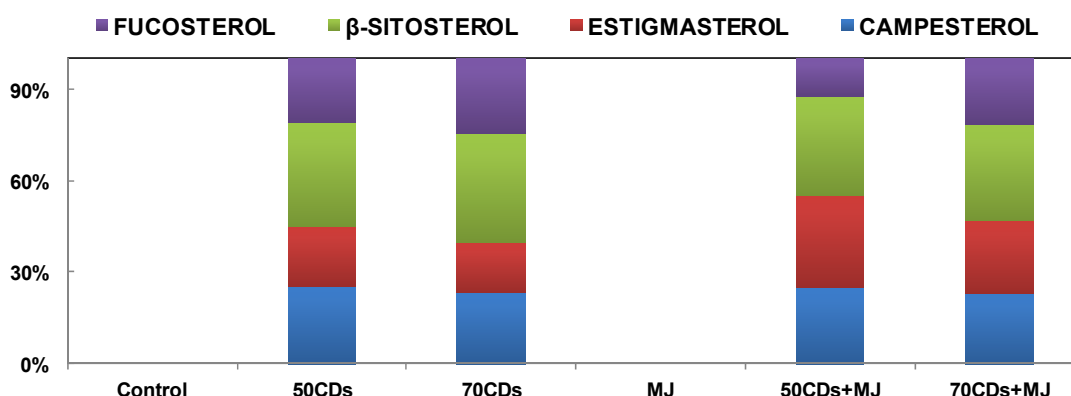
Los fitoesteroides también fueron identificados y cuantificados en el medio extracelular. Como se observa en la Figura 8, solamente en presencia de CDs hubo una secreción y acumulación de fitoesteroides en el medio extracelular. Al igual que ocurre con los carotenoides, el tratamiento que provocó una mayor acumulación de fitoesteroides en el medio extracelular fue 70 mM de CDs ( $26,8 \pm 1,8$  mg/L lo que equivale a  $1533,6 \pm 104,1 \mu\text{g/g}$  PS). Coincidiendo con nuestros resultados, estudios previos han mostrado que las CDs son capaces de extraer los fitosteroides y secretarlos al medio extracelular en cultivos celulares de zanahoria (Sabater-Jara y Pedreño, 2013). Además, la presencia de MJ provocó una considerable disminución de la producción de fitoesteroides en SC de zanahoria verde. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Bonfill *et al.* (2011) quienes mostraron que los niveles de fitoesteroides disminuyeron cuando MJ fue aplicado a SC de *Centella asiatica*. Mangas *et al.* (2006) también observaron que 100  $\mu$ M de MJ redujo los niveles de fitoesteroides en vitroplantas de *C. asiatica*, *Galphimia glauca* y *Ruscus aculeatus*.



**Figura 8.** Efecto de 50 y 70 mM de CDs y 100 µM de MJ solos o en combinación sobre la acumulación extracelular de fitoesteroles en SC de zanahoria verde tras 7 días de elicitación. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

En relación a la proporción de fitoesteroles en el medio extracelular, se detectó fucosterol, un fitoesterol que no estaba presente en el interior celular. El fitoesterole encontrado en mayor proporción fue el  $\beta$ -sitosterol (Figura 9). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sabater-Jara y Pedreño (2013), quienes encontraron el  $\beta$ -sitosterol como fitoesterol mayoritario en cultivos celulares de zanahoria tras 7 días de tratamiento con 50 mM de CDs.

Por otro lado, la presencia de MJ incrementó ligeramente la proporción de estigmasterol (Figura 9) al igual que ocurría en las células. Estos resultados sugieren que el estigmasterol podría ser inducido bajo condiciones de estrés. Esto coincide con los resultados encontrados por Griebel y Zier (2010), quienes relacionaron el estigmasterol con la respuesta de defensa de *A. thaliana* frente a *P. syringae*.

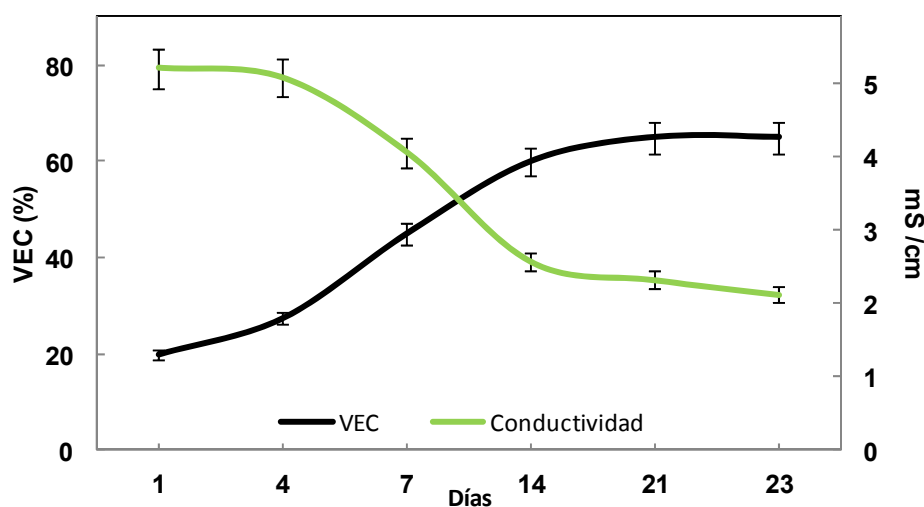


**Figura 9.** Proporción de fitoesteroles en el medio extracelular en presencia de 50 y 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ solos o en combinación en SC de zanahoria verde tras 7 días de elicitación.

### 1.6 Caracterización de la producción de compuestos isoprenoides en cultivos celulares de zanahoria verde elicidadas con ciclodextrinas

Es conocido que las CDs actúan como verdaderos elicitors induciendo la biosíntesis de metabolitos secundarios en diferentes cultivos celulares (Morales *et al.*; 1998., Almagro *et al.*, 2011 y 2012; Briceño *et al.*, 2012). Estos elicitors tiene además la habilidad de formar complejos de inclusión con compuestos apolares favoreciendo su acumulación en medios acuosos (Sabater-Jara y Pedreño, 2013). Además, en estudios previos realizados por Bru *et al.* (2006) se determinó que la concentración de 50 mM de CDs fue suficientemente alta para estimular la biosíntesis de metabolitos y para extraer y acumular estos compuestos al medio de cultivo. Además, aunque en el estudio previo se observó que 70 mM de CDs era la concentración más eficiente extrayendo compuestos al medio de cultivo, por una cuestión de optimización de recursos y teniendo en cuenta que la tendencia fue similar se decidió usar una concentración de 50 mM CDs. Así, se evaluó el efecto de las CDs metiladas al azar sobre la producción de fitosteroles durante 21 días analizando periódicamente el contenido total de fitosteroles tanto intra- como extracelularmente.

Previo al análisis de compuestos isoprenoides se caracterizó el crecimiento celular de SC de zanahoria verde elicidadas con 50 mM de CDs. Para ello, se partió de una densidad del 20% de VEC, lo que equivale a una densidad celular de 200 g PF/L. El  $VEC_{max}$  alcanzado en presencia de CDs fue del 65% frente al 70% encontrado en el tratamiento control (Figura 1). La disminución del crecimiento en presencia de CDs no fue provocada por muerte celular ya que las células permanecieron vivas durante todo el tiempo de cultivo. Estos resultados fueron también observados por Almagro *et al.* (2014) en SC de *Vitis vinifera* donde la presencia de CDs disminuyó el crecimiento y los procesos de división celular. La conductividad también disminuyó de manera más lenta que en células control alcanzando al final del ciclo celular 2,12 mS/cm. Al presentar un crecimiento más lento que el control y un VEC más bajo,  $T_a$  fue mayor de 14 días (Figura 10).



**Figura 10.** Representación de la curva de crecimiento (expresada como VEC) y de la conductividad durante el crecimiento de las SC de la línea de zanahoria verde elicidadas con 50 mM de CDs. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes

En relación a la conductividad del medio, tal y como ocurre en el tratamiento control se observó una variación inversamente proporcional a la curva de crecimiento. De hecho, cuando las células están en la fase exponencial, el consumo de nutrientes minerales del medio fue mayor y por tanto la

conductividad disminuyó considerablemente. Además, durante la fase estacionaria se observó que las variaciones de la conductividad fueron menores.

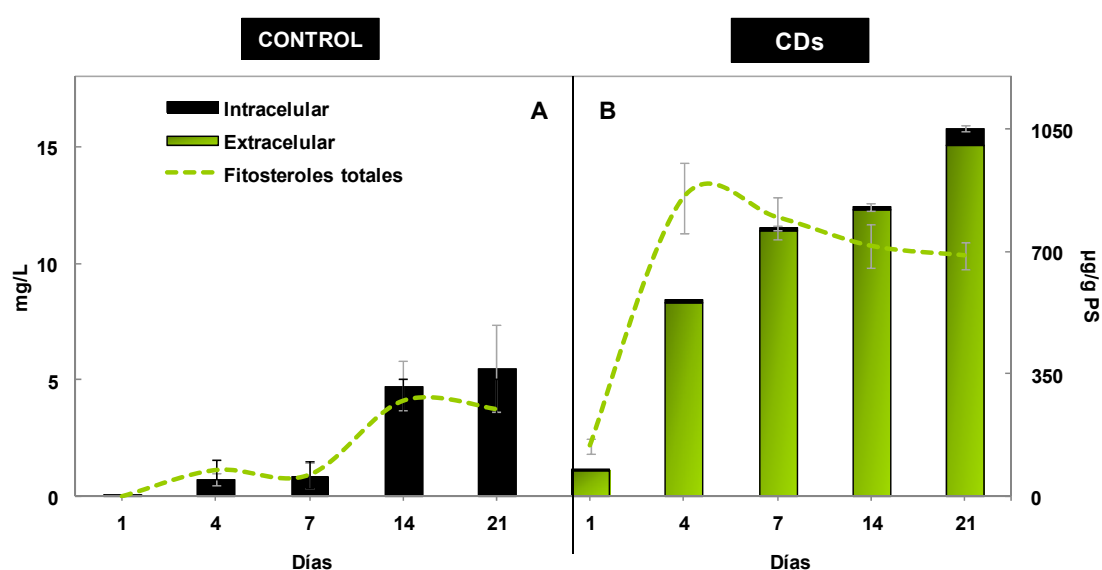
### **1.6.1 Efecto de las ciclodextrinas sobre el contenido total de fitosteroles en cultivos celulares de zanahoria verde**

Como se observa en la Figura 11A, los fitoesteroles en el tratamiento control se acumularon únicamente en el interior celular. El contenido en las células se incrementó hasta alcanzar el día 14 ( $5,5 \pm 1,9$  mg/L, lo que equivale a  $250,00 \pm 85,6$   $\mu\text{g/g}$  PS, Figura 11A). Sin embargo, la presencia de CDs provocó un aumento de la acumulación extracelular de fitoesteroles, incrementando desde el día 4 ( $8,4 \pm 0,9$  mg/L) hasta el día 21 ( $15,1 \pm 0,2$  mg/L, Figura 11B). Además, los niveles de producción en presencia de CDs fueron aproximadamente 2,8 veces más altos que en el control después de 21 días de elicitación (Figuras 11 A y B).

La concentración intracelular de fitoesteroles en SC elicidadas ( $0,7 \pm 0,1$  mg/L) fue baja y del mismo orden de magnitud que en células control a los 4 y 7 días de cultivo ( $0,7 \pm 0,3$  mg/L o  $75,6 \pm 27,6$   $\mu\text{g/g}$  PS, Figura 11B). De hecho, existe una marcada diferencia entre el contenido intra- y extracelular en las SC elicidadas ya que el contenido total en el interior de las células representa aproximadamente el 4% de los fitoesteroles producidos bajo condiciones de elicitación. En presencia de CDs, se observó una mayor acumulación en el medio extracelular siendo aproximadamente el 96% del total de fitoesteroles (Figuras 11 A y B). Estos resultados están de acuerdo con los mostrados por otros autores como Briceño *et al.*, (2012) Sabater-Jara y Pedreño (2013) y Almagro *et al.*, (2016) quienes observaron que la presencia de CDs incrementó la producción de fitoesteroles en SC de tomate, zanahoria naranja y lino alcanzando niveles de 50, 6500 y 1325  $\mu\text{g/g}$  PS, respectivamente, en las mejores condiciones de elicitación. Este incremento de fitoesteroles observado en SC vegetales tratadas con CDs puede ser debido a sus propiedades fisicoquímicas, ya que presentan una cavidad central hidrofóbica capaz de

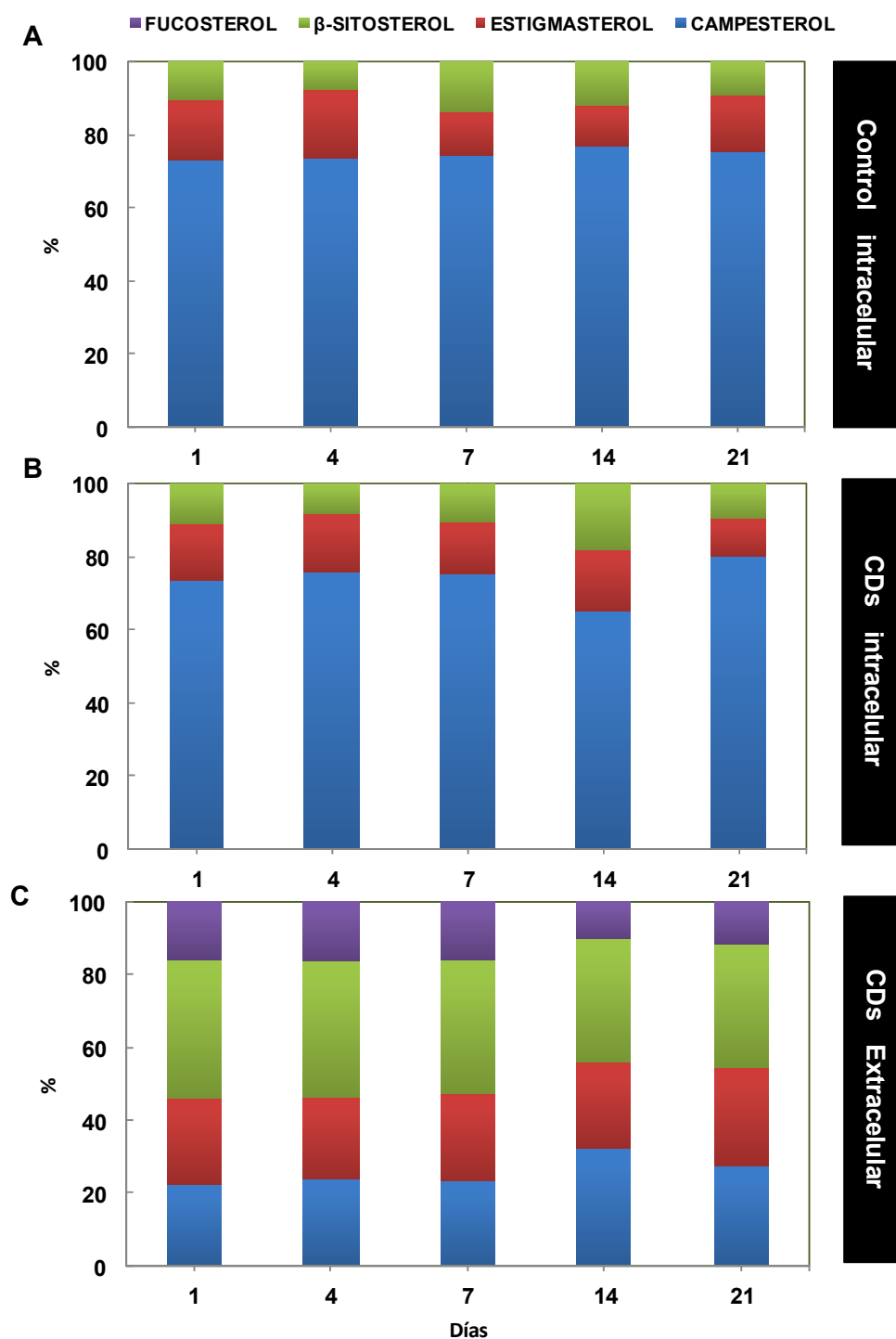
formar complejos de inclusión con estos compuestos apolares (Sabater-Jara y Pedreño, 2013). Las CDs pueden actuar como inductores de la biosíntesis de fitoesteroles y también son capaces de formar complejos de inclusión con estos compuestos en el medio extracelular, reduciendo la inhibición por retroalimentación y permitiendo una alta acumulación de fitoesteroles en el medio de cultivo (Almagro *et al.*, 2016).

Aunque los niveles de fitoesteroles registrados en esta memoria de investigación no alcanzaron los valores encontrados por Sabater-Jara y Pedreño (2013) en SC de zanahoria naranja elicidadas, es importante destacar que nuestras SC de zanahoria verde no produjeron solamente fitoesteroles sino también otros compuestos de naturaleza isoprenoide. Esto convierte a las SC de zanahoria verde en un sistema altamente atractivo para obtener diferentes compuestos bioactivos.



**Figura 11.** Comparación de los niveles de fitoesteroles en SC de zanahoria verde en condiciones control (A) y tratadas con 50 mM de CDs (B) durante 21 días. Las barras representan valores expresados como mg/L y las líneas representan valores expresados como µg/g PS. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Por otro lado, como se observa en la Figura 12 A y B, el principal fitoesterol encontrado en células fue el campesterol tanto en SC control como elicidadas (75% aproximadamente). Sin embargo, la proporción de estigmasterol (15 %) y  $\beta$ -sitosterol (10%) se mantuvo más baja y constante durante todos los días de elicitación. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Almagro *et al.*, (2016), quienes mostraron que el principal fitoesterol acumulado en cultivos celulares de lino elicitados con CDs fue el campesterol. Sin embargo, en el medio extracelular de las SC elicidadas se observó una tendencia diferente (Figura 12 C). El principal fitoesterol encontrado fue el  $\beta$ -sitosterol, que se mantuvo constante durante los 21 días de elicitación mientras que los niveles de campesterol y estigmasterol fueron similares (alrededor del 25%). Además, la proporción de fucosterol se mantuvo estable durante los 21 días de cultivo en los diferentes tratamientos. Sabater-Jara y Pedreño (2013) también observaron que en SC de zanahoria naranja elicidadas durante 120 h, el principal fitoesterol acumulado en el medio de cultivo fue el  $\beta$ -sitosterol, seguido de campesterol y estigmasterol mientras que el fucosterol se encontró en menor proporción.



**Figura 12.** Proporción de fitosteroles expresado como porcentaje del contenido total intracelular en SC control (A), contenido total intracelular en SC elicidas con 50 mM CDs (B) y como porcentaje del contenido extracelular de fitosteroles en SC elicidas con 50 mM de CDs (C). Cada tipo de fitosterol fue analizado durante 21 días de cultivo mediante GC/MS.

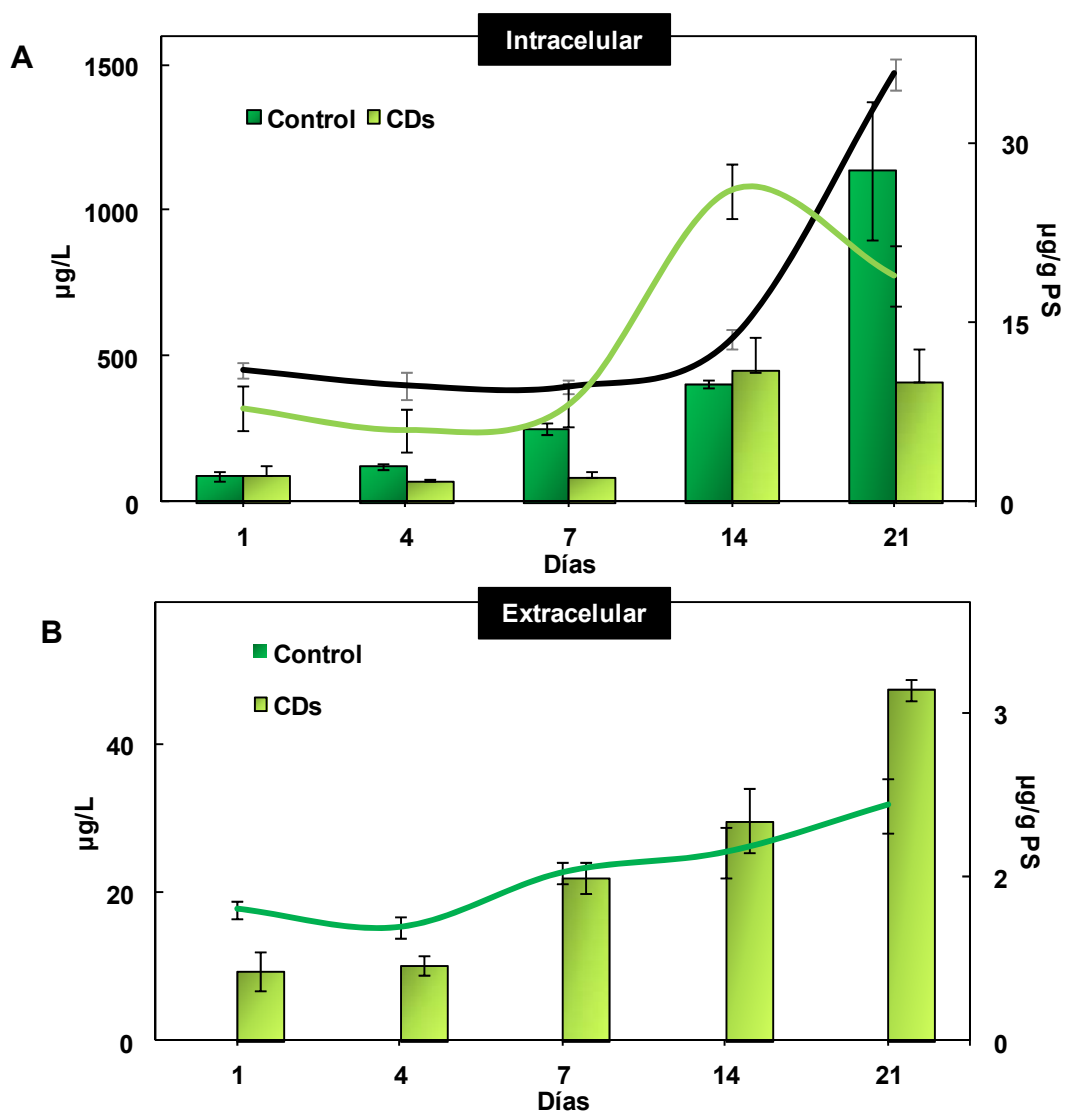


### 1.6.2 Efecto de ciclodextrinas sobre el contenido de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria verde

Los carotenoides son compuestos isoprenoides esenciales del sistema fotosintético (Simkin *et al.*, 2002). Estos compuestos se localizan en los centros de reacción del Fotosistema I y II o formando complejos pigmento-proteína cuya función es proteger de la fotooxidación por el exceso de luz. Los principales carotenoides encontrados en las SC de zanahoria verde fueron la luteína y el  $\beta$ -caroteno coincidiendo con los principales pigmentos identificados en raíces de zanahoria (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2015). Además, también se detectaron otros carotenoides como  $\alpha$ -caroteno, neurosporeno, violaxantina y neoxantina aunque en menor proporción, por lo que no fueron cuantificados. Como se observa en la Figura 13A, en las células control se detectaron los valores más altos de  $\beta$ -caroteno ( $1138,03 \pm 236,53 \mu\text{g/L}$ ) en todos los tiempos estudiados excepto a los 14 días de tratamiento, donde la producción fue mayor con CDs, llegando a alcanzar valores de  $26,0 \pm 2,3 \mu\text{g/g PS}$  aunque no se observaron diferencias en cuanto a productividad ( $449,7 \pm 118,25 \mu\text{g/L}$ ). La producción de  $\beta$ -caroteno fue significativamente mayor a los 21 días de elicitación y fue 2,7 veces mayor en células control que en células elicidadas. En el tratamiento control la acumulación intracelular de  $\beta$ -caroteno (Figura 13B), incrementó linealmente con el tiempo alcanzando niveles de  $1138,0 \pm 236,5 \mu\text{g/L}$  después de 21 días.

Por otro lado, se detectó  $\beta$ -caroteno en el medio extracelular de las SC control lo que sugiere que las CDs inducen la secreción de este compuesto al medio de cultivo. Sin embargo, los niveles alcanzados en el medio extracelular son considerablemente más bajos ( $47,3 \pm 1,4 \mu\text{g/L}$ , Figura 13B) que aquellos detectados en el interior celular después de 21 días de tratamiento ( $415,25 \mu\text{g/L}$ , Figura 13 A). Estos resultados coinciden con aquellos descritos por Rizzello *et al.* (2014) quienes mostraron que el tratamiento con 50 mM de Ds era capaz de incrementar la producción extracelular de  $\beta$ -caroteno en cultivos celulares de *A. annua*. De acuerdo con nuestros resultados, estos autores

observaron una acumulación intracelular de 10  $\mu\text{g/g}$  PS de  $\beta$ -caroteno mientras que la acumulación extracelular fue del orden de 10  $\mu\text{g/L}$  a los 7 días de incubación.



**Figura 13.** Evolución del contenido de  $\beta$ -caroteno intra- y extracelular en SC de zanahoria verde no tratadas y SC de zanahoria verde tratadas con 50 mM de CDs. Las barras representan valores expresados como  $\mu\text{g/L}$  y las líneas representan valores expresados como  $\mu\text{g/g PS}$ . Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

En estos experimentos de elicitación también se analizó el contenido intra y extracelular de luteína. Como se puede observar en la Figura 14A, el contenido intracelular de luteína en células control fue de  $25959,54 \pm 6083,83 \mu\text{g/L}$  mientras que en las células elicidadas se alcanzó una producción de  $7238,7 \pm 1970,8 \mu\text{g/L}$ . Esto supone una reducción del 72% en el contenido de luteína. La tendencia observada en producción de luteína es similar a la encontrada en el caso del  $\beta$ -caroteno, ya que la acumulación de luteína fue mayor en las células control excepto a los 14 días de tratamiento. De hecho, la concentración de luteína en células control fue 3,5 veces mayor que en las células tratadas con 50 mM de CDs. Además, la cantidad intracelular de luteína fue 20 veces mayor que de  $\beta$ -caroteno lo que significa que la ruta de biosíntesis de luteína es más activa que la de  $\beta$ -caroteno.

En relación a la producción extracelular (Figura 14B), la acumulación de luteína fue 10 veces mayor que la acumulación de  $\beta$ -caroteno, alcanzándose niveles de  $424,15 \pm 12,47 \mu\text{g/L}$  en el día 21 de tratamiento con CDs. La luteína no se detectó en el medio de cultivo de las SC control.

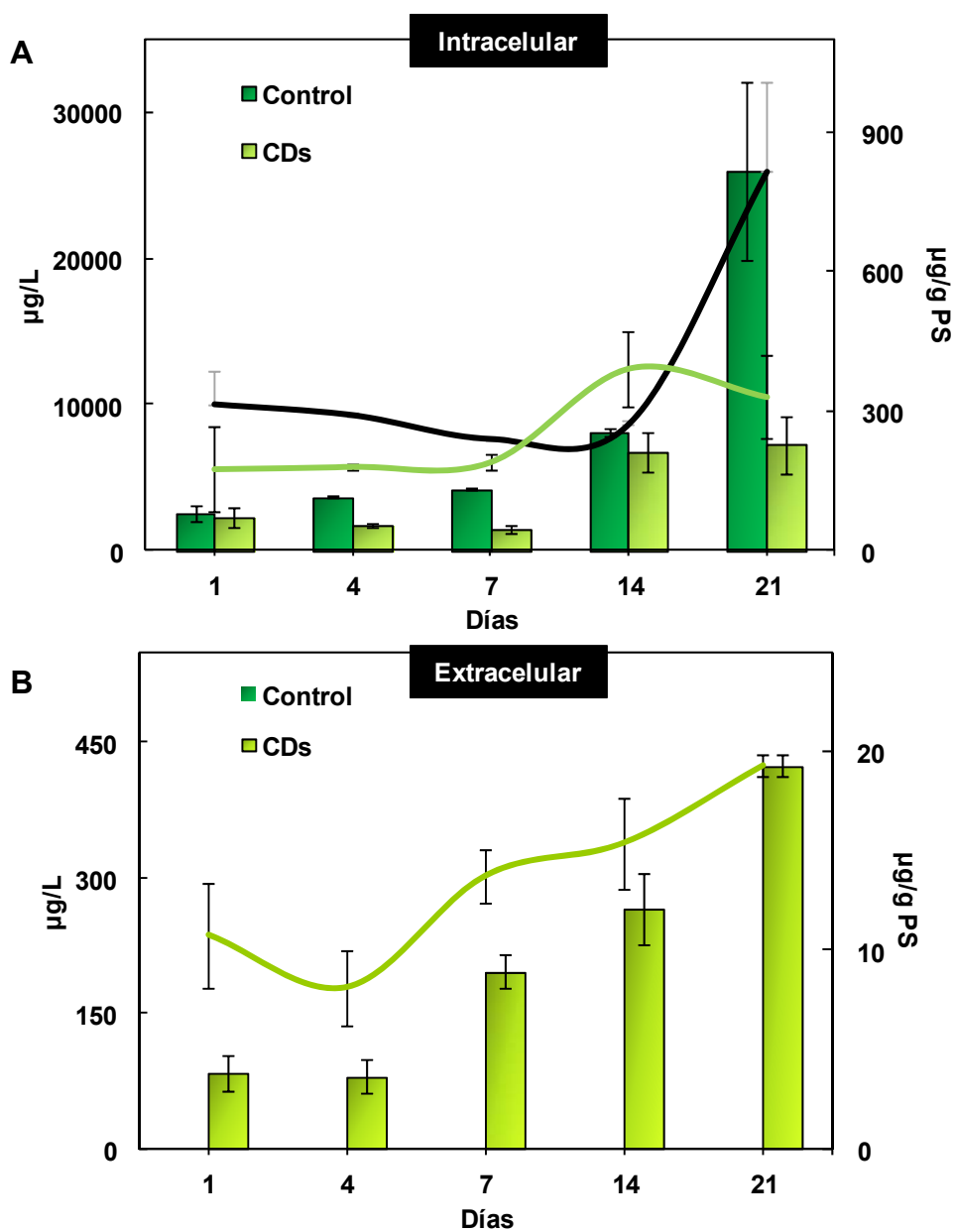
Al contrario de lo que ocurre con los fitoesteroles, los carotenoides se acumularon principalmente en el interior celular (alrededor del 98% del total). Esta diferencia puede deberse a que las CDs son capaces de alterar las membranas celulares incrementando su permeabilidad (Yuan *et al.*, 2013; Zidovetzki *et al.*, 2007). Los resultados sugieren que la secreción de los fitoesteroles al medio podría ser más fácil debido a que son sintetizados en el citosol mientras que los carotenoides se localizan dentro de los cromoplastos.

La capacidad de las CDs para incrementar la producción de carotenoides fue demostrada en SC de *A. annua* (Rizello *et al.*, 2014), donde se observó un incremento de la producción extracelular de luteína y  $\beta$ -caroteno tras 7 días de elicitación. En este estudio los niveles extracelulares de luteína y  $\beta$ -caroteno fueron del mismo orden o menores ( $140 \mu\text{g/L}$  y  $10 \mu\text{g/L}$  respectivamente) que los niveles encontrados en nuestras SC de zanahoria verde elicidadas después de 7 días de tratamiento ( $196,52 \mu\text{g/L}$  de luteína y  $21,93 \mu\text{g/L}$  de  $\beta$ -caroteno). Sin embargo, el contenido intracelular de  $\beta$ -caroteno y luteína detectado en SC de *A. annua* ( $19 \mu\text{g/g PS}$  y  $200 \mu\text{g/g PS}$  respectivamente) fue del mismo orden

de magnitud al detectado en zanahoria verde ( $35,8 \pm 1,3 \mu\text{g/PS}$  y  $815,4 \pm 191,2 \mu\text{g/PS}$  respectivamente, Figuras 13A y 14A).

Por otro lado, existen numerosos estudios en los cuales se determina el nivel de carotenoides en diferentes materiales vegetales. Los niveles de carotenoides totales detectados en SC de zanahoria verde ( $835 \mu\text{g/g PS}$ ) son iguales o superiores a los encontrados en otros materiales vegetales. Por ejemplo, Carvalho *et al.* (2013) y Fatimah *et al.* (2012) analizaron el contenido de carotenoides en frambuesa y *Oenanthе javanica* y detectaron una producción total de  $20,80 \mu\text{g/g PS}$  y  $260 \mu\text{g/g PS}$  respectivamente.

Teniendo en consideración todos estos resultados podemos concluir que la obtención de carotenoides utilizando SC de zanahoria verde podría constituir un sistema de producción sostenible y respetuoso con el medio ambiente.

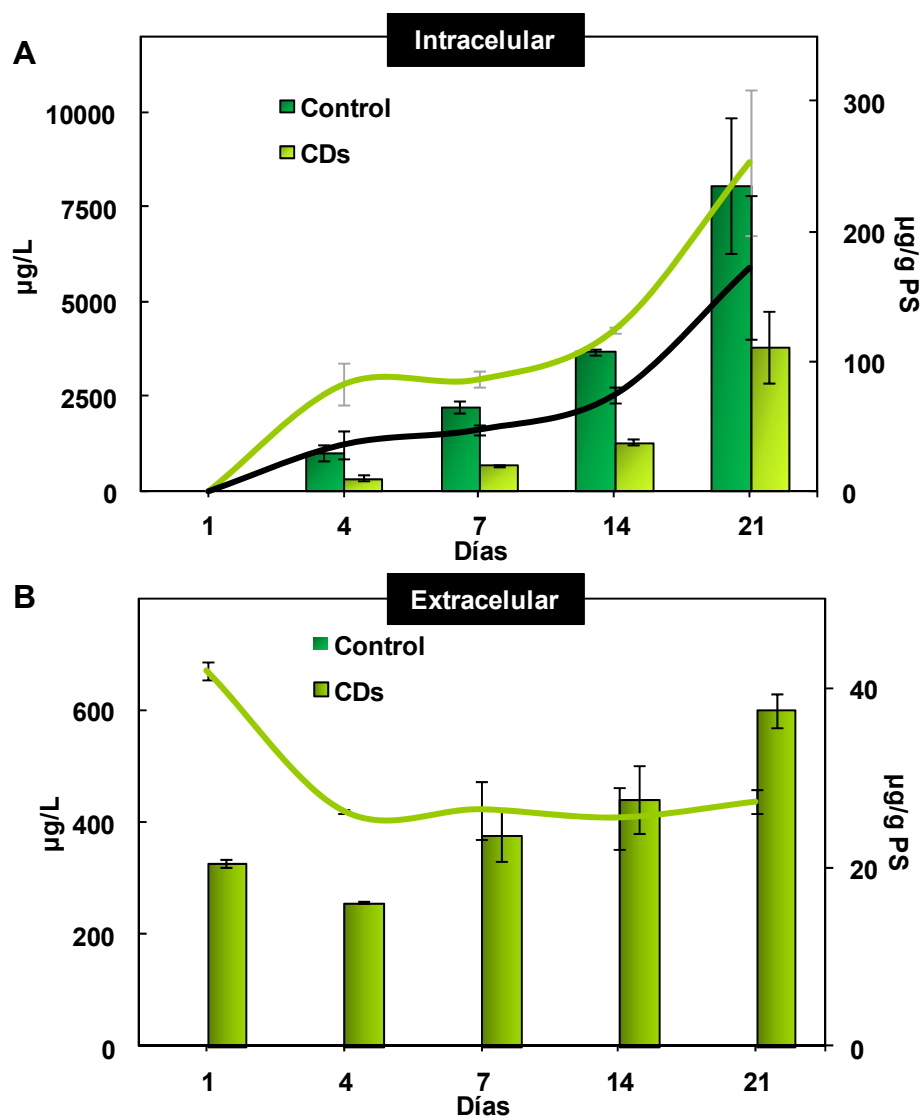


**Figura 14.** Evolución del contenido de luteína intra- y extracelular en SC de zanahoria verde no tratadas y SC de zanahoria verde tratadas con 50 mM de CDs. Las barras representan valores expresados como  $\mu\text{g/L}$  y las líneas representan valores expresados como  $\mu\text{g/g PS}$ . Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

### 1.6.3 Efecto de las ciclodextrinas sobre el contenido de $\alpha$ -tocoferol en cultivos celulares de zanahoria verde

Como ocurría en el caso de los carotenoides, los niveles más altos de  $\alpha$ -tocoferol se detectaron en las células control de zanahoria verde alcanzando a los 21 días de tratamiento valores de  $8063,8 \pm 1755,6 \mu\text{g/L}$  (lo que equivale a  $253,4 \pm 56,1 \mu\text{g/g PS}$ , Figura 15A). Sin embargo, en células elicidadas con 50 mM de CDs, el contenido de  $\alpha$ -tocoferol fue más bajo ( $3789,2 \pm 953,0 \mu\text{g/L}$  lo que equivale a  $172,3 \pm 55,1 \mu\text{g/g PS}$ , Figura 15 A). Por otra parte, como se observa en la Figura 15 B, la acumulación extracelular después de 21 días de elicitación con CDs fue de  $599,6 \pm 29,4 \mu\text{g/L}$  ( $27,3 \pm 1,3 \mu\text{g/g PS}$ ). Esta secreción al medio representa alrededor del 8% del contenido total de  $\alpha$ -tocoferol ya que la mayor parte del contenido de este compuesto se encontró en el interior celular.

Estos resultados muestran que las CDs favorecen la acumulación extracelular de  $\alpha$ -tocoferol en SC de zanahoria verde. Sin embargo, mientras que las CDs incrementan el contenido total de los fitoesteroles en SC de zanahoria verde, el contenido total de  $\alpha$ -tocoferol detectado fue mayor en el tratamiento control que en las células elicidadas. Además, los niveles de  $\alpha$ -tocoferol detectados en estas SC de zanahoria verde son mayores que los detectados en otras SC de otras especies vegetales. De hecho, en SC de girasol y tabaco suplementadas con ácido homogentísico y fitol, la producción fue de  $24 \mu\text{g/g PF}$  y  $41 \mu\text{g/g PF}$  respectivamente (Furuya *et al.*, 1987; Harish *et al.*, 2013). De manera similar, Caretto *et al.* (2010) analizaron los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en diferentes órganos de plantas de girasol y en SC derivadas de esta planta, obteniendo valores de  $100 \mu\text{g/g PS}$  en hipocotilos,  $70 \mu\text{g/g PS}$  en tallos,  $180 \mu\text{g/g PS}$  en hojas y  $239 \mu\text{g/g PS}$  en SC.



**Figura 15.** Evolución del contenido de  $\alpha$ -tocoferol intra- y extracelular en SC de zanahoria verde no tratadas y SC de zanahoria verde tratadas con 50 mM de CDs. Las barras representan valores expresados como  $\mu\text{g/L}$  y las líneas representan valores expresados como  $\mu\text{g/g PS}$ . Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

#### 1.6.4 Efecto de ciclodextrinas sobre el contenido de clorofilas en cultivos celulares de zanahoria verde

La concentración de clorofilas a y b (expresada como  $\mu\text{g/L}$ ) fue tres veces mayor en células control que en células elicidadas (Tabla 2). Además, no se detectaron clorofilas en el medio de cultivo control ni en el elicitado. Como se observa en la Tabla 2 los niveles de clorofila b fueron mayores que los niveles de clorofila a. Los bajos niveles de clorofila encontrados en las células tratadas con CDs podría ser debido a la disminución de carotenoides en presencia del elicitor dado que éstos protegen a las clorofilas de la fotooxidación.

**Tabla 2.** Evolución del contenido intracelular de clorofila a y b en SC de zanahoria verde no tratadas y tratadas con 50 mM de CDs. Los valores están expresados como  $\mu\text{g/L}$  y como  $\mu\text{g/g PS}$ .

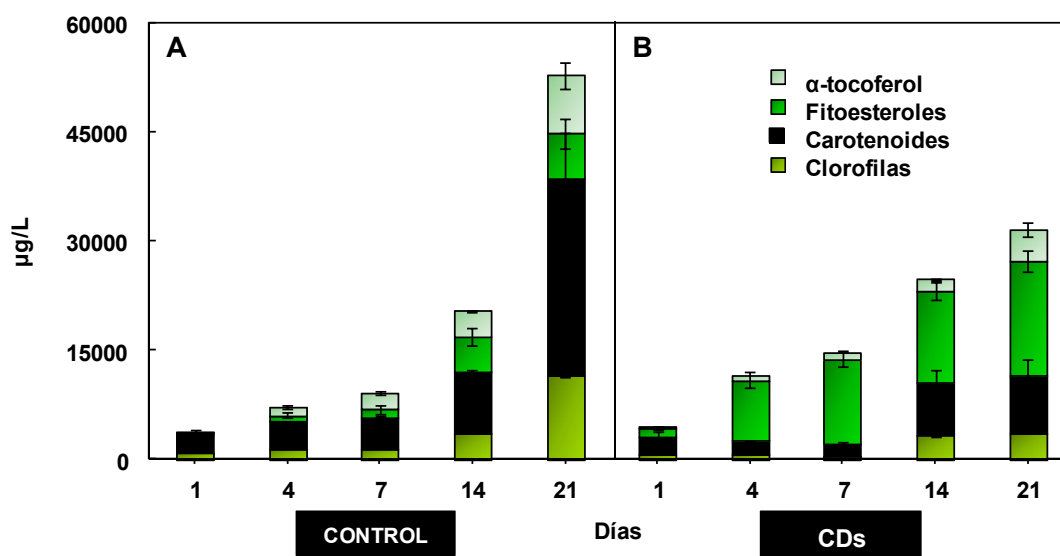
| Clorofila a |                 |                    |                 |                    |
|-------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| Días        | Control         |                    | CDs             |                    |
|             | $\mu\text{g/L}$ | $\mu\text{g/g PS}$ | $\mu\text{g/L}$ | $\mu\text{g/g PS}$ |
| 1           | 104,70±0,07     | 12,94±0,78         | 82,85±0,47      | 10,66±0,56         |
| 4           | 187,33±1,67     | 14,90±2,43         | 64,97±1,90      | 6,64±1,59          |
| 7           | 176,42±0,24     | 6,77±0,93          | 55,06±1,56      | 3.85±0.25          |
| 14          | 470,85±0,04     | 15,84±0,10         | 457,75±15,91    | 26.49±5.36         |
| 21          | 1625,13±34,10   | 51,08±9,37         | 527,97±0,68     | 24.01±0,25         |

| Clorofila b |                 |                    |                 |                     |
|-------------|-----------------|--------------------|-----------------|---------------------|
| Días        | Control         |                    | CDs             |                     |
|             | $\mu\text{g/L}$ | $\mu\text{g/g PS}$ | $\mu\text{g/L}$ | $\mu\text{g/ g PS}$ |
| 1           | 737.13±0.39     | 91.08±4.57         | 559.51±3.23     | 72.00±3.86          |
| 4           | 1240.00±1.71    | 98.64±2.49         | 482.74±9.01     | 49.35±14.76         |
| 7           | 1175.62±10.42   | 45.10±1.78         | 366.45±4.01     | 25.62±5.79          |
| 14          | 2964.29±2.31    | 99.70±6.60         | 2703.60±99.08   | 153.44±27.33        |
| 21          | 9958.33±161.23  | 312.98±58.51       | 2888.79±3.72    | 131.36±1.39         |



### 1.6.5 Efecto de ciclodextrinas sobre el contenido total de isoprenoides en cultivos celulares de zanahoria verde

Como resultado de los estudios anteriores, la Figura 16 resume la distribución de isoprenoides totales en SC de zanahoria verde control y SC elicidadas con 50 mM de CDs. El contenido total de compuestos isoprenoides en SC de zanahoria verde control (52924,3 µg/L) fue mayor que en aquellas SC tratadas con 50 mM de CDs (31722,5 µg/L) tras 21 días de tratamiento (Figura 16). En cuanto a la distribución de estos compuestos isoprenoides, los carotenoides fueron los principales compuestos encontrados transcurridos 21 días de cultivo en SC sin tratar. Además, en condiciones control, la suma de carotenoides,  $\alpha$ -tocoferol y clorofilas, compuestos biosintetizados por la ruta plastidial del MEP, fue mayor que el contenido de fitosteroles, biosintetizados por la ruta del MVA (Figura 16A). Por tanto, estos resultados sugirieron que la ruta del MEP fue más activa en estas SC de zanahoria verde que la ruta del MVA. Sin embargo, la Figura 16B muestra como los fitosteroles fueron los compuestos mayoritarios en SC elicidadas con CDs. Así, estos resultados sugirieron que las CDs indujeron la ruta biosintética del MVA incrementando los niveles de fitosteroles y acumulándolos en el medio extracelular. Por tanto, el uso de CDs parece desviar el flujo de carbono hacia la ruta citosólica del MVA en detrimento de la ruta platídica del MEP. En este sentido, Saiman *et al.* (2014) mostraron que diferentes compuestos eran capaces de desviar el flujo de carbono entre las diferentes rutas de biosíntesis de los compuestos isoprenoides en SC de *Catharanthus roseus*.



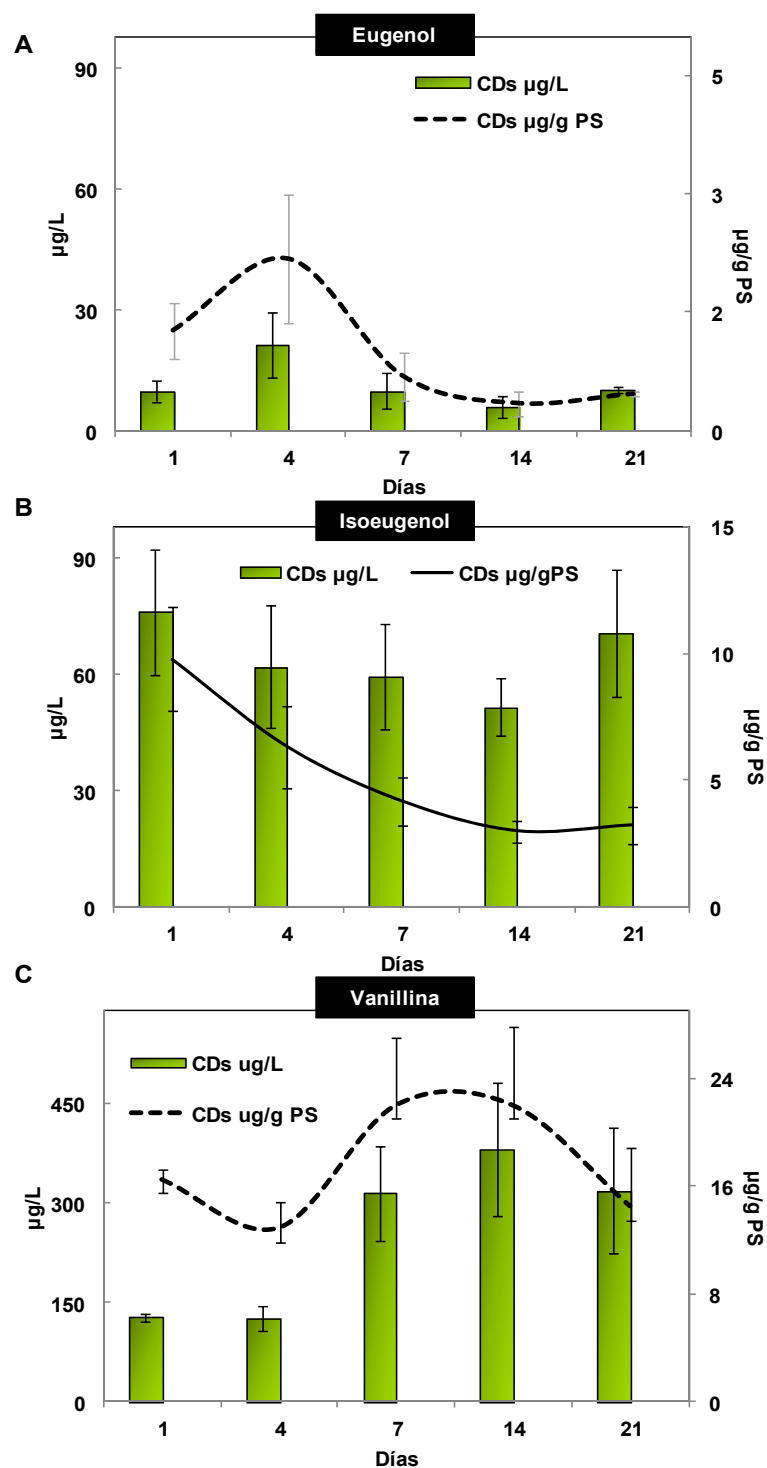
**Figura 16.** Acumulación total de compuestos isoprenoides en SC de zanahoria verde. Contenido total de isoprenoides en SC de zanahoria verde control (A) y contenido total de carotenoides en SC de zanahoria verde elicidadas con 50 mM de CDs (B). Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

### 1.6.6 Efecto de ciclodextrinas sobre el contenido de compuestos fenólicos en cultivos celulares de zanahoria verde

También se analizó el efecto de las CDs sobre la producción intra- y extracelular de compuestos fenólicos en SC de zanahoria verde tratadas durante 21 días. Los compuestos fenólicos identificados fueron vanillina, eugenol e isoeugenol tanto en células como en el medio de cultivo. La concentración en las células no se pudo cuantificar ya que los niveles estaban por debajo del límite de detección. Los máximos niveles encontrados en el medio extracelular de eugenol, isoeugenol y vanillina en condiciones de elicitación fueron  $21,3 \pm 8,0$ ,  $75,9 \pm 16,1$  y  $380,2 \pm 80,3$   $\mu\text{g/L}$  respectivamente, lo que equivale a  $2,2 \pm 0,8$ ,  $9,8 \pm 2,1$  y  $22,0 \pm 5,8$   $\mu\text{g/g PS}$  (Figura 17). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Rao y Ravishankar (1999) quienes observaron que SC de *Capsicum frutescens* fueron capaces de acumular vanillina cuando se le añadió al medio de cultivo isoeugenol como precursor. Los niveles máximos de vanillina encontrados añadiendo 2,5 mM de isoeugenol a dichas SC fueron  $14,2$   $\mu\text{g/L}$ . Además, estos autores utilizaron las

CDs combinadas con isoeugenol para incrementar la acumulación de vanillina. Sin embargo, la concentración obtenida en SC de *C. frutescens* (14,2 µg/L) fue 16,5 veces menor que los encontrados en las SC de zanahoria verde (380,2 ± 80,3 µg/L). Otros estudios realizados elicitando SC de *C. chinense* con 200 µM de ácido salicílico, alcanzaron niveles de 67 µg/g PS de vanillina (Rodas-Junco *et al.*, 2013). De manera similar, Misra *et al.* (2005) incrementaron la producción de vanillina en SC de *Hemidesmus indicus* R. eliminando las hormonas del medio de cultivo (1,0 µg/g PS). Sin embargo todos estos autores obtuvieron niveles más bajos que los detectados en las SC de zanahoria verde. Todos estos resultados sugieren que las SC de zanahoria verde elicítadas constituyen una fuente alternativa para la producción de vanillina, eugenol e isoeugenol.

Estos compuestos fenólicos se forman a partir de la fenilalanina por la vía del siquimato. Mientras que la biosíntesis de fenilalanina tiene lugar en los plastidios, la conversión de este precursor en los compuestos fenólicos ocurre fuera de estos orgánulos (Maeda *et al.*, 2012). De esta forma, la biosíntesis del eugenol e isoeugenol tiene lugar en el citosol a través de la ruta fenilpropanoide, teniendo como precursor directo el alcohol coniferílico. La biosíntesis de la vanillina también se produce a través de la ruta fenilpropanoide pero teniendo como precursor el ácido cinámico (Dudareva *et al.*, 2013). Con estos antecedentes y teniendo en consideración los datos obtenidos, se podría sugerir que la presencia de CDs incrementa los niveles de compuestos fenólicos en el medio de cultivo mediante la activación de la ruta de biosíntesis fenilpropanoide. Resultados similares fueron obtenidos por Belchí-Navarro *et al.* (2012) ya que observaron que las CDs eran capaces de activar la ruta fenilpropanoide en SC de *V. vinifera* incrementando así los niveles de *trans*-resveratrol.



**Figura 17.** Comparación de los niveles extracelulares de eugenol (A), isoeugenol (B) y vanillina (C) en SC de zanahoria verde tratadas con 50 mM de CDs tras 21 días de elicitación. Las barras representan valores expresados como  $\mu\text{g/L}$  y las líneas representan valores expresados como  $\mu\text{g/g PS}$ .

### 1.7 Efecto de ciclodextrinas separadamente o en combinación con hexenol y $\beta$ -glucano sobre el contenido de compuestos bioactivos en cultivos celulares de zanahoria verde

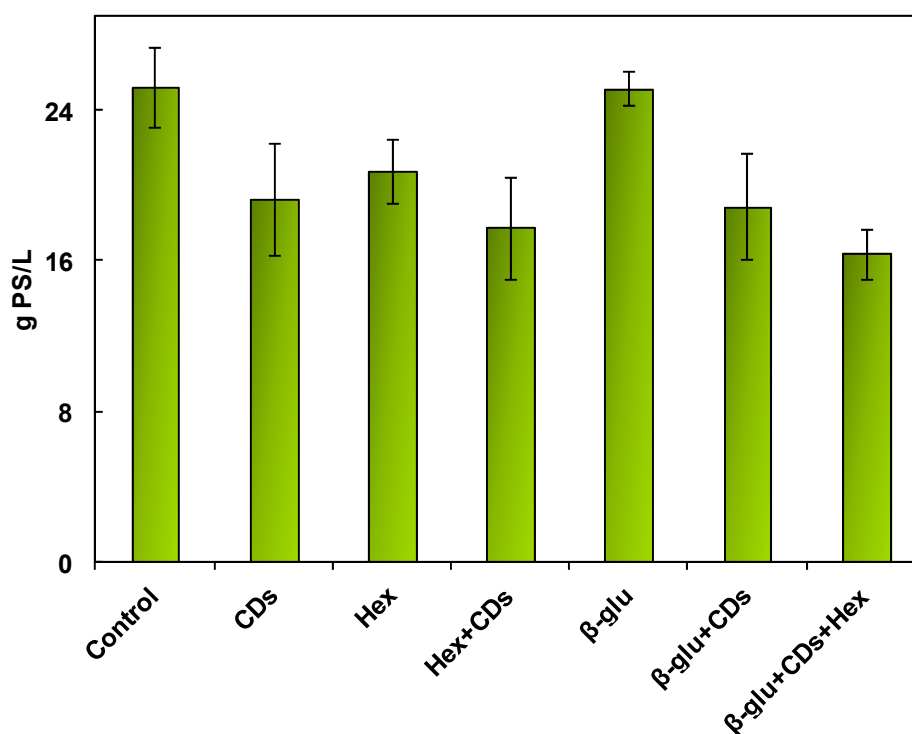
Teniendo en consideración que CDs incrementaron la producción de varios compuestos bioactivos en SC de zanahoria verde, se diseñaron nuevos experimentos basados en la introducción de nuevos elicitores Hex y  $\beta$ -glu separadamente o en combinación, con la finalidad de incrementar la producción de estos compuestos bioactivos. En este sentido, Hex es un compuesto volátil sintetizado por las plantas para hacer frente al ataque de insectos y herbívoros. Este compuesto juega un papel importante como molécula señal en las cascadas de respuestas de defensa vegetal (Engelberth *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que Hex tiene actividad antibacteriana y antifúngica desencadenando una serie de respuestas de defensa frente a infecciones en las plantas. De hecho, se ha observado que Hex es capaz de inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios de naturaleza fitoalexina (Matsui, 2006).

Por otro lado, los  $\beta$ -glu son oligosacáridos propios de algunas especies de hongos y levaduras (Okinaka *et al.*, 1995). Los  $\beta$ -glu se han utilizado para elicitar un amplio rango de especies vegetales. De hecho, se ha observado que los  $\beta$ -glu son capaces de estimular la biosíntesis de fitoalexinas en *Lotus japonicus*, *Medicago sativa*, *M. truncatula* y *Solanum tuberosum* (Fesel y Zuccaro, 2016).

Teniendo en consideración que los resultados descritos sugieren que tanto Hex como  $\beta$ -glu pueden actuar como moléculas señal para inducir respuestas de defensa en plantas, en este estudio se analizó el efecto de ambos elicitores solos o en combinación con CDs sobre la producción de metabolitos secundarios en SC de zanahoria verde durante 7 días.

Para ello, en primer lugar se determinó el efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento celular de SC de zanahoria verde (expresado como g PS/L) tras 7 días de elicitación. Como se observa en la Figura 18, los niveles de biomasa más elevados se encontraron en el tratamiento control y en

presencia de  $\beta$ -glu. Sin embargo, las SC elicidadas con Hex y CDs solas o en combinación, presentaron una ligera disminución del crecimiento. A pesar de la disminución en el crecimiento celular con CDs y Hex, las células permanecieron vivas durante los 7 días de incubación (Figura 18).

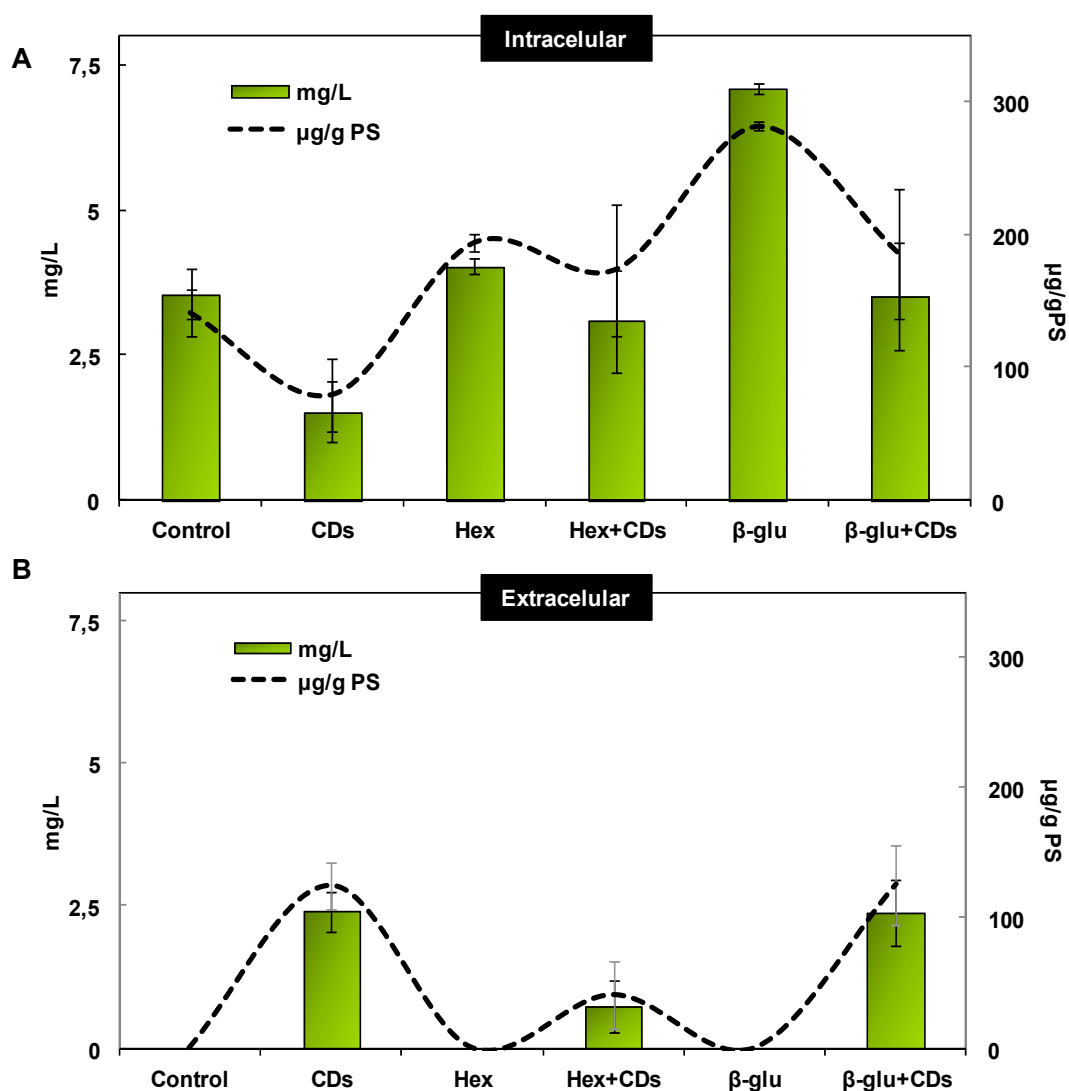


**Figura 18.** Efecto de 50 mM de CDs, 1 mg/L de  $\beta$ -glu y 40  $\mu$ M de Hex separados o en combinación sobre el crecimiento celular en SC de zanahoria verde tras 7 días de elicitación. Los valores están expresados como g PS/L. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Una vez caracterizado el crecimiento celular, se realizaron los experimentos de elicitación. Para ello, las SC se incubaron durante 7 días en presencia de Hex y  $\beta$ -glu separadamente o en combinación con CDs. De todos los isoprenoides y compuestos fenólicos analizados (carotenoides, fitoesteroles, vanillina, eugenol, isoeugenol, tocoferoles) tanto en las células como en el medio extracelular, estos elicitors sólo fueron capaces de incrementar los niveles de  $\alpha$ -tocoferol.

Como se observa en la Figura 19A, el tratamiento con CDs solas provocó una reducción de la producción intracelular de  $\alpha$ -tocoferol del 56% ( $78,8 \pm 27,6 \mu\text{g/g}$

PS) con respecto al control ( $140,8 \pm 17,3 \mu\text{g/g PS}$ ). Además, el tratamiento con Hex presentó un ligero aumento de la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol ( $193,9 \pm 6,4 \mu\text{g/g PS}$ ). Por otro lado, los niveles más altos de  $\alpha$ -tocoferol se encontraron en el tratamiento con  $\beta$ -glu, presentando el doble de tocoferoles ( $282,0 \pm 3,5 \mu\text{g/g PS}$ ) que el control. Estos resultados están de acuerdo con aquellos mostrados por Almagro *et al.*, (2016) quienes observaron que el Hex y  $\beta$ -glu aumentaron la producción de tocoferoles en cultivos celulares de lino. Además, el  $\beta$ -glu fue capaz de inducir un incremento de *trans*-resveratrol en cultivos celulares de *V. vinifera* (Vuong *et al.*, 2014).



**Figura 19.** Efecto de 50 mM de CDs, 1mg/L  $\beta$ -glu y 40  $\mu$ M de Hex solos o en combinación sobre la acumulación extracelular de  $\alpha$ -tocoferol tras 7 días de tratamiento. Las barras representan valores expresados como mg/L y las líneas representan valores expresados como  $\mu$ g/g PS. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Por otro lado, Hex y  $\beta$ -glu no indujeron una acumulación extracelular de  $\alpha$ -tocoferol y solamente se detectó este compuesto en las SC tratadas con CDs ( $2,4 \pm 0,4$  mg/L, Figura 19B). Sin embargo, el contenido total de  $\alpha$ -tocoferol fue mayor en el tratamiento con CDs y  $\beta$ -glu (5,8 mg/L) mientras que la producción total en presencia de CDs fue de 3,9 mg/L. Por lo tanto, la adición de  $\beta$ -glu al



medio de cultivo indujo la biosíntesis de  $\alpha$ -tocoferol mientras que no afectó a la producción de otros compuestos isoprenoides.

## ***CAPÍTULO II***

***Análisis metabólico y génico de una línea celular  
de zanahoria (*Daucus carota*) naranja***



## HIPÓTESIS DE PARTIDA

Los isoprenoides constituyen una de las más diversas clases de metabolitos secundarios. Además de tener funciones esenciales en los procesos metabólicos como la fotosíntesis o señalización, estos metabolitos tienen un alto valor como compuestos bioactivos (Frank y Groll, 2016). Estudios previos han determinado que la ruta de biosíntesis de isoprenoides está especialmente activa en las raíces de zanahoria (Dash *et al.*, 2016). Además, esta especie es conocida por su inusualmente alto contenido de carotenoides en sus raíces. De hecho, la zanahoria naranja supone el 30% de la provitamina A consumida en Estados Unidos (Simon *et al.*, 2008). No obstante, otros isoprenoides tales como fitoesteroles, clorofilas y tocoferoles también han sido identificados en esta planta (Zeb *et al.*, 2004; Sabater-Jara *et al.*, 2013; Ombódi *et al.*, 2014). Además, la raíz de zanahoria también contiene otros compuestos de naturaleza fenólica (Alasalvar *et al.*, 2001). Sin embargo, son muchas las dificultades para obtenerlos de las plantas ya que los niveles de estos compuestos en el material vegetal son muy bajos y su síntesis química no es viable económicamente para su explotación comercial. El uso de cultivos *in vitro* vegetales constituyen una alternativa a los métodos clásicos de extracción convencional de metabolitos a partir de materia prima vegetal aunque hasta el momento actual se han realizado con escaso éxito comercial. Por otra parte, varios estudios mostraron que la utilización de elicitors como MJ, pectinas, Hex o CDs (Bonfill *et al.*, 2011; Flores-Sánchez., 2002; Almagro *et al.*, 2016; Briceño *et al.*, 2012) estimulan la biosíntesis de compuestos isoprenoides e incrementan la expresión de varios genes implicados en su ruta de biosíntesis.

Con estos antecedentes y para el desarrollo de este capítulo se utilizaron las SC de zanahoria naranja elicitada como un sistema para la producción de compuestos isoprenoides y compuestos fenólicos, por lo que los objetivos generales que se plantean son los siguientes:

- la caracterización de la producción de compuestos bioactivos en SC de zanahoria naranja.

- el estudio del perfil de expresión de los genes que codifican para enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de compuestos isoprenoides en SC de zanahoria naranja elicidadas con CDs, en presencia o ausencia de inhibidores de las rutas de biosíntesis de carotenoides y fitoesteroles.

## 1. Caracterización de los cultivos celulares de zanahoria naranja

### 1.1 Producción de fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria naranja

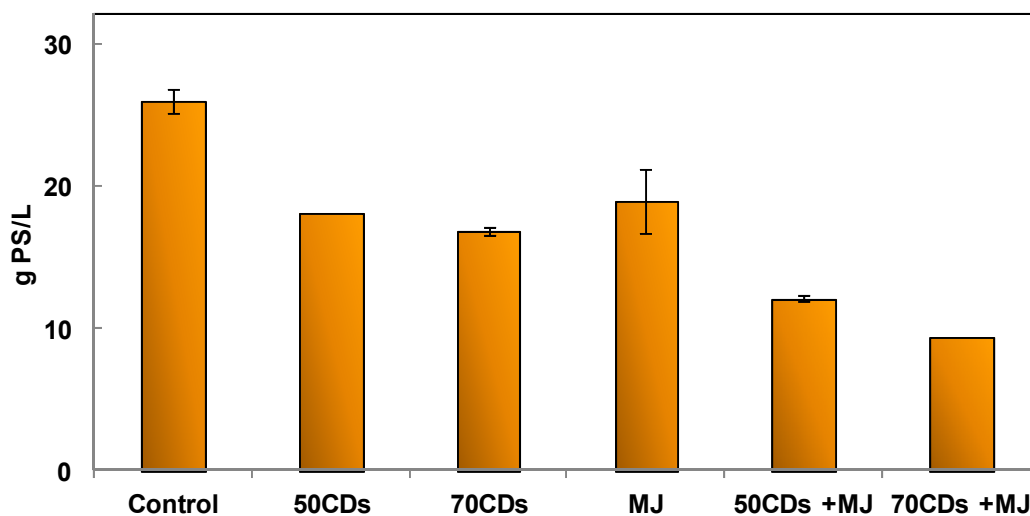
Los esteroides son componentes esenciales de las membranas de todos los organismos eucariotas y son responsables de su permeabilidad y fluidez (Piironen *et al.*, 2000; Posé *et al.*, 2009). En las plantas estos compuestos se denominan fitoesteroides y se han identificado más de 200 tipos diferentes. El 96-98% de estos fitoesteroides están compuestos por  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Lagarda *et al.*, 2006). En la última década, estos compuestos han tenido gran demanda debido a sus propiedades farmacológicas, anti-inflamatorias y antioxidantes pero sobre todo por su capacidad de reducir el colesterol y proteger frente a enfermedades cardiovasculares (Moreau *et al.*, 2002; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011; Delgado-Zamarreño *et al.*, 2009). Aunque la principal función de los fitoesteroides en las plantas es modular las propiedades físico-químicas de las membranas, estos compuestos también están implicados en defensa vegetal frente a varios tipos de estreses tanto bióticos como abióticos. De hecho, se ha observado que la sobreexpresión de la enzima HMGR, la cual es responsable de la formación de precursores de los fitoesteroides, podría suponer un incremento de la resistencia frente a *Botrytis cinerea* en plantas de *Arabidopsis* (Gibriel y Zeir, 2010). En *Arabidopsis* también se observó que el citocromo P450, que codifica para la enzima C22-sterol desaturasa transformando  $\beta$ -sitosterol en estigmasterol, fue inducido significativamente en presencia de patógenos (Morikawa *et al.*, 2006). Además, otros autores mostraron que el silenciamiento de los genes de SQS produjo un incremento del crecimiento de *Pseudomonas syringae* en *Nicotiana benthamiana* (Wang *et al.*, 2012).

Debido al alto valor de estos compuestos tanto para el ser humano como para las plantas, se están desarrollando nuevas estrategias para incrementar su producción. Una alternativa para la producción de fitoesteroles es el uso de cultivos celulares vegetales y cultivo de raíces pilosas. Estudios previos demostraron que las CDs son capaces de extraer grandes cantidades de fitoesteroles en el medio extracelular de SC de zanahoria naranja sin afectar a la viabilidad celular (Sabater-Jara y Pedreño, 2013). Este procedimiento supone una alternativa interesante para la obtención de fitoesteroles sin destrucción de biomasa vegetal ya que los compuestos se recuperan directamente del medio de cultivo. En este estudio también se mostró que la presencia de MJ disminuyó la producción de fitoesteroles mientras que incrementó la producción de compuestos fenólicos. Teniendo en consideración estos antecedentes se decidió realizar una caracterización de los compuestos biosintetizados por SC de zanahoria naranja en presencia de CDs y/o MJ tanto en el interior celular como en el medio de cultivo.

### **1.1.1 Caracterización de la producción intracelular de fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria naranja elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo**

En estudios previos se determinó que la concentración de 50 mM de CDs en el medio de cultivo era suficientemente alta para extraer elevadas concentraciones de fitoesteroles. Además, en este estudio también se evaluó el efecto de 70 mM de CDs. Por otro lado, el MJ es una molécula señal que activa la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas (Wasternack y Hause, 2013; Tamogami *et al.*, 2011). Numerosos estudios previos (Gunlach *et al.*, 1992; Mizukami *et al.*, 1993; Ketchum *et al.*, 1999; Sánchez-Sampedro *et al.*, 2005, Belchí-Navarro., 2012) mostraron que la concentración óptima de MJ para la inducción de metabolitos secundarios en SC de distintas especies vegetales fue de 100  $\mu$ M, por lo que se decidió trabajar a esta concentración. Para ello, en primer lugar se determinó el efecto de los elicitors sobre la tasa de crecimiento celular tras 7 días de tratamiento con CDs y/o MJ, tal y como se

describe en el apartado 3 de Material y Métodos. Como muestra la Figura 1, todos los tratamientos presentaron una disminución del crecimiento frente a las SC control. Además, la presencia de ambos elicitors conjuntamente provocó la mayor inhibición de crecimiento en las SC. Mientras el control alcanzó un crecimiento de  $25 \pm 0,8$  g PS/L, los tratamientos con CDs y MJ provocaron una reducción de la biomasa de un 32% aproximadamente (Figura 1). Además, la biomasa disminuyó un 53,7 % y un 63,9% en presencia de 50 y 70 mM de CDs, respectivamente. Aunque esta disminución es considerable, tan sólo los tratamientos combinados provocaron muerte celular, lo que explicaría la disminución de biomasa (Figura 1). Sin embargo, los tratamientos individuales con 50 o 70 mM de CDs y el tratamiento con 100  $\mu$ M de MJ no indujeron muerte celular pese a la considerable disminución de crecimiento celular. Resultados similares se han observado en diferentes cultivos celulares como *N. tabacum* (Goossens *et al.*, 2003) o *V. vinifera* (Belchí-Navarro *et al.*, 2012), donde el tratamiento con elicitors provocó una reducción del crecimiento celular. Esto podría deberse a una desviación del flujo de carbono del metabolismo primario al metabolismo secundario, lo que conllevaría una reducción de la biomasa celular (Larronde *et al.*, 2003; Sivakumar y Paek, 2005). Esta acción del MJ también ha sido descrita por Pauwels *et al.* (2008) en cultivos celulares de *Arabidopsis* en donde la aplicación exógena de MJ reprimió la progresión del ciclo celular e indujo el metabolismo fenilpropanoide. Además, también se ha observado muerte celular en SC de diferentes especies tratadas con MJ debido a que induce altos niveles de metabolitos como el taxol que son tóxicos para las células de *T. chinensis* y *T. baccata* (Expósito *et al.*, 2002). Por tanto, aunque el crecimiento celular en SC de zanahoria naranja se ve reducido posiblemente por un desvío del flujo metabólico del metabolismo primario hacia el secundario, esto no se ve acompañado de una pérdida de viabilidad celular ya que las células no producen metabolitos en cantidades tan elevadas que lleguen a producir muerte celular.



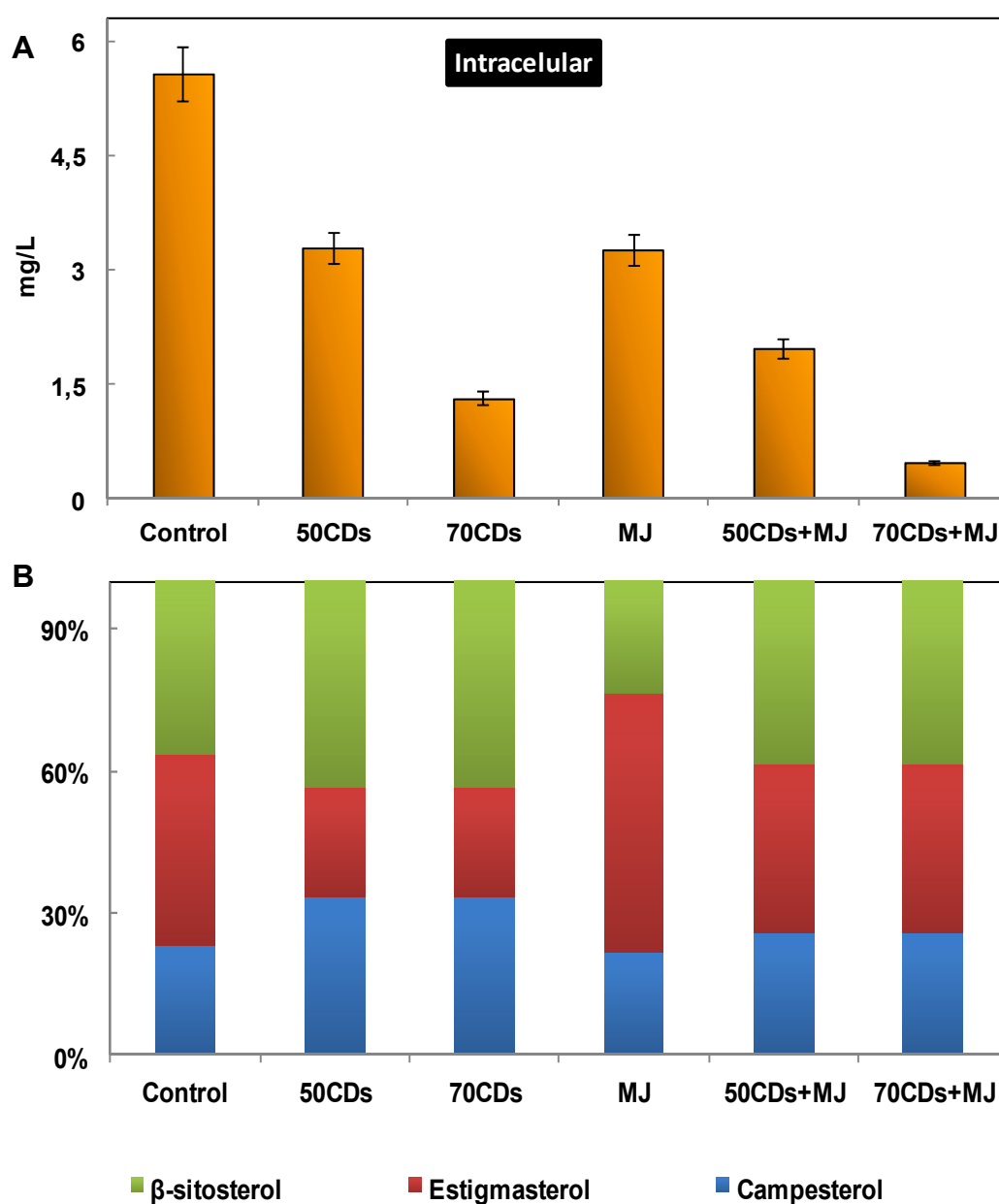
**Figura 1.** Efecto de 50 y 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ solos o en combinación sobre la acumulación de biomasa en SC de zanahoria naranja tras 7 días de tratamiento. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Una vez evaluado el crecimiento celular en presencia de los diferentes elicitors, se extrajeron los fitoesteroides presentes en el interior de las células. En las células se identificaron tres fitoesteroides diferentes: campesterol,  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol. Como se observa en la Figura 2A, los niveles más altos de fitoesteroides intracelulares se encontraron en las SC control alcanzando niveles de  $5,6 \pm 0,4$  mg/L. Sin embargo, en aquellas SC tratadas con 50 mM de CDs o con MJ, se detectaron niveles de 3 mg/L. Además, la combinación de 50 mM de CDs y MJ redujo la producción de fitoesteroides respecto al control ( $2 \pm 0,1$  mg/L), encontrándose niveles más bajos en presencia de 70 mM de CDs solo ( $1,3 \pm 0,1$  mg/L) o en combinación con MJ ( $0,46 \pm 0,03$  mg/L). Esta disminución en los tratamientos con CDs puede deberse a la extracción de estos compuestos esenciales al medio de cultivo (Sabater-Jara y Pedreño, 2013). Sin embargo, la disminución de fitoesteroides en los tratamientos con MJ podría deberse a la capacidad de esta molécula señal de inducir la biosíntesis de otros triterpenos como taraxasterol, lupeol o  $\beta$ -amirina en diferentes cultivos celulares vegetales (Briceño *et al.*, 2012; James *et al.*, 2013; Zaragoza-Martínez *et al.*, 2016) cuyo precursor común con los



fitosteroles es el 2,3-oxidosqualeno. Así, MJ podría estar favoreciendo el flujo de carbono hacia la biosíntesis de estos compuestos disminuyendo la producción de esteroides vegetales (Kim *et al.*, 2005).

Por otro lado, se analizó el porcentaje de cada fitosterol en el interior celular (Figura 3). Así, se observó que las CDs provocaron una disminución de la concentración de estigmasterol frente a los niveles de  $\beta$ -sitosterol y campesterol. Sin embargo, la presencia de MJ incrementó el contenido de estigmasterol (14%). El estigmasterol se sintetiza a partir de  $\beta$ -sitosterol mediado por el citocromo P450. Esto explicaría la disminución del  $\beta$ -sitosterol frente al aumento de estigmasterol. Comparando las células tratadas con CDs y MJ frente a las tratadas únicamente con CDs, también se observó un aumento del 12% en la acumulación de estigmasterol. De acuerdo con estos resultados Griebel y Zier (2010) observaron que la exposición de *A. thaliana* a *P. syringae* provocó un aumento en el contenido de estigmasterol mientras que los niveles de  $\beta$ -sitosterol disminuyeron. Estos resultados sugirieron que estigmasterol podría estar implicado en las respuestas de defensa de las plantas frente a diferentes tipos de elicitores como *P. syringae* y MJ.

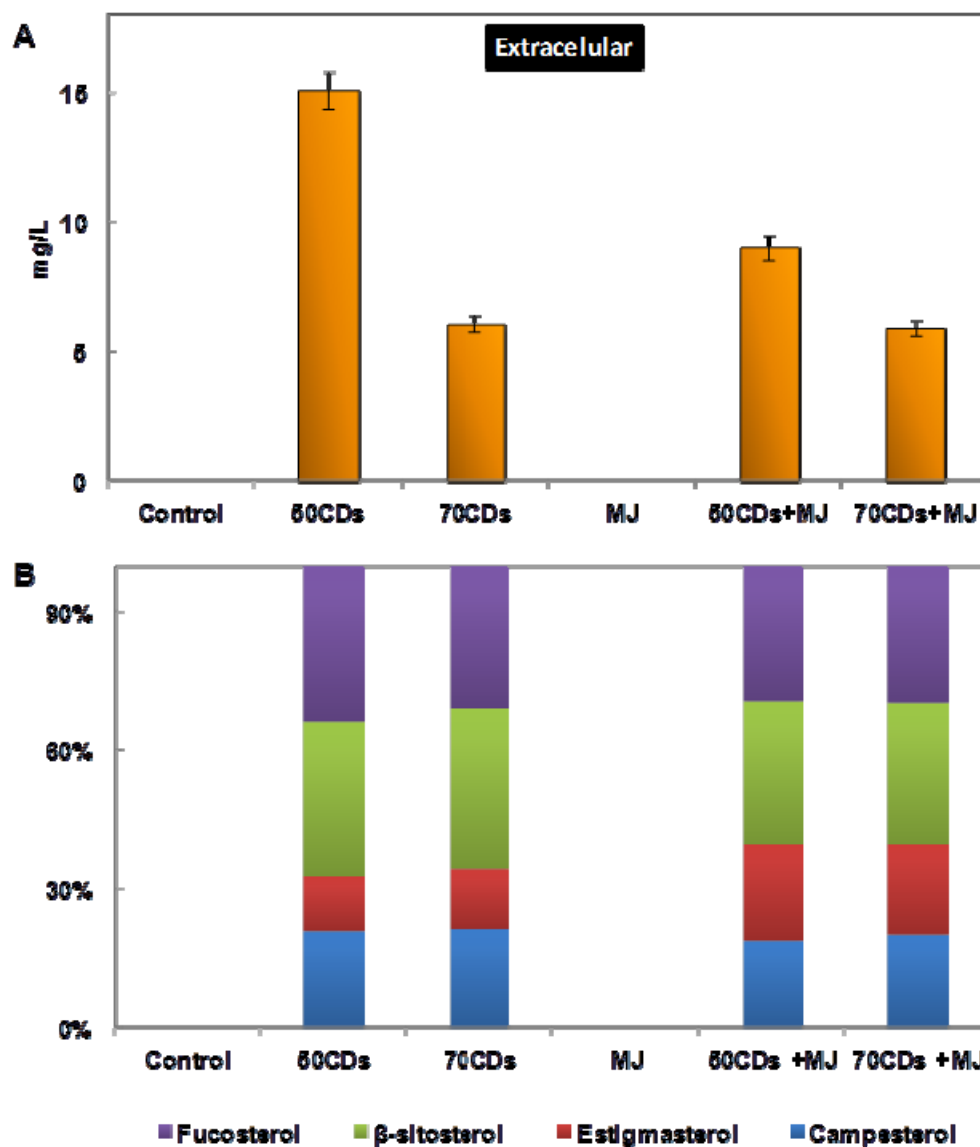


**Figura 2.** Efecto de 50 y 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ solos o en combinación sobre la acumulación intracelular de fitoesteroides totales en SC de zanahoria verde tras 7 días de tratamiento expresado en mg/L (A) y expresado en % de cada fitoesterol en particular (B). Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

### 1.1.2 Caracterización de la producción extracelular de fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria naranja elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo

Dado que las CDs son capaces de extraer los fitoesteroles al medio de cultivo (Sabater-Jara y Pedreño, 2013), se analizó el efecto de estos oligosacáridos cíclicos solos o en combinación con MJ sobre la acumulación extracelular de fitoesteroles en SC de zanahoria naranja. Para ello, estas SC fueron elicidadas con 50 o 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ separadamente o en combinación durante 168h. Transcurrido el tiempo de elicitación se extrajeron los compuestos presentes en el medio de extracelular y se identificaron y cuantificaron los fitoesteroles mediante GC/MS. Como se observa en la Figura 3A, solo aquellas SC tratadas con CDs presentaron fitoesteroles en el medio de cultivo. Además, en el tratamiento con 50 mM de CDs se alcanzaron valores de  $15,1 \pm 2,3$  mg/L de fitoesteroles totales mientras que en el tratamiento con 70 mM de CDs se detectaron  $6,1 \pm 0,9$  mg/L. Sin embargo, el tratamiento combinado de 50 mM de CDs y MJ resultó en una disminución del 40,5% respecto al tratamiento individual mientras que el tratamiento de 70 mM de CDs y MJ no mostró diferencias significativas con respecto a los niveles alcanzados en presencia de 70 mM de CDs solas. Estos resultados indican que la concentración óptima de CDs para la extracción de fitoesteroles en SC de zanahoria naranja fue de 50 mM y que el tratamiento con MJ provocó una disminución de su producción, probablemente debido al efecto de esta molécula señal sobre la biosíntesis de otros metabolitos relacionados con la defensa vegetal. La acumulación extracelular de fitoesteroles encontrada con 50 mM de CDs ( $834,3 \pm 41,7$   $\mu$ g/g PS) fue similar a la detectada en SC de zanahoria verde, donde se alcanzó la misma producción a los 21 días de elicitación. Además, estos resultados están de acuerdo con Briceño *et al.* (2012), Sabater-Jara y Pedreño (2013), y Almagro *et al.* (2016) quienes observaron que la presencia de CDs incrementó la producción de fitoesteroles en cultivos celulares de tomate, zanahoria naranja y lino encontrando valores de 50, 6500 y 1302  $\mu$ g/g PS, respectivamente.

Por otro lado, en las células de zanahoria naranja se identificaron tres fitoesteroles diferentes: campesterol,  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol (Figura 2B) mientras que en el medio extracelular también se detectó fucosterol (Figura 3B). Este fitoesterol es el precursor directo del  $\beta$ -sitosterol que a su vez es transformado en estigmasterol. En cuanto al porcentaje de cada uno de los fitoesteroles en el medio extracelular, el principal fitoesterol encontrado fue el  $\beta$ -sitosterol seguido de campesterol, coincidiendo con los resultados obtenidos por Sabater-Jara y Pedreño (2013). La acumulación de  $\beta$ -sitosterol en el medio de cultivo podría explicar la disminución de estigmasterol en el interior de las células en presencia de CDs. Al igual que ocurría en las células de zanahoria verde (Capítulo 1), el estigmasterol se acumuló principalmente en aquellos tratamientos que presentan MJ.

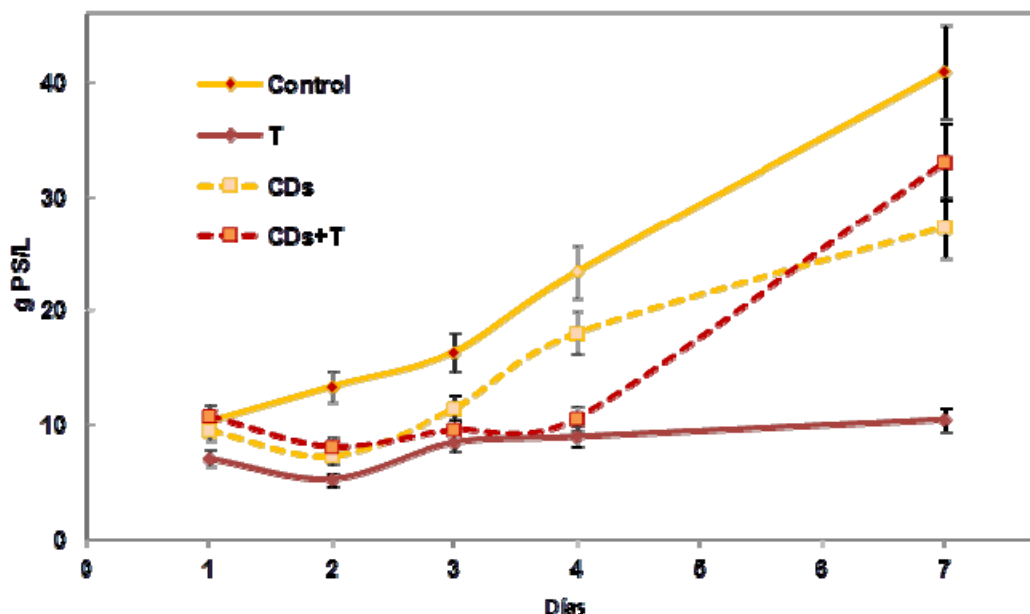


**Figura 3.** Efecto de 50 y 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ solos o en combinación sobre la acumulación extracelular de fitoesteroles totales en SC de zanahoria verde tras 7 días de tratamiento expresado en mg/L (A) y expresado en % de cada fitoesterol en particular (B). Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

## 1.2 Efecto de la terbinafina sobre la producción de escualeno y fitoesteroles en cultivos celulares de zanahoria naranja

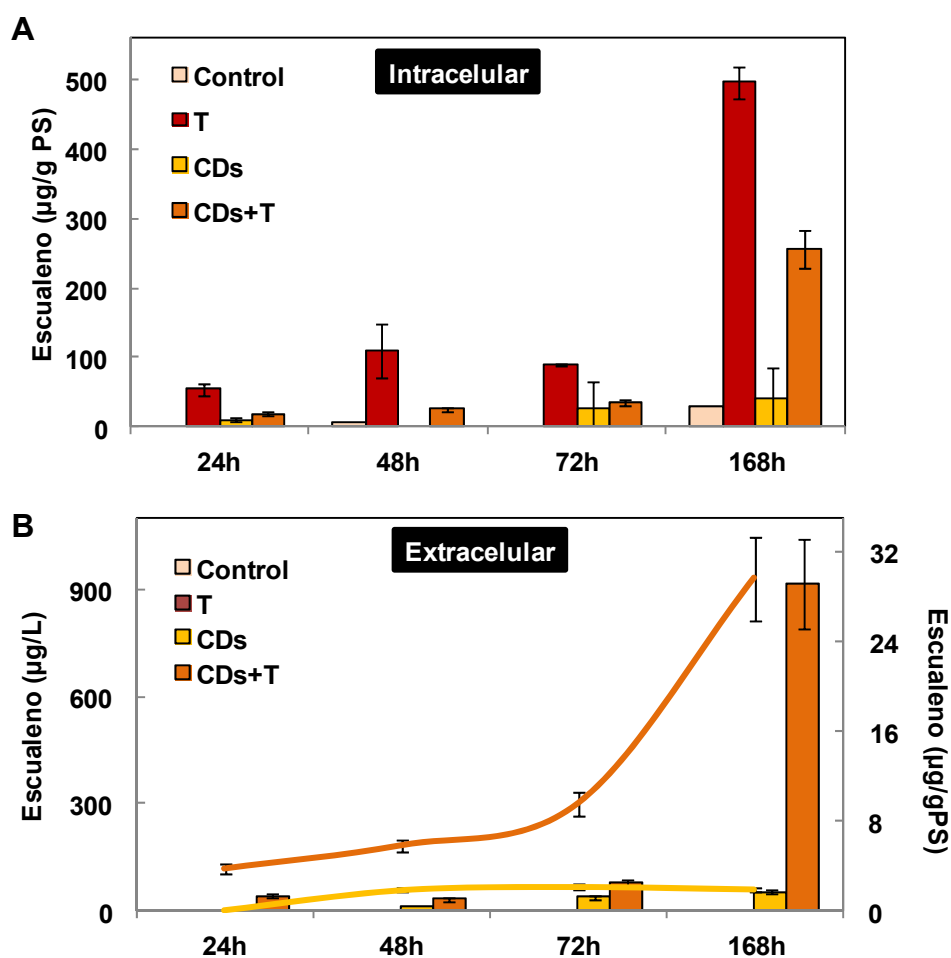
La T es un agente anti fúngico que actúa inhibiendo la biosíntesis de ergosterol actuando sobre la enzima SQO, impidiendo así la biosíntesis de esteroides. La enzima SQO cataliza la conversión de escualeno a 2,3-oxidosqualeno, primer paso para la formación de los compuestos triterpénicos. Este inhibidor también ha sido utilizado en plantas de tabaco con el fin de estudiar la ruta de biosíntesis de fitoesteroides en plantas (Nurhalim *et al.*, 2014). Así, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de este inhibidor de la ruta de biosíntesis de fitoesteroides en SC de zanahoria naranja sobre la producción de escualeno y fitoesteroides. Además, se evaluó el efecto del inhibidor en condiciones de elicitación con CDs.

Como se observa en la Figura 4, todos los tratamientos produjeron una reducción del crecimiento celular con respecto al control. De hecho, se observó que las SC de zanahoria naranja tratadas únicamente con T no crecieron durante los 168h de tratamiento. Sin embargo, al añadir CDs y T conjuntamente, el crecimiento fue similar al de las SC tratadas con CDs solas a los 1, 2, 3 y 7 días de tratamiento (Figura 4).



**Figura 4.** Efecto de 0,2 mg/ml de T sobre el crecimiento de celular de SC de zanahoria naranja en condiciones control y elicidadas con 50 mM de CDs durante 7 días. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

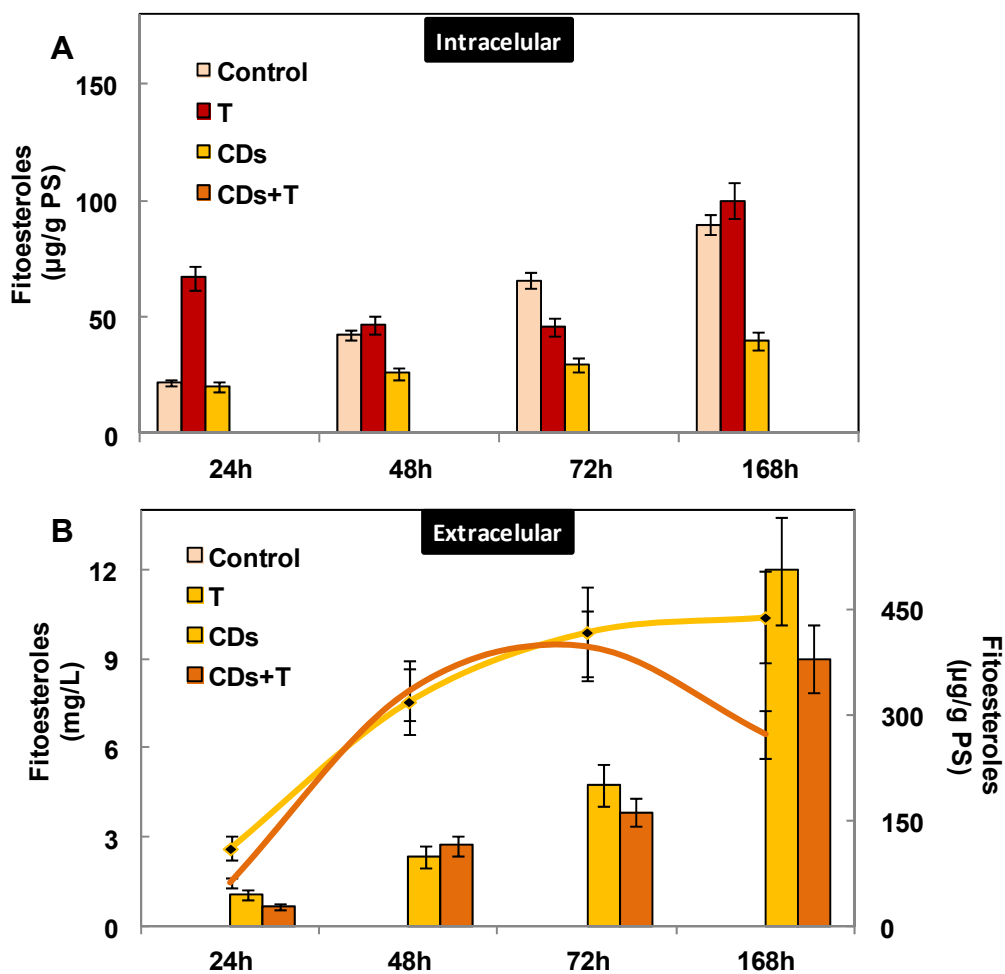
Por otro lado, al tratar las SC de zanahoria naranja con T se observó un incremento significativo en la producción intracelular de escualeno, precursor de los fitoesteroles, tras 168h de tratamiento ( $497,0 \pm 23,5 \mu\text{g/g PS}$  que equivale a  $5,4 \text{ mg/L}$ ) que no se observa en condiciones control (Figura 5A). Cuando las SC se trataron con T y CDs en combinación se observó una menor acumulación ( $225 \pm 35,2 \mu\text{g/g PS}$ ) que en el tratamiento con T solo. Además, los niveles alcanzados en presencia de CDs fueron similares a los encontrados en el control. Por otro lado, se evaluó la capacidad de las CDs para acumular escualeno en el medio extracelular (Figura 5B). Como muestra la Figura 5B, solo en los tratamientos con CDs se identificó el escualeno encontrándose los mayores niveles de acumulación en las SC tratadas con T y CDs conjuntamente tras 168h ( $27,7 \pm 1,6 \mu\text{g/g PS}$  lo que equivale a  $905,1 \pm 52,5 \mu\text{g/L}$ ). Sin embargo, en SC tratadas con CDs solas esta acumulación extracelular fue muy baja y se encontró a niveles basales (Figura 5B).



**Figura 5.** Efecto de 0,2 mg/ml de T y 50 mM de CDs separadamente o en combinación sobre la acumulación intracelular (A) y extracelular (B) de escualeno durante 168h. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Además de la acumulación de escualeno, se evaluó el efecto de la T sobre la producción de fitoesteroles. Como muestra la Figura 6, se observó que a 24h, la acumulación intracelular de fitoesteroles aumentó en presencia de T mientras que a 168h de tratamiento la acumulación de fitoesteroles fue la misma que en el control. Además sólo se encontraron fitoesteroles en el medio en presencia de CDs tanto solas como combinadas con T. Sin embargo, la acumulación extracelular fue similar tanto en presencia como en ausencia de T (Figura 6B).





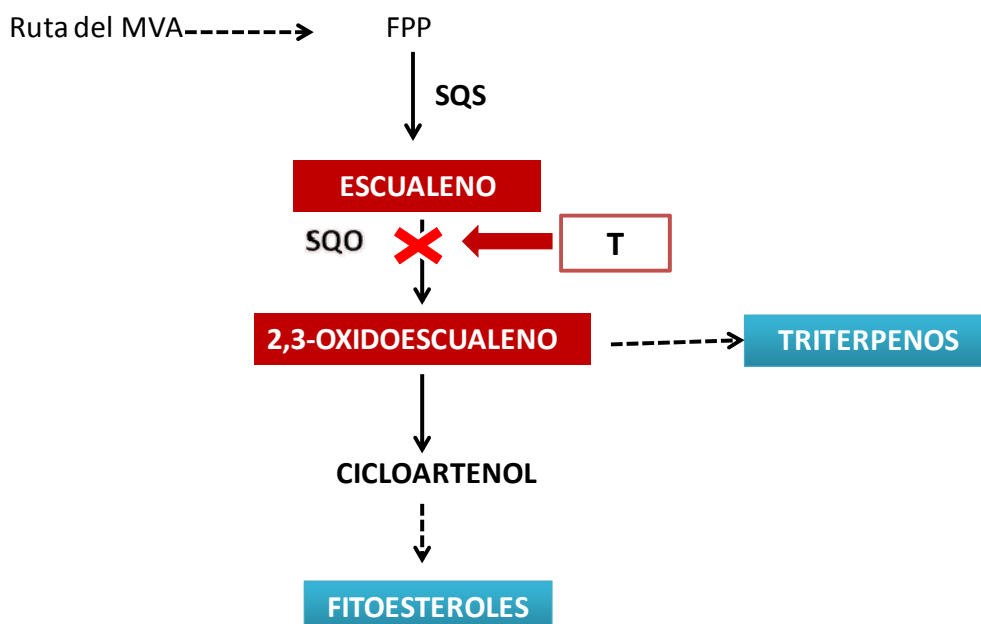
**Figura 6.** Efecto de 0,2 mg/ml de T y 50 mM de CDs separadamente o en combinación sobre la acumulación intracelular (A) y extracelular (B) de fitosteroles durante 168h. Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes.

Por tanto, los resultados mostraron que la T provocó una acumulación de escualeno y sin embargo no provocó una disminución significativa de fitosteroles. Además, se observó que las SC tratadas con T no crecieron durante las 168h de tratamiento. En contra de nuestros resultados, Flores-Sánchez *et al.* (2002) encontraron que la misma concentración de T no disminuyó el crecimiento celular de SC de *Uncaria tomentosa* aunque sí afectaba a la viabilidad celular. Sin embargo los valores de escualeno encontrados en estos cultivos de *U. tomentosa* fueron bajos (22,2 µg/g PS)

tras 13 días de tratamiento. Sin embargo, nuestros resultados están de acuerdo con Yates *et al.* (1991), quienes observaron que el crecimiento de SC de apio tratadas con 30 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de T fue significativamente menor que el tratamiento control tras 3 días de incubación. Estos autores sugirieron que la disminución del crecimiento celular se debe más bien a la disminución del contenido de esteroides que a la acumulación de escualeno en cantidades tóxicas (Yates *et al.*, 1991). Sin embargo, con las concentraciones más bajas (menor de 1  $\mu\text{g/ml}$ ), la disminución de esteroides no fue significativa, al igual que la acumulación de escualeno, siendo similar a su tratamiento control. Wentzinger *et al.* (2002) observaron en plantas de tabaco una gran acumulación de escualeno (5 mg/g PS) y una disminución del contenido de fitoesteroides del 50 % aproximadamente utilizando 30  $\mu\text{M}$  de T. Recientemente, Kobayashi *et al.* (2017), también mostraron que la presencia de 5  $\mu\text{M}$  de T redujo la concentración de fitoesteroides entre un 20 y un 40% en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban el gen sesquiterpeno sintasa. Sin embargo, estos autores no encontraron una reducción significativa cuando utilizaron concentraciones más bajas de T (1  $\mu\text{M}$ ). A pesar de que estas concentraciones de T son menores que las utilizadas en esta tesis, la cantidad de T utilizada en este trabajo de investigación podría no ser suficiente para inhibir a esos niveles la biosíntesis de fitoesteroides en SC de zanahoria naranja. Además, al no estar completamente inhibida, podría haber un aumento de fitoesteroides a 24h por la rápida acumulación del escualeno. Por tanto, los resultados sugieren que el efecto de la T sobre el crecimiento de las SC de zanahoria naranja podría deberse a una acumulación de escualeno en cantidades tóxicas para las células como ocurre en hongos (Fravre *et al.*, 2004) aunque se debería probar si concentraciones más bajas acumulan escualeno sin perjudicar a la viabilidad celular ni al crecimiento.

Por otro lado, en vista de los resultados obtenidos en presencia de CDs, estos elicitores podrían estar amortiguando el efecto del inhibidor sobre el crecimiento celular permitiendo la acumulación de escualeno con un menor efecto negativo. Por tanto, estos resultados sugieren que la línea de zanahoria naranja tratada con T y CDs podría ser una alternativa biotecnológica para la

producción de escualeno. Además, el uso de las CDs podría disminuir el efecto negativo de T sobre el crecimiento celular aunque son necesarios más estudios utilizando diferentes concentraciones del inhibidor.

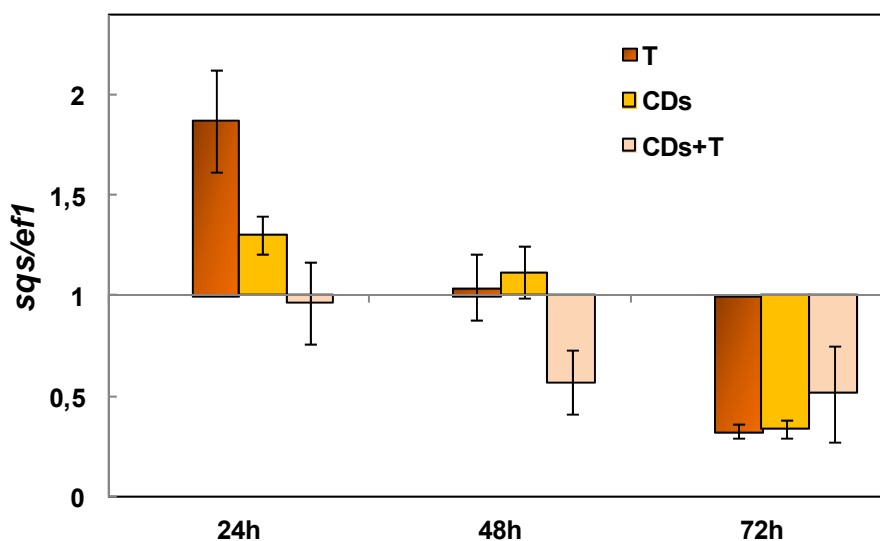


**Figura 7.** Ruta de biosíntesis de los fitoesteroides simplificada y lugar de acción de la T. SQS: escualeno sintasa; SQO: escualeno epoxidasa

Por otro lado, se analizó el efecto de la T sobre la expresión del gen *sqs* que regula la síntesis de escualeno y, por tanto, el primer paso clave de la ruta de biosíntesis de fitosteroides (Figura 7). Como se observa en la Figura 8, la T produjo un incremento de los niveles de expresión tras 24h de tratamiento con respecto al control y a los tratamientos con CDs. Sin embargo, tras 48h el nivel de expresión fue similar en control, T y CDs, mientras que el tratamiento de CDs con T presentó los niveles más bajos. A 72h, los niveles de expresión de *sqs* en todos los tratamientos fueron más bajos que en el control (Figura 8). Estos resultados podrían explicar la acumulación de fitoesteroides en las células. Se ha descrito que la sobreexpresión del gen *sqs* parece estar relacionada con una acumulación mayor de fitoesteroides. De hecho, diversos estudios sugieren que el gen *sqs* regula el flujo de carbono hacia la síntesis de fitoesteroides (Seo

*et al.*, 2005; Devarenne *et al.*, 2002). Por tanto, el aumento de fitosteroles observado a 24h en presencia de T (ver Figura 6) podría explicarse por la mayor expresión del gen *sqs*. Además, la expresión de este gen en presencia de T también podría explicar la alta acumulación de escualeno (Figura 5).

Además, los resultados de expresión del gen *sqs* en presencia de CDs sugirieron que estos compuestos no actuaron como moléculas elicitores sobre la ruta de biosíntesis de fitosteroles sino que favorecieron su extracción al medio.



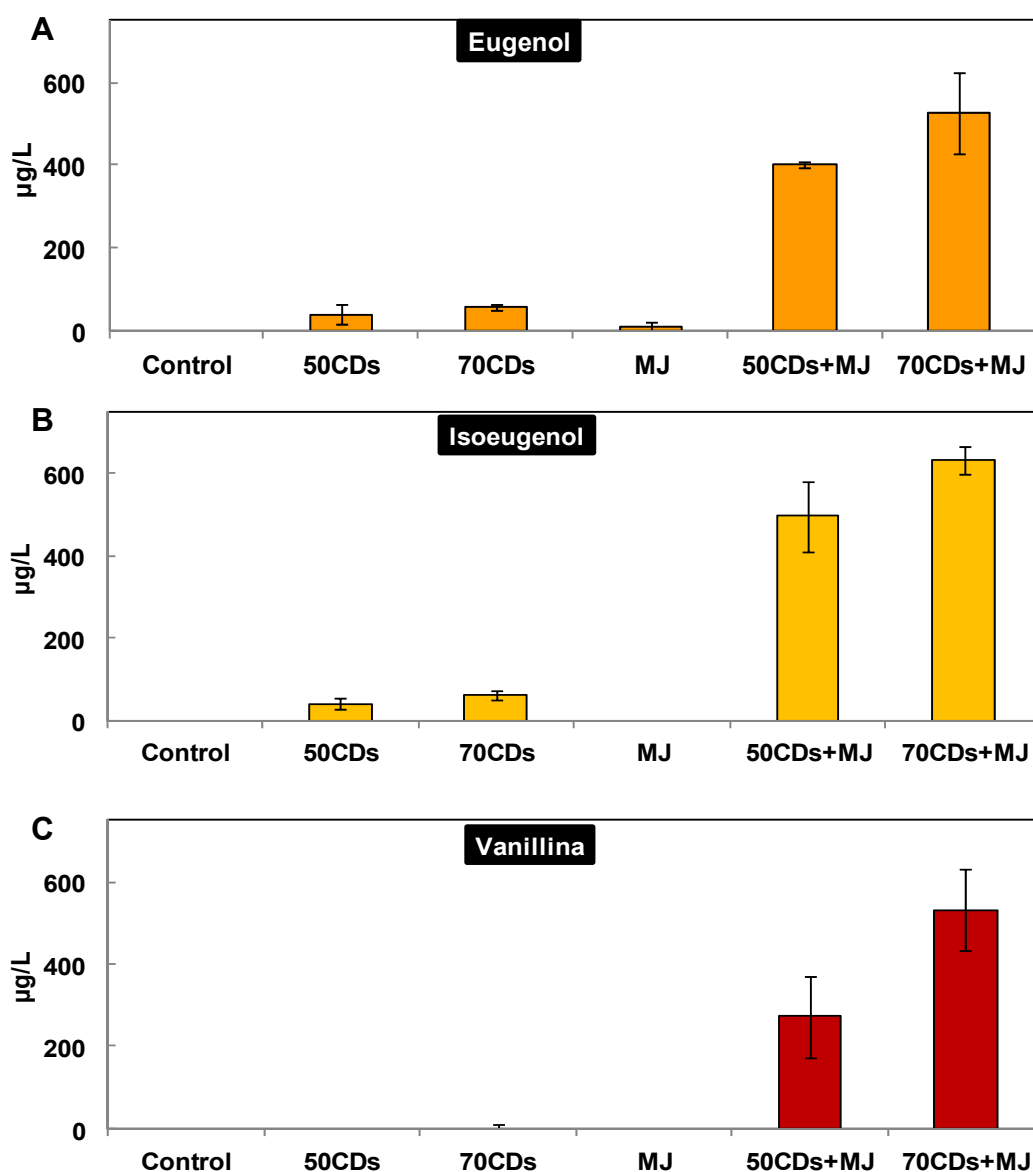
**Figura 8.** Variación de la expresión relativa del gen *sqs* en cultivos celulares de zanahoria naranja en presencia de T y CDs. El análisis de la expresión se realizó mediante qPCR frente al gen de referencia *ef1*. El control representa el valor de expresión=1. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres réplicas independientes.

### 1.3 Caracterización de la producción de compuestos fenólicos en cultivos celulares de zanahoria naranja elicitados con ciclodextrinas y/o jasmonato de metilo

Los compuestos fenólicos en frutas y vegetales tienen gran interés debido a la relación que guardan con la calidad sensorial de los mismos en términos de astringencia, sabor y aroma. Además de poseer diferentes propiedades farmacológicas y terapéuticas, estos metabolitos aumentan la resistencia de las

frutas frente al ataque de parásitos. Sin embargo, su función fisiológica no está del todo clara. En raíces de zanahoria se han identificado diferentes compuestos de naturaleza fenólica como el ácido cafeico, ácido clorogénico y cumarinas entre otros (Sarkar y Phan, 1975; Alasalvar *et al.*, 2001).

Aunque el objetivo principal de este capítulo fue evaluar el efecto de CDs y MJ sobre los compuestos isoprenoides, otros metabolitos fueron identificados mediante GC/MS. Los principales compuestos fenólicos encontrados fueron eugenol, isoeugenol y vanillina. Además, estos compuestos fueron solamente identificados y cuantificados en el medio extracelular ya que los niveles en el interior de las células estaban por debajo del límite de detección. Como se observa en la Figura 9, la producción de estos compuestos solamente se detectó en las SC de zanahoria naranja elicidadas con CDs. Sin embargo, la combinación de CDs y MJ incrementó su producción. De hecho, el tratamiento de 50 mM o 70 mM de CDs combinado con MJ incremento la producción 10,6 y 9,46 veces respecto al tratamiento con CDs solas, respectivamente. Por lo tanto, el tratamiento en presencia de 70 mM de CDs y MJ fue el más efectivo en todos los casos alcanzando valores de eugenol de  $524,8 \pm 98,6 \mu\text{g/L}$ , de isoeugenol de  $634,6 \pm 33,9 \mu\text{g/L}$  y de vanillina de  $523,7 \pm 100 \mu\text{g/L}$ . Estos resultados indicaron que la combinación de CDs y MJ provocó un efecto sinérgico sobre la acumulación de compuestos fenólicos ya que la suma individual de MJ y CDs fue menor ( $116 \mu\text{g/g PS}$ ) que la acumulación de estos compuestos en el tratamiento combinado con 70 mM CDs y MJ ( $1700 \mu\text{g/g PS}$ ).



**Figura 9.** Efecto de 50 y 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ solos o en combinación sobre la acumulación extracelular de eugenol (A), isoeugenol (B) y vanillina (C) en SC de zanahoria naranja tratadas con 50 mM y 70 mM de CDs separadamente o en combinación con 100  $\mu$ M de MJ tras 7 días de elicitación. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Sabater-Jara y Pedreño (2013), quienes observaron que el tratamiento combinado de CDs y MJ incrementaba significativamente estos compuestos fenólicos en cultivos celulares de zanahoria. Kim *et al.*, (2006) también mostraron que MJ

incrementó un 56% el contenido de eugenol en SC de *Ocimum basilicum*. Resultados similares se obtuvieron en SC de lechuga (Kim *et al.*, 2007). Además, estos autores observaron un aumento de la actividad de la enzima (PAL), enzima reguladora de la ruta fenilpropanoide, en presencia de MJ que se corelacionó con un aumento del contenido de compuestos fenólicos como el ácido cafeico. Por tanto, estos autores sugirieron que el MJ podría estar actuando favoreciendo el flujo de carbono hacia la ruta de biosíntesis de los compuestos fenólicos (Kim *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que bajas concentraciones de MJ (25  $\mu\text{M}$ ) son suficientes para incrementar significativamente la concentración de vanillina en SC de *C. chinense* (Altúzar-Molina *et al.*, 2011). Todos estos resultados sugieren que el MJ es capaz de desencadenar respuestas de defensa en SC vegetales induciendo la síntesis de compuestos antioxidantes como isoeugenol, eugenol y vanillina. Además, la presencia de CDs promueve su secreción al medio extracelular.

#### **1.4 Caracterización de la producción de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja**

La zanahoria es una planta bianual cuya principal característica es la gran acumulación de carotenoides en sus raíces. A pesar de que la raíz de zanahoria era blanca antes de su domesticación, existen numerosas variedades de diferentes colores en función del pigmento que acumulan. El cultivar más extendido es el de zanahoria naranja, el cual acumula grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno. Además, esta acumulación de carotenoides en oscuridad es inusual en plantas (Rodríguez-Concepción y Stange, 2013; Stange Klein y Rodríguez-Concepción, 2015). Los carotenoides se pueden dividir principalmente en dos grupos: carotenos y xantofilas. Todos los carotenoides se biosintetizan en plastídios a partir de precursores obtenidos a partir de la ruta del MEP. El primer precursor específico de todos los carotenoides es el fitoeno.

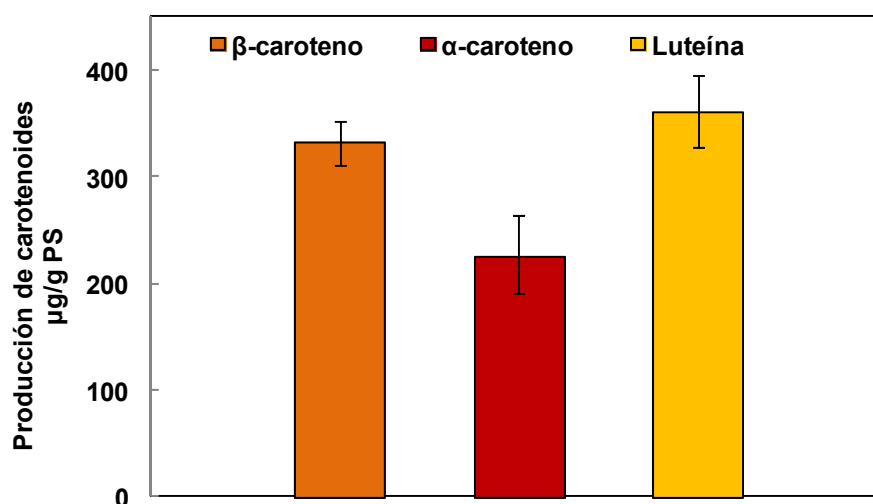
### 1.4.1 Identificación y cuantificación de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja

Teniendo en consideración la importancia de los carotenoides en la salud humana, ya que son potentes antioxidantes y precursores de la vitamina A como en el caso del  $\beta$ -caroteno, el objetivo de este estudio fue cuantificar los principales carotenoides producidos en SC de zanahoria naranja de manera constitutiva o en condiciones de elicitación.

En una primera aproximación en el laboratorio del Dr. Fraser (Royal Holloway University of London) se identificaron y cuantificaron los principales carotenoides (luteína y  $\beta$ -caroteno) presentes en SC control de zanahoria naranja. Además, también se encontraron niveles significativos de  $\alpha$ -caroteno, cuyo contenido en plantas es menos común.  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno tienen una importante función en nutrición como pro-vitamina A. Ambos compuestos son sintetizados a través de ciclaciones del licopeno, carotenoide característico del tomate y la sandía. Estas ciclaciones son mediadas por la enzima  $\beta$ LCYB en el caso del  $\beta$ -caroteno y por las enzimas  $\beta$ LCYB y  $\epsilon$ LCYE en el caso del  $\alpha$ -caroteno. Sin embargo, la luteína, una xantofila que no tiene función como pro-vitamina A, se forma por hidroxilación del  $\alpha$ -caroteno.

Como se observa en la Figura 10, los niveles de  $\beta$ -caroteno y luteína registrados en las SC de zanahoria naranja tras 96 h de cultivo fueron similares, alcanzando valores de  $331,9 \pm 0,4 \mu\text{g/PS}$  y  $361,3 \pm 33,9 \mu\text{g/PS}$ , respectivamente, mientras que los niveles de  $\alpha$ -caroteno fueron más bajos. Otros autores han descrito que la acumulación de  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno en raíces de zanahoria variedad sativa fue de  $600 \mu\text{g/g PS}$  y  $320 \mu\text{g/g PS}$ , respectivamente después de 12 días de cultivo. Los principales carotenoides identificados en las SC de zanahoria naranja coinciden con los principales carotenoides encontrados en raíces de zanahoria (Baranska *et al.*, 2006; Rodríguez-Concepción y Stange, 2013). Además, en nuestras SC se identificaron otros carotenoides acumulados en menor proporción como el licopeno, violaxantina y fitoeno.



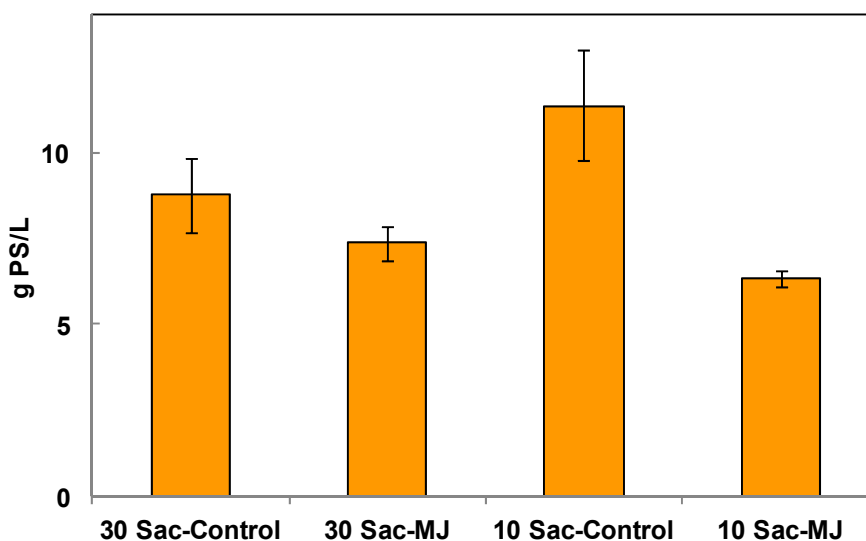


**Figura 10.** Identificación de los principales carotenoides presentes en SC de zanahoria naranja sin elicitar identificados tras 96 h de cultivo mediante UPLC. Los datos están expresados en  $\mu\text{g/g PS}$ . Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

#### 1.4.2 Efecto de la concentración de sacarosa y jasmonato de metilo sobre la producción de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja

Con el objetivo de encontrar una estrategia óptima para la obtención de carotenoides a partir de SC de zanahoria naranja, se evaluó el efecto de diferentes estreses tanto bióticos (MJ) como abióticos (sacarosa) tras 96 h de elicitación. Para ello, SC de zanahoria naranja fueron elicidadas con 100  $\mu\text{M}$  de MJ en medios de cultivo que contenían 10 o 30 (concentración estandar de sacarosa en el medio de cultivo) g/L de sacarosa, para determinar si la fuente de carbono era un factor limitante en la producción de estos compuestos ya que se ha observado que la reducción de factores esenciales como el azúcar o el nitrógeno en el medio de cultivo pueden llevar a un incremento de metabolitos secundarios (Knobloch y Berlin, 1981; Yamakawa *et al.*, 1983; Rao y Ravishankar, 2002). En primer lugar, se determinó el efecto de la sacarosa y MJ separadamente o en combinación sobre el crecimiento celular. La Figura 11 muestra que sólo aquellas SC tratadas con MJ presentaron un menor crecimiento de la biomasa celular respecto al control con 30 g/L, mientras que

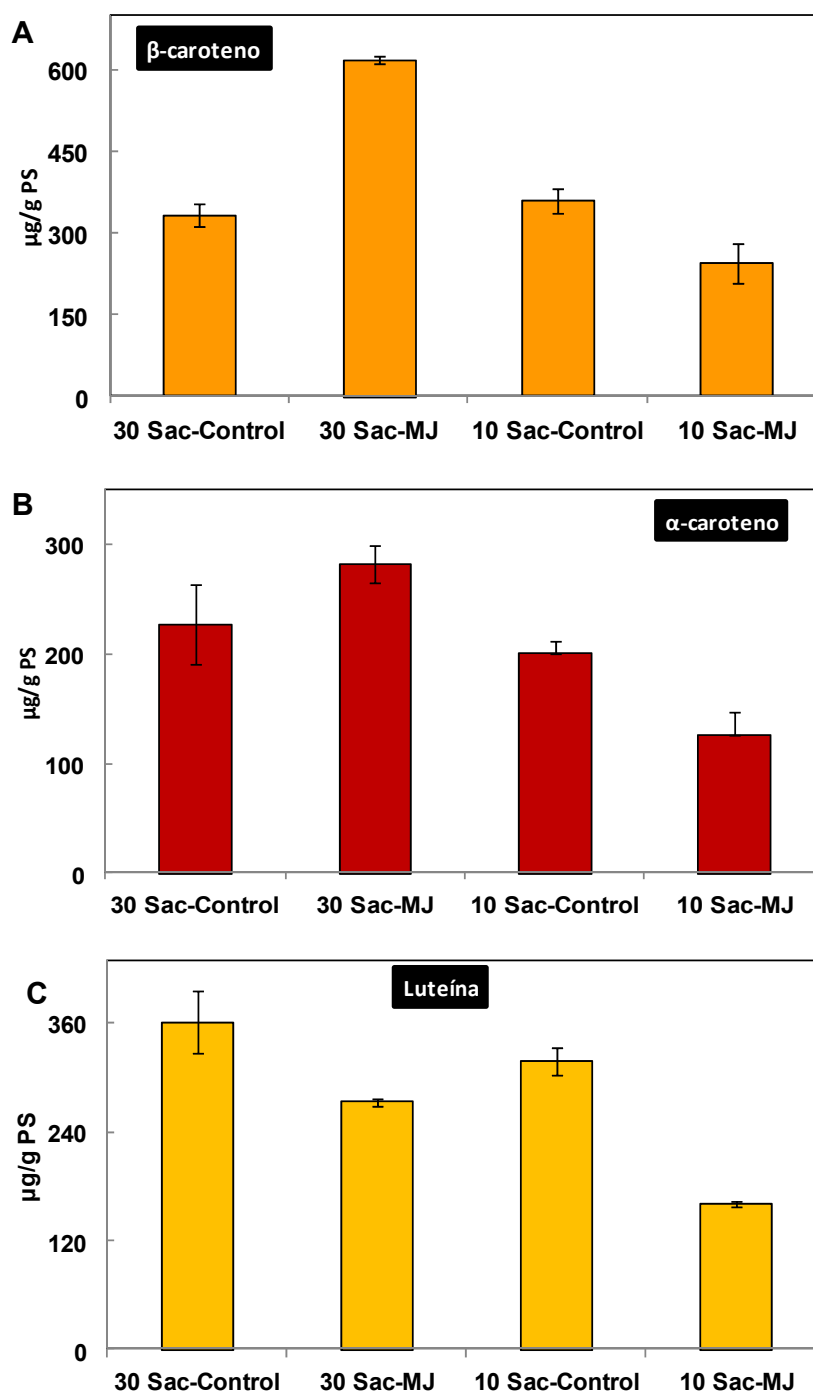
la disminución de la fuente carbonada (10 g/L) no afectó significativamente al crecimiento celular.



**Figura 11.** Efecto de la concentración de de sacarosa (10 y 30 g/L) y de la adición de 100  $\mu$ M de MJ sobre el crecimiento de SC de zanahoria naranja tras 96 h de cultivo. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Tras evaluar el efecto de los elicitores sobre el crecimiento celular, se analizó el contenido intracelular de  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y luteína. Como se observa en la Figura 12A, no se encontraron diferencias significativas en la producción de  $\beta$ -caroteno en las SC control crecidas con 10 y 30 g/L de sacarosa. Sin embargo, el tratamiento con MJ y 30 g/L de sacarosa provocó la mayor acumulación de este pigmento ( $619,3 \pm 4 \mu\text{g/g PS}$ ). El tratamiento que presentó los valores más bajos de  $\beta$ -caroteno fue el tratamiento en presencia de MJ y 10 g/L de sacarosa ( $224,2 \pm 36,3 \mu\text{g/g PS}$ ) (Figura 12A).

La tendencia sobre la producción de  $\alpha$ -caroteno fue similar a la encontrada en la producción de  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos excepto en presencia de 10 g/L de sacarosa y MJ ( $126,5 \pm 20,7 \mu\text{g/g PS}$ ) donde los niveles de producción fueron más bajos que el control con 30 g/L de sacarosa ( $226,6 \pm 36,5 \mu\text{g/g PS}$ ) (Figura 12B).



**Figura 12.** Efecto de la concentración de sacarosa (10 o 30 g/L) y de 100  $\mu\text{M}$  de MJ separadamente o en combinación sobre la acumulación intracelular de  $\beta$ -caroteno (A),  $\alpha$ -caroteno (B) y luteína (C) en SC de zanahoria naranja tras 96 h de tratamiento. Los carotenoides fueron analizados mediante UPLC. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Por último, en la Figura 12C se observa que el tratamiento control con 30 g/L de sacarosa es el que presentó la mayor acumulación de luteína ( $361,3 \pm 33,9$   $\mu\text{g/g}$  PS). Además, los niveles de producción en presencia de 10 g/L de sacarosa fueron similares al control con 30 g/L de sacarosa, mientras que se observó una disminución en presencia de MJ y 10 g/L de sacarosa (Figura 12C).

En este estudio se analizaron dos estrategias para incrementar la producción de carotenoides. Por un lado, el uso de un elicitor como el MJ, una molécula señal que desencadena respuestas de defensa en plantas, y por otro la manipulación del medio de cultivo. Estudios previos demostraron que la variación de factores como la luz, la concentración de sacarosa o los reguladores del crecimiento pueden incrementar la producción de metabolitos (Stafford *et al.*, 1986; Misawa, 1985; Rao y Ravishankar, 2002). Además, ambas estrategias podrían actuar conjuntamente ya que existen estudios que muestran que la acción de MJ para incrementar la síntesis de compuestos como el *trans*-resveratrol podría depender de la concentración de azúcar en el medio de cultivo (Belchí-Navarro *et al.*, 2012).

Observando el efecto del MJ solo, nuestros resultados sugieren que este elicitor podría inducir la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno en SC de zanahoria naranja en condiciones de cultivo estándar. Sin embargo, la presencia del elicitor no afectó a la producción de  $\alpha$ -caroteno y tuvo un efecto negativo sobre la producción de luteína. De acuerdo con nuestros resultados, Saniewski y Czapski (1983) observaron que MJ parecía inducir la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno en tomate. Además, Pérez *et al.* (1993) también mostraron que la vaporización con MJ aumentó la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno en la piel de manzanas Golden. Otros estudios más recientes mostraron que la presencia de MJ no variaba la concentración de carotenoides en plantas de lechuga a lo largo del tiempo mientras que en tratamientos control esta concentración de pigmentos disminuía sugiriendo que el MJ podría preservar los niveles de carotenoides y, por tanto, incrementar los valores nutricionales en plantas de lechuga (Kim *et al.*, 2007).

Por otro lado, dado que los cultivos celulares suelen crecer de manera heterotrófica, los azúcares simples suponen la fuente de carbono de estas células. Así, se ha visto que la adición de diferentes concentraciones de sacarosa al medio de cultivo regula la producción de polifenoles en *V. vinifera*. De hecho, también se observó que el azúcar induce la biosíntesis de antocianinas en *Arabidopsis* (Wind *et al.*, 2010; Teng *et al.*, 2005).

Sin embargo, la variación de azúcar en el medio de cultivo de las SC de zanahoria naranja no afectó ni al crecimiento ni a la producción de carotenoides sugiriendo que 10 g/L es suficiente cantidad de azúcar para actuar como fuente carbonada. A la vista de estos resultados deberían considerarse concentraciones más altas de sacarosa en el medio de cultivo.

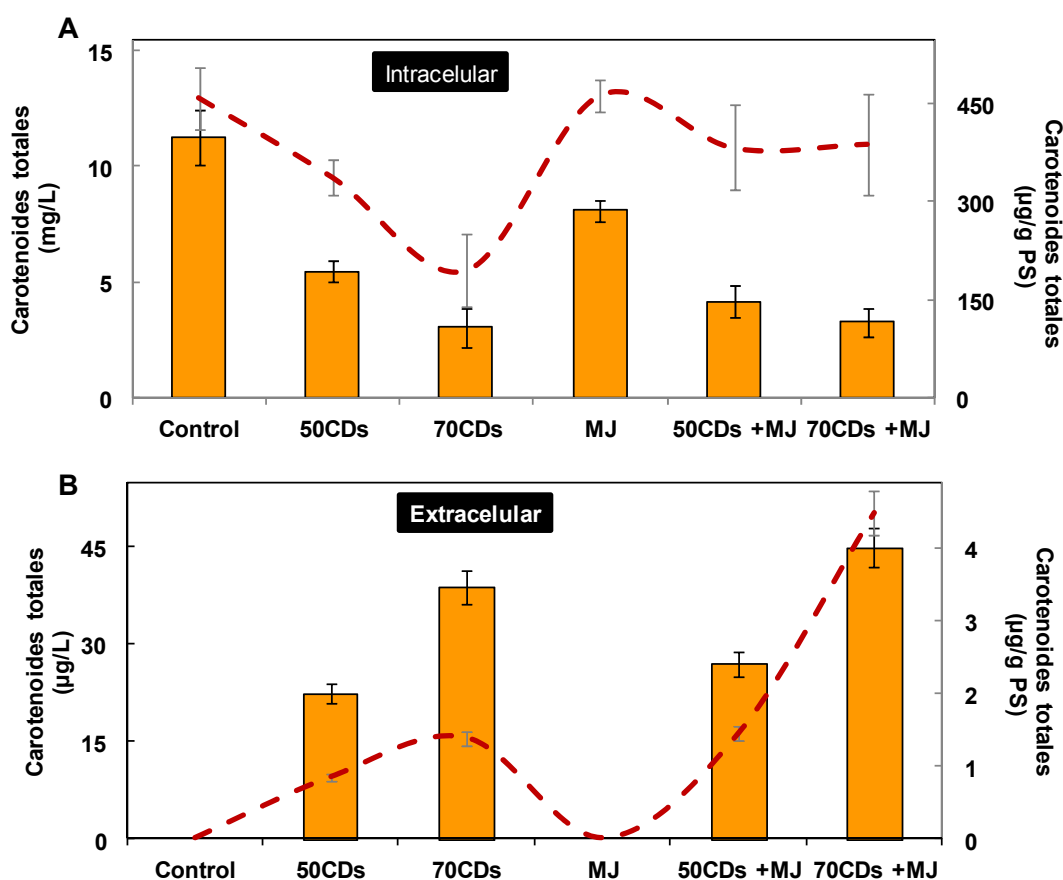
Además, este estudio muestra que el efecto del MJ y el azúcar es diferente cuando se combinan los tratamientos. Resultados similares encontraron Belchí-Navarro *et al.* (2012) en cultivos celulares de *V. vinifera*. Estos autores observaron que la variación de la concentración de azúcar no produjo ningún efecto en los niveles de *trans*-resveratrol. Sin embargo, observaron que cuando se le añadía MJ y se variaba la cantidad de azúcar en el medio los niveles sí variaban. Así, esos autores sugirieron que la concentración óptima de MJ dependía de la cantidad de azúcar presente en el medio (Belchí-Navarro *et al.*, 2012).

Por último, se ha demostrado que la utilización de medios empobrecidos incrementa la biosíntesis de metabolitos secundarios en cultivos celulares vegetales elicitados (Belchí-Navarro, 2012). Por ello, se comprobó si la utilización de 10 y 30 g/L de sacarosa, 100  $\mu$ M de MJ y un medio de cultivo GB empobrecido incrementaba la acumulación de carotenoides. Sin embargo, los resultados mostraron que los niveles de estos compuestos tanto en medio MS como en medio empobrecido GB fueron similares, indicando que la composición mineral del medio de cultivo no es un factor limitante para la biosíntesis de carotenoides (datos no mostrados).

### 1.4.3 Efecto de ciclodextrinas y jasmonato de metilo sobre la producción de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja

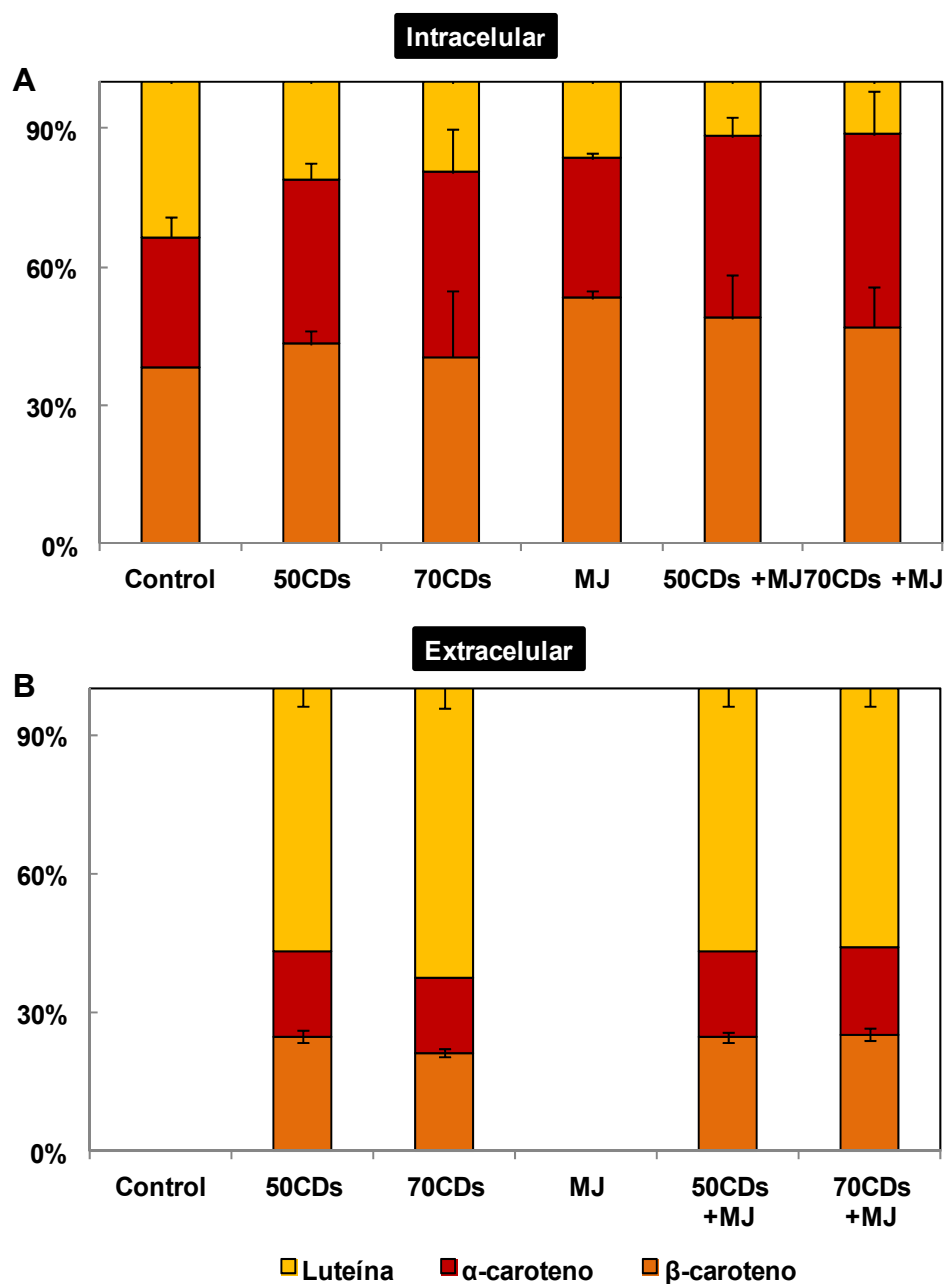
Estudios previos demostraron que las CDs eran capaces de extraer ciertos carotenoides al medio de cultivo de SC vegetales (Rizello *et al.*, 2014; Caretto *et al.*, 2016). Además, numerosos estudios sugieren que la combinación de CDs y MJ provocan un efecto sinérgico sobre la acumulación de metabolitos secundarios en diferentes SC vegetales (Almagro *et al.*, 2014; Belchí-Navarro *et al.*, 2012; Almagro *et al.*, 2010). Teniendo en consideración estos antecedentes, se evaluó el efecto de 50 y 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ separadamente o en combinación sobre la producción de carotenoides intra y extracelulares en SC de zanahoria naranja tras 7 días de elicitación.

La Figura 13 muestra el contenido intracelular y extracelular de carotenoides totales ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y luteína). Como muestra la Figura 13A, los niveles más elevados de carotenoides totales en el interior celular se encontraron en el tratamiento control ( $460,5 \pm 47,6 \mu\text{g/gPS}$ ) y en el tratamiento con MJ ( $463,9 \pm 24,7 \mu\text{g/gPS}$ ). Sin embargo, en las SC tratadas con CDs, se observó una reducción en la acumulación intracelular de carotenoides conforme incrementaba la concentración de CDs. En cuanto al contenido extracelular de carotenoides (Figura 13B), solo se identificaron estos compuestos en las SC de zanahoria naranja tratadas con CDs. Además, a diferencia de lo que ocurre en el interior celular, la acumulación de carotenoides resultó ser mayor conforme aumentaba la concentración de CDs. Así, los tratamientos que presentaron los niveles más elevados de carotenoides totales fueron los tratamientos de 70 mM de CDs solas y en combinación con MJ ( $38,9 \pm 2,6 \mu\text{g/L}$  y  $44,9 \pm 3,5 \mu\text{g/L}$ , respectivamente).



**Figura 13.** Efecto de 50 o 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ, separadamente o en combinación, sobre la producción intracelular (A) y extracelular (B) de carotenoides en SC de zanahoria naranja tras 7 días de tratamiento. Los carotenoides fueron analizados mediante HPLC. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Por otro lado, también se analizó la composición individual de cada carotenoide en cada tratamiento de elicitación con respecto al total de carotenoides analizados (Figura 14). El carotenoide acumulado en mayor proporción en el interior celular en todos los tratamientos fue el  $\beta$ -caroteno representando en torno al 45%, seguido de luteína (35%) y  $\alpha$ -caroteno (20%). Sin embargo, el carotenoide acumulado en mayor proporción en el medio extracelular resultó ser la luteína (Figura 14B) en detrimento del  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno.



**Figura 14.** Efecto de 50 o 70 mM de CDs y 100  $\mu$ M de MJ separadamente o en combinación sobre la composición de carotenoides tras 7 días de elicitación. El contenido está expresado en % de cada carotenoide individual en el interior celular (A) y en el medio extracelular (B). Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que las CDs son capaces de inducir la secreción de carotenoides al medio de cultivo, principalmente luteína. Sin embargo,



observando la cantidad secretada, la mayor parte de los carotenoides se acumulan en el interior celular. A diferencia de los fitoesteroles, los carotenoides son sintetizados y acumulados en los plastidios, lo que podría dificultar la salida de estos compuestos al medio extracelular. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Rizello *et al.* (2014) en cultivos celulares de *A. annua*, quienes observaron que las CDs eran capaces de secretar violaxantina, zeaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno al medio extracelular. Sin embargo, la producción extracelular de luteína en las SC de zanahoria naranja fue menor ( $15 \pm 1,9 \mu\text{g/L}$ ) que la encontrada por Rizello *et al.* (2014) ( $150 \mu\text{g/L}$ ). Los niveles de  $\beta$ -caroteno fueron similares ( $6,7 \pm 2,7 \mu\text{g/L}$ ) en ambos estudios. Además, en este estudio de SC de *A. annua* se observó un incremento de los carotenoides intracelulares en presencia de CDs a los 3 días de incubación y no se encontraron diferencias significativas a los 7 días de tratamiento. Estos resultados sugieren que las CDs podrían incrementar la acumulación intracelular de carotenoides durante los primeros días de cultivo. Además, las CDs en ese cultivo no afectaron a la biomasa, mientras que otros autores sí observaron una disminución de la biomasa en cultivos celulares de *V. vinifera* tratados con CDs (Belchí-Navarro *et al.*, 2012).

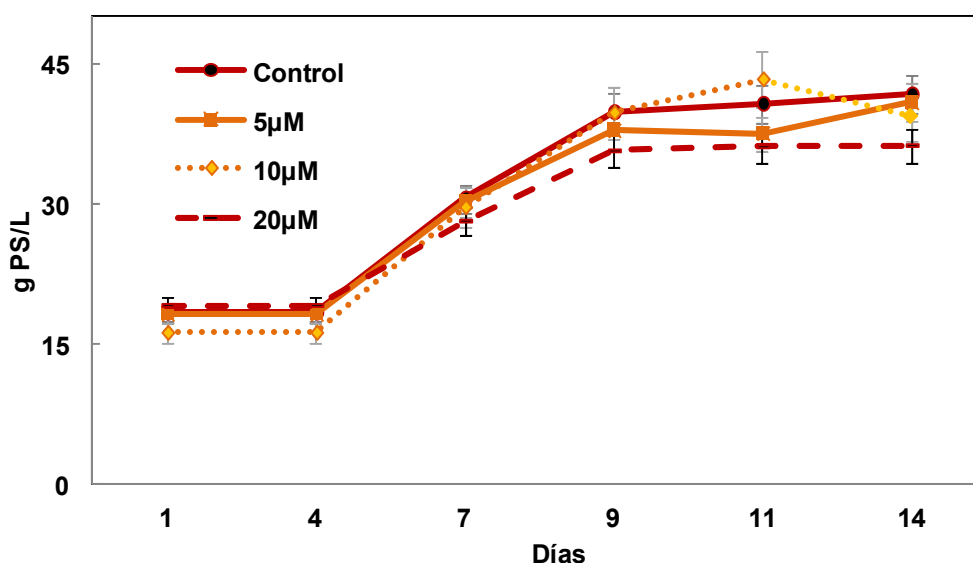
Por otro lado, en presencia de MJ y CDs, la suma de carotenoides tanto intra como extracelular fue mayor que en CDs solas y similar al control, lo que estaría de acuerdo con estudios previos en los que MJ podría tener un efecto de preservación de los carotenoides (Kim *et al.*, 2007).

Todos estos resultados indican que las SC de zanahoria naranja sin elicitar constituyen una fuente alternativa para la obtención de carotenoides sin necesidad de extraerlos desde materia prima vegetal o por síntesis química. Además, los niveles de carotenoides totales no se incrementaron en presencia de elicitors, lo que indica que estos compuestos probablemente estén induciendo rutas metabólicas alternativas y por tanto, disminuyendo el flujo de carbono hacia la biosíntesis de carotenoides

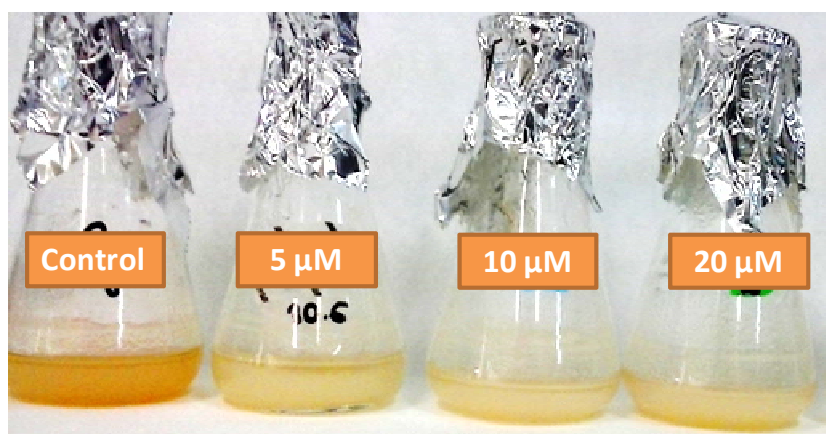
#### **1.4.4 Efecto de la adición del inhibidor diflufenican sobre la producción de carotenoides en cultivos celulares de zanahoria naranja**

DFF es un herbicida conocido por inhibir la biosíntesis de carotenoides y como consecuencia provoca la muerte de la planta ya que los carotenoides tienen funciones vitales en la fotosíntesis. De hecho, la inhibición de estos pigmentos provoca una clorosis de los tejidos verdes debido a la degradación oxidativa de las clorofilas (Boger y Sandmann, 1998; Dayan y Zaccaro, 2012). Como muchos otros inhibidores como el norflurazón o la fluridona, el DFF actúa sobre la enzima PDS impidiendo la desaturación del fitoeno y la biosíntesis de licopeno. Teniendo en consideración que el fitoeno, precursor de los carotenoides, es un compuesto de alto valor añadido y que raramente se acumula en plantas, se comprobó si la adición de DFF a SC de zanahoria naranja incrementaba su acumulación. Para ello, se determinó el efecto de diferentes concentraciones del inhibidor sobre el crecimiento celular y sobre la producción de carotenoides (Figura 15).

Como se observa en la Figura 15, las SC tanto control como las tratadas con diferentes concentraciones de DFF mostraron un crecimiento típicamente sigmoide, y no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos hasta el día 11 de elicitación. Sin embargo, transcurridos 14 días de cultivo, las SC tratadas con 20  $\mu\text{M}$  de DFF presentaron una ligera disminución del crecimiento. Además, la viabilidad no se vio afectada en ninguno de los tratamientos realizados (datos no mostrados). Estos resultados indican que el tratamiento con DFF no alteró el crecimiento celular de las SC de zanahoria naranja a pesar de tratarse de un herbicida. Esto podría deberse a que en los cultivos celulares, la inactivación de la fotosíntesis y de la función fotoprotectora de los carotenoides por el DFF, no resulta tan perjudicial como ocurre en los tejidos verdes de las plantas.



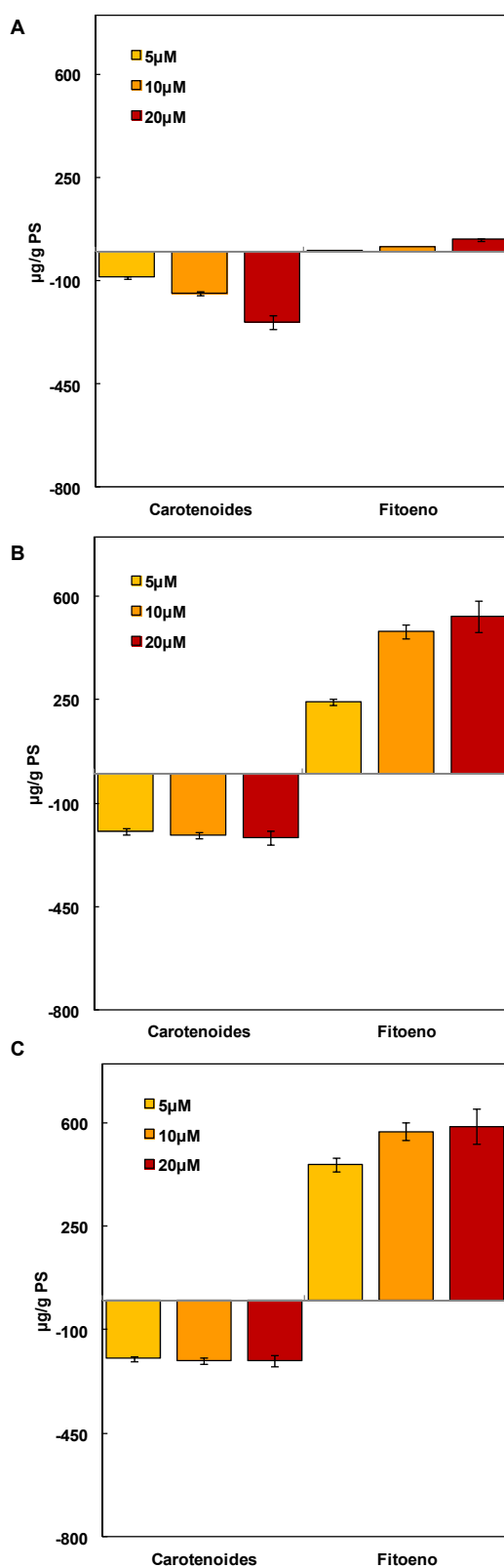
**Figura 15.** Efecto de diferentes concentraciones de DFF (5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) sobre el crecimiento de SC de zanahoria naranja durante 14 días de cultivo. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.



**Figura 16.** Efecto macroscópico del DFF sobre las SC de zanahoria naranja control y tratadas con 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  de DFF a los 7 días de tratamiento.

A continuación, se determinó el efecto de DFF sobre la acumulación de carotenoides y fitoeno durante 14 días de tratamiento. Los resultados mostraron que el DFF tuvo un efecto negativo sobre la acumulación de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y luteína y un efecto positivo sobre la acumulación de fitoeno (Figura 17). Además, la adición de DFF llevó asociada una pérdida del color de las SC de zanahoria naranja (Figura 16). Así, tras 24h de tratamiento,

se observó que las concentraciones usadas (5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) de DFF produjeron una disminución de la acumulación de carotenoides totales ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y luteína) frente a una ligera acumulación de fitoeno (Figura 17). La máxima inhibición se encontró a los 7 días, encontrándose niveles muy bajos de  $\beta$ ,  $\alpha$ -caroteno y luteína mientras se encontró la máxima acumulación de fitoeno. No se encontraron grandes diferencias entre los 7 y los 11 días de tratamiento, lo que sugiere una limitación de los precursores del fitoeno. Comparando los tratamientos, en los tres casos se observa un comportamiento similar. Sin embargo, la concentración de 5  $\mu\text{M}$  no llegó a alcanzar los niveles de producción de 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Además, no se observaron diferencias significativas entre ambas concentraciones. Estos resultados sugieren que la concentración óptima para la producción de fitoeno fue 10  $\mu\text{M}$  siendo el tiempo óptimo de incubación de 7 días.



**Figura 17.** Concentración de carotenoides y fitoeno en el interior celular normalizada respecto al control durante 24 h (A), 7 días (B) y 11 días (C) de cultivo. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

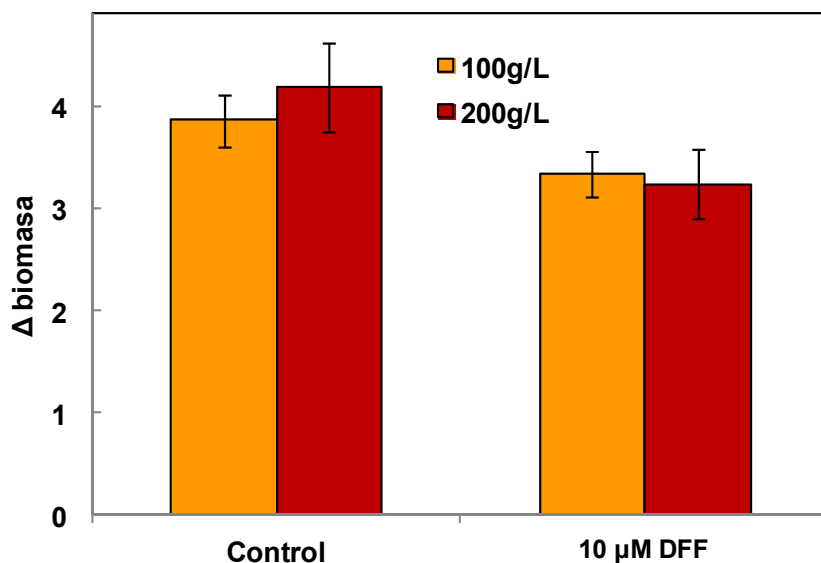
Por otro lado, la enzima PDS es la diana de muchos herbicidas. La inhibición de la acción de la PDS impide la desaturación del fitoeno. Al impedir la biosíntesis de los carotenoides cuyo papel principal es la protección de las clorofilas, se produce una fotooxidación de las mismas dando como resultado una clorosis de la planta tras la exposición a la luz (Bramley, 1994; Mayer *et al.*, 1989). Además se ha visto que esta inhibición lleva asociada una acumulación de fitoeno y, en algunos casos su derivado, el fitoflueno (Mayer *et al.*, 1989). Sin embargo, estos compuestos no suelen acumularse en las plantas y su disponibilidad comercial está limitada. Además de tener propiedades anticancerígenas, se ha visto que estos compuestos son asimilados por el organismo mejor que otros compuestos como el licopeno, y se han encontrado cantidades considerables en órganos como el colón y el hígado (Campbell *et al.*, 2006). Por lo tanto, es interesante el estudio de fuentes alternativas para la producción de estos compuestos. En este sentido las SC de zanahoria tratadas con DFF son un sistema eficiente para la producción del fitoeno. La adición del DFF implicó además, una aparente inhibición de la biosíntesis de carotenoides ya que se observó una menor concentración de los mismos conforme aumentaba la concentración de DFF. En cultivos celulares de tomate, la adición de 2,5  $\mu\text{M}$  de norflurazón provocó una acumulación de fitoeno de  $633,7 \pm 99,2$   $\mu\text{g/L}$  en las mejores condiciones (Campbell *et al.*, 2006). Los resultados de este estudio en SC de zanahoria naranja muestran que la máxima producción de fitoeno en presencia de 10  $\mu\text{M}$  a los 7 días fue mucho mayor, alcanzando valores de 15 mg/L aproximadamente. Además, observando los carotenoides totales ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína y fitoeno), el nivel acumulado es mayor en células tratadas con DFF que en condiciones control. Numerosos estudios sugirieron que el efecto de inhibidores de la PDS lleva asociada una activación de la ruta biosintética de los carotenoides debido al aumento de los niveles de precursores (Simkim *et al.*, 2000).

Por tanto, todos estos resultados sugieren que el cultivo celular de zanahoria naranja es una alternativa efectiva para la producción de fitoeno en presencia del inhibidor DFF, el cual no afecta a producción de biomasa.

#### 1.4.4.1 Efecto de la densidad celular sobre la acumulación de fitoeno en cultivos celulares de zanahoria naranja

Como se ha descrito anteriormente, las SC de zanahoria naranja pueden suponer una alternativa biotecnológica para la producción de fitoeno. Por ello, se diseñaron diferentes estrategias para optimizar su producción. Así, el objetivo de estos ensayos fue determinar la densidad celular óptima para la producción de fitoeno ya que es un parámetro fundamental a nivel del escalado industrial. Para ello, se realizó un estudio de la acumulación de carotenoides totales, ( $\alpha$  y  $\beta$ - caroteno, luteína y fitoeno) en condiciones control y en SC tratadas con 10  $\mu$ M de DFF partiendo de una densidad celular de 100 y 200 g/L de PF lo que se corresponde con 4,5 y 9 g/L de PS, aproximadamente.

Como se observa en la Figura 18, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento celular de las SC control y las tratadas con 10  $\mu$ M de DFF utilizando utilizando 100 g/L o 200 g/L de PF de células.



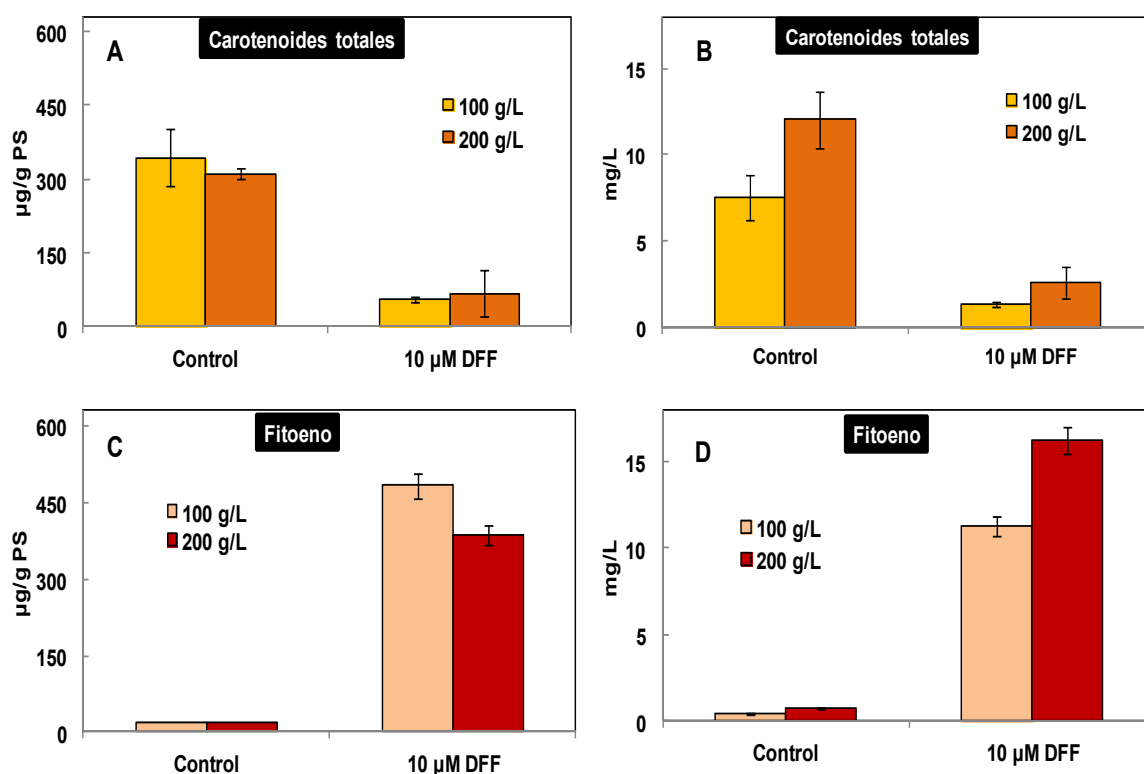
**Figura 18.** Efecto de la densidad celular (100 g/L y 200 g/L de PF) sobre la variación de biomasa en SC de zanahoria naranja tratadas con 10  $\mu$ M de DFF durante 7 días. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

En la Figura 19 se muestra la concentración de carotenoides y fitoeno expresada en  $\mu$ g/g PS y en mg/L en SC iniciadas con diferentes densidades

celulares (100 y 200 g/L de PF) en presencia de 10  $\mu$ M de DFF durante 7 días. La densidad inicial de células no tuvo efecto en la acumulación de carotenoides (Figura 19A). Sin embargo, la cantidad de compuestos por L de medio de cultivo sí varió en función de la densidad inicial (Figura 19B). Así, mientras en SC de zanahoria naranja sin DFF y utilizando una densidad celular de 100 g/L se detectaron niveles de carotenoides de 7,5 mg/L, en las SC iniciadas con 200 g/L la producción fue de 12 mg/L (Figura 19B), observándose una drástica disminución de estos compuestos en las SC de zanahoria naranja tratadas con 10  $\mu$ M de DFF.

Por otro lado, la acumulación de fitoeno (Figura 19C y D) sí se vio afectada por la densidad celular inicial, alcanzando valores de 483 y 360  $\mu$ g/g PS cuando se utilizó una densidad celular de 100 y 200 g/L, respectivamente (Figura 19C). Sin embargo, teniendo en consideración la producción expresada como mg/L se observó que la densidad celular óptima fue de 200 g/L ya que la producción de fitoeno fue de 14 mg/L mientras que utilizando una densidad celular de 100 mg/L los valores alcanzados fueron de 11 mg/L (Figura 19D). Estos resultados están de acuerdo con los observados en SC de vid, donde densidades más bajas fueron más adecuadas para la bioproducción de *trans*-resveratrol (Belchí-Navarro, 2012). Sin embargo, para la producción de fitoesteroles se ha determinado que una densidad celular intermedia fue la más indicada para la producción de estos compuestos (Sabater-Jara, 2013).





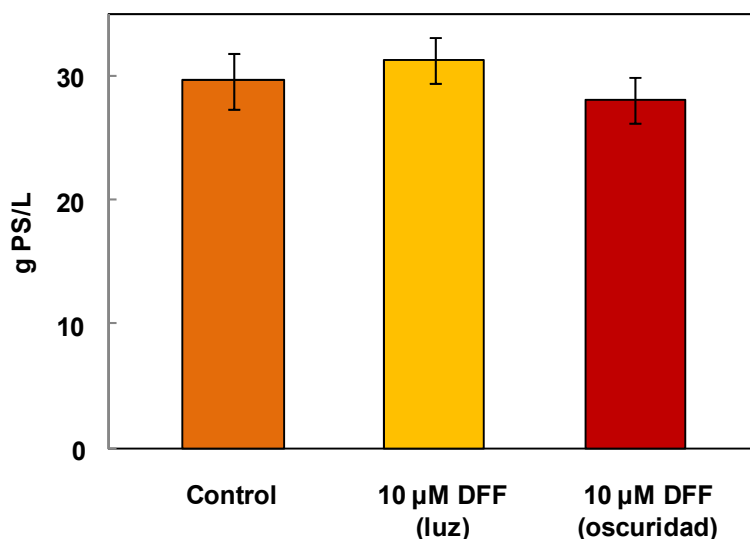
**Figura 19.** Concentración intracelular de carotenoides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y luteína) expresado como  $\mu\text{g/g PS}$  (A) y  $\text{mg/L}$  (B) en SC de zanahoria naranja tratadas con  $10 \mu\text{M}$  de DFF y concentración intracelular de fitoeno expresado como  $\mu\text{g/g PS}$  (C) y  $\text{mg/L}$  (D) en SC de zanahoria naranja tratadas con  $10 \mu\text{M}$  de DFF durante 7 días. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

#### 1.4.4.2 Efecto de la luz sobre la acumulación de fitoeno en cultivos celulares de zanahoria naranja

La luz es uno de los factores que regulan la biosíntesis y acumulación de carotenoides (Hirschberg, 2001; Cazzonelli y Pogson, 2010, Pizarro y Stange, 2009). Uno de los puntos clave a la hora de escalar la producción de un metabolito a un biorreactor es la presencia de luz u oscuridad ya que la presencia de luz encarece los costes. Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si la presencia de luz era un factor limitante en la producción de fitoeno. Para ello, SC tratadas con  $10 \mu\text{M}$  de DFF fueron tratadas bajo condiciones de fotoperiodo y oscuridad durante 7 días. Transcurrido ese tiempo

se llevó a cabo la extracción y cuantificación de fitoeno en ambas condiciones de cultivo.

En primer lugar, se analizó si la presencia de luz suponía una limitación para el crecimiento celular. Como se observa en la Figura 20, no existen diferencias significativas entre SC de zanahoria naranja crecidas en presencia o ausencia de luz.



**Figura 20.** Efecto de la presencia o ausencia de luz sobre el crecimiento celular de SC de zanahoria naranja tratadas con 10 µM de DFF tras 7 días de incubación. Los valores representados son las medias ± DE de tres experimentos independientes.

Por un lado, la luz es un factor determinante en plantas debido a su carácter autótrofo y a la implicación de este factor en la fotosíntesis. Sin embargo, este cultivo celular es presumiblemente heterótrofo, por lo que la luz parece no tener el mismo efecto. Así, la luz no parece ser un factor determinante en el crecimiento de este cultivo celular. Otros autores encontraron que los cultivos celulares de *T. cuspidata* crecían de 2 a 3 veces más cuando crecían en oscuridad (Fett-Neto *et al.*, 1995). Sin embargo, estos autores estudiaron el comportamiento celular a tiempos más largos (35 días), por lo que sería conveniente analizar el efecto de la luz a diferentes tiempos.

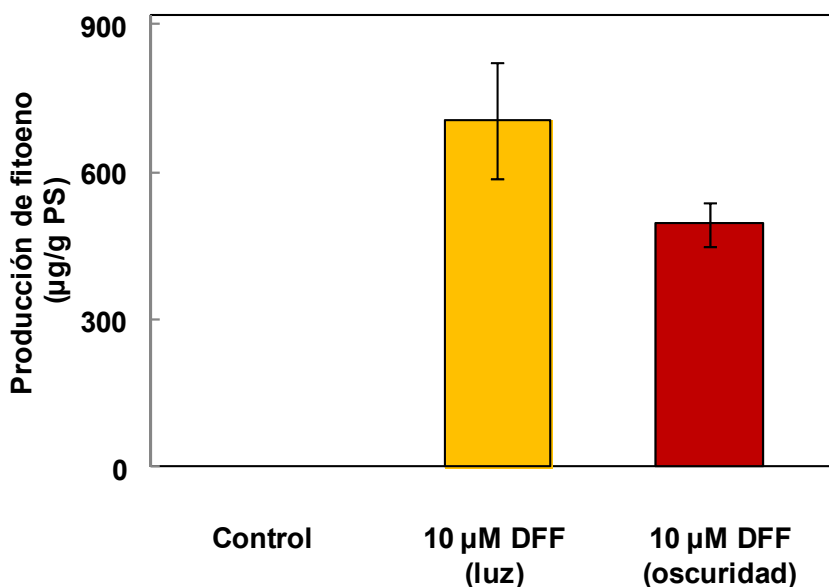
Por otro lado, se sabe que al inhibir la biosíntesis de carotenoides se produce una clorosis en plantas (Bramley, 1993). Sin embargo, en este trabajo de investigación la luz no tuvo efecto sobre la viabilidad celular ni sobre el

incremento de la biomasa en SC de zanahoria naranja que presentaban mínimos niveles de carotenoides (tratadas con DFF). Esto podría ser debido a que las SC de zanahoria naranja no presentan clorofilas, por lo que el papel de fotoprotección de los carotenoides podría tener menos importancia. Por tanto, estos resultados sugieren que la luz no es un factor regulador del crecimiento en zanahoria naranja y que en ausencia de carotenoides, la luz no produce un efecto nocivo. Sin embargo, para cultivos con clorofilas como el caso de la zanahoria verde (Capítulo 1) sería conveniente analizar el efecto de la luz en presencia del inhibidor.

Una vez caracterizado el crecimiento celular, se analizó el efecto de la presencia de luz sobre la acumulación de fitoeno. Como se observa en la Figura 21, la producción de fitoeno fue ligeramente superior en presencia de luz en SC tratadas con 10  $\mu$ M de DFF.

Estos resultados sugieren que la presencia de luz influye en la biosíntesis de carotenoides. Se ha descrito en la bibliografía que la expresión y la regulación del gen *psy* es dependiente de la presencia de luz. De hecho, se ha observado que la expresión génica de *psy* puede ser inducida por la luz roja y la blanca en plantas de tabaco (Woitsch y Römer, 2003). Además, varios estudios indicaron que los niveles de expresión de los genes *psy*, *pds*, *zds* y *lcy $\beta$*  fueron más bajos en la oscuridad en plantas de *C. annuum* (Simkin *et al.*, 2003) mientras que en *A. thaliana* los niveles de expresión de los genes *psy* y *hdr* estaban activos pero a niveles basales (Welsch *et al.*, 2003; Botella-Pavia *et al.*, 2004). Sin embargo, la ruta de biosíntesis de carotenoides también está activa en tejidos crecidos en oscuridad (Rodríguez-Villalón *et al.*, 2009). Por otro lado, Stange *et al.* (2008) observaron que cuando raíces de zanahoria fueron expuestas parcialmente a la luz, dicha parte no se volvía naranja sino que permanecía más fina y con un color parecido a un tejido verde (Stange *et al.*, 2008). Por lo tanto, la luz no sólo afecta a la regulación de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides como *psy*, sino que también parece afectar a la acumulación de carotenoides mediante la regulación de la formación de cromoplastos (Fuentes *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en este estudio indican que la presencia de luz activa los genes implicados en la ruta de

biosíntesis de carotenoides de una manera más eficiente que en ausencia de luz aunque en la oscuridad también se observó una alta acumulación de fitoeno indicando que deben existir otros factores que regulan la biosíntesis de este compuesto.

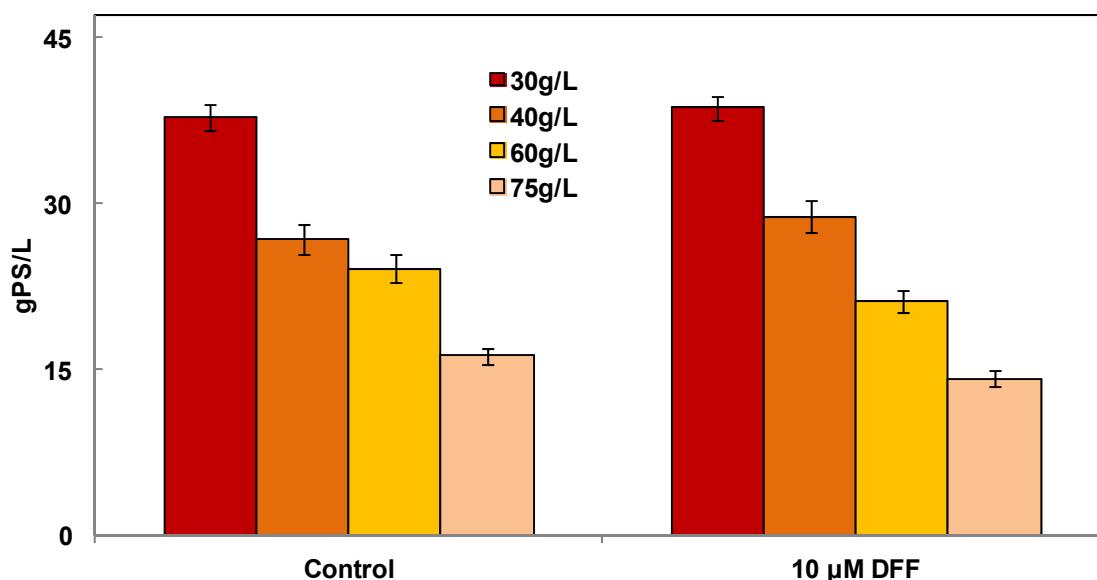


**Figura 21.** Efecto de la presencia o ausencia de luz sobre la producción de fitoeno en SC de zanahoria naranja tratadas con 10 µM de DFF durante 7 días. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

#### 1.4.4.3 Efecto de diferentes concentraciones de azúcar sobre la producción de fitoeno en cultivos celulares de zanahoria naranja

Existen estudios basados en la variación del contenido de sacarosa en el medio de cultivo que 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). En experimentos previos se determinó que la baja concentración de sacarosa no afectaba a la producción de carotenoides. Por tanto, se decidió probar concentraciones más altas de 30 g/L con el fin de determinar si un incremento de la fuente carbonada incrementaba la producción de fitoeno.

En primer lugar se analizó el efecto de altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo sobre el crecimiento celular en SC control y tratadas con 10  $\mu$ M de DFF (Figura 22). Como se observa en la Figura 22, concentraciones superiores a 30 g/L provocaron una reducción considerable del crecimiento celular tanto en presencia como en ausencia de DFF. De hecho, las concentraciones de 40 y 60 g/L de sacarosa redujeron un 30% el crecimiento celular en las SC control mientras que el crecimiento celular fue reducido un 57% en presencia de 75 g/L de sacarosa. La misma tendencia fue observada en el crecimiento de células tratadas con 10  $\mu$ M de DFF (Figura 22).

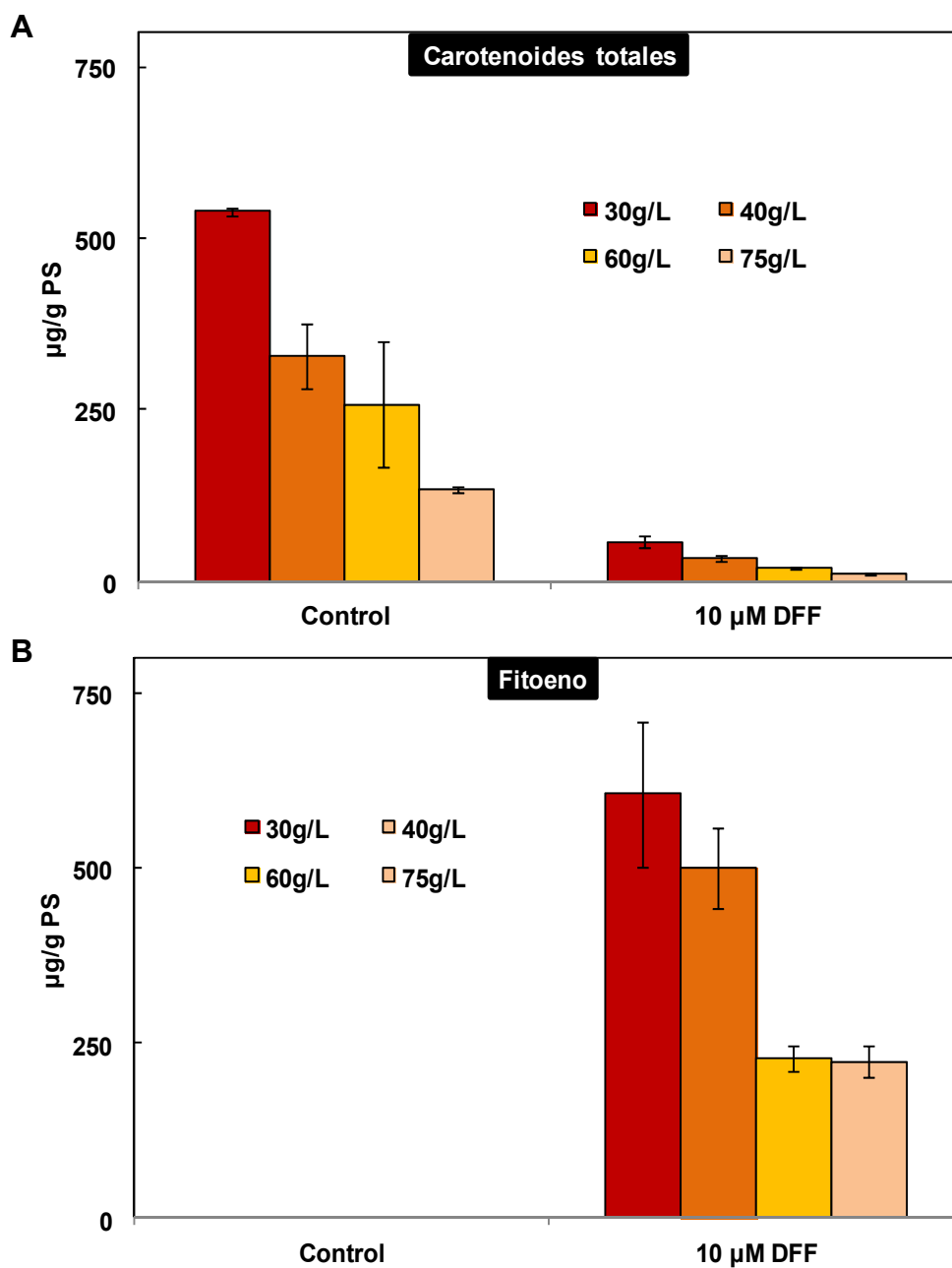


**Figura 22.** Efecto de la concentración de sacarosa (30, 40, 60 y 75 g/L) en el medio de cultivo sobre el crecimiento celular de SC de zanahoria naranja tratadas con 10  $\mu$ M de DFF durante 7 días. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Además, también se analizó el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio del cultivo sobre la acumulación de carotenoides totales (Figura 23A) y fitoeno (Figura 23B). En ambos casos, concentraciones superiores a 30 g/L de sacarosa provocaron una disminución del contenido de carotenoides totales y fitoeno. De hecho, en presencia de 40 y 60 g/L de sacarosa se redujo la concentración de carotenoides un 30 y 40%

respectivamente respecto al control con 30 g/L, siendo la reducción en presencia de 75 g/L del 75 % (Figura 23A). En la Figura 23B se observa que un aumento en la concentración de sacarosa también provocó una disminución en la producción de fitoeno, disminuyendo sus niveles hasta un 63% en presencia de 60 y 75 g/L de sacarosa.

Por lo tanto, los resultados del crecimiento de la biomasa y de la acumulación de carotenoides sugirieron que la presencia de altas concentraciones de sacarosa podría estar causando un estrés osmótico en las SC de zanahoria naranja. De hecho, otros autores han demostrado que altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo provocan estrés osmótico lo que conlleva una disminución del crecimiento celular (Ibrahim, 1987). Además, otros compuestos esenciales como los fitoesteroles fueron analizados y también se observó una disminución de su producción en presencia de 60 y 75 g/L de sacarosa, sugiriendo el posible estrés osmótico sobre las SC de zanahoria naranja (datos no mostrados).

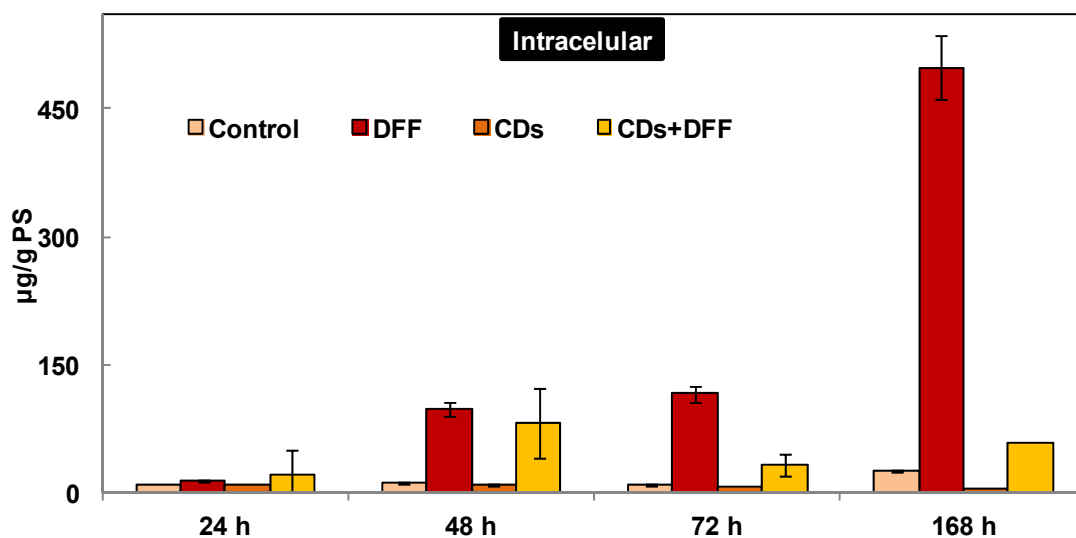


**Figura 23.** Efecto de la concentración de sacarosa (30, 40, 60 y 75 g/L) en el medio de cultivo sobre la producción de carotenoides totales (A) o fitoeno (B) en SC de zanahoria naranja tratadas con 10  $\mu$ M de DFF durante 7 días. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

#### 1.4.4.4 Efecto de ciclodextrinas sobre la producción de fitoeno en cultivos celulares de zanahoria naranja

Dado que se ha observado que las CDs secretan al medio extracelular diversos isoprenoides y en concreto carotenoides (Rizello *et al.*, 2014; Caretto *et al.*, 2016), se evaluó la capacidad de estos compuestos para acumular el fitoeno en el medio de cultivo. Como en experimentos anteriores no se observó la acumulación de fitoeno en presencia de CDs, se probó el efecto de estos elicitores con 10  $\mu\text{M}$  de DFF. Como se observa en la Figura 24, cuando las CDs se añadieron junto al DFF, éste pareció no tener el mismo efecto sobre el cultivo. Así, la mayor cantidad de fitoeno se encontró en el tratamiento con DFF solo mientras que los tratamientos con CDs y DFF la acumulación de fitoeno fue considerablemente menor (Figura 24).

Estos resultados sugieren que las CDs inhiben el efecto de DFF probablemente porque son capaces de formar complejos de inclusión con este compuesto y por tanto en las SC de zanahoria no se ve inhibida la expresión del gen *pds*.

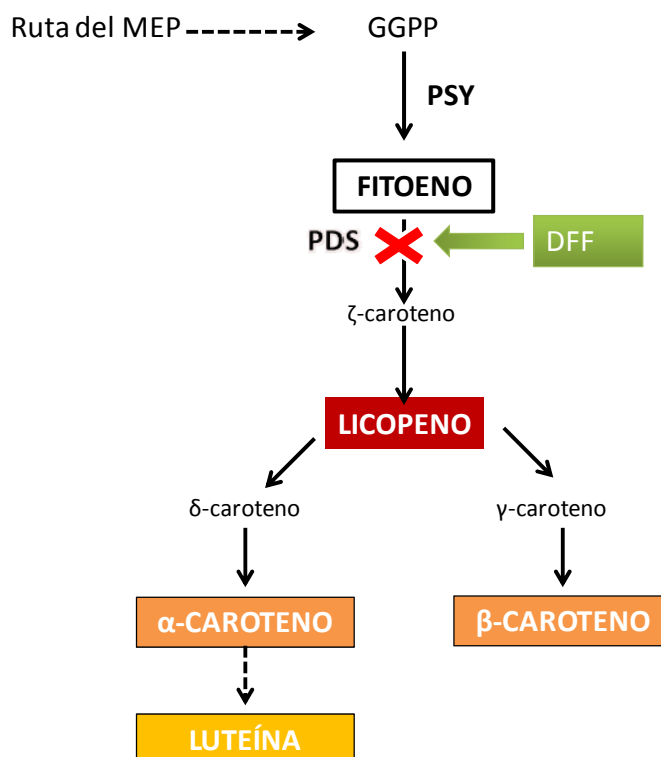


**Figura 24.** Efecto de 50 mM de CDs y 10  $\mu\text{M}$  de DFF sobre la producción de fitoeno en SC de zanahoria naranja durante 7 días. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.



### 1.4.5 Efecto de diflufenican sobre la expresión de genes que codifican para las enzimas clave de la ruta de biosíntesis de carotenoides

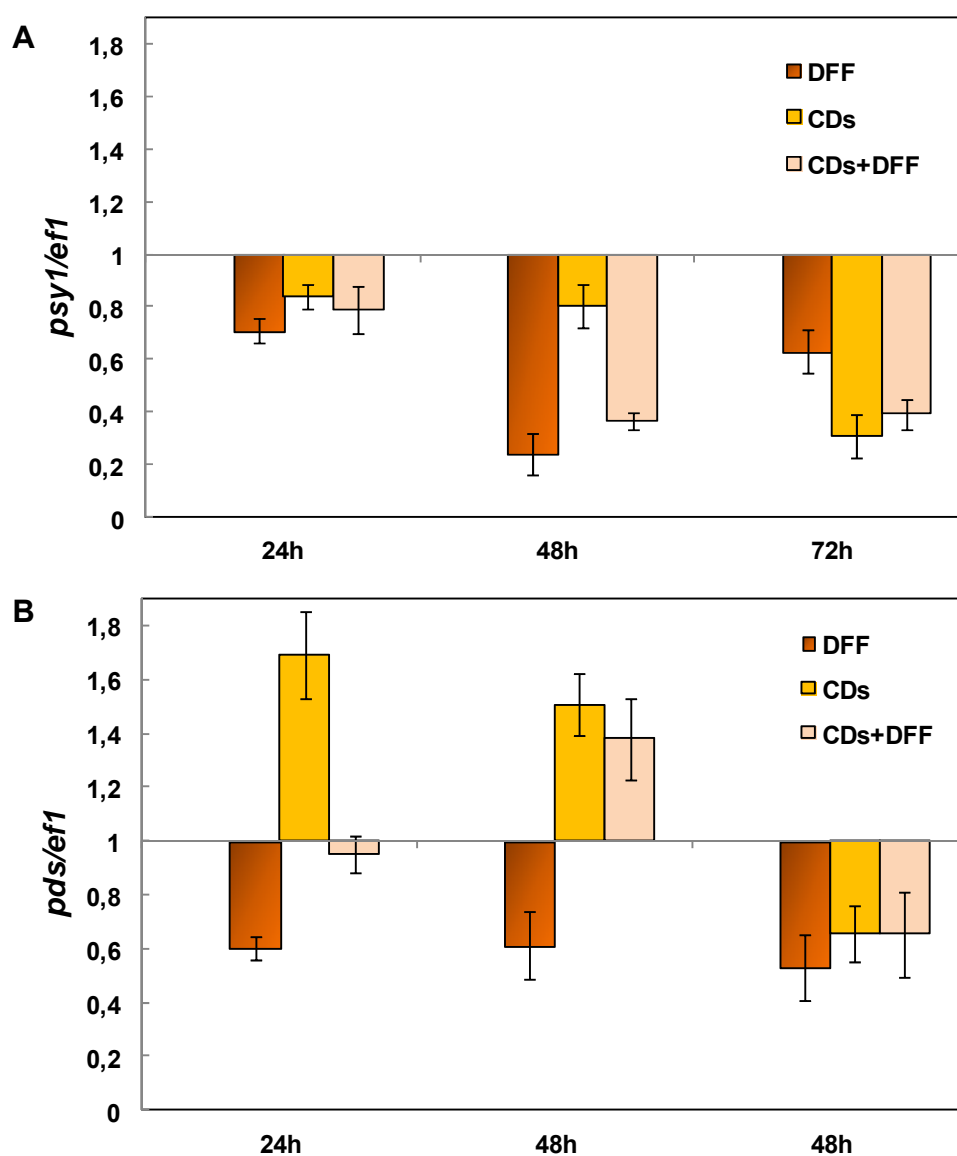
Una vez caracterizada la producción de fitoeno en presencia del inhibidor DFF se procedió a analizar la expresión de los genes que codifican para las principales enzimas implicadas en la biosíntesis de los carotenoides (Figura 25) a las 24, 48 y 72 h de tratamiento.



**Figura 25.** Ruta de biosíntesis de carotenoides simplificada y acción del DFF.

Uno de los genes analizado fue el *psy1*, primer gen clave de la ruta de biosíntesis de carotenoides. Como se observa en la Figura 26A, la mayor expresión de este gen se encontró en tratamientos control durante todo el periodo analizado. Así, el tratamiento con el inhibidor produjo una reducción del nivel de expresión similar a las CDs. Los niveles de expresión más bajos del gen *psy1* se observó a las 48h en SC tratadas con DFF. Por otro lado, se analizaron también los niveles de expresión del gen *pds*, cuya enzima es la diana de acción del DFF. Así, se observó que este tratamiento con DFF provocaba una disminución de la expresión a los 3 tiempos analizados. Sin

embargo, el tratamiento con CDs en este caso pareció no influir en la expresión presentando una tendencia a aumentar dicha expresión.



**Figura 26.** Variación de la expresión relativa del gen *psy1* (A) y *pds* (B) en SC de zanahoria naranja tratadas con 50 mM de CDs y 10  $\mu$ M de DFF. El análisis de la expresión se realizó mediante qPCR frente al gen de referencia *ef1*. La expresión del control=1. Los valores representados son las medias  $\pm$  DE de tres réplicas independientes.

Los dos genes analizados están implicados en la biosíntesis de carotenoides. La enzima PSY cataliza el primer paso específico de la ruta de biosíntesis de los carotenoides mediante la condensación de dos moléculas de GGPP dando lugar al fitoeno, precursor incoloro de todos los carotenoides (Figura 25). En *Arabidopsis* se ha identificado una única PSY mientras en otras especies se han descrito dos, como en el caso del tabaco (Busch *et al.*, 2002). En el caso del tomate se han descrito tres isoformas del gen *psy*, *psy1*, *psy2* y *psy3*. De hecho, en tomate, *psy1* está más expresada en frutos, lo que está correlacionado con una alta acumulación de carotenoides mientras la expresión de *psy2* es necesaria para la síntesis de carotenoides en hojas (Giuliano *et al.*, 1993 ; Fraser *et al.*, 1999). La isoforma *psy3* parece estar asociada a raíces en condiciones de estrés (Kachanovsky *et al.*, 2012; Fantini *et al.*, 2013). Sin embargo, en zanahoria se han identificado dos isoformas diferentes de PSY (Maas *et al.*, 2009). Los resultados de carotenoides acumulados en esta línea de zanahoria naranja coinciden con la expresión del gen *psy1*. Como se ha visto en apartados anteriores, tanto el DFF como las CDs mostraron una menor acumulación de carotenoides (luteína,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno) que en tratamientos control. En cuanto a la expresión, DFF y CDs mostraron igualmente una menor expresión que el control. Así, se ha visto que en zanahoria, la enzima PSY1 parece estar relacionada con la acumulación de carotenoides en la raíz (Stange *et al.*, 2008). Así, Maas *et al.*, (2009) sugirieron que esta enzima era la responsable del color naranja de la zanahoria, y que la sobreexpresión de este único gen en raíces blancas de zanahoria produjo la coloración naranja, mientras que la manipulación de otros genes no estuvo acompañada necesariamente de un aumento de los carotenoides (Maas *et al.*, 2009). Esta implicación clave del gen *psy1* fue también analizada en plantas de *Arabidopsis* obteniendo el mismo resultado (Maas *et al.*, 2009).

Otra enzima importante en la ruta de biosíntesis de los carotenoides es la PDS. Esta enzima cataliza la primera reacción de desaturación del fitoeno (Figura 25). Posteriores desaturaciones dan lugar al licopeno, que a su vez se cicla para dar lugar al  $\alpha$  y  $\beta$ - caroteno. La baja expresión del gen *pds* con el tratamiento con DFF se debe a que es la diana de este inhibidor. Sin embargo,

la mayor expresión de este gen no estuvo acompañada de una mayor acumulación de carotenoides, lo que sugiere que el gen *psy1* está más implicado en la acumulación de estos compuestos coincidiendo con estudios previos (Al-Babili *et al.*, 2006).

Además, se ha descrito que la acumulación de fitoeno provoca una retroalimentación negativa de la ruta de biosíntesis de los carotenoides. Así, cuando la expresión de los genes aguas abajo como *zds* o *pds* está inhibida, también se observa una menor expresión de genes aguas arriba como el *psy* (Qin *et al.*, 2007; Cazzonelli y Pogson, 2010). Esto podría explicar la menor expresión de *psy* en presencia de DFF.



## **CONCLUSIONS**



I. Green carrot cell line biosynthesized constitutively the following isoprenoids: carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, chlorophylls a and b and phytosterols. The main isoprenoid found in green line was lutein, a yellow xanthophyll.

II. The characterization of green carrot cell line under elicitation conditions (50 mM CDs) showed that the phytosterols and phenolic compounds were mainly accumulated in the extracellular medium (15100  $\mu\text{g/L}$  and 477,5  $\mu\text{g/L}$ , respectively) in the presence of CDs. Unlike the aforementioned compounds,  $\beta$ -carotene (1138,1  $\mu\text{g/L}$ ), lutein (25949,5  $\mu\text{g/L}$ ),  $\alpha$ -tocopherol (8063,8  $\mu\text{g/L}$ ), and chlorophyll a (1625,1  $\mu\text{g/L}$ ) and b (9958,3  $\mu\text{g/L}$ ) were mainly accumulated inside the cells. Therefore, CDs were able to induce the cytosolic mevalonate pathway, increasing the biosynthesis of phytosterols and phenolic compounds, and accumulating them outside the cells. However, in the absence of CDs, carrot cells mainly accumulated carotenoids through the methylerythritol 4-phosphate pathway. Thus, the use of CDs would allow the extracellular accumulation of both phytosterols and phenolic compounds by diverting the carbon flux towards the cytosolic mevalonate/phenylpropanoid pathway. On the other hand, the elicitor  $\beta$ -glu was able to induce  $\alpha$ -tocopherol intracellular accumulation in green carrot cell line.

III. Orange carrot cell line biosynthesized constitutively carotenoids and phytosterols. Unlike green carrot cell line, neither chlorophylls nor tocopherols were found in orange carrot cell line. The main isoprenoids accumulated in this cell line were  $\beta$ -carotene and lutein.

IV. The analysis of orange carrot cell line under elicitation conditions (50 mM CDs) showed that the phytosterols were mainly accumulated in the extracellular medium. However,  $\beta$ -carotene and lutein were essentially accumulated inside the cells. Additionally, the combined treatment of CDs and MJ enhanced the extracellular accumulation of phenolic compounds. Hence, orange carrot cell line under elicitation condition provides an efficient biotechnological system to produce bioactive compounds.



V. The addition of T and DFF, which inhibit the biosynthetic pathways of phytosterols and carotenoids respectively, provoked a high accumulation of squalene and phytoene. These bioactive compounds are not usually accumulated and, due to this fact, orange carrot cell line treated with these inhibitors is an alternative source to produce them.

VI. The highest expression levels of *sqs* gen were found after 24h of treatment with inhibitor T. This may explain the high intracellular accumulation of squalene with no negative effect on phytosterol levels. Moreover, CDs did not increase the *sqs* expression levels. This fact highlighted that CDs did not function as elicitor molecules on the biosynthesis of phytosterols but they could recover these compounds from cellular membranes.

VII. The *psy1* expression levels suggested that the accumulation of the total content of carotenoids could be linked to the expression of this gen. However, the treatment with DFF inhibitor decreased *psy1* and *pds* expression levels suggesting that the high phytoene accumulation was not correlated with a high expression level of these genes.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abe I, Rohmer M, Prestwich GD** (1993) Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews*, 93, 2189-2206
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 6103-6105
- Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, Mucha O, Phon TH, Stephanopoulos G** (2008) Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Molecular pharmaceuticals*, 5, 167-190.
- Akram A, Ongena M, Duby F, Dommes J, Thonart P** (2008) Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC plant biology*, 8, 113.
- Alasalvar C, Grigor JM, Zhang D, Quantick PC, Shahidi F** (2001) Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1410-1416.
- Al-Babili S, Hoa T, Schaub P** (2006) Exploring the potential of the bacterial carotene desaturase *CrtI* to increase the  $\beta$ -carotene content in Golden Rice. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1007–1014.
- Almagro L, Carbonell-Bejerano P, Belchí-Navarro S, Bru R, Martínez-Zapater JM, Lijavetzky D, Pedreño MA** (2014) Dissecting the transcriptional response to elicitors in *Vitis vinifera* cells. *PLoS one*, 9, e109777.
- Almagro L, García-Pérez P, Belchí-Navarro S, Sánchez-Pujante PJ, Pedreño MA** (2016) New strategies for the use of *Linum usitatissimum* cell factories for the production of bioactive compounds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99, 73-78.
- Almagro, L.** (2011). Análisis funcional de la producción de compuestos con actividad antitumoral en cultivos celulares. Tesis doctoral.
- Al-Okbi SY** (2014) Nutraceuticals of anti-inflammatory activity as complementary therapy for rheumatoid arthritis. *Toxicology and industrial health*, 30, 738-749.
- Altúzar-Molina AR, Muñoz-Sánchez JA, Vázquez-Flota F, Monforte-González M, Racagni-Di Palma G, Hernández-Sotomayor ST** (2011)

Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* J. cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 151-158.

**Anwar MH** (1963) Paper chromatography of monohydroxyphenols in vanilla extract. *Analytical Chemistry*, 35, 1974–1976

**Araki N, Kusumi K, Masamoto K, Niwa Y, Iba K** (2000) Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 108, 19-24.

**Asami T, Nakano T, Fujioka S** (2005) Plant brassinosteroid hormones. *Vitamins & Hormones*, 72, 479-504.

**Ashour M, Wink M, Gershenzon J** (2010) Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. En *Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. John Wiley & Sons.

**Balfour, JA y Faulds D** (1992) Terbinafine. *Drugs*, 43, 259-284.

**Baranska M, Baranski R, Schulz H, Nothnagel, T** (2006) Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta*, 224, 1028-1037.

**Barchetti T, Masciangelo S, Bicchiega V, Bertoli E, Ferretti G** (2010) Phytosterols, phytostanols and their esters: from natural to functional foods. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 4, 165:172.

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

**Belchí-Navarro S, Pedreño MA, Corchete P** (2010) Methyl jasmonate increases silymarin production in *Silybum marianum* (L.) Gaertn cell cultures treated with  $\beta$ -cyclodextrins. *Biotechnology Letters* 33, 179-184

**Beltrán B, Estévez R, Cuadrado C, Jiménez S, Olmedilla B** (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado

nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutrición Hospitalaria* 27, 1334-1343.

**Bhuiyan Md NH, Adachi T** (2002). Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension cultured cells of *Portulaca*. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1117-1124

**Bishayee A, Sarkar A, Chatterjee M** (1995) Hepatoprotective activity of carrot (*Daucus carota* L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. *Journal of ethnopharmacology*, 47, 69-74.

**Bishayee A, Sarkar, A, Chatterjee M** (1995) Hepatoprotective activity of carrot (*Daucus carota* L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. *Journal of ethnopharmacology*, 47, 69-74.

**Bleeker PM, Spyropoulou EA, Diergaarde PJ, Volpin H, De Both MT, Zerbe P, Haring MA** (2011) RNA-seq discovery, functional characterization, and comparison of sesquiterpene synthases from *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites* trichomes. *Plant molecular biology*, 77, 323-336.

**Boger P y Sandmann G** (1998) Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides - mode of action and resistance mechanisms. *Pesticide Outlook* 9, 29–35.

**Bonfill M, Mangas S, Moyano E, Cusido RM, Palazon J** (2011) Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104, 61-67.

**Botella-Pavía P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodríguez-Concepción M** (2004) Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal*, 40, 188-199.

**Boutté Y y Grebe M** (2009) Cellular processes relying on sterol function in plants. *Current opinion in plant biology*, 12, 705-713.

**Bramley PM** (1993) Inhibition of carotenoid biosynthesis. In *Carotenoids in photosynthesis* (pp. 127-159). Springer Netherlands.

**Bramley PM** (2002) Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of experimental botany*, 53, 2107-2113.

- Briceño Z** (2014) Aproximación proteómica y metabolómica de la producción de metabolitos secundarios en líneas celulares elicidadas de *Solanum Lycopersicum*. Tesis doctoral.
- Briceño Z, Almagro L, Sabater-Jara AB, Calderón AA, Pedreño MA, Ferrer MA** (2012) Enhancement of phytosterols, taraxasterol and induction of extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Journal of plant physiology*, 169, 1050-1058.
- Britton G** (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9, 1551- 1558.
- Bru R, Selles S, Casado-Vela J, Belchi-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
- Busch M, Seuter A, Hain R** (2002) Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 128, 439-453.
- Cai Z, Kastell A, Knorr D, Smetanska I** (2012) Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant cell reports*, 31, 461-477.
- Campbell JK, Stroud CK, Nakamura MT, Lila MA, Erdman JW** (2006) Serum testosterone is reduced following short-term phytofluene, lycopene, or tomato powder consumption in F344 rats. *The Journal of nutrition*, 136, 2813-2819.
- Caretto S, Nisi R, Paradiso A, De Gara L** (2010) Tocopherol production in plant cell cultures. *Molecular nutrition & food research*, 54, 726-730.
- Caretto S, Rizzello F, Durante M, Lenucci MS, De Paolis A, Blando F, Mita G** (2016) *Artemisia annua* cell cultures as tools for investigating the production of bioactive compounds. *Planta Medica*, 81, P753.
- Carvalho E, Fraser PD, Martens S** (2013) Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food chemistry*, 139, 744-752.
- Cazzonelli CI** (2011) Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, 38, 833-847.

- Cazzonelli CI y Pogson BJ** (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in plant science*, 15, 266-274.
- Cela Udaondo J** (2012) Regulación de la biosíntesis de la vitamina E y su función en señalización celular en condiciones de estrés abiótico. Tesis doctoral.
- Chandra RK y Vyas D** (1989) Vitamin A, immunocompetence, and infection. *Food and Nutrition Bulletin (UNU)*.
- Cheong JJ y Hahn MG** (1991) A specific, high-affinity binding site for the hepta-beta-glucoside elicitor exists in soybean membranes. *The Plant Cell*, 3, 137-147.
- Cho K, Agrawal GK, Shibato J, Jung YH, Kim YK, Nahm BH, Jwa NS, Tamogami S, Han O, Kohda K, Iwahashi H and Rakwal R** (2007) Survey of differentially expressed proteins and genes in jasmonic acid treated rice seedling shoot and root at the proteomics and transcriptomics levels. *Journal of Proteome Research*, 6, 3581-3603
- Chucair AJ, Rotstein NP, SanGiovanni JP, During A, Chew EY, Politi LE** (2007) Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48, 5168-5177.
- Clarke SM, Cristescu SM, Miersch O, Harren FJM, Wasternack C, Mur LAJ** (2009) Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytology*, 182,175-187
- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E** (2008) Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany*, 59, 3563-3573.
- Cohen Y** (1994) 3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 44, 273-288
- Cormier F, Crevier HA, Do CB** (1990) Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Canadian Journal of Botany*, 68, 1822-1825.



- Coss JL, Kutney JP, Milanova RK, Jollez P** (2000) Process of purifying phytosterols from wood or plant-derived sources and composition resulting therefrom. WO20064921.
- Croteau RB, Kutchan, TM, Lewis NG** (2000) Natural products (secondary metabolites). En: *Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan, B, Gruissem, W & Jones, R. (Eds.). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp 1250-1268.
- Dash PK, Biswas DK, Sreevathsa R, Rai R** (2016) Carrot Genome Provides Insights into Root Accumulation of Carotenoid.
- Dashwood RH** (1997) Chlorophylls as anticarcinogens (Review). *International journal of oncology*, 10, 721-728.
- Davies ME** (1972) Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. *Planta*, 104, 50-65.
- Dayan FE y Zaccaro MLM** (2012) Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 102, 189–197.
- Delgado-Zamarreño MM, Bustamante-Rangel M, Martínez-Pelarda D, Carabías-Martínez R** (2009) Analysis of  $\beta$ -sitosterol in seeds and nuts using pressurized liquid extraction and liquid chromatography. *Analytical Sciences* 25, 765–768.
- Derdemezis CS, Filippatos TD, Mikhailidis DP, Elisaf MS** (2010) Effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 15, 120-134.
- Devarenne TP, Ghosh A, Chappell J** (2002) Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco. *Plant Physiology*, 129, 1095-1106.
- Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang HS, Chilcott C, Zhu T and Turner J** (2005) Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound-and methyl JA-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology*, 58, 497-513

- Do CB y Cormier F** (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 9, 143-146.
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ, Kirkegaard JA, Ross JJ, Reid JB, Fitt GP, Sewelam N, Schenk PM, Manners JM and Kazan K** (2007) MYC2 differentially modulates diverse JA-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, 2225-2245
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J** (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102,933-938
- Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I** (2013) Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198, 16-32.
- Enfissi E, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W, Bramley PM** (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 3, 17-27.
- Engelberth J, Contreras CF, Dalvi C, Li T, Engelberth M** (2013) Early transcriptome analyses of Z-3-hexenol-treated *Zea mays* revealed distinct transcriptional networks and anti-herbivore defense potential of green leaf volatiles. *PloS one*, 8, e77465.
- Enjuto M, Lumbreras V, Marín C, Boronat A** (1995) Expression of the Arabidopsis HMG2 gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell*, 7,517-527
- Estévez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jiménez LF, Kuzuyama T, León P** (2000) Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 124, 95-104.
- Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili MH, Cusidó RM, Palazón J** (2009) Biotechnological production of taxol and related taxoids.

Current state and prospects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 9, 109–121.

**Falara V, Akhtar TA, Nguyen TT, Spyropoulou EA, Bleeker PM, Schauvinhold I, Schuurink RC** (2011) The tomato terpene synthase gene family. *Plant physiology*, 157, 770-789.

**Fantini E, Falcone G, Frusciante S, Giliberto L, Giuliano G** (2013) Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing. *Plant physiology*, 163, 986-998.

**Fatimah AMZ, Norazian MH, Rashidi O** (2012) Identification of carotenoid composition in selected 'ulam' or traditional vegetables in Malaysia. *International Food Research Journal*, 19.

**Favre B, Ghannoum MA, Ryder NS** (2004). Biochemical characterization of terbinafine-resistant *Trichophyton rubrum* isolates. *Medical mycology*, 42, 525-529.

**Fernandes P y Cabral JMS** (2007) Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, 98,2335-2350.

**Ferruzzi MG y Blakeslee J** (2007) Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27, 1-12.

**Fesel PH y Zuccaro A** (2016)  $\beta$ -glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*, 90, 53-60.

**Fesel PH y Zuccaro A** (2016)  $\beta$ -glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*, 90, 53-60.

**Fett-Neto AG, Pennington JJ, DiCosmo F** (1995) Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata* Sieb and Zucc. *Journal of plant physiology*, 146, 584-590.

**Flores-Sánchez IJ, Ortega-López J, del Carmen Montes- Horcasitas M, Ramos-Valdivia AC** (2002).Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Plant and cell physiology*, 43, 1502-1509.

**Frank A y Groll M** (2016) The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chemical Reviews*.

- Fraser PD y Bramley PM** (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43, 228-265.
- Fraser PD, Kiano JW, Truesdale MR, Schuch W, Bramley PM** (1999) Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant molecular biology*, 40, 687-698.
- Fraser PD, Pinto MES, Holloway DE, Bramley PM** (2000) Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *The Plant Journal*, 24, 551-558.
- Fridman Y y Savaldi-Goldstein S** (2013) Brassinosteroids in growth control: how, when and where. *Plant science*, 209, 24-31.
- Fu HW, Zhang L, Yi T, Tian JK** (2009) A new sesquiterpene from the fruits of *Daucus carota* L. *Molecules*, 14, 2862-2867.
- Fuentes P, Pizarro L, Moreno JC, Handford M, Rodriguez-Concepcion M, Stange C** (2012) Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant molecular biology*, 79, 47-59.
- Fujita Y** (1988) Shikonin: production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell cultures. En *Medicinal and Aromatic Plants I* (pp. 225-236). Springer Berlin Heidelberg.
- Furubayashi M, Li L, Katabami A, Saito K, Umeno D** (2014) Construction of carotenoid biosynthetic pathways using squalene synthase. *FEBS letters*, 588, 436-442.
- Furuya T, Yoshikawa T, Kimura T, Kaneko H** (1987) Production of tocopherols by cell culture of safflower. *Phytochemistry*, 26, 2741-2747.
- García-Llitas G y Rodríguez-Estrada MT** (2011) Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 607-624
- Geipel K, Song X, Socher ML, Kümritz S, Püschel J, Bley T, Steingroewer J** (2014) Induction of a photomixotrophic plant cell culture of *Helianthus annuus* and optimization of culture conditions for improved  $\alpha$ -tocopherol production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 2029-2040.

- Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA** (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell*, 5, 379-387.
- Goossens A, Häkkinen ST, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Inzé D** (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 8595-8600.
- Griebel T y Zeier J** (2010) A role for  $\beta$ -sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *The plant journal*, 63, 254-268.
- Gudesblat GE y Russinova E** (2011) Plants grow on brassinosteroids. *Current opinion in plant biology*, 14, 530-537.
- Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 2389-2393.
- Gundlach H, Müller, MJ, Kutchan TM, Zenk MH** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 2389-2393.
- Guo ZJ, Nakagawara S, Sumitani K, Ohta Y** (1993) Effect of intracellular glutathione level on the production of 6-methoxymellein in cultured carrot (*Daucus carota*) cells. *Plant physiology*, 102, 45-51.
- Gutiérrez-Carbajal MG, Monforte-González M, Miranda-Ham MDL, Godoy-Hernández G, Vázquez-Flota F** (2010) Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biologia Plantarum*, 54(3), 430-434.
- Guttikonda, S. K.; Quach, T. N.; Aldrich, D. L.; Nes, W. D.; Nguyen, H. T. Molecular characterization and functional analysis of Glycine max**
- Halliwell, B.** (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The lancet*, 344(8924), 721-724.
- Hampel D, Mosandl A, Wüst M** (2005) Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry*, 66(3), 305-311.

- Harborne JB** (1999) Classes and functions of secondary products from plants. *Chemicals from plants*, 1-25.
- Harish MC, Dachinamoorthy P, Balamurugan S, Murugan SB, Sathishkumar R** (2013) Enhancement of  $\alpha$ -tocopherol content through transgenic and cell suspension culture systems in tobacco. *Acta physiologiae plantarum*, 35, 1121-1130.
- Hartmann MA** (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends in plant science*, 3, 170-175.
- Havaux M** (2014) Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, 79, 597-606.
- Hayes KC, Pronczuk A, Wijendran V, Beer M** (2002) Free phytosterols effectively reduce plasma and liver cholesterol in gerbils fed cholesterol. *Journal of Nutrition*, 132, 1983-1988.
- Hirner AA y Seitz HU** (2000) Isoforms of chalcone synthase in *Daucus carota* L. and their differential expression in organs from the European wild carrot and in ultraviolet-A-irradiated cell cultures. *Planta*, 210, 993-998.
- Hirner AA, Veit S, Seitz HU** (2001) Regulation of anthocyanin biosynthesis in UV-A-irradiated cell cultures of carrot and in organs of intact carrot plants. *Plant Science*, 161, 315-322.
- Hirschberg J** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current opinion in plant biology*, 4, 210-218.
- Hopp R y Mori K** (1992) Recent developments in flavor and fragrance chemistry. En International Haarmann & Reimer Symposium. Kyoto, Japan.
- 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 Journal* 39, 147-160
- Hussain N, Irshad F, Jabeen Z, Shamsi IH, Li Z, Jiang L** (2013) Biosynthesis, structural, and functional attributes of tocopherols in planta; past, present, and future perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 6137-6149.
- Hwang I, Kim Y, Han J, Nou IS** (2016) Orange color is associated with CYC-B expression in tomato fleshy fruit. *Molecular Breeding*, 36, 1-10.

Ibrahim RK (1987) Regulation of synthesis of phenolic. In Cell culture and somatic cell genetics of plants (pp. 77-95). Ed: F. Constabel and I. K. Vasil. Academic Press Books, New York

**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*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4406-4413.

**Jacobo-Velázquez DA, González-Agüero M, Cisneros-Zevallos L** (2015) Cross-talk between signaling pathways: the link between plant secondary metabolite production and wounding stress response. *Scientific reports*, 5, 8608.

**Jain AB y Jain VA** (2012) Vitamin E, its beneficial role in diabetes mellitus (DM) and its complications. *Journal of Clinical and Diagnostic Research for doctors*, 6, 1624-1628.

**James JT, Tugizimana F, Steenkamp PA, Dubery IA** (2013) Metabolomic analysis of methyl jasmonate-induced triterpenoid production in the medicinal herb *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*, 18, 4267-4281.

**James, J. T., Tugizimana, F., Steenkamp, P. A., & Dubery, I. A.** (2013). Metabolomic analysis of

JING, J., YANG, R., & LU, Y. (2008). The anticancer activity of compounds in lipophilic fraction of *Daucus carota*. *Journal of Guiyang Medical College*, 5, 014.

**Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N** (2009) Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Molecular plant*, 2, 1154-1180.

**Jung C, Lyou S, Yeu S, Kim M, Rhee S, Kim M, Lee J, Choi Y, Cheong JJ** (2007) Microarray-based screening of JA responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 26, 1053-1063

- Jung S** (2004) Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 225-231.
- Kachanovsky DE, Filler S, Isaacson T, Hirschberg J** (2012) Epistasis in tomato color mutations involves regulation of phytoene synthase 1 expression by cis-carotenoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 19021-19026.
- Kessler A y Baldwin IT** (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 299-328.
- Ketchum RE, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML** (1999) The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnology and bioengineering*, 62, 97-105.
- 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. *Biotechnology and Bioengineering*, 62, 97-105.
- Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, Berendschot TT** (2012) Lutein: more than just a filter for blue light. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31, 303–15.
- Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, Berendschot TT** (2012) Lutein: more than just a filter for blue light. *Progress in retinal and eye research*, 31, 303-315.
- Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC** (2006) Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2327-2332.
- Kim HJ, Fonseca JM, Choi JH, Kubota C** (2007) Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 10366-10372.
- Kim OK, Kim MY, Huh SM, Bai DG, Ahn JC, Hwang B** (2005) Cloning of cDNA probably encoding oxidosqualene cyclase associated with asiaticoside biosynthesis from *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell Report*. 24, 304–311.
- Kjeldsen F, Christensen LP, Edelenbos M** (2001) Quantitative analysis of aroma compounds in carrot (*Daucus carota* L.) cultivars by capillary gas chromatography using large-volume injection technique. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 4342-4348.



- Klein CS y Rodriguez-Concepcion M** (2015) Carotenoids in Carrot. In *Pigments in Fruits and Vegetables* (pp. 217-228). Springer New York.
- Knobloch KH y Berlin J** (1980) Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Zeitschrift fuer Naturforschung c*, 35, 551-556.
- Kobayashi K, Kobayashi K, Yamaguchi H, Inoue YM, Takagi K, Fushihara K, Muranaka T** (2017) Platform for “Chemical Metabolic Switching” to Increase Sesquiterpene Content in Plants. *Plant Biotechnology*, 34, 65-69.
- Kundu, A. (2017). Vanillin biosynthetic pathways in plants. *Planta*, 1-10.
- Lagarda MJ, García-Llatas G, Farré R** (2006) Analysis of phytosterols in foods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41, 1486-1496.
- Langcake P y Pryce RJ** (1977) The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiations. *Phytochemistry*, 16, 1193-1196
- Lange BM y Ghassemian M** (2003) Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant molecular biology*, 51, 925-948.
- Larronde F, Gaudillère JP, Krisa S, Decendit A, Deffieux G, Mérillon JM** (2003) Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 63-66.
- Lee-Parsons CW y Ertürk S** (2005) Ajmalicine production in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures depends on  $Ca^{2+}$  level. *Plant cell reports*, 24, 677-682.
- Leivar P, González VM, Castel S, Trelease RN, López-Iglesias C, Arró M, Boronat A, Campos N, Ferrer A, Fernández-Busquets X** (2005) Subcellular localization of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiology*, 137,57-69
- 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

- Li L y Yuan H (2013) Chromoplast biogenesis and carotenoid accumulation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 539, 102-109.
- Llamos BRH, Falero Morejón AF, Pérez Bolaños CP, Tirado Morales ST, Quiñones YB, Rodríguez MP** (2008) Fitoesteroles. Parte 2: Fuentes de obtención, formas de uso y posición actual en el mercado. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* 39, 97-104.
- López-Arnaldos T, Ferrer MA, García AAC, Muñoz R** (2002) Changes in peroxidase activity and isoperoxidase pattern during strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus development. *Journal of plant physiology*, 159, 429-435.
- López-Serrano M, Ferrer MA, Calderón AA, Muñoz R, Ros Barceló A** (1994) Aluminum mediated fosetyl-Al effects on peroxidase secreted from grapevine cells. *Environmental and Experimental Botany* 24, 329-336
- López-Serrano M, Ferrer MA, Pedreño MA, Ros Barceló A** (1997)  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  ions counteract the reduction by fosetyl-Al (aluminum tris[ethyl phosphonate]) of peroxidase activity from suspension-cultured grapevine cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47, 207-212
- López-Serrano M, Ros Barceló A** (1996) Effect of metal ions on peroxidase activity from grapevine cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 34, 827-832
- Lu Y, Jiang P, Liu S, Gan Q, Cui H, Qin S** (2010) Methyl jasmonate-or gibberellins A 3-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of  $\beta$ -carotene ketolase genes (bkts) in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, 101, 6468-6474.
- Lushchak VI y Semchuk NM** (2012) Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta physiologiae plantarum*, 34, 1607-1628.
- Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R** (2009) Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *Plos One*, 4, e6373.
- Maeda H y Dudareva N** (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 63, 73-105.
- Mandujano-Chávez A, Schoenbeck MA, Ralston LF, Lozoya-Gloria E, Chappell J** (2000) Differential induction of sesquiterpene metabolism in

tobacco cell suspension cultures by methyl jasmonate and fungal elicitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 381, 285-294.

**Mangas S, Bonfill M, Osuna L, Moyano E, Tortoriello J, Cusido RM, Palazon J** (2006) The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants. *Phytochemistry*, 67, 2041-2049.

**Manrique E** (2003) Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. *Ecosistemas*, 12, 235-245.

**Mantell SH y Smith H** (1983) Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. En Seminar series- *Society for Experimental Biology*.

**Matsui K** (2006) Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current opinion in plant biology*, 9, 274-280.

**Mauch-Mani B y Mauch F** (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current opinion in plant biology*, 8, 409-414.

**Mayer MP, Bartlett DL, Beyer P, Kleinig H** (1989) The *in vitro* mode of action of bleaching herbicides on the desaturation of 15-cis-phytoene and cis- $\zeta$ -carotene in isolated daffodil chromoplasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 34, 111-117.

**Mercier J, Roussel D, Charles MT, Arul J** (2000) Systemic and local responses associated with UV and pathogen-induced resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrot. *Phytopathology*, 90, 981-986.

**Misawa M.** (1985) Production of useful plant metabolites. En Plant cell culture (pp. 59-88). Springer Berlin Heidelberg.

**Misra N, Misra P, Datta SK, Mehrotra S** (2005) *In vitro* biosynthesis of antioxidants from *Hemidesmus indicus* R. Br. cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41, 285-290.

**Mizukami H, Tabira Y, Ellis BE** (1993) Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 12, 706-709.

- Mizukami H, Tabira Y, Ellis BE** (1993) Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 12, 706-709.
- Mongrand S, Stanislas T, Bayer EM, Lherminier J, Simon-Plas F** (2010) Membrane rafts in plant cells. *Trends in plant science*, 15, 656-663.
- Morales M, Bru R, Garcia-Carmona F, Ros Barceló A, Pedreno MA** (1998) Effect of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with shape *Xylophilus ampelinus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53, 179-187.
- Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB** (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41,457–500
- Morikawa T, Mizutani M, Aoki N, Watanabe B, Saga H, Saito S, Wadano A** (2006) Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in *Arabidopsis* and tomato. *The Plant Cell*, 18, 1008-1022.
- Morrone, D., Hillwig, M., Mead, M., Lowry, L., Fulton, D., & Peters, R.** (2011) Evident and latent plasticity across the rice diterpene synthase family with potential implications for the evolution of diterpenoid metabolism in the cereals. *Biochemical Journal*, 435, 589-595.
- Mukherjee C, Samanta T, Mitra A** (2016) Redirection of metabolite biosynthesis from hydroxybenzoates to volatile terpenoids in green hairy roots of *Daucus carota*. *Planta*, 243, 305-320.
- Murashige T y Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15,473-497
- Murthy HN, Lee EJ, Paek KY** (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(1), 1-16.
- Nagata N, Suzuki M, Yoshida S, Muranaka T** (2002) Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta*, 216, 345-350.

- Nakamura N y Horikoshi K** (1977) Production of Schardinger  $\beta$ -dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology and Bioengineering* 19, 87-99
- Neelakandan AK, Chamala S, Valliyodan B, Nes WD, Nguyen HT** (2012) Metabolic engineering of soybean affords improved phytosterol seed traits. *Plant Biotechnology Journal*, 10,12-19
- Neelakandan AK, Nguyen HT, Kumar R, Tran LSP, Guttikonda SK, Quach TN, Nguyen HT** (2012) Molecular characterization and functional analysis of *Glycine max* sterol methyl transferase 2 genes involved in plant membrane sterol biosynthesis. *Plant molecular biology*, 74, 503-518.
- Nicolle C, Simon G, Rock E, Amouroux P, Rémésy C** (2004) Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic, and mineral content in white, yellow, purple, orange, and dark-orange carrot cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129, 523-529.
- Nurhalim L, Kristanti T, Chahyadi A, Suhandono S** (2014) Effect of Terbinafin and DMSO on The Gene Expression Level of Squalene Synthase (Sqs) and Amorpha-4, 11-Diene Synthase (Ads) in *Artemisia Annu*a L. *Procedia Chemistry*, 13, 85-91.
- O'Connor SE** (2015) Engineering of secondary metabolism. *Annual review of genetics*, 49, 71-94.
- Okinaka Y, Mimori K, Takeo K, Kitamura S, Takeuchi Y, Yamaoka N, Yoshikawa M** (1995) A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant [ $\beta$ ]-1, 3-endoglucanase. *Plant Physiology*, 109, 839-845.
- Okinaka Y, Mimori K, Takeo K, Kitamura S, Takeuchi Y, Yamaoka N, Yoshikawa M** (1995) A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant [ $\beta$ ]-1, 3-endoglucanase. *Plant Physiology*, 109, 839-845.
- Ombódi A, Daood HG, Helyes L** (2014) Carotenoid and tocopherol composition of an orange-colored carrot as affected by water supply. *American Society for Horticultural Science*, 49, 729-733.

- Pajot E, Daniel Le Corre, Silué D** (2001) Phytogard and DL-amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L). *European Journal of Plant Pathology*, 107, 861-869
- Pant B y Manandhar S** (2007) *In Vitro* Propagation of Carrot (*Daucus Carota*) L. *Scientific world*, 5, 51-53.
- Pauwels L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inze D and Goossens A** (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 105, 1380-1389
- Pérez AG, Sanz C, Richardson DG, Olías JM** (1993) Methyl jasmonate vapor promotes  $\beta$ -carotene synthesis and chlorophyll degradation in Golden Delicious apple peel. *Journal of Plant Growth Regulation*, 12, 163-167.
- Perrin F, Brahem M, Dubois-Laurent C, Huet S, Jourdan M, Geoffriau E, Gagné S** (2016) Differential pigment accumulation in carrot leaves and roots during two growing periods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64, 906-912.
- Petersen-Mahrt SK, Ekelund NG, Widell S** (1994) Influence of UV-B radiation and nitrogen starvation on daily rhythms in phototaxis and cell shape of *Euglena gracilis*. *Physiologia Plantarum*, 92, 501-505.
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM** (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 939-966.
- Pineda M, García B, Hung Llamas B** (2005) Fitoesteroles y patentes: sus aplicaciones en la industria farmacéutica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 36.
- Pizarro L y Stange C** (2009) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e investigación agraria*, 36, 143-162..
- Porfirova S, Bergmüller E, Tropf S, Lemke R, Dörmann P** (2002) Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 12495-12500.

- Posé D, Castanedo I, Borsani O, Nieto B, Rosado A, Taconnat L, Botella MA** (2009) Identification of the *Arabidopsis* dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *The Plant Journal*, 59, 63-76.
- Qin G, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng XW, Chen Z, Qu LJ** (2007) Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell research*, 17, 471-482.
- Quilez J, García-Lorda P, Salas-Salvado J** (2003) Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition* 22, 343-351.
- Ramakrishna A y Ravishankar GA** (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6,1720-1731
- 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
- Rao SR y Ravishankar GA** (1999) Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour metabolites and capsaicin in suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*: study of the influence of  $\beta$ -cyclodextrin and fungal elicitor. *Process biochemistry*, 35, 341-348.
- Rao SR y Ravishankar GA** (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20, 101-153.
- Reinbothe C, Springer A, Samol I, Reinbothe S** (2009) Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS Journal*, 276,4666-4681
- Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A** (2001) Vitamin E 80th anniversary: a double life, not only fighting radicals. *IUBMB life*, 52, 71-76.
- Rizzello F, De Paolis A, Durante M, Blando F, Mita G, Caretto S** (2014) Enhanced production of bioactive isoprenoid compounds from cell suspension cultures of *Artemisia annua* L. using  $\beta$ -cyclodextrins. *International journal of molecular sciences*, 15, 19092-19105.

- Rizzello F, De Paolis A, Durante M, Blando F, Mita G, Caretto S** (2014) Enhanced production of bioactive isoprenoid compounds from cell suspension cultures of *Artemisia annua* L. using  $\beta$ -cyclodextrins. *International journal of molecular sciences*, 15, 19092-19105.
- Rock, CL** (2009) Carotenoids and cancer. In *Carotenoids* (pp. 269-286). Birkhäuser Basel.
- Rodas-Junco BA, Cab-Guillen Y, Muñoz-Sanchez JA, Vázquez-Flota F, Monforte-Gonzalez M, Hernández-Sotomayor ST** (2013) Salicylic acid induces vanillin synthesis through the phospholipid signaling pathway in *Capsicum chinense* cell cultures. *Plant signaling & behavior*, 8, e26752.
- Rodríguez-Concepcion M y Stange C** (2013) Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Archives of biochemistry and biophysics*, 539, 110-116.
- Rodríguez-Concepción M, Forés O, Martínez-García JF, González V, Phillips MA, Ferrer A, Boronat A** (2004) Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *The Plant Cell*, 16, 144-156.
- Rodríguez-Villalón A, Gas E, Rodríguez-Concepción M** (2009) Colors in the dark: a model for the regulation of carotenoid biosynthesis in etioplasts. *Plant signaling & behavior*, 4, 965-967.
- Rodríguez-Villalón A, Gas E, Rodríguez-Concepción M** (2009). Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 60, 424-435.
- Rossi PG, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert JM, Costa J, Berti L** (2007) (E)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 7332-7336.
- Rudolf JR, Resurreccion AVA** (2005) Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 10186-10192



- Ruiz-Sola MA y Rodríguez-Concepción M** (2012) Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *The Arabidopsis Book*, e0158.
- Sabater-Jara AB** (2013) Estudio de las Respuestas de Defensa Inducidas por Elicitores en Cultivos de Células Vegetales. Tesis doctoral.
- Sabater-Jara AB y Pedreño MA** (2013) Use of  $\beta$ -cyclodextrins to enhance phytosterol production in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114, 249-258.
- 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 annuum*. *J Plant Physiol.* 167, 1273-1281
- Sabater-Jara AB, Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Palazón J, Pedreño MA, Cusidó RM** (2014) Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures. *Plant biotechnology journal*, 12, 1075-1084.
- Saiman MZ, Mustafa, NR, Pomahočová B, Verberne M, Verpoorte R, Choi YH, Schulte AE** (2014) Analysis of metabolites in the terpenoid pathway of *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117, 225-239.
- Salinthon S, Kerns AR, Tsang V, Carr DW** (2013)  $\alpha$ -Tocopherol (vitamin E) stimulates cyclic AMP production in human peripheral mononuclear cells and alters immune function. *Molecular immunology*, 53, 173-178.
- 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 in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *J Biotechnol.* 119: 60-69
- 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. *Journal of biotechnology*, 119, 60-69.

- 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. *Journal of biotechnology*, 119, 60-69.
- Sandmann G, Schmidt A, Linden H, Böger P** (1991) Phytoene desaturase, the essential target for bleaching herbicides. *Weed Science*, 474-479.
- Saniewski M, Czapski J** (1983) The effect of methyljasmonate on lycopene and 13-carotene accumulation in ripening red tomatoes. *Experientia* 39:1373-1374
- Santas J, Codony R, Rafecas M** (2013) Phytosterols: beneficial effects. En *Natural products* (pp. 3437-3464). Springer Berlin Heidelberg.
- Sarkar SK y Phan C** (1975) The Biosynthesis of 8-Hydroxy-6-methoxy-3-methyl-3, 4-dihydroisocoumarin and 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromone in Carrot Root Tissues Treated with Ethylene. *Physiologia Plantarum*, 33, 108-112.
- Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Awai K, Shimada H** (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *Dna Research*, 8, 153-161.
- Schnitzler JP, Madlung J, Rose A, Ulrich Seitz H** (1992) Biosynthesis of p-hydroxybenzoic acid in elicitor-treated carrot cell cultures. *Planta*, 188, 594-600.
- Schwender J, Müller C, Zeidler J, Lichtenthaler HK** (1999) Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 455,140-144
- Scragg AH** (2007) The production of flavours by plant cell cultures. En *Flavours and Fragrances* (pp. 599-614). Springer Berlin Heidelberg.
- Seo JW, Jeong JH, Shin CG, Lo SC, Han SS, Yu KW, Choi YE** (2005) Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation. *Phytochemistry*, 66, 869-877.
- 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 Science*, 165, 951-957

- Shintani D y DellaPenna D** (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*, 282, 2098-2100.
- Simkin AJ, Breitenbach J, Kuntz M, Sandmann G** (2000) *In vitro* and in situ inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 4676-4680.
- Simon PW, Freeman RE, Vieira JV, Boiteux LS, Briard M, Nothnagel T y Kwon YS** (2008) Carrot. Vegetables II (pp. 327-357). Springer New York.
- Sircar D y Mitra A** (2009) Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* 2: Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. *Journal of plant physiology*, 166, 1370-1380.
- Sivakumar G y Paek KY** (2005) Methyl jasmonate induce enhanced production of soluble biophenols in *Panax ginseng* adventitious roots from commercial scale bioreactors. *Chemistry of natural compounds*, 41, 669-673.
- Son SH, Choi SM, Lee YH, Choi KB, Yun SR, Kim JK, Park YG** (2000) Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor. *Plant Cell Reports*, 19, 628-633.
- Stafford A, Morris P, Fowler MW** (1986) Plant cell biotechnology: a perspective. *Enzyme and microbial technology*, 8, 578-587.
- Stahl W y Sies H** (2007) Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Molecular biotechnology*, 37, 26-30.
- Stampfer MJ y Rimm EB** (1995) Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*, 62, 1365S-1369S.
- Stange C, Fuentes P, Handford M, Pizarro L** (2008) *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biological research*, 41, 289-301.
- Steward N, Martín R, Engasser JM, Goergen JL** (1999) A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Reports*, 19, 171-176.

- Stubberfield LCF y Shaw PJA** (1990) A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measurements of microbial activity. *Journal of Microbiological Methods*, 12, 151-162.
- Szejtli J** (1998) Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, 98, 1743-1754.
- Taiz L, Zeiger E** (2006) Secondary metabolites and plant defense. En: *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.
- Tamogami S, Agrawal GK, Rakwal R** (2011) Jasmonates to jasmonolites in plants: past present and future. *Advances in Botanical Research*, 60, 309-348
- Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro LR** (2008) Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 129-134.
- Tholl D** (2015) Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. En *Biotechnology of Isoprenoids* (pp. 63-106). Springer International Publishing.
- Thompson KA, Marshall MR, Sims CA, Wei CI, Sargent SA, Sott JW** (2000) Cultivar, maturity and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science*, 65, 791-795.
- Thorpe TA** (1980) Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. *International review of cytology*, 11, 71-112
- Ubaldo Suárez D** (2007) Efecto de la luz en el desarrollo y en la acumulación de carotenoides en lígulas de *Tagetes erecta*. Tesis doctoral.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J** (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1, 13-25
- Vogt T** (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3, 2-20.
- Vranová E, Coman D, Grisse W** (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Molecular plant*, 5(2), 318-333.
- Vranová E, Coman D, Grisse W** (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology*, 64, 665-700.

- Vuong TV, Franco C, Zhang W** (2014) Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. *Biotechnology Reports*, 1, 15-21.
- Waffo Teguo P, Decendit A, Krisa S, Deffieux G, Vercauteren J, Mérillon JM** (1996) The accumulation of stilbene glycosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Journal of Natural Products*, 59, 1189-1191.59:1189–1191.
- 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
- Wakamatsu K y Takahama U** (1993) Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88, 167– 171.
- Wang K, Senthil-Kumar M, Ryu CM, Kang L, Mysore KS** (2012) Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiology*, 111.
- Wang Z, Cao G, Wang X, Miao J, Liu X, Chen Z, Qu LJ and Gu H** (2008) Identification and characterization of COI1-dependent transcription factor genes involved in JA-mediated response to wounding in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports* 27, 125-135
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals Botany*, 100,681-697
- Wasternack C y Hause B** (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review. *Annals of Botany*, 111, 1021-1058
- Wei S** (2010) Methyl jasmonic acid induced expression pattern of terpenoid indole alkaloid pathway genes in *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Growth Regulation* 613, 243-251
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, Von Lintig J** (2003) Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216, 523-534.

- Wenk C** (2000) Herbs, spices and botanicals: 'Old fashioned' or the new feed additives for tomorrow's feed formulations? Concepts for their successful use. *Biotechnology in the feed industry*, 200, 79-96.
- Wenk C** (2003) Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 282-289.
- Winkel-Shirley B** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 218-223.
- Woitsch S y Römer S** (2003) Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiology*, 132, 1508-1517.
- Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJH** (2009) Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 813-820.
- Yamaguchi T, Yamada A, Hong N, Ogawa T, Ishii T, Shibuya N** (2000) Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean:  $\beta$ -glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *The Plant Cell*, 12, 817-826.
- Yamakawa T, Kato S, Ishida K, Kodama T, Minoda Y** (1983) Production of anthocyanins by Vitis cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 2185-2191.
- Yates, PJ, Haughan PA, Lenton JR, Goad LJ** (1991) Effects of terbinafine on growth, squalene and sterol ester content of celery cell suspension culture. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 40, 221-226.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I** (2000) Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451), 303-305.
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y** (1996) Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnology*, 14, 1129-1132.
- Zamboni A, Gatto P, Cestaro A, Pilati S, Viola R, Mattivi F, Moser C and Velasco R** (2009) Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. *BMC Genomics* 10, 363-337.

- Zaragoza-Martínez F, Lucho-Constantino GG, Ponce-Noyola T, Esparza-García F, Poggi-Varaldo H, Cerda-García-Rojas CM, Ramos-Valdivia AC** (2016) Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127, 47-56.
- Zeb A y Mehmood S** (2004) Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 199-204.
- Zenk MH** (1965) *Biosynthese von vanillin in Vanilla planifolia Andr.* G. Fischer.
- Zhang CH, Wu JY, He GY** (2002) Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 60, 396-402.
- 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 Science* 162, 459-468
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R** (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23, 283-333.
- Zheng Z, Wu M** (2004) Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant Science*, 166, 507-514
- Zidovetzki R y Levitan I** (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768, 1311-1324.







