

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

44

PRODUCCIÓN DE MONOTERPENOS POR
BIOTRANSFORMACIÓN DE GERANIL
PIROFOSFATO EN CULTIVOS *IN VITRO* DE
Piqueria trinervia Cav.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

MARÍA ISABEL SAAD VILLEGAS



DIRECTOR DE TESIS: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

MÉXICO, D.F.

MAYO 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL JARDÍN BOTÁNICO DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA, EN EL INSTITUTO DE QUÍMICA Y EN EL INTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL COMITÉ TUTORIAL FORMADO POR:

- EL DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
- EL DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS
- EL DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPEN

EL DIRECTOR DE TESIS FUE EL DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA.

AGRADECIMIENTOS

A Tonatiuh por su ayuda en la elaboración de las figuras.

A Giza por todas las horas que cuidó a mi bebita.

Al Dr. Abraham Rubluc por tantos años de consejo y ayuda.

Al DR. Manuel Jiménez por su apoyo incondicional, su comprensión y su amistad.

A la DGAPA de la UNAM por el apoyo dado para la realización de esta investigación.

Índice

	Página
I. Resumen	1
Abstract	3
Abreviaturas	5
Lista de tablas	6
Lista de figuras	7
II. Introducción	8
III. Marco teórico	10
1. <i>El metabolismo especial</i>	10
2. <i>Terpenos</i>	12
3. <i>Monoterpenos</i>	20
4. <i>Ciclasas</i>	22
5. <i>Monoterpeno ciclasas</i>	26
6. <i>Sitios intercelulares de biosíntesis</i>	30
7. <i>Cloroplastos</i>	31
8. <i>La oferta biotecnológica</i>	36
9. <i>Elicitores</i>	42
a. El proceso de inducción	43
b. Los cultivos elicitados	47
10. <i>Biotransformaciones con células vegetales</i>	50
a. Especies utilizadas	52
b. Reacciones efectuadas	57
c. Biotransformaciones con terpenos	59
d. Optimización de los sistemas de biotransformación	60
11. <i>Una planta muy particular: Piqueria trinervia</i>	64
IV. Objetivos	67
V. Hipótesis	68
VI. Materiales y métodos	69
1. <i>Estrategia desarrollada</i>	69
2. <i>Cultivos</i>	72
a. <i>Material biológico</i>	72
b. <i>Medios de cultivo</i>	72
c. <i>Organogénesis</i>	73
d. <i>Elicitores fúngicos</i>	73
Aislamiento de las cepas de <i>Fusarium moniliforme</i>	73
Obtención de cepas monospóricas	73
Preparaciones de elicitores	74
e. <i>Inducción de callo</i>	74
f. <i>Cultivo de callos en suspensión</i>	74
g. <i>Cultivos elicitados de células en suspensión</i>	75

	<i>Página</i>
3. Aislamiento del piquerinol	75
<i>a. Caracterización del piquerinol</i>	75
4. Síntesis de GPP y GPP deuterado	76
<i>a. Síntesis de geranil pirofosfato</i>	76
Preparación del éster pirofosfato	76
Síntesis del agente fosforilante: bis-trietilamoniofosfato	77
Purificación del GPP	77
Caracterización del GP y GPP	78
<i>b. Preparación de GPP deuterado</i>	78
Obtención de geranial	78
Obtención de geraniol deuterado	79
Síntesis de geranil pirofosfato deuterado	80
5. Biotransformación	80
<i>a. Experimentos de biotransformación</i>	80
<i>b. Aislamiento de cloroplastos</i>	80
<i>c. Experimentos de biotransformación con cloroplastos</i>	81
<i>d. Análisis cuantitativo y cualitativo de piquerol y piquerinol</i>	81
Muestras auténticas	81
Análisis cualitativo	82
Análisis cuantitativo	82
<i>e. Cuantificación de clorofila</i>	83
<i>f. Cuantificación de proteínas</i>	83
6. Ensayos enzimáticos	83
VII. Resultados y discusión	85
1. Cultivos	85
<i>a. Organogénesis</i>	85
<i>b. Cultivo de células en suspensión</i>	86
<i>c. Cultivos elicitados de células en suspensión</i>	86
2. Aislamiento y caracterización del piquerinol	88
3. Síntesis de geranil pirofosfato	90
<i>a. Marcaje del GPP con deuterio</i>	90
<i>b. Adición del pirofosfato</i>	92
4. Biotransformación	94
<i>a. Niveles básicos de síntesis</i>	94
<i>b. Biotransformación de GPP por cultivos en suspensión</i>	97
<i>c. Biotransformación de GPP por cultivos elicitados</i>	101
<i>d. Experimentos de biotransformación con cloroplastos</i>	106
<i>e. Los sistemas probados</i>	110
5. Actividad enzimática	114
<i>a. Búsqueda de tricomas en los diferentes estadios de crecimiento de P. trinervia</i>	115
<i>b. Pruebas de actividad enzimática</i>	116

	<i>Página</i>
VIII. Conclusiones	117
IX. Consideraciones finales	119
X. Bibliografía	122
XI. Apéndice 1: Espectros de RMN y masas	139
Geraniol	
H^1 RMN	140
Geranial	
H^1 RMN	141
Geraniol deuterado	
H^1 RMN	142
Espectrometría de masas	143
Geranil monofosfato (GP)	
H^1 RMN	144
C^{13} RMN	145
Geranil pirofosfato (GPP)	
H^1 RMN	146
C^{13} RMN	147
Piquerinol	
H^1 RMN	148
C^{13} RMN	149
Infrarrojo	150
Espectro de masas	151
Cosy	152
BQG	153
Hetcor	154
Actividad enzimática	
Espectro de masas del piquerol	155
Espectro de masas extracto Flores, testigos	156
Espectro de masas extracto Flores, tratadas	157
Espectro de masas extracto hojas de brotes, testigos	158
Espectro de masas extracto hojas de brotes, tratadas	159
Espectro de masas extracto hojas, testigos	160
Espectro de masas extracto hojas, tratadas	161
Espectro de masas extracto cultivos elicitados testigos	162
Espectro de masas extracto cultivos elicitados, tratados	163

I.- Resumen

Piqueria trinervia Cav. es una planta silvestre que representa un sistema ideal para la biotransformación de precursores de monoterpenos porque sintetiza estos compuestos en dos metabolones. Un canal metabólico es constitutivo y se expresa tanto en plantas completas como en cultivo de tejidos; mientras que el otro se induce con elicitores, en sistemas de cultivo en suspensión de la planta. En el primer sistema el monoterpeno más abundante es el piquerol, sustancia interesante por su efecto alelopático, molusquicida, acaricida y sobre protozoarios; mientras en el segundo, el compuesto más notable es el piquerinol, una fitoalexina, que presenta actividad fungicida y antibiótica. Con el objeto de sobreproducir los dos monoterpenos más abundantes en cada uno de los metabolones, se efectuaron ensayos de biotransformación de geranyl pirofosfato (GPP), con cultivos de células en suspensión, cultivos inducidos con elicitores y cloroplastos de *P. trinervia*. Se estableció cultivo en suspensión en medio-MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con ANA (1 mg/l) y BAP (1 mg/l), usando entrenudos como explantes. Se formó un cultivo semi-disgregado, formado por pequeños callos esféricos con núcleos verdes, que acumula piquerol A (entre 1.7 y 2.1×10^{-2} mg/g, peso seco), durante la fase de crecimiento exponencial. Hasta donde sabemos, este es el primer sistema que produce monoterpenos en cultivos de células en suspensión de angiospermas. Se desarrolló un protocolo para producir *in vitro*, plantas completas por organogénesis somática. Se optimizó la técnica de aislamiento y se hizo la caracterización química del piquerinol (2-metilen-7,7-dimetil biciclo [3,3,1] heptano -4,6-diol), el monoterpeno más abundante en los cultivos elicitados. Se estandarizó el proceso de síntesis química de GPP y GPP marcado con deuterio, mediante la optimización de ocho pasos secuenciados: síntesis de dióxido de manganeso (MnO_2), oxidación de geraniol, purificación de geraniol, reducción de geraniol, purificación de geraniol, síntesis de bis-trietilamoniofosfato, fosforilación del geraniol y purificación del GPP. En los experimentos de biotransformación con cultivos de células en suspensión, se obtuvieron las mayores concentraciones de piquerol (0.41 mg/g de biomasa seca), a las 48 horas de tratamiento, adicionando 30 mg de GPP por matraz. En los cultivos elicitados, la mayor tasa de transformación se obtuvo a las 48 horas de reacción, empleando 20 mg de GPP por matraz. Con estas condiciones se obtuvieron 38.0 mg/g de biomasa seca (183.2 mg/g de proteína) de piquerinol, que representa una sobreproducción de 6.4 veces, en relación con los testigos y una eficiencia de transformación del 90%. Se estandarizó la técnica de aislamiento de cloroplastos funcionales de hojas de *P. trinervia*. En todos los ensayos

de biotransformación con cloroplastos se obtuvieron piquerol y piquerinol. La etapa de crecimiento que proveyó los cloroplastos con mayor capacidad de transformación de GPP, para los dos monoterpenos, fue la de floración. En este sistema se obtuvieron rendimientos de 37.0 mg/g de proteína, que representa una sobreproducción de 341.0 veces, en relación con los testigos; y 2.9 mg/g de proteína de piquerinol. Los cloroplastos resultaron el sistema más eficiente de bioconversión de GPP en piquerol.

Abstract

Piqueria trinervia Cav. is a wild Mexican plant in the Asteracea family. It could be a suitable system for precursor monoterpenes biotransformation for several reasons: it can synthesize monoterpenes via two metabolic channels. The first route is constitutive and the monoterpene is expressed in both liquid and solid cultures, while the second route is inducible and responds to several pathogen and elicitor substances. The most abundant substance produced in the first system is piquerol A, it is interesting because, shows the following effects: allelopathic, molusquicide, and against the protozoa *Trypanosoma cruzi*; while in the second system, the most abundant monoterpene is piquerinol, a phytoalexin, which shows antifungal and antibiotic activity. In order to increase production of the most abundant monoterpenes in two metabolic channels, biotransformation of geranyl pirofosfat (GPP) experiments were carried. Experiments with cell suspension cultures, elicited cell suspension culture and chloroplast of *P. trinervia* were carried. Compact, fast-growing greenish callus was generated in MS-medium (Murashige & Skoog, 1962), to which 1 mg l^{-1} of NAA and 1 mg l^{-1} of BAP were added, using internodes as explants. This callus accumulated piquerol A beginning the sixth week of culture. Using this calli, a semi-desegregated suspension culture (small spherical calli with greenish areas) was established. The suspension culture accumulated piquerol A during the exponential growth stage (1.7 to $2.1 \times 10^{-2} \text{ mg/g}$, dry wt). Its specific rate of growth was 1.84 g/day/l (dry wt) and the duplication time was 7 days. To the best of our knowledge, this is the first time that monoterpenes have been obtained from cell suspension cultures of angiosperms. A protocol to regenerate whole plants by organogenesis was developed. The structure of most substance produced in elicited cell suspension culture, the 2-methylene-7,7-dimethylbicyclo (3,3,1) heptane-4,6-diol, or Piquerinol was determined. The synthesis process of geranyl pirofosfat (GPP) and geranyl pirofosfat deuterated was standardized. This process consists in eight reactions: (MnO_2) synthesis, geraniol oxidation, geraniol purification, geraniol reduction, geraniol purification, bis-(triethylamonio) fosfate synthesis, geraniol fosforilation and GPP purification. In biotransformation experiments with suspension cell cultures, the bigger piquerol concentrations were obtained (0.41 mg/g dry wt.), after 48 hours of treatment, adding 30 mg of GPP each flask. In elicited cell suspension culture, the best time of transformation was 48 h, using 20 mg of GPP each flask. In this conditions 38.0 mg/g (183.2 mg/g protein) of piquerinol were obtained, this represents a 6.4 times overproduction,

related with control groups and 90% transformation efficiency. The functional chloroplasts isolation technique (*P. trinervia*'s leaves) was established. In all biotransformation experiments made with chloroplast, piquerol and piquerinol, were obtained. The growing stage that shows the most active chloroplasts, to transform GPP for both monoterpenes was the floration. In this system 37.0 mg/g protein, of piquerinol were obtained, which is 341.0 times bigger to chloroplast not treated. The chloroplast were the most efficient system to bioconversion of GPP in piquerol.

Abreviaturas

Aa	Aminoácidos
AIA	Ácido indol acético
ANA	Ácido naftalen acético
BAP	Bencil amino purina
DMAPP	Dimetil alil pirofosfato
FPP	farnesil pirofosfato
GGPP	geranilgeranil pirofosfato
GP	Geranil monofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
RMN	Resonancia magnética nuclear
IPP	Isopentenil pirofosfato
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MS	Medio nutritivo Murashige y Skoog, 1962
PCR	Polimerasa de reacción en cadena
PDA	Medio nutritivo papa, dextrosa, agar
ppm	Partes por millón
PR	Proteínas relacionadas con la defensa
RE	Reticulo endoplasmático
Tps	Familia de genes de las terpeno sintasas

Lista de tablas

	Página	
Tabla 1	Terpenos con incorporación confirmada de 1-deoxi-D-xilulosa	18
Tabla 2	Comparación de secuencias parciales de aminoácidos de δ -cadineno sintasa de algodón y otras ciclasas de plantas	22
Tabla 3	Monoterpeno sintasas que han sido caracterizadas	30
Tabla 4	Historia de la biotecnología vegetal	37
Tabla 5	Productos acumulados en altos niveles en cultivos de células en suspensión	40
Tabla 6	Plantas transgénicas con síntesis alterada de compuestos secundarios	42
Tabla 7	Familias de proteínas vegetales antimicrobianas relacionadas con la defensa	48
Tabla 8	Especies vegetales empleadas en estudios de biotransformación	52
Tabla 9	Formas celulares empleadas en biotransformaciones vegetales	62
Tabla 10	Experimentos de biotransformación de GPP con cultivos de <i>P. trinervia</i>	71
Tabla 11	Producción de piquerol y piquerinol en plantas silvestres, plantas cultivadas, callos, cultivos en suspensión y cultivos elicitados	96
Tabla 12	Concentración de proteínas en diferentes órganos y cultivos de <i>P. trinervia</i>	97
Tabla 13	Producción de piquerol en diferentes tiempos después de la adición del GPP a los cultivos en suspensión	99
Tabla 14	Concentración óptima de sustrato para la obtención de piquerol por biotransformación en cultivos de células en suspensión	99
Tabla 15	Eficiencia de transformación de piquerol en cultivos en suspensión	100
Tabla 16	Producción de piquerinol en cultivos elicitados de <i>P. trinervia</i> a diferentes tiempos después de la adición de GPP	101
Tabla 17	Concentración óptima de sustrato en la biotransformación de GPP en piquerinol por cultivos elicitados	104
Tabla 18	Biotransformación con cloroplastos	108
Tabla 19	Resultados de los experimentos de biotransformación de GPP con cultivos de <i>P. trinervia</i>	111
Tabla 20	Eficiencia de transformación por peso seco de los sistemas celulares utilizados	112
Tabla 21	Eficiencia de transformación por gramo de proteína de los sistemas empleados	113
Tabla 22	Presencia de glándulas y tricomas glandulares en diferentes etapas fenológicas y órganos de <i>P. trinervia</i>	115

Lista de figuras

	Página
Fig. 1	Ruta acetato-mevalonato 14
Fig. 2	Biosíntesis de isopentenil pirofosfato 15
Fig. 3	Mecanismo propuesto para la formación de la 1-deoxixilulosa 5-fosfato 17
Fig. 4	Síntesis de los principales precursores de terpenos 19
Fig. 5	Comparación de secuencias de terpeno sintasas vegetales 23
Fig. 6	Árbol filogenético de terpeno sintasas vegetales 25
Fig. 7a	Mecanismo de ciclización de monoterpenos 27
Fig. 7b	Ruta propuesta para la bioconversión de geranil pirofosfato en (+) α -pineno y (+) bornil pirofosfato 28
Fig. 8	Esquema de la estructura del cloroplasto y el origen biogenético de las proteínas del organelo 32
Fig. 9	Representación esquemática del transporte de proteínas al lumen de tilacoides 35
Fig. 10	Elicidores raza-específicos codificados por genes de avirulencia fúngicos, bacterianos y virales, los cuales son reconocidos por los correspondientes genes vegetales de resistencia. 44
Fig. 11	Modelo simplificado de la transducción de señales en las respuestas de defensa vegetal 45
Fig. 12	Estructura del piquerol 65
Fig. 13	Estrategia desarrollada 70
Fig. 14	Estructura del piquerinol 89
Fig. 15	Interacciones $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (^3J) obtenidas en el experimento HMBC e interacciones $^1\text{H} - ^1\text{H}$ en NOEdiff, NOESY 89
Fig. 16	Proceso de síntesis de geranil pirofosfato 91
Fig. 17	Mecanismo de la reacción de adición de pirofosfato al geraniol 95
Fig. 18	Tiempo óptimo de biotransformación de GPP en piquerol, en los cultivos de células en suspensión 98
Fig. 19	Concentración óptima de sustrato para la biotransformación de GPP en piquerol en cultivos de células en suspensión 100
Fig. 20	Tiempo óptimo de transformación de GPP en piquerinol en los cultivos elicitados de <i>P. trinervia</i> 102
Fig. 21	Concentración óptima de sustrato para la biotransformación de GPP en piquerinol por los cultivos elicitados 103
Fig. 22	Mecanismo propuesto para la síntesis de piquerol y piquerinol a partir de GPP 105
Fig. 23	Eficiencia de biotransformación con cloroplastos. A.- mg de piquerol por muestra. B.- mg de piquerol por gramo de proteína 109

II.- Introducción

El aprovechamiento de la maquinaria enzimática de células vivas para hacer modificaciones específicas a sustancias químicas, o para efectuar pasos limitantes en la síntesis de compuestos de interés, es una de las áreas más promisorias de la biotecnología. Ante la demanda creciente en todos los segmentos del mercado de productos naturales, cada vez más industrias incorporan en la fabricación de sus productos uno o varios pasos de síntesis biológica por cuatro razones principales: 1) en muchas ocasiones la intrincada y fascinante arquitectura de las moléculas biológicas, a la cual deben sus propiedades, no puede construirse con síntesis química, la alternativa en este caso, es la utilización de los complejos enzimáticos que naturalmente las producen; 2) el manejo de transformaciones biológicas, permite montar procesos más cortos, eficientes y baratos; 3) la catálisis enzimática trabaja en condiciones fisiológicas, consume menos energía, no demanda altas presiones y temperaturas, ni ocupa metales pesados, es por lo tanto, una tecnología de bajo impacto ambiental; 4) la intervención de sistemas biológicos, en el proceso de síntesis, permite seguir considerando a las sustancias "productos naturales", etiqueta que les da ventajas comparativas en el mercado.

Existen muchos procesos industriales que involucran bioconversión de compuestos orgánicos efectuada por células microbianas. Son considerables las ventajas que ofrecen estos sistemas: existe una gran experiencia con fermentaciones que utilizan bacterias y levaduras, las células crecen rápidamente y tienen mucha resistencia a los efectos de corte ¹, los biorreactores que existen en el mercado han sido diseñados para ellas y requieren medios de cultivos de bajo costo. Sin embargo no están, en los microbios las capacidades catalíticas que más nos interesan. Las plantas, como reflejo de: su naturaleza autotrófica, su redundancia metabólica, la presencia de compartimentación metabólica que no se encuentra en bacterias o animales (debida a los plastidios y la vacuola), su condición sésil que complica más sus necesidades metabólicas y sus extensas capacidades biosintéticas (Plaxton, 1997), son la principal fuente de sustancias naturales en la Tierra. Ellas son las proveedoras más importantes de alimentos terrestres, medicinas, combustibles, aceites y fibras; representan además, un inmenso repertorio de sustancias bioquímicas, incluidos: saborizantes, esencias, fragancias, desecantes, gomas, pigmentos, químicos finos, sustancias farmacéuticas y nuevos compuestos con actividad biológica.

¹ Daño que sufren las células por la agitación mecánica en los reactores

El desarrollo de las tecnologías de cultivos de tejidos hizo suponer que era factible la utilización de cultivos vegetales en grandes biorreactores para la producción de fitoquímicos. Con esta intención se estudiaron intensamente las capacidades sintéticas de los cultivos de células de una gran cantidad de plantas, sólo para encontrar que la síntesis de metabolitos secundarios está fuertemente regulada, la productividad es baja y algunas rutas de síntesis no se expresan en cultivos indiferenciados.

Empero, la posibilidad real de aprovechar células vegetales en la industria química puede encontrarse en la interacción de la química sintética con el cultivo de tejidos vegetales. Pueden conseguirse grandes rendimientos y productividades muy altas, si se adiciona a cultivos en suspensión, un precursor de los metabolitos que la planta produce o sustancias extrañas que pueden sufrir modificaciones específicas.

Durante la última década se ha incrementado mucho el interés en las transformaciones de compuestos orgánicos con cultivos de células vegetales. Se han empleado plantas para llevar a cabo modificaciones de una amplia gama de sustratos, tanto naturales como sintéticos. Quizá la maquinaria catalítica de los cultivos vegetales que más se ha empleado es la capacidad oxido-reductora del metabolismo primario. No obstante, las mayores bondades de los cultivos de plantas se encuentran sobre todo, en las especificidades sintéticas del metabolismo secundario.

Piqueria trinervia Cav. una planta silvestre empleada en la medicina tradicional mexicana, puede convertirse en un excelente modelo para el estudio del metabolismo de monoterpenos y su producción por biotransformación, porque sintetiza monoterpenos en cultivos desdiferenciados, unos de forma constitutiva y otros durante la respuesta de defensa inducida con elicitores; cuando los cultivos son elicitados, producen varias fitoalexinas, con propiedades fungicidas, que se excretan al medio de cultivo; responde a varios hongos fitopatógenos y a diferentes sustancias inductoras. Con la intención de contribuir en este sentido, aquí presentamos los resultados de los experimentos de biotransformación de geranil pirofosfato (el intermediario ubicuo de la síntesis de monoterpenos en plantas), por cultivos de células en suspensión y de cloroplastos aislados de *Piqueria trinervia*, para la producción de piquerol y piquerinol, los dos monoterpenos más abundantes en esta planta.

III.- Marco teórico

1. *El metabolismo especial*

La vida en su forma más íntima se circunscribe al pequeño ámbito de las células, ahí las instrucciones de los genes se convierten en procesos de síntesis, transporte y degradación de sustancias. En esa compleja red de reacciones químicas catalizadas por enzimas, que llamamos metabolismo, se fundamentan todos los procesos biológicos.

A partir del CO₂ atrapado en la fotosíntesis, se inicia una intrincada trama de reacciones bioquímicas que llevan a la producción de las sustancias esenciales para la vida: azúcares, aminoácidos, lípidos y nucleótidos. Las reacciones implicadas en los procesos de síntesis de estas sustancias, los sustratos, co-sustratos, co-enzimas y combustibles (así como el código genético), son comunes a todos los seres vivos y se conocen como metabolismo primario. Estas soluciones evolutivas análogas en el diseño bioquímico de una amplia variedad de organismos forman la unidad fundamental de la vida.

A pesar de su unidad bioquímica básica, los seres vivos fabrican miles de sustancias orgánicas particulares, formadas en rutas de síntesis especializadas, que inician siempre a partir de alguna sustancia del metabolismo primario. A estas sustancias naturales, producidas sólo en ciertos géneros o especies, es a lo que hemos dado en llamar metabolitos secundarios.

La denominación metabolito secundario tiene connotación histórica. Derivó de las primeras explicaciones dadas a la presencia de compuestos sin función conocida, en el mantenimiento de los procesos vitales fundamentales, y por ello, de importancia secundaria para los individuos que los producían (Bell, 1981).

En los últimos 30 años, nuestra concepción del metabolismo secundario ha cambiado mucho, ascendió de poza de desperdicios celulares, hasta regulador de procesos ecológicos complejos, porque comprendimos que el papel de los compuestos secundarios debe buscarse no en el individuo que lo produce, sino en las respuestas bioquímicas que induce en los organismos con los que convive (Croteau, 1987; Cavalier-Smith, 1992). Ahora sabemos que los metabolismos secundarios son tan esenciales para la supervivencia como los intermediarios del metabolismo primario. Cumplen una amplia variedad de funciones: detienen predadores potenciales;

incrementar la habilidad de competencia con otras especies; protegen contra agentes estresantes del ambiente; atraen polinizadores, dispersores de semillas, simbioses y parejas sexuales; contribuyen al crecimiento y sobrevivencia bajo condiciones sub-óptimas (Smirnov 1995); permiten marcar territorio; constituyen señales de comunicación química entre los miembros de una colonia; defensa contra organismos patógenos (Bell 1981); y son los actores principales de la guerra química perpetua, librada contra competidores, predadores y parásitos (Gottlieb, 1990; Cavalier-Smith 1992). Un nombre más conveniente para ellos podría ser metabolitos especiales.

La enorme variedad de productos naturales se debe a procesos azarosos de cambio y fuerzas selectivas particulares, que difieren en detalle de acuerdo con el organismo y las enzimas presentes. La diversidad es posible porque los seres vivos han encontrado soluciones químicas diferentes, para problemas similares (Dayhoff, 1980). Es posible que algunas características químicas reflejen más las necesidades del pasado, que las presentes, o que estén ahí porque los genes que las codifican, se encuentran asociados con otras características actualmente valiosas para la especie (Bell, 1980). El incremento en diversidad en la química de sustancias especiales trae ventajas selectivas al productor porque aumenta las posibilidades de respuesta a los retos de su entorno.

Los metabolitos secundarios se caracterizan por lo siguiente:

- Son sustancias naturales;
- con una gran heterogeneidad de estructuras químicas;
- de distribución restringida (se encuentran sólo en ciertos géneros o especies);
- sintetizadas en rutas metabólicas multipaso, estrechamente relacionadas, fuertemente reguladas, a través de ramificaciones laterales del metabolismo primario;
- existe compartimentación de enzimas, precursores, intermediarios y productos involucrados en su biosíntesis y catabolismo;
- la expresión de las enzimas involucradas en su metabolismo se da en células especializadas y en momentos particulares del desarrollo del individuo que las produce;
- son sustancias de importancia relativa para las células que las sintetizan y de gran importancia para el organismo como un todo

Actualmente se conocen cientos de miles de metabolitos secundarios, pero tal vez existan millones y el número va en aumento, se siguen sintetizando nuevos

productos porque la evolución y las interacciones bióticas dentro y entre especies continúan. A pesar de su enorme diversidad, todos los metabolitos secundarios derivan de alguna de las siguientes sustancias del metabolismo primario: α -aminoácidos, acetil CoA, ácido mevalónico, intermediarios de la ruta del ácido shikímico e intermediarios de la poza de la triosa fosfato (Hebert, 1989; Eisenreich, *et al.*, 1996). En atención a su biosíntesis, los compuestos del metabolismo secundario pueden clasificarse en tres grupos principales: los fenoles y polifenoles, los terpenos y los productos del metabolismo especial del nitrógeno (Plaxton, 1997). A continuación revisaremos uno de estos grandes grupos, el de los terpenos.

2. Terpenos

Los derivados de isopreno son tal vez, el grupo más grande de productos naturales, se han reportado más de 30,000 terpenos y terpenoides naturales y su número sigue en aumento (Croteau, *et al.*, 1994). Hay dos criterios para clasificar terpenos, el primero atiende a la presencia de anillos, así los terpenos pueden ser cíclicos o abiertos; la segunda los agrupa por el número de átomos de carbono, los de cinco son hemiterpenos, los de diez, monoterpenos, son sesquiterpenos los de quince y diterpenos los de veinte. La gran mayoría de los terpenos son metabolitos secundarios de plantas, ellas pueden sintetizar (y catabolizar) muchos tipos diferentes de terpenos, desde sustancias con cinco carbonos hasta moléculas con cuarenta (Funk *et al.*, 1992). Un número mucho más pequeño de terpenos es producido por hongos.

Los terpenos tienen una amplia variedad de funciones biológicas. Por ejemplo, la vitamina A actúa como fotorreceptor en animales, algunos alcoholes terpenicos desempeñan un papel muy importante en la señalización celular en vertebrados y son elementos cromóforos de las bombas de protones manejadas por luz, en ciertas bacterias; el colesterol es un componente esencial de las membranas de células eucarióticas (Eisenreich *et al.*, 1998). En los vegetales las funciones que cumplen estas sustancias son muy diversas: son pigmentos fotosintéticos (carotenoides y clorofilas), hormonas vegetales (ABA y giberelinas), transportadores de electrones (ubiquinona y plástiquinona), mediadores en el ensamble de polisacáridos, componentes estructurales de la membrana y sustancias de comunicación y defensa (Colby *et al.*, 1993; Goodwin y Mercer, 1988; McGarvey y Croteau, 1995).

Este tipo de compuestos derivó su nombre de una sustancia colorida, la trementina, también llamada turpenina, palabra que dio origen a la denominación terpeno (Chappell, 1995). En un principio se pensó que los terpenos derivaban de precursores sencillos tales como el farnesol, el geraniol y el escualeno. En 1953 se

determinó que merecían ese nombre las sustancias derivadas de unidades isopreno. Dichas unidades debían cumplir con una regla, la de unirse de cabeza a cola. Cinco décadas de investigación han mostrado que esta regla especial tiene demasiadas excepciones para serlo (Chappell, 1995). Hoy se sabe que todos los terpenos son ensamblados biosintéticamente a partir de dos precursores: isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Satterwhite *et al.*, 1985). La biosíntesis de terpenos puede dividirse en varias etapas:

- En la primera ocurre la síntesis de isopentenil pirofosfato, la isomerización a dimetilalil pirofosfato, condensación de estas dos unidades C_5 , catalizada por la preniltransferasa, para formar geranil pirofosfato (GPP) y la subsecuente 1'-4 adición de isopentenil pirofosfato para formar farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (Bohlman *et al.*, 1998)
- En la segunda etapa, intervienen las preniltransferasas, enzimas encargadas de formar las moléculas básicas para la producción de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos. El prenil difosfato experimenta un rango de ciclizaciones basada en variaciones de un mismo mecanismo para producir un esqueleto parental de cada clase. Entonces, el geranil pirofosfato (GPP) da origen a monoterpenos (C_{10}), El farnesil pirofosfato (FPP) a sesquiterpenos (C_{15}) y el geranil-geranil pirofosfato GGPP a diterpenos (C_{20}). Los terpenos de más de veinte átomos de carbono como los esteroides y carotenoides, se sintetizan por condensación de estos intermediarios (Bohlman *et al.*, 1998; (McGarvey y Croteau, 1995).
- En la tercera etapa ocurren transformaciones secundarias de estas moléculas catalizadas por terpeno sintasas (ciclasas); los esqueletos básicos experimentan una variedad de transformaciones redox (oxidaciones, reducciones, isomerizaciones, conjugaciones), las cuales llevan a la formación de miles de terpenos diferentes que componen los aceites, turpeninas y resinas de origen vegetal. La mayoría de las hidroxilaciones o epoxidaciones involucran a P-450 citocromo oxidasas (Karp *et al.*, 1990; Funk *et al.*, 1994; McGarvey y Croteau, 1995; Neau *et al.*, 1997).

Los terpenos de plantas superiores, han sido estudiados ampliamente, pero la biosíntesis de los isoprenoides precursores de terpenos, todavía no es clara, a pesar de que se han estudiado por varias décadas. En la década de los 50s, observaciones iniciales indicaron que estos monómeros isopreno son derivados del mevalonato. Durante cuatro décadas se pensó que todos los terpenos derivaban de esta ruta biosintética común, conocida como ruta del mevalonato. La ruta del

mevalonato (dilucidada primero en células animales y levaduras) está dividida en cuatro pasos (Fig. 1 y Fig. 2). El paso inicial involucra la fusión de tres moléculas de acetil CoA, con la intervención de dos enzimas: dos moléculas de acetil CoA se condensan para formar acetoacetil CoA y una adición aldol de otra molécula de acetil CoA produce 3-hidroxi - 3-metilglutaril CoA, la cual es reducida a ácido mevalónico en el paso subsecuente. El mevalonato es entonces fosforilado para formar el 3-fosfo 5-piropofomevalonato y la subsecuente eliminación de fosfato y CO₂ rinde el IPP, el cual puede ser convertido en DMAPP por una isomerasa.

Desde el descubrimiento de la ruta del mevalonato han sido publicados muchos estudios de biosíntesis de una amplia variedad de especies (Croteau *et al.*, 1985; Wheeler y Croteau, 1988; Wheeler y Croteau, 1990; Pyun *et al.*, 1994; Endo y Suga, 1992). En muchos casos, sin embargo, los datos experimentales de la biosíntesis de terpenos específicos en plantas y microorganismos no puede ser explicada fácilmente por la ruta del mevalonato (Norman *et al.*, 1990). Específicamente, acetato y mevalonato no son incorporados

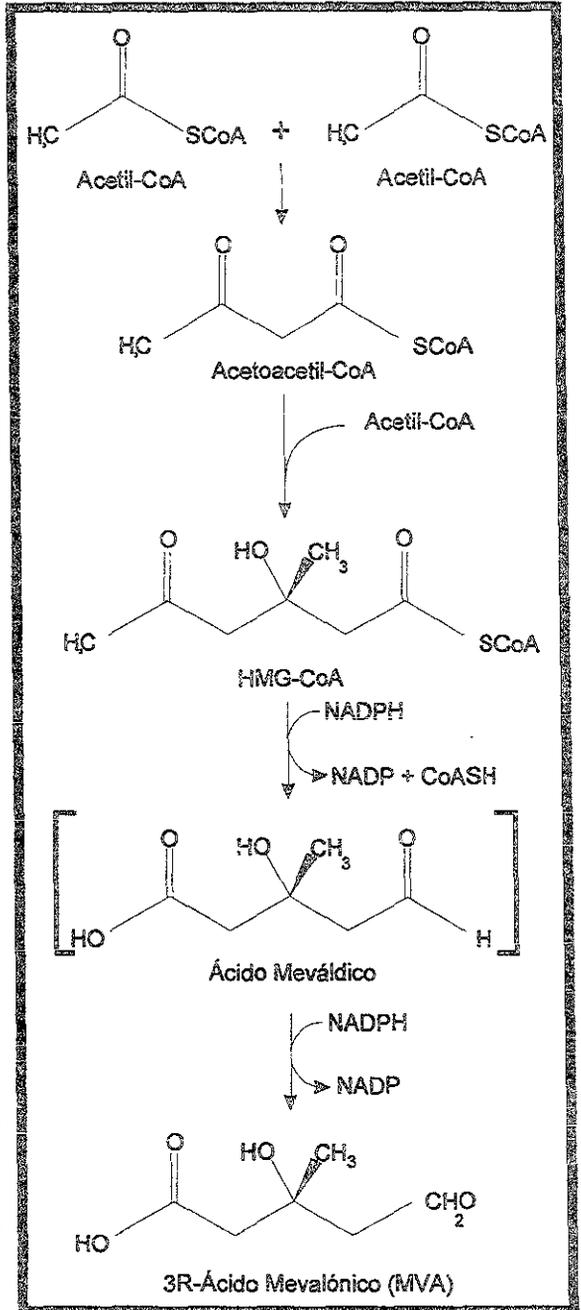


Fig. 1.- Ruta acetato-mevalonato

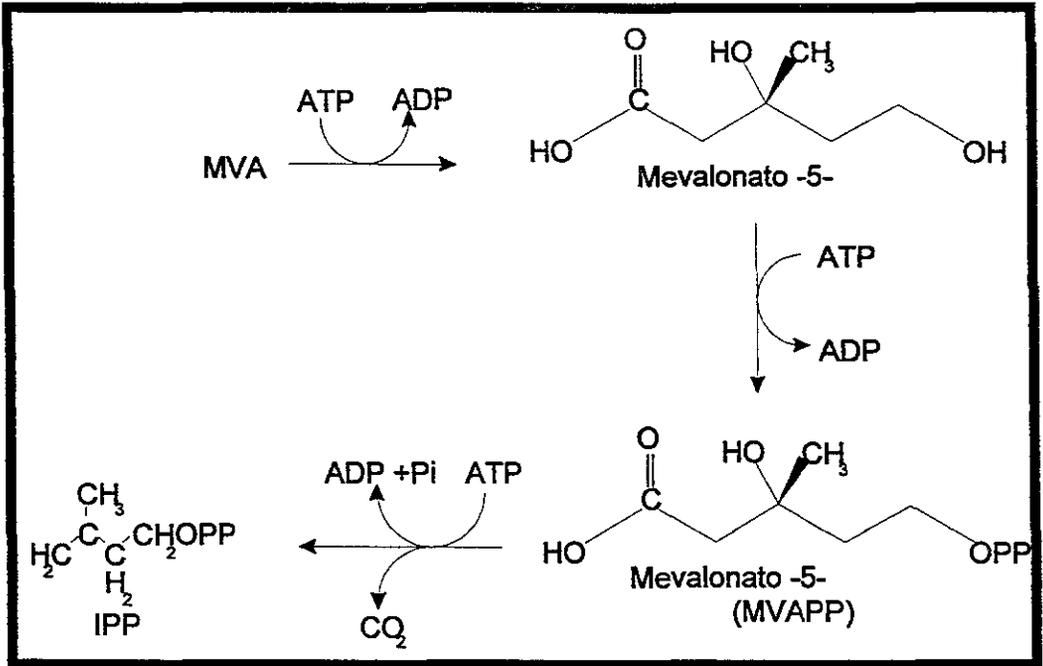


Fig. 2.- Biosíntesis de isopentenil pirofosfato

eficientemente en los terpenos bajo estudio. El mevalonato puede servir como precursor de sesquiterpenos, fitoesteroles y carotenoides (Croteau *et al.*, 1972; Nemethy *et al.*, 1983), pero mevalonato y acetato son incorporados pobremente en mono y di-terpenos (Funk *et al.*, 1994; Dudley *et al.*, 1986). Se han propuesto complejas hipótesis en un intento por reconciliar estas evidencias con el paradigma universal de la ruta del mevalonato como origen de todos los terpenos de todos los organismos:

- que acetato y mevalonato son translocados pobremente a los sitios subcelulares de biosíntesis;
- que ocurre reciclaje rápido de sustratos;
- que se perturbó la ruta normal, la cual requiere necesariamente concentraciones fisiológicas de sustratos;
- o que estos sustratos son degradados por inhibidores enzimáticos potenciales.

La primera pista para comprender el comportamiento de esta ruta biosintética se encontró cuando se descubrió que la ruta clásica del mevalonato para la formación de isoprenoídes no existe en un buen número de bacterias y en los tilacoídes de

cianobacterias. Más tarde se descubrió en microorganismos una nueva ruta para la biosíntesis de isopreno: la ruta de la deoxixilulosa, que involucra la condensación de una triosa fosfato con un acetaldehído y un subsiguiente rearrreglo del producto (Eisenreich *et al.*, 1996). Por otra parte hay evidencias de que esta ruta también se encuentra en plantas superiores (Heintze *et al.*, 1990). En estudios de incorporación de ^{13}C glucosa en ginkgolidos de *Ginkgo biloba*, realizados en la década de los 80, se determinó que la formación de IPP, la unidad fundamental de la biosíntesis de terpenos, ocurren en dos rutas biosintéticas con mecanismos distintos, que se encuentran casi completamente segregadas entre el citosol y los plástidos. Mientras las unidades IPP involucradas en la formación de sitoesterol se forman a partir de ácido mevalónico por la ruta clásica del acetato, la biosíntesis de las moléculas de IPP que formarán ginkgolidos y biobálidos, no usa ácido mevalónico, son formados de monómeros de isopreno por la contribución de fragmentos de la glucosa de tres-carbonos y dos-carbonos (Neau *et al.*, 1997). Esto no podía explicarse por la ruta del mevalonato, en la cual se utilizan sólo bloques de construcción de tres carbonos (por ejemplo, acetil CoA).

Estudios posteriores concluyeron que en la nueva ruta, los isoprenoides derivaban de intermediarios de la poza de la triosa fosfato (Fig. 3). Se sugirió la condensación cabeza-cabeza de gliceraldehído 3-fosfato y acetaldehído activado generado de piruvato por una descarboxilación tiamina-fosfato-dependiente. Mecanismo que ahora es un universalmente aceptado (Eisenreich *et al.*, 1998).

En *E. coli* y *Bacillus subtilis* la 1-deoxixilulosa es catalizada por la enzima piruvato deshidrogenasa, la cual usa piruvato y gliceraldehído como sustratos y requiere tiamina pirofosfato como cofactor (Eisenreich *et al.*, 1998). Experimentos *in vivo* documentan inequívocamente la incorporación de la 1-deoxixilulosa al precursor isoprenoide por procesos intramoleculares (Tabla 1). La 1-deoxixilulosa exógena puede estar entrando a la ruta vía fosforilación por una carbohidrato kinasa con amplio espectro de sustrato. Es posible que la 1-deoxi- D- xilulosa 5 fosfato más que la 1-deoxixilulosa sea el precursor en la ruta alternativa de biosíntesis de terpenos. La enzima de la 1-deoxi- D- xilulosa 5 fosfato sintasa de menta, ha sido clonada y expresada en *E. coli*. El gene de 71 kDa contiene un péptido de tránsito a plástido. En base a la secuencia de este gen se ha determinado la presencia de genes homólogos en varias especies de plantas y microbios (Eisenreich *et al.*, 1998).

Aunque los intermediarios entre 1-deoxi- D- xilulosa 5 fosfato y IPP/DMAPP todavía no han sido caracterizados, la transformación total debe involucrar un rearrreglo del esqueleto así como tres pasos de reducción y al menos un paso de fosforilación. Pero no se ha obtenido aún una evidencia formal de que IPP y DMAPP

son intermediarios de la ruta de la deoxixilulosa. No se sabe tampoco si el producto inicial es IPP o DMAPP (Eisenreich *et al.*, 1998).

Las dos rutas para la biosíntesis de terpenos, la del mevalonato y la de la deoxixilulosa funcionan en las plantas superiores, operan separadas por compartimentalización en dos maquinarias biosintéticas de terpenos: la ruta del mevalonato aparentemente se localiza en el citoplasma, mientras la ruta de la deoxixilulosa parece que opera en el plastidio. Hay evidencias de un limitado intercambio de metabolitos entre las dos rutas (Heintze *et al.*, 1990).

La evolución de las dos rutas de terpenos puede ser evaluada por su distribución en diferentes reinos. Las arqueobacterias aparentemente utilizan la ruta del mevalonato. En eubacterias, puede encontrarse o la ruta del mevalonato o la ruta de la 1-deoxixilulosa fosfato. Las cianofíceas utilizan la ruta de la 1-deoxixilulosa. Ambas rutas parece que operan en compartimientos separados en células vegetales.

Un sólido cuerpo de evidencias estructurales, bioquímicas y moleculares apoya la teoría que postula que los cloroplastos se originaron por endocitosis y subsiguiente endosimbiosis de cianobacterias (Gray, 1991). Los genes que codifican para las enzimas de la deoxixilulosa pueden haberse transportado del endosimbionte

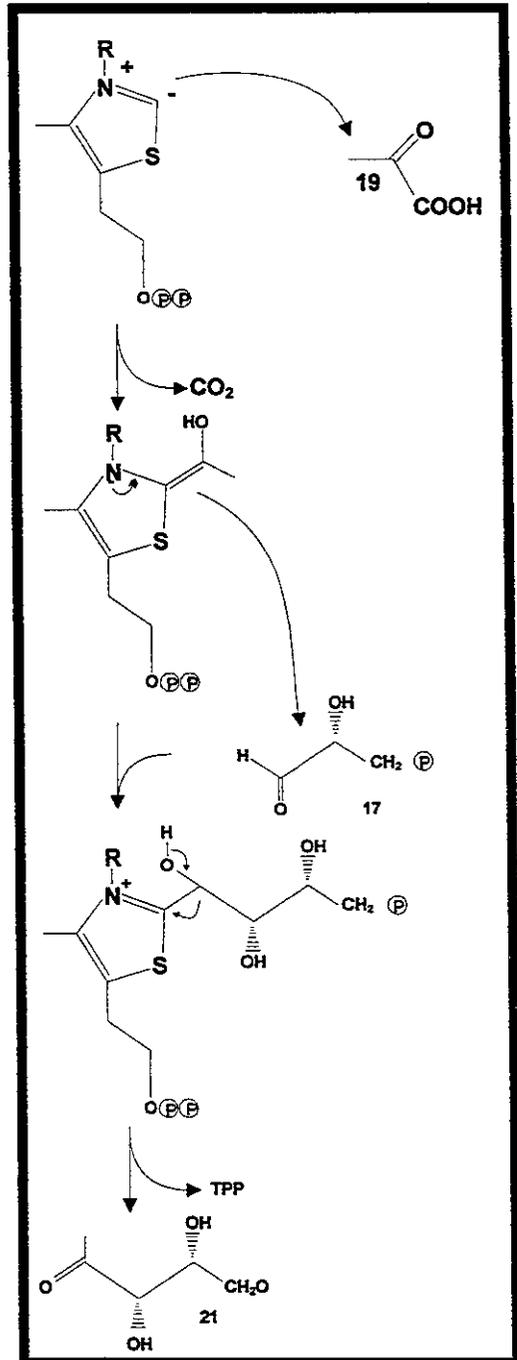


Fig. 3.- Mecanismo propuesto para la formación de la 1-deoxixilulosa 5- fosfato

primitivo al genoma nuclear. Esto implicaría que las dos rutas de terpenos codificadas en el núcleo de las células vegetales, tienen un origen doble, las enzimas de la ruta del mevalonato se heredaron del hospedero metanogénico, mientras las enzimas de la ruta de la deoxixilulosa pudieron derivar de la bacteria fotosintética endosimbionte, emparentada con las cianofíceas, que dio origen a los plastidios (Eisenreich *et al.*, 1998).

Tabla 1.- Terpenos con incorporación confirmada de 1-deoxi- D- xilulosa

Terpeno	Organismo
Ubiquinona	<i>E. coli</i>
Ginkgolidos	<i>G. biloba</i>
Diterpenos	<i>Salvia miltiorrhiza</i>
Molécula fitol de la clorofila	<i>Catharanthus roseus</i> <i>Lemna gibba</i> <i>Cyanidium caldarium</i> (alga roja) <i>Scenedesmus obliquus</i> (alga verde) <i>Chlamy domonas reinhardtii</i> (alga verde)
Isopreno	<i>Populus nigra</i> <i>Chelidonium majus</i> <i>Salix viminalis</i>

Fuente: Eisenreich *et al.*, 1996

La acumulación de terpenos en una planta, a partir de dos rutas biosintéticas que operan en dos compartimentos celulares requiere de regulación compleja. El fenómeno de compartimentalización metabólica adiciona un nivel extra de control. La tasa de biosíntesis está determinada además por: los niveles de actividad y las propiedades cinéticas de las enzimas de la ruta; el balance entre procesos sintéticos y catabólicos particulares de cada vía; la tasa de producción del precursor básico (IPP) o su reparto en cada compartimiento; y del intercambio de metabolitos comunes entre las dos rutas (McGarvey y Croteau, 1995; Dixon *et al.*, 1996; Heintze *et al.*, 1990; Gershenzon y Croteau, 1990).

El flujo de carbono hacia las dos rutas biosintéticas depende en buena medida, del suministro de IPP. El origen del IPP parece diferir en distintos tejidos y estados de desarrollo, por eso no es posible adoptar un modelo general de organización. No es claro tampoco cual es el origen de IPP en los diferentes organelos. En contraste, los sitios subsecuentes de la biosíntesis de terpenos son claros. Hay por lo menos tres compartimentos celulares autónomos donde la síntesis se efectúa, el RE en citosol para sesquiterpenos y triterpenos; el plastidio para monoterpenos, diterpenos,

tetraterpenos y carotenoides (así como moléculas prenilo para clorofila y plastoquinonas); y mitocondria y/o aparato de golgi, para la biosíntesis de ubiquinona (Mettal *et al.*, 1988; Guo y Wagner, 1995; Sun y Kamiya, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1996; Reil y Berger, 1997).

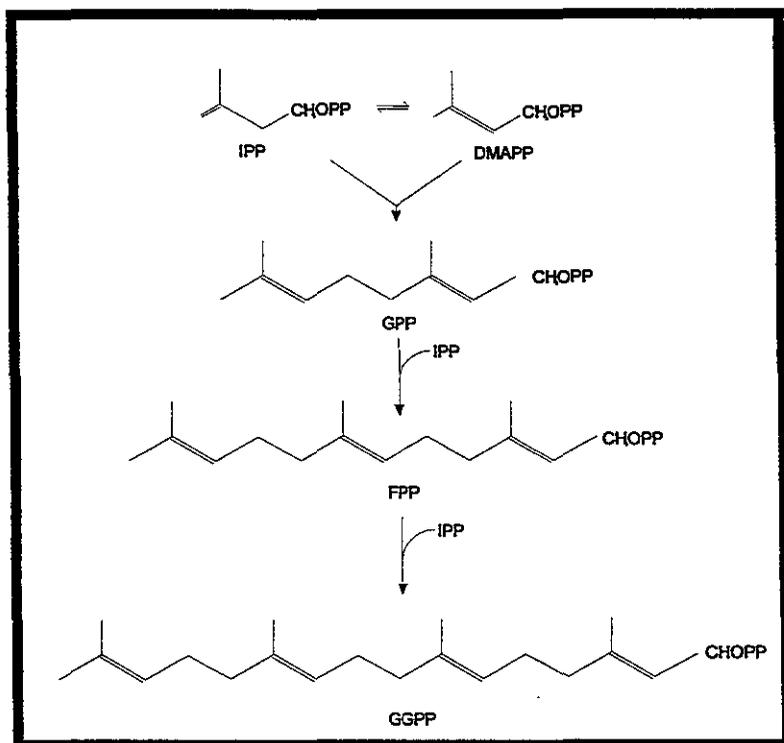


Fig. 4.- Síntesis de los principales precursores de terpenos

En la ruta del mevalonato, se ha identificado a la hidroximetilglutaril-CoA reductasa como enzima reguladora (Chappell, 1995; Reil y Berger, 1997). En el punto donde la síntesis de cada tipo de terpeno diverge (Fig. 4), se localizan otras enzimas reguladoras, las preniltransferasas. Algunas de estas enzimas pueden sintetizar los intermediarios de los diferentes grupos de terpenos: geranil pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP), sin embargo, suelen tener mayor afinidad por alguno de los sustratos y dependiendo de ella se localizan en organismos distintos (Gershenzon y Croteau, 1990). Las ciclasas son también enzimas reguladoras con localización especial en las células. Estas enzimas

están involucradas en la regulación de flujo metabólico porque operan en puntos de ramificación metabólica y catalizan el primer paso que lleva a varias clases de terpenos.

3. Monoterpenos

Los monoterpenos son compuestos de bajo peso molecular formados por diez átomos de carbono (dos unidades isopreno). Son sustancias coloridas, lipofílicas, volátiles, responsables del olor característico de muchas plantas. Ellos se han encontrado en cerca de cincuenta familias de angiospermas y suelen ser los constituyentes principales de los aceites y resinas de las gimnospermas (Gershenzon y Croteau, 1990). Al igual que otros metabolitos secundarios que se excretan, cumplen roles ecológicos: atraen polinizadores, son agentes alelopáticos o sustancias de defensa contra predadores y parásitos (Colby *et al.*, 1993; Chappell, 1995; Gershenzon y Croteau, 1990; Goodwin y Mercer, 1988). La gran mayoría de los monoterpenos naturales de plantas son compuestos cíclicos basados en un anillo ciclohexanoide, sintetizado por monoterpeno ciclasas (Colby *et al.*, 1993; Croteau, 1987). Hay también monoterpenos acíclicos como el mirceno y el linalool.

La importancia económica de los monoterpenos es muy grande, son muy apreciados en la industria de los saborizantes y aromas (Borg-Karlson *et al.*, 1994). Sus usos comerciales también comprenden las áreas farmacéutica y agroquímica (McGarvey y Croteau, 1995).

A pesar de su importancia biológica y comercial es poco lo que se conoce sobre el metabolismo de los monoterpenos. Han sido varias las causas de esta situación: procesos de regulación espaciales y temporales muy complejos, bajas concentraciones de las ciclasas en extractos de hojas completas, presencia de otras enzimas que compiten por actividad, como las fosfohidrolasas derivadas del mesófilo de las hojas y falta de disponibilidad hasta hace poco tiempo, de sustratos radiomarcados. Afortunadamente esta situación ha empezado a revertir y se cuenta ya con varios sistemas adecuados para estudios bioquímicos (Chappell, 1995; McGarvey y Croteau, 1995), gracias a los avances en la extracción de glándulas epidérmicas, a las técnicas cromatográficas de afinidad, al desarrollo de métodos radioquímicos muy sensibles y al empleo de inmunología y biología molecular (Croteau, 1987).

El control de la biosíntesis de monoterpenos es múltiple, comprende regulación temporal, espacial y ambiental. Los niveles de acumulación de los monoterpenos

sufren cambios drásticos durante el crecimiento. Aparecen en estructuras secretorias en ciertos órganos de la planta como hojas y flores, en momentos particulares del desarrollo del vegetal - casi siempre en la fase juvenil - y bajo estímulos especiales como estrés hídrico. La síntesis de monoterpenos está regulada también por luz y concentración de CO₂ (Lewinsohn *et al.*, 1993; Gleizes *et al.*, 1980; Chappell, 1995; Gershenzon y Croteau, 1990; McGarvey y Croteau, 1995; Loreto *et al.*, 1996).

La regulación espacial comprende límites histológicos, celulares y subcelulares. (Savage *et al.*, 1996). Dada su característica hidrofóbica, los monoterpenos son generalmente acumulados en estructuras secretorias complejas, tales como ductos, cavidades de resina o tricomas glandulares (Gershenzon *et al.*, 1989; Karp *et al.*, 1990; Hallahan *et al.*, 1998; Croteau, 1987). La complejidad y estructura de los ductos, cavidades, glándulas y tricomas determina, en alguna medida el nivel de la producción. La biosíntesis puede estar restringida a los tejidos donde las sustancias se utilizan, pétalos de flores, para los atrayentes de polinizadores, cromoplastos del fruto, para colorantes que indican maduración a los dispersores de semillas, capas epidermales aéreas para los compuestos volátiles, tejidos epidermales o partes de la planta importantes para la reproducción y la supervivencia para compuestos de defensa; etcétera (Wink, 1997). Las células involucradas en la síntesis tienen retículos endoplasmáticos bien desarrollados y poseen abundancia de plastidios (Gershenzon y Croteau, 1990; Wickham y West, 1992).

Estudios efectuados en 45 especies de plantas demuestran que a nivel subcelular, los plastidios (leucoplastos y cromoplastos) son el sitio exclusivo de síntesis de los monoterpenos (McGarvey y Croteau, 1995). La conversión metabólica y el flujo de la misma se regulan en el organelo por las enzimas presentes (ciclasas y una preniltransferasa que sintetiza predominantemente GPP, isopentenil pirofosfato (IPP) isomerasa y la geranyl transferasa) (Feron *et al.*, 1990; Dudley *et al.*, 1986); por la permeabilidad de la membrana intracelular a precursores, intermediarios y productos; y por la disponibilidad de cofactores.

A nivel enzimático la regulación incluye tanto cambios en la cantidad absoluta de enzimas, resultado de variación en la tasa de síntesis y degradación, controlados a nivel transcripcional, como cambios en la capacidad catalítica relacionados con modificación alostérica o covalente, regulados a nivel post-transcripcional (Gershenzon y Croteau, 1990).

4. Ciclasas

La mayoría de los terpenos son cíclicos y contienen sistemas múltiples de anillos, cuya estructura básica es determinada por enzimas altamente específicas llamadas terpeno sintasas o ciclasas (Bohlman *et al.*, 1998). Estas enzimas han recibido considerable atención porque las reacciones que catalizan determinan en gran medida las características básicas del terpeno final; por su posible importancia regulatoria como punto de ramificación en el metabolismo de isoprenoides (Alonso *et al.*, 1992) y por su catálisis inusual, con múltiples pasos de reacciones secuenciadas que involucran isomerización, ciclización y desprotonación de intermediarios carbocatiónicos (Gershenzon y Croteau, 1990).

Las sesquiterpeno ciclasas de citosol y las monoterpene, sesquiterpeno y diterpeno ciclasas de cloroplasto son muy parecidas. La notable semejanza de características de enzimas responsables de generar compuestos parentales de varios tipos, está relacionada con el hecho de que estas enzimas tienen mecanismos de acción análogos que involucran pasos comunes (Chen *et al.*, 1995). Esta semejanza de funciones es reflejo de la similitud de la estructura primaria (Fig. 5) de todas las terpeno ciclasas del origen vegetal (Tabla 2) (Straks *et al.*, 1997). En cambio hay muy poca similitud entre las ciclasas fúngicas y las vegetales (Back y Chappell, 1995).

Tabla 2.- Comparación de secuencias parciales de aminoácidos de δ -cadineno sintasa de algodón y otras ciclasas de plantas

Planta	Aminoácidos		Identidad (%)	Similitud (%)
	No.	Secuencia		
<i>Mentha spicata</i>	179	FKNEEGEPK	67	100
<i>Gossypium hirsutum</i>	---	FKDEQGNFK	---	---
<i>Nicotiana tabacum</i>	128	FQDENGKFK	67	67
<i>Hyoscyamus muticus</i>	128	FQDANGKFK	56	56
<i>Ricinus communis</i>	183	FKDSDGKFK	67	78
<i>Mentha spicata</i>	310	KLPF	75	100
<i>Gossypium hirsutum</i>	---	KLPY	---	---
<i>Nicotiana tabacum</i>	259	TLPY	75	75
<i>Hyoscyamus muticus</i>	258	TLPY	75	75
<i>Ricinus communis</i>	313	DIPY	50	75
<i>Mentha spicata</i>	575	NGDGHGT	43	57
<i>Gossypium hirsutum</i>	---	EGDGYTY	---	---
<i>Nicotiana tabacum</i>	523	NLDGYTH	57	71
<i>Hyoscyamus muticus</i>	522	NQDGYTH	57	71
<i>Ricinus communis</i>	578	YGDGYTD	71	71

Fuente: Davis *et al.*, 1996

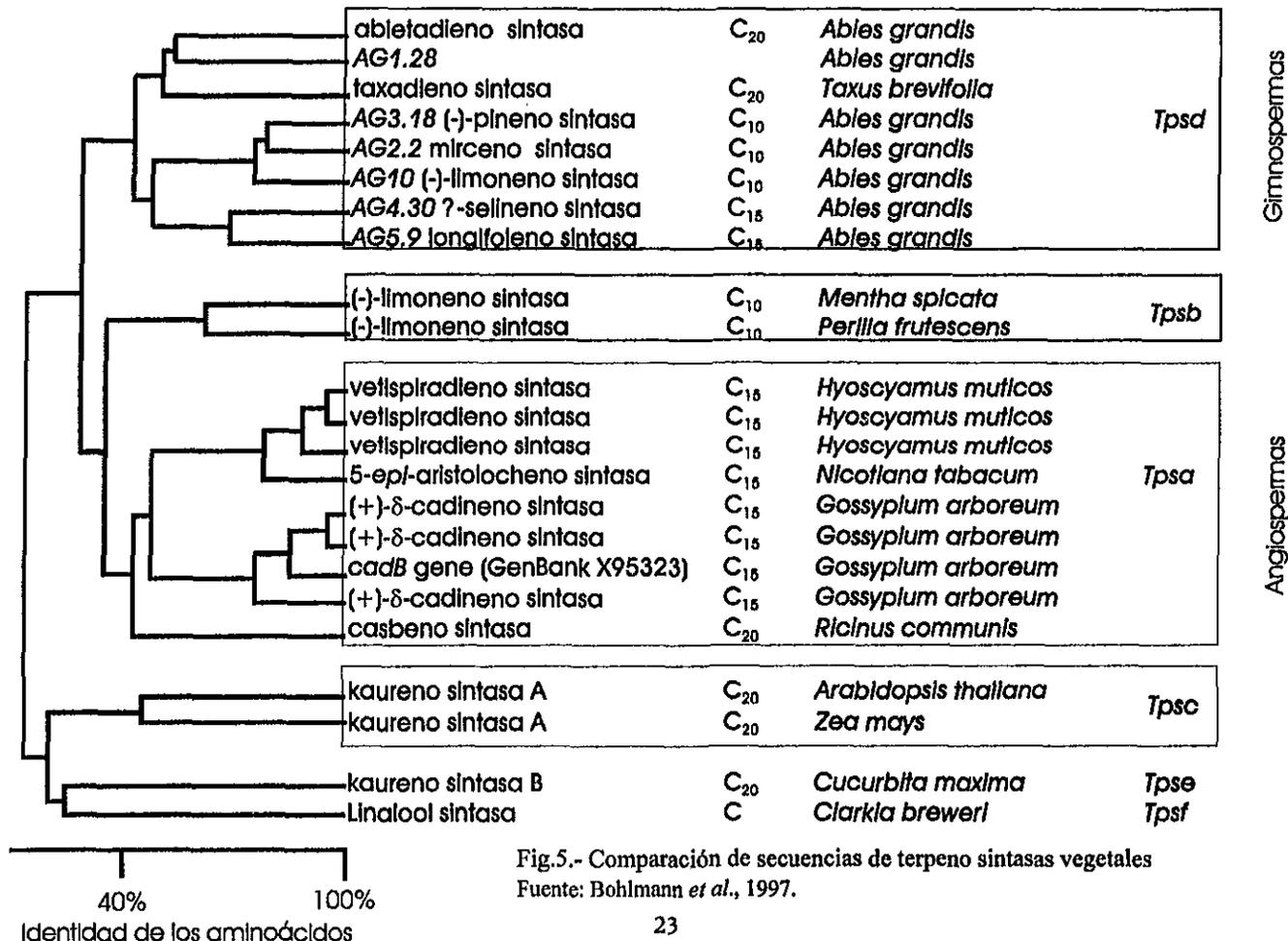


Fig.5.- Comparación de secuencias de terpeno sintasas vegetales
Fuente: Bohlmann *et al.*, 1997.

Numerosas terpeno ciclasas de plantas -tanto de angiospermas como de gimnospermas- y de microorganismos han sido parcialmente o completamente purificadas y caracterizadas (Wildung y Croteau, 1996; Wise *et al.*, 1998). Estos estudios incluyen evaluación de los mecanismos de reacción propuestos, eficacia de sustratos análogos, empleo de inhibidores suicidas¹ y el uso de agentes químicos modificadores, para identificar los aminoácidos esenciales para la catálisis (Back y Chappell, 1995). Más de 30 terpeno sintasas de plantas han sido clonadas, muchas de las cuales codifican enzimas del metabolismo secundario. (Dudley *et al.* 1986; Mau y West, 1994; Davis *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1995).

La secuencia de Aa de estas enzimas permite la subdivisión de los Tps² genes en seis subfamilias (Fig. 6), designadas Tpsa hasta Tpsf. Cada subfamilia tiene un mínimo de 40% de identidad entre sus miembros. La similitud en las secuencias de aminoácidos de las ciclasas de diferente tipo proporcionan bases experimentales de la propuesta de un ancestro común de estos genes vegetales (Mau y West, 1994; Savage *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995). La comparación de los genes de terpeno sintasas de diferentes grupos, reveló una estructura general global con seis intrones³ posicionalmente conservados. Este patrón de conservación ha guiado experimentos donde pueden ser intercambiados dominios de exones⁴ entre diferentes sintasas (epi-aristolocheno y vetispiradieno) para producir proteínas quiméricas funcionales, algunas de las cuales producen mezclas de los productos enzimáticos originales.

La comparación de secuencias de los genes de sintasas puede permitir aislar nuevas secuencias dentro de las seis subdivisiones de la familia de genes vegetales de las terpeno sintasas (Tps). Hasta el momento se ha determinado la estructura tridimensional de una sola ciclasa (Straks, 1997). La estructura cristalina de la epi-aristolocheno sintasa revela una proteína compuesta completamente por α -hélices conectadas por rizos y vueltas cortos, que forman un sitio activo α -barril de dos capas. La enzima está compuesta de dos distintos dominios estructurales. Un dominio sitio C-terminal activo y un dominio N-terminal, cuya estructura recuerda el núcleo catalítico de las glicosil-hidrolasas.

¹ Inhibidores que se unen a la enzima y ya no se separan de ella.

² Abreviaturas de los genes que codifican para las terpeno sintasas.

³ En los eucariontes, secuencia de DNA que forman parte de un gen, se transcriben, pero no forman parte del RNA mensajero porque son cortadas de la molécula antes de que salga del núcleo.

⁴ En los cromosomas eucarióticos, porciones de ADN que forman parte de un gene que codifican para una proteína

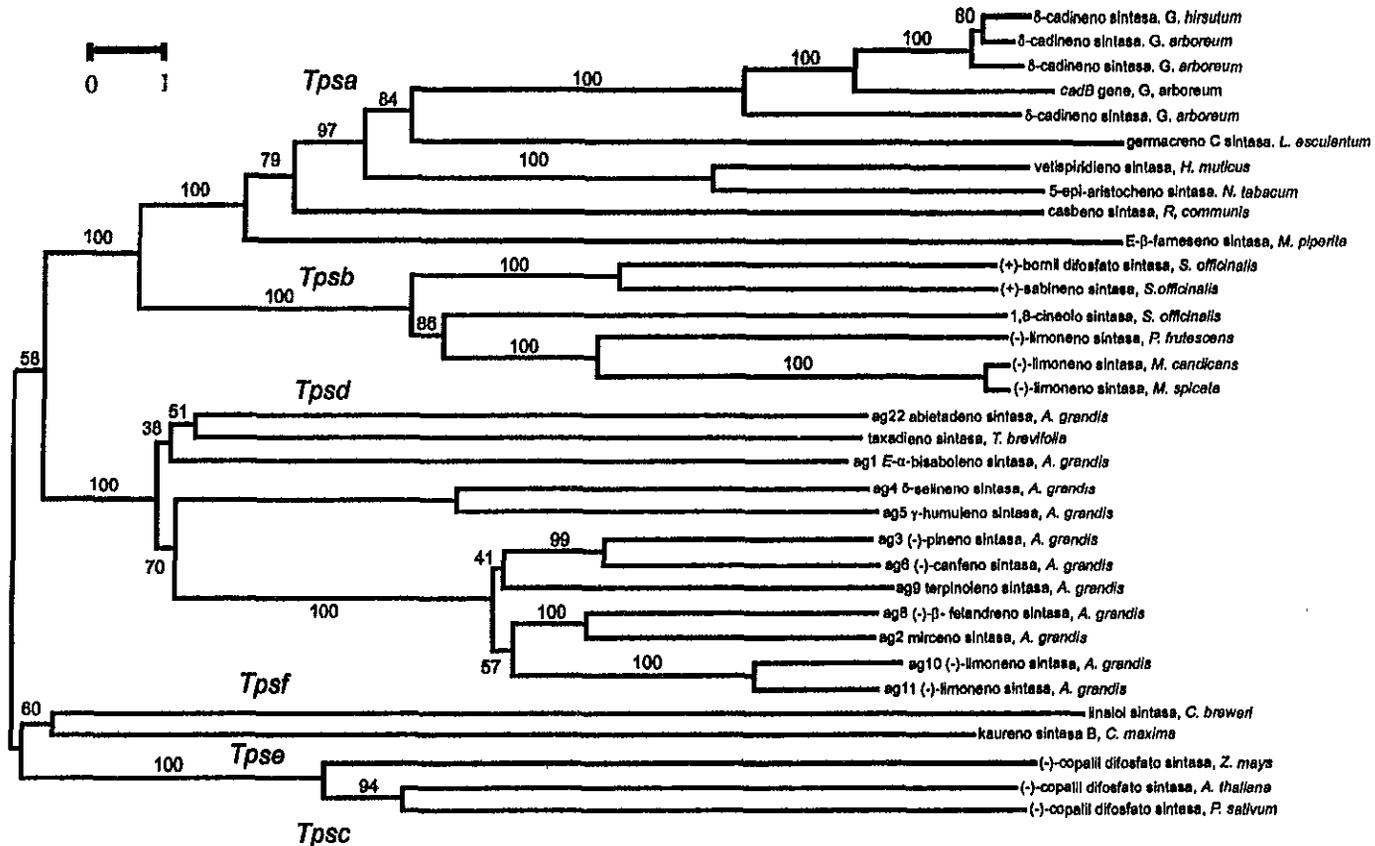


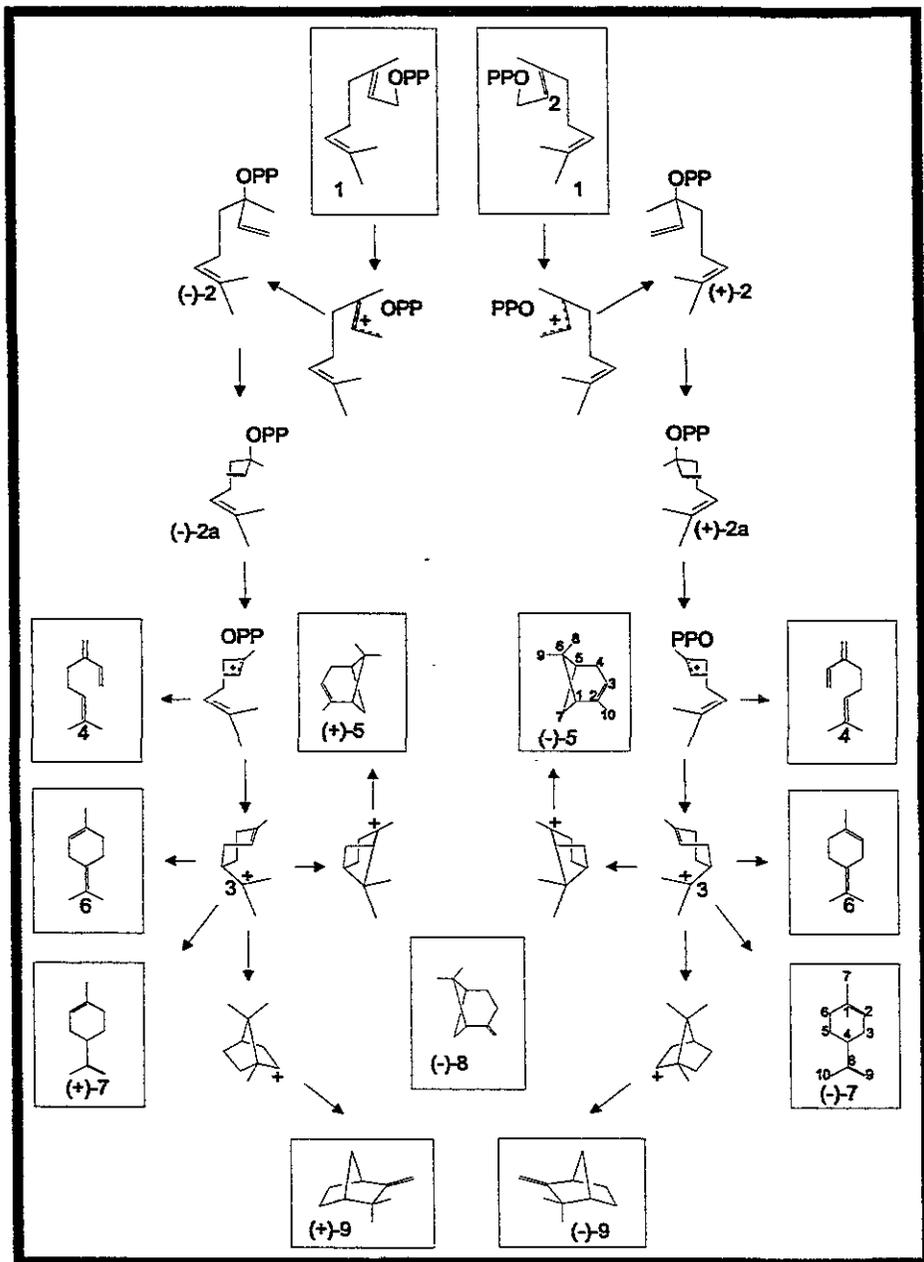
Fig. 6.- Árbol filogenético de terpeno sintasas vegetales. La línea de escala significa 1% de divergencia de secuencias
 Fuente: Bohlmann *et al.*, 1998

5. Monoterpeno ciclasas

Se conocen cerca de 1000 monoterpenos y se estima que son sintetizados por alrededor de 50 ciclasas (Croteau, 1987; Bohlman *et al.*, 1998). Cada sintasa cataliza una reacción química distinta; sin embargo, las reacciones ocurren por un mecanismo catiónico de ciclización similar (Chen *et al.*, 1995). Muchos átomos de carbono del sustrato experimentan alteraciones en sus uniones, ocurren también adiciones internas y rearrreglos, hibridaciones y cambios de configuración (Colby *et al.*, 1993).

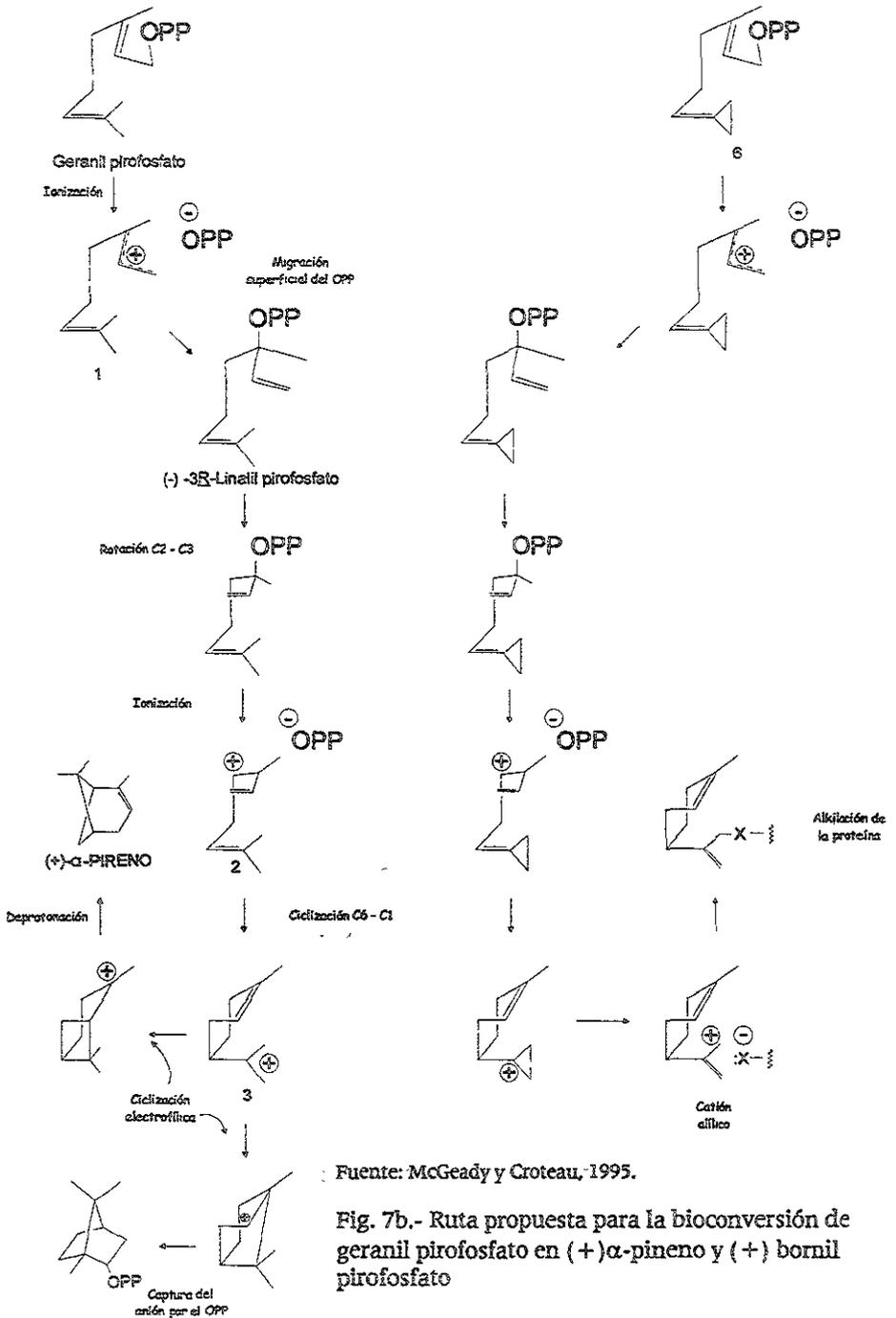
En las dos últimas décadas se han hecho estudios extensos para establecer los detalles básicos de la ciclización, que han llevado a la formulación de un mecanismo general y una hipótesis estereoquímica para la formación de los principales prototipos de esta clase de compuestos, a partir de GPP (Fig. 7a y 7b): puesto que el GPP no puede ser ciclado directamente por la doble unión trans C2-C3, el mecanismo de reacción necesariamente involucra, tanto isomerización como ciclización (Croteau *et al.* 1994). El GPP se ioniza con la asistencia de un metal iónico divalente. La ionización inicial y rearrreglo suprafacial de la molécula lleva a la formación de un isómero alílico terciario o (-)-(3R) o (+)-(3S)- linalil difosfato (LPP) (2) dependiendo de la enzima particular. El alilcaio difosfato resultante se rearrregla para formar el isómero terciario alílico unido a enzima, 3R- o 3S linalil difosfato (LDP). Después de la rotación del conformero cisoides, el LDP se ioniza y cicliza en la forma anti-endo al correspondiente 4R o 4S α -terpenil catión (3). El último intermediario puede ser entonces transformado a cualquiera de los monoterpenos monocíclicos o bicíclicos por la combinación apropiada de ciclización electrofílica y/o rearrreglo seguido por un cambio de carga positiva por desprotonación o captura de un nucleófilo externo como agua o el in pirofosfato original (Arigoni *et al.*, 1993). La combinación particular de ciclizaciones electrofílicas internas y rearrreglos antes de la terminación hacen a cada ciclasa única. Transformaciones subsecuentes de un esqueleto básico, que involucra oxidaciones, reducciones, hidrataciones, conjugaciones e isomerizaciones, dan por resultado gran número de derivados. Se han realizado muchos estudios de hidroxilación de monoterpenos, estas reacciones son catalizadas por sistemas citocromo P-450, que utilizan oxígeno molecular y NADH (Croteau, 1991).

Como las monoterpeno sintetas se encuentran en bajos niveles en las plantas y se localizan exclusivamente en plastidios de órganos especializados (McGeedy y Croteau, 1995; Colby *et al.* 1993), no son fáciles de purificar. Por eso la gran mayoría de las rutas biosintéticas de los monoterpenos cíclicos permanecen desconocidas



Fuente: Arigoni *et al.*, 1993

Fig. 7a.- Mecanismo de ciclización de monoterpenos



(Croteau y Karp, 1976). La purificación de proteínas de monoterpene ciclasas de la misma especie se ha visto limitada por la similitud de sus características físicas. Una alternativa recientemente usada, que ha resultado muy exitosa es el empleo de la estrategia PCR, basada en homología, que fue desarrollada por la comparación de secuencias de Aa a partir del DNAC que codifica para una monoterpene sintasa, una sesquiterpene sintasa y una diterpene sintasa de especies de angiospermas evolutivamente distantes. Así se localizan secuencias de regiones conservadas para diseñar con ellas cebadores para PCR⁵, los cuales se amplifican y se hibridizan con mRNA (Wise *et al.*, 1998).

Varias monoterpene sintasas de angiospermas, gimnospermas y briofitas han sido purificadas y caracterizadas (Tabla 3): γ -terpineno sintasa de *Thymus vulgaris* (Alonso y Croteau, 1991); 1,8-cineolo sintasa, (+)-sabineno sintasa y (+)-bornil difosfato sintasa, de *Salvia officinalis* (Croteau *et al.* 1994; Wise *et al.*, 1998); 4-S limoneno sintasa, de *Mentha piperita* y *Mentha spicata* (Alonso *et al.*, 1992; Croteau, 1991); mirceno sintasa, limoneno sintasa y pineno sintasa de *Abies grandis* (Bohlmann *et al.*, 1997; Gijzen *et al.*, 1992; Gijzen *et al.* 1991 Alonso y Croteau 1991).

Todas las monoterpene ciclasas estudiadas presentan propiedades similares: En general tienen un peso molecular nativo entre 50 y 100 kDa, entre 600 y 650 aminoácidos (Aa) de largo (Davis *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1992; Colby *et al.*, 1998), que incluye un péptido N-terminal de tránsito a cloroplasto (que no es requerido para la actividad catalítica), con un alto contenido de serina y treonina y un bajo número de residuos ácidos; son monómeros u homodímeros, requieren un ión metálico divalente (generalmente Mg² o Mn²), tienen un valor de punto isoeléctrico cercano a 5.0 y un pH óptimo a una unidad de la neutralidad. Las monoterpene ciclasas son operacionalmente solubles, aunque *in vivo* están asociadas a plastidios. Las sintasas de gimnospermas se distinguen de las de angiospermas por el requerimiento de iones monovalentes (K⁺ preferentemente) la preferencia de Mn² o Fe² sobre el Mg² como cofactor y un valor de pH óptimo alto (Bohlman *et al.*, 1998). Una característica inusual de las monoterpene ciclasas es que muchas de ellas sintetizan varios productos (Vogel *et al.*, 1996).

⁵ Polimerasa de reacción en cadena

Tabla 3.- Monoterpeno sintasas que han sido caracterizadas

Especie	Características de la enzima	Particularidades	Referencia
<i>Mentha piperita</i>	4-S limoneno sintasa	- Aislada de células de tricomas glandulares	Alonso <i>et al.</i> , 1992
<i>Mentha spicata</i>	proteína soluble p.m. 56 kDa Mn ²⁺ único cofactor monomérica	- La enzima es idéntica en las dos plantas	Croteau, 1991
<i>Salvia officinalis</i>	(+)- sabineno sintasa - monómero 1,8-cineolo sintasa - monómero (+)-bornil difosfato sintasa - homodímero	- Clonación, caracterización y expresión funcional de las ciclasas - secuencias de péptidos de tránsito a cloroplasto	Wise <i>et al.</i> , 1998
<i>Pinus contorta</i>	p.m. 67 kDa Requiere Mn ²⁺ pI 4.75± pH 7.8	- Datos de la mezcla de monoterpeno ciclasas de la especie	Savage <i>et al.</i> , 1994
<i>Abies grandis</i>	Mirceno sintasa - 72.5 kDa limoneno sintasa - 73.5 kDa Pineno sintasa - 71.5 kDa	- cDNA clonas en E. coli - Más parecidas a otras ciclasas de la planta con diferentes esqueletos que a otras ciclasas de monoterpenos de angiospermas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1997 Gijzen <i>et al.</i> , 1992 Gijzen <i>et al.</i> , 1991
<i>Thymus vulgaris</i>	γ-terpinene sintasa 55 kDa pI 4.85 pH 6.8 Mn ₂	- Purificación y caracterización - Actividad inhibida por cisteína e histidina	Alonso y Croteau, 1991

6. Sitios intercelulares de biosíntesis

El metabolismo secundario de terpenos esta organizado en compartimentos metabólicos en organelos con membrana, a través de los cuales los intermediarios metabólicos pueden ser canalizados sin necesidad de equilibrar con el arsenal libre del citoplasma (Dixon *et al.*, 1996). Esta forma de organización es un medio independiente de regulación del flujo de carbón a través de esta ruta biosintética. Las ventajas de esta forma de regulación son muchas: se concentran enzimas y se canalizan precursores, intermediarios y productos al sitio de la actividad metabólica; la proximidad de las enzimas y la alta concentración local de sustratos favorecen la transformación rápida de intermediarios; se forman barreras que impiden

retroalimentación negativa; se protegen intermediarios lábiles; se proporciona un ambiente favorable para ciertas reacciones; hay transporte directo de precursores e intermediarios; pueden acumularse grandes cantidades de sustancias tóxicas, sin poner en peligro a la célula; las rutas relacionadas pueden interactuar de forma más próxima y se facilita la transformación y degradación de sustancias y la liberación de productos. En algunos casos, la secuencia de reacciones que comprende una ruta metabólica puede estar localizada en más de un organelo, en estos casos, los organelos implicados suelen estar asociados cercanamente para facilitar la transferencia de intermediarios comunes (Emes y Dennis, 1997).

En las plantas una de las formas más importantes de compartimentalización del metabolismo de terpenos se da entre el citoplasma y los plastidios. Estos organelos funcionalmente complejos tienen capacidades biosintéticas muy amplias y participan en diversos procesos metabólicos (Keegstra, 1997; Stitt, 1997).

7. Cloroplasto

En los tejidos de las plantas existe una amplia variedad de plastidios con distintas funciones metabólicas y capacidades. Aunque todos tienen el mismo genoma y comparten un progenitor común, los distintos plastidios tienen propiedades moleculares y bioquímicas diferentes. han adquirido funciones especiales como la biosíntesis y almacenamiento de almidón (amiloplastos) carotenoides (cromoplastos) o lípidos (leucoplastos) (Gray, 1991). Plastidios especializados se localizan usualmente en tejidos u órganos específicos, que se diferencian de acuerdo con las necesidades del tejido, por ejemplo amiloplastos en tubérculos o cromoplastos en capas epidermales de frutas y pétalos (Mullet, 1997).

Todos los plastidios tienen un origen común. Los proplastidios, son heredados por vía materna por el cigoto (Mullet, 1997). Estos organelos no fotosintéticos de 1-2 μm de diámetro, presentes en bajo número en las células meristemáticas, tienen una pequeña estructura interna aparte de unos cuantos sacos que ocasionalmente tienen continuidad con la membrana interna de la envoltura. Durante la diferenciación de la raíz, los proplastidios se desarrollan para formar amiloplastos, los cuales son plastidios de almacenamiento que contienen grandes cantidades de granos de almidón. Durante la diferenciación de las hojas en presencia de luz, se convierten en cloroplastos, que acumulan clorofila en su interior y son el sitio donde ocurre la fotosíntesis. En ausencia de luz los proplastidios de hoja se convierten en etioplastos que contienen una estructura de aspecto cristalino llamada cuerpo prolamelar. Los etioplastos pueden transformarse en cloroplastos en presencia de luz. Los

cloroplastos pueden desarrollarse de proplastidios o cloroplastos durante la floración, maduración del fruto o senescencia. (Joyard *et al.*, 1992).

Los plastidios tienen en común una doble membrana (interna y externa) llamada envoltura y un espacio formado por una matriz acuosa llamada estroma, los cloroplastos contienen además un sistema de membranas internas llamadas tilacoides, que se encuentran en el estroma (Fig. 8). En los tilacoides de los cloroplastos se encuentran cuatro complejos fotosintéticos: Fotosistema I, Fotosistema II, complejo de citocromos b-f y ATP sintasa (Mullet, 1997).

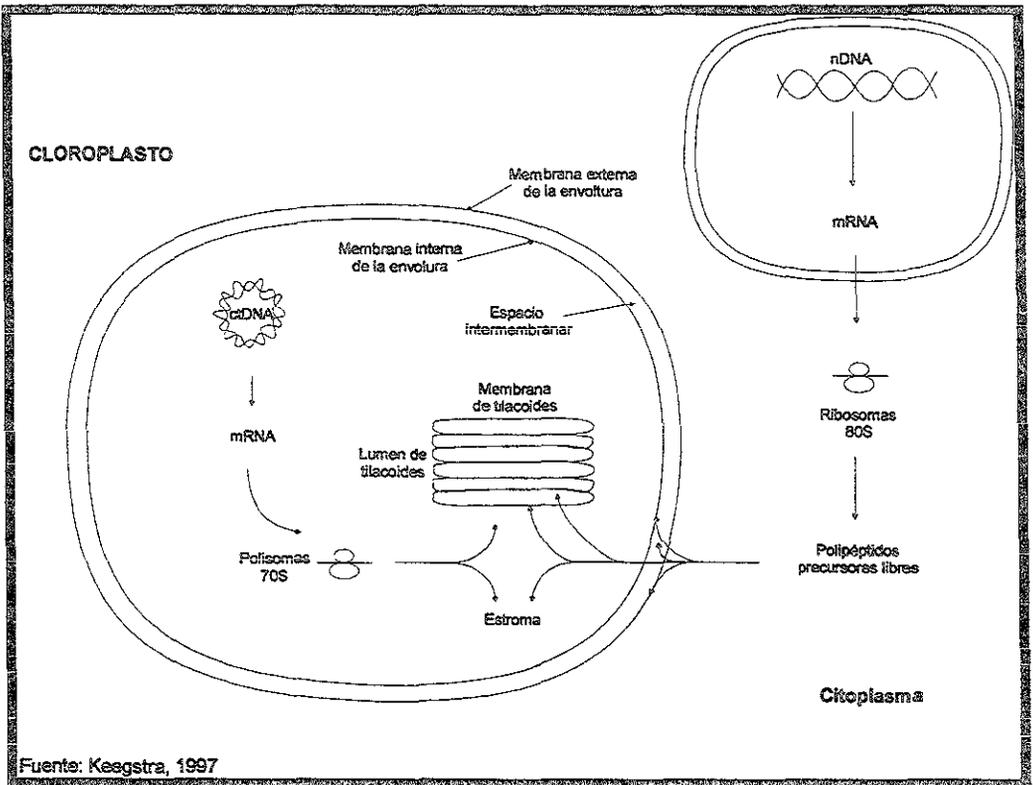


Fig. 8.- Esquema de la estructura del cloroplasto y el origen biogénico de las proteínas del organelo

La alta capacidad metabólica del cloroplasto, es lógica, puesto que estos organelos son la fuente primaria de energía y de fijación de carbono, y ambos elementos son requeridos para la actividad biosintética. Las principales actividades sintéticas presentes en los cloroplastos son: síntesis de ácidos grasos, asimilación de nitrato en glutamato, la biosíntesis de algunos aminoácidos y pigmentos (carotenoides y xantofilas) y terpenos (Kirk y Tilney-Bassett, 1978; Emes y Dennis, 1997; Fischer *et al.*, 1997).

Los plastidios aislados de plantas superiores no duplican ni sobreviven por un corto periodo de tiempo *in vitro*, porque la biogénesis y el desarrollo de estos organelos requiere un ensamble orquestado de proteínas, lípidos, azúcares y cofactores (Nickelsen *et al.*, 1992). Estos componentes derivados de varias rutas biosintéticas demandan la participación de dos sistemas genéticos, el del organelo y el núcleo. Los procesos metabólicos que ocurren en plastidios dependen en buena medida del suministro de proteínas, péptidos y precursores metabólicos canalizados desde el citoplasma (Emes y Dennis, 1997). La interdependencia del plastidio y la célula es relativamente específica. Entre el 80 y el 85% de los cientos de proteínas encontradas en plastidios son codificadas en el genoma nuclear, traducidas en el citoplasma e importadas post-transcripcionalmente al organelo (Cline y Henry 1996; Emes y Dennis, 1997).

El genoma del cloroplasto es más pequeño que el de la mitocondria (208-2400 kpb), pero codifica para más genes y puede producir un rango mucho más amplio de productos, incluidos tanto los elementos de la maquinaria para la síntesis de proteínas, como los componentes enzimáticos necesarios para el transporte fotosintético de electrones y la fijación del CO₂ (Crawford, 1990; Palmer, 1991; Nickelsen, 1992). En el genoma del cloroplasto se encuentran genes de tres categorías:

- Genes para decodificar el genoma, RNAr, RNAt, subunidades α y β de la RNA polimerasa, proteínas ribosomales y proteínas para iniciar la traducción
- Proteínas involucradas en la fotosíntesis, la subunidad mayor de rubisco y algunas subunidades de proteínas del transporte de electrones (FI, FII, complejo citocromo, ATP sintasa)
- Secuencias del complejo NADH oxidoreductasa, una proteasa, genes de la síntesis de clorofila y alrededor de 30 genes de función desconocida.

Por la capacidad limitada del genoma del plastidio, la mayoría de las proteínas del cloroplasto están codificadas por genes nucleares, se sintetizan en el citoplasma como precursores y son transportadas al cloroplasto vía un proceso post-

traduccional, que involucra la presencia de péptidos de tránsito localizados en la parte final de las proteínas que se transportan (Stitt, 1997; Hendriks y Fuller, 1994). Los genes nucleares que codifican las proteínas de los plastidios son eucarióticos en organización y están regulados por un sistema complejo de señales ambientales, como la luz, así como por señales del desarrollo y el metabolismo. La expresión genética es regulada a nivel de transcripción, procesamiento y estabilidad de RNA, traducción y movimiento de proteínas (Mullet, 1997).

La integración del metabolismo requiere interacción controlada entre varias rutas presentes en varios compartimientos celulares. El flujo de carbono entre el plastidio y el citosol se da por la localización temporal y el tránsito de proteínas a través de su membrana (Stitt, 1997). Este proceso depende de la permeabilidad altamente selectiva de la membrana del organelo, a un número limitado de intermediarios que deben ser transportados de un compartimiento a otro; y de un sistema de transporte que controla la localización de estas enzimas en la célula y define la presencia de éstas en diferentes tipos de plastidios (Emes y Dennis, 1997; Schmit, 1993).

En los cloroplastos hay al menos seis compartimientos diferentes: la envoltura externa, el espacio entre membranas, la membrana interna, el estroma, lumen de tilacoides o la membrana de tilacoides (Heijne, 1994; Cline y Henry 1996). Un solo aparato de translocación media el transporte de todas las proteínas internas (Keegstra, 1997). El proceso de transporte puede dividirse en pasos secuenciados. El primer paso es el transporte a través de la membrana de la envoltura, el cual puede dividirse en dos estados: unión del precursor a un receptor a la superficie del organelo, donde un receptor proteico lo reconoce, y transporte del precursor a la membrana interna (Keegstra, 1997) (a expensas del consumo de ATP). Una vez atravesada la envoltura, una proteasa remueve la secuencia del péptido de tránsito responsable del reconocimiento en membrana. Una sola proteasa puede cortar muchos precursores proteicos de entrada a cloroplasto diferentes. Una vez que el precursor ha sido cortado en el estroma, pueden seguirse diferentes rutas. Algunas proteínas necesitan ser dobladas y ensambladas en su forma madura, con otras se forman holoenzimas, algunos monómeros son activos y sólo requieren redoblarse, otras sufren modificaciones como adiciones de ferredoxina o centros con iones de azufre. La proteína reensamblada en el estroma es dirigida al espacio interno del organelo donde corresponde -estroma, membrana interna, lumen de tilacoides o la membrana de tilacoides- (Keegstra, 1997). Este mecanismo funciona como ruta de acceso general de proteínas, para cualquier localización celular y está determinada por un péptido de tránsito a estroma (Stitt, 1997).

Una de las rutas más complejas de tránsito es la que dirige las proteínas al lumen de los tilacoides, porque estas proteínas deben atravesar tres membranas biológicas (Keegstra, 1997). El transporte de las proteínas que se dirigen a la membrana y el lumen de los tilacoides se hace a través de cuatro mecanismos distintos (Fig.9): dos homólogos a los que ocurren en bacterias a) un complejo proteico (CPSecA) que requiere ATP y mueve la proteína por la membrana a través de un poro (CPSecY, posiblemente homólogo a SecE de *E. Coli*) y el complejo proteico Citocromo F que también emplea CPSecA; un sistema de transporte similar al del retículo endoplásmico, con un complejo proteico (54CP, homólogo del SRP54 del RE), que involucra hidrólisis de GTP; una tercera ruta, única de cloroplasto, que requiere sólo un gradiente de pH como generador de energía para realizar el transporte a través de la membrana; y un cuarto mecanismo mediado por la inserción del complejo CF₁F₀, que se presume es un mecanismo espontáneo, aún desconocido. Las proteínas dirigidas a la membrana interna del cloroplasto, donde interactúan con proteínas esenciales (TipoA) se unen a ella, sin aparentes requerimientos de energía y son insertadas antes de que el ensamble sea completado (Keegstra, 1997; (Cline y Henry 1996).

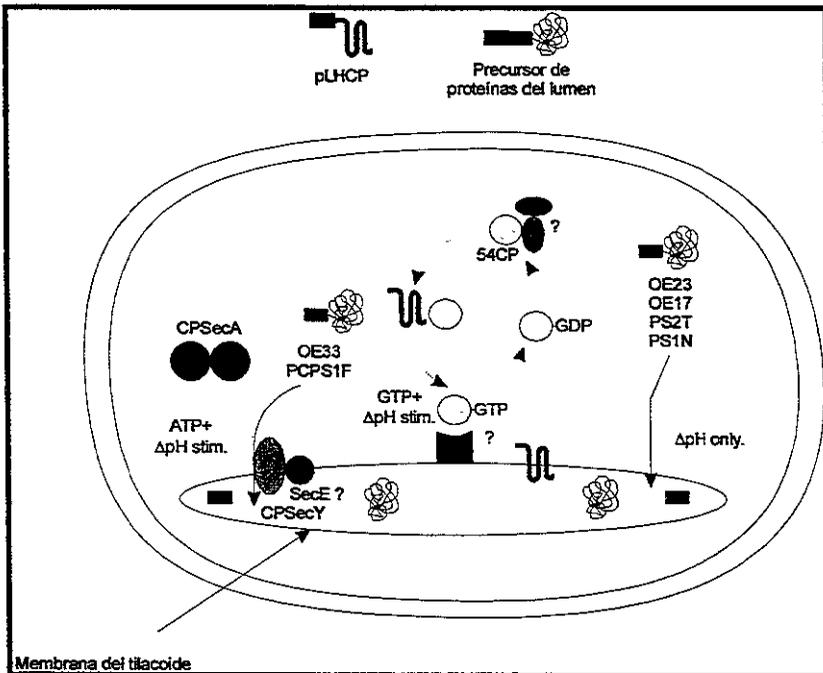


Fig. 9.- Representación esquemática del transporte de proteínas al lumen de tilacoides

Las secuencias de los diferentes péptidos de tránsito a cloroplasto son actores centrales en este proceso (Heijne, 1994).

- Los péptidos de tránsito a estroma varían en tamaño y secuencia, son ricos en aminoácidos hidroxilados, carecen de residuos ácidos o tienen muy pocos, la región central puede estar involucrada en la unión inicial a la superficie del cloroplasto y las regiones N y C terminal con los últimos pasos de la ruta de importación
- Las proteínas que se dirigen a la envoltura externa del cloroplasto se unen de forma espontánea, no requieren de factores proteicos para su integración
- Los péptidos de tránsito a tilacoides tienen una región terminal de tránsito a estroma seguida de una secuencia de transferencia a tilacoides

Los compuestos de bajo peso molecular pueden atravesar la membrana externa fácilmente, porque ésta, contiene proteínas llamadas porinas que permiten el movimiento de moléculas con un peso molecular mayor a 10 000 (Stitt, 1997). La membrana interna es el sitio específico en el cual se regula el transporte de metabolitos entre el citosol y el cloroplasto (Stitt, 1997) por medio de translocadores proteicos específicos (Fischer *et al.*, 1997).

Mucho del control genético del cloroplasto ocurre en eventos post-transcripcionales que incluyen: estabilidad del transcrito, transporte de proteínas y actividad proteica (Gatehouse, 1997; Danon, 1997). La regulación a nivel de transcripción es lenta, en cambio, la regulación por traducción permite aumentar o reducir rápidamente los niveles de síntesis de proteína. Los elementos cis y trans que regulan el proceso de expresión genética del plastidio no se encuentran codificados en el organelo, el control de la actividad genética ha sido tomado por el núcleo y se manifiesta a nivel transcripcional y post-transcripcional. El genoma nuclear mantiene el control sobre los genes del organelo de dos maneras: codifica genes que son estratégicos para las funciones del organelo (por ejemplo, para la duplicación), los cuales están regulados por factores nucleares; y controla la expresión de los genes del organelo por medio de proteínas, también codificadas por genes nucleares, que dirige al cloroplasto.

8. La oferta biotecnológica

Con el desarrollo de los cultivos de células vegetales a mediados del siglo XX (Tabla 4), una de las promesas más atractivas de la biotecnología vegetal fue el

aprovechamiento de la amplia capacidad sintética de las plantas superiores, mediante el empleo de células vegetales, como base de procesos industriales. Promesa que no ha cumplido.

Tabla 4.- Historia de la biotecnología vegetal

Año	Acontecimiento
1902	Primera supervivencia <i>in vitro</i> sin multiplicación
1907	Se descubre que las plantas pueden ser alteradas por interacción con una bacteria del suelo <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
1922	Primer crecimiento <i>in vitro</i> de puntas de raíces
1925	Se descubre que bacterias inocuas pueden transformarse en cepas letales
1935	Descubrimiento de las propiedades de una auxina
1939	Los primeros reportes de cultivos prolongados de callos
1946	Primer cultivo de meristemos
1949	Primer reporte de desarrollo de primordios de raíz en cultivos de callo
1948	Obtención de plantas completas a partir de megagametofitos en cicadas (embriogénesis somática, no reconocida como tal)
1950	Descubrimiento de la cinetina
1952	Primera generación de plantas libres de virus a partir de cultivos de meristemos de papa y dalia
1954	Primer cultivo de protoplastos vegetales
1956	Reporte de embriogénesis somática en cultivos de <i>Citrus</i>
1957	Se definen las bases hormonales de la organogénesis de tabaco
1958	Dos grupos independientes logran desarrollar <i>in vitro</i> embriones de zanahoria
1960	Protoplastos obtenidos con tratamiento enzimático se fusionan con ayuda de agentes químicos
1966	El primer cultivo de anteras
1971	El primer reporte de plantas regeneradas a partir de protoplastos
1971	El primer reporte bien documentado de variación somaclonal en regenerantes de cultivos de tejidos
1972	Primer híbrido somático por fusión de protoplastos
1976	Se enfatiza la utilidad de la variación somaclonal para el mejoramiento de cultivos
1978	Formación del primer híbrido, por fusión de protoplastos de tabaco
1979	El primer reporte de electrofusión de protoplastos
1983	Uso de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para transformar plantas
1984	Empleo de polietilén-glicol para transmitir el plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i> a protoplastos de tabaco
1984	Reporte de la primera planta transgénica obtenida con el sistema <i>Agrobacterium</i>
1987	El primer reporte de bombardeo de micro-proyectiles para transmitir ADN a células vivas de plantas
1990	El primer reporte de transmisión de ADN por electroporación a tejidos intactos

Fuente: elaboración propia

Aunque el cultivo de tejidos de células vegetales es una tecnología madura con aplicación en el mejoramiento de cultivos agrícolas, la conservación de germoplasma y la micropropagación; la aplicación de los sistemas de cultivo *in vitro* para la producción comercial de metabolitos secundarios, se ha restringido a la manufactura de unos cuantos productos: shikonina (y las naftoquinonas relacionadas) de *Lithospermum erythrorhizon* por Mitsui Petroleum Co., Japón, y berberinas por Mitsui, Company, Japón (Towers y Ellis, 1995; Berlín, 1997); ginseng a partir de cultivos de células en suspensión de *Panax ginseng*, comercializado por Nitto Denko Co. Japón, desde 1990. (Fu, 1998).

Las dos limitantes más importantes para la aplicación industrial amplia de esta tecnología, son problemas asociados con baja productividad e inestabilidad de los cultivos (Toivonen, 1993). Otra dificultad es la escasez de compuestos vegetales, muy especiales, con características químicas o farmacológicas extraordinarias, que le permitan alcanzar altos precios en el mercado (Berlín, 1997).

Los problemas de rendimiento y productividad son originados en gran medida por la falta de conocimiento suficiente de la bioquímica vegetal, que permita controlar la producción de metabolitos secundarios. En general se sabe relativamente poco sobre las rutas metabólicas de estos productos y no es fácil identificar las enzimas limitantes de la síntesis. Pero incluso en los casos donde las rutas sintéticas están bien establecidas, la síntesis total de los productos de interés no puede hacerse siempre de forma económicamente factible (DiCosmo *et al.*, 1989).

La inestabilidad de los cultivos es el segundo gran problema para su explotación comercial. Los cultivos de células en suspensión normalmente están constituidos por células con distinta morfología y estado de agregación. La diferente distribución de estas células en las líneas celulares es una de las causas que determina la variabilidad en la producción de metabolitos secundarios (Berlín, 1997). La variación genética de los cultivos incluye: cambios de número cromosómico, rearrreglo cromosómico, amplificación y ablación del DNA, activación de transposones.

En realidad el problema es complejo, hay mucho por resolver. Las células vegetales crecen más lento que los microbios, lo cual aumenta el riesgo de contaminación (a esto también contribuye la necesidad de utilizar medios nutritivos complejos) y eleva los costos del cultivo. Las características de las células vegetales significan un enorme reto para el diseño de reactores adecuados para su producción industrial. Los cultivos vegetales están formados por células de una variedad de formas y tamaños, que forman frecuentemente agregados celulares, la heterogeneidad que esto provoca ocasiona problemas de transferencia de masa y

contribuye a formar cultivos más viscosos. Hay también problemas con los propulsores porque aunque tienen una demanda de oxígeno baja, presentan alta sensibilidad de corte⁶. Su tamaño, 10 a 100 veces más grandes que las células microbianas y una mayor proporción del volumen celular ocupado por vacuolas; hace a las células vegetales más sensibles a los cambios de potencial osmótico y estrés físico. Además la producción intracelular de metabolitos y su almacenamiento en organelos, aumentan de forma muy importante los costos de purificación de los productos (Taticek, 1991).

Las células, callos y cultivos de órganos vegetales son capaces de producir la mayoría de los compuestos secundarios, incluyendo fenilpropanoides, poliquetidos, terpenos, alcaloides y carbohidratos (Towers y Ellis, 1995). Pero los niveles de síntesis y acumulación de los diferentes grupos de metabolitos secundarios son muy distintos y siguen una tendencia general. En cultivos indiferenciados, sólo una pequeña parte del potencial biosintético de la planta es expresado. Compuestos absolutamente esenciales como la lignina o los carotenoides, pueden producirse en este tipo de cultivos (Towers y Ellis, 1995), pero ciertas rutas del metabolismo especial, se expresan pobremente en cultivos de células. En cambio, hay sustancias que se acumulan espontáneamente, con niveles razonablemente altos, en cultivos de células vegetales (Tabla 5). En estos casos, la producción puede mejorarse optimizando las condiciones de cultivo. No obstante, no se han montado procesos industriales con la mayoría de los productos naturales que presentan altos niveles de síntesis *in vitro*, porque, salvo raras excepciones, no son de gran importancia comercial. En la actualidad sólo las rutas que se expresan espontáneamente en el cultivo o son fácilmente inducibles son accesibles para desarrollos tecnológicos.

Se han adoptado varias estrategias para aumentar rendimientos de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales:

- Selección y aislamiento de líneas sobreproductoras.
- Optimización de condiciones de cultivo
- Cultivos de tejidos organizados
- Células inmovilizadas
- Extracción del producto *in situ*
- Ingeniería de rutas metabólicas en células vegetales
- Elicitores
- Biotransformación

⁶ Daño provocado a las células en el reactor porque chocan con las paredes y son disparadas por los propulsores.

Tabla 5. Productos acumulados en altos niveles en cultivos de células en suspensión

Grupos de compuestos	Sustancia específica	Especies
Ésteres y amidas del ácido cinámico	Ácido rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>
		<i>Anchusa officinalis</i>
Naftaquinonas y antraquinonas	Verbascósido	
	L-putrescina	<i>Nicotiana tabacum</i>
	Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Protoberberinas y benzofenatridina alcaloides	Lucidin	<i>Morinda citrifolia</i>
	primverósido	<i>Gallium mollugo</i>
	Protoberberinas	<i>Coptis japonica</i>
Antocianinas y betalainas	Sanguinarina	<i>Papaver somniferum</i>
	Antocianinas	<i>Aralia cordata</i>
	Betalafnas	<i>Beta vulgaris</i>
Compuestos esteroidales	Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>
	Saponinas	<i>Panax ginseng</i>
Polisacáridos inmunológicamente activos		<i>Echinacea purpurea</i>

Fuente: Berlín, 1997.

1. **Selección y aislamiento de líneas sobreproductoras.**- La selección y aislamiento de líneas sobreproductoras requiere, en primera instancia el desarrollo de estudios fitoquímicos, de poblaciones silvestres de la especie en cuestión, para obtener individuos sobreproductores, y posteriormente el establecimiento y selección de líneas celulares con altos rendimientos.
2. **Optimización de condiciones de cultivo.**- La optimización de las condiciones de cultivo incluye: la formulación del medio de cultivo (fuente de nitrógeno, concentración de las sales minerales, reguladores de crecimiento)⁷
3. **Cultivos de tejidos organizados.**- Los cultivos de tejidos vegetales presentan varias opciones para la producción de metabolitos especiales: raíces, brotes; cultivos de tejidos transformados y cultivos en suspensión⁸. Cuando un metabolito no se produce en cultivos de callos en suspensión, una alternativa es la producción de metabolitos secundarios por tejidos diferenciados (DiCosmo *et al.* 1989). Otra opción muy prometedora es el aprovechamiento del potencial de las células transformadas (raíces

⁷ Esta estrategia resultó muy conveniente para el escalamiento a nivel industrial de la producción de shikonina en cultivos en suspensión de *Lithospermum erythrorhizon* por la empresa química Mitsui, de Japón.

⁸ Sólo los cultivos en suspensión han sido escalados a nivel comercial.

transformadas y teratomas) para producir fitoquímicos (Nakano *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1998; Toivonen, 1993).

4. **Células inmovilizadas.**- Usualmente en los cultivos en suspensión la síntesis de metabolitos secundarios se da en la fase de crecimiento estacionario. En un intento de conseguir producción por largos periodos de tiempo, las células se inmovilizan en una matriz inerte. Aunque las células inmovilizadas tienen tasas muy lentas de crecimiento, puede aumentarse la acumulación de productos y conseguirse periodos ampliados de biosíntesis (DiCosmo *et al.* 1989).
5. **Remoción del producto *in situ*.**- Es la adición al cultivo celular de una segunda fase que tiene afinidad preferencial por el producto de interés. El proceso se refiere como extracción *in situ* o absorción *in situ*, dependiendo del estado físico de la fase, líquido o sólido, respectivamente. Esta técnica no sólo ayuda a recobrar el producto más fácilmente, a menudo aumenta productividad. Este incremento de productividad puede ser resultado de disminución de la inhibición por retroalimentación, protección de degradación del producto o por aumento en la excreción del producto (Fu, 1998).
6. **Ingeniería de rutas metabólicas en células vegetales .-** La ingeniería genética ha permitido la producción de plantas con contenido alterado de metabolitos secundarios (Siebert, 1996). Nuestro conocimiento de las enzimas de algunas rutas del metabolismo secundario se ha incrementado en la última década, algunos genes que codifican para enzimas clave han sido clonados. Esto abre la posibilidad de manipulación genética de las rutas del metabolismo secundario en plantas. Las primeras manipulaciones genéticas ocurrieron ya (Tabla 6), pero se ha dado más atención a la producción de plantas transgénicas que a la obtención de cultivos de células transformadas (Berlin 1997).
7. **Elictores.**- Uso de agentes específicos de origen biológico que estimulan la acumulación de los productos, aprovechando el hecho de que las plantas responden al ataque de patógenos microbianos produciendo varios antibióticos. Este método ha resultado muy adecuado para incrementar la producción de alcaloides, cumarinas, flavonoides, acetileno terpenos y esteroides; porque la respuesta es muy rápida y los productos se liberan al medio (DiCosmo *et al.*, 1989).

Tabla 6.- Plantas transgénicas con síntesis alterada de compuestos secundarios

<i>Especie</i>	<i>Característica transformada</i>
<i>Atropa belladonna</i>	Transformadas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Aumento de producción de escopolamina
<i>Paganum harmala</i>	Sobreexpresan el gen de la triptofano descarboxilasa, producen altos niveles de serotonina.
<i>Brassica napus</i>	Sobreexpresan el gen de la triptofano descarboxilasa, acumulan altos niveles de triptamina
<i>Nicotiana tabacum</i>	Transformadas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que sobreexpresan el gen de la putrescina N-metil transferasa. Aumento de la síntesis de nicotina
<i>Nicotiana tabacum</i>	Transformadas con el gen que codifica para la corismato piruvato liasa (un intermediario de la ruta del shikimato) Aumento de más de 1000 veces en la producción de 4-hidroxibenzoato glucósido
Plantas de alfalfa	Con producción alterada de metoxichalcona
Plantas de alfalfa	Con contenido alterado de lignina (PAL modificadas), por supresión, inhibición antisentido y sobreexpresión

Fuente: Berlín, 1997; Siebert, 1996; Dixon *et al.*, 1996

8. **Biotransformación.**- Las reacciones de biotransformación involucran el suministro en los cultivos celulares de una sustancia precursora, que en un paso enzimático o unos cuantos, produce el producto de interés. El desarrollo de estas tecnologías puede llegar a procesos de escala industrial.

Por su importancia para el desarrollo de la investigación que aquí se presenta abundaremos en dos estrategias tecnológicas: el empleo de elicitores y la biotransformación con cultivos de células vegetales.

9. Elicitores

Se conoce como elicitores a las moléculas de origen biológico que pueden inducir la síntesis de compuestos secundarios en una planta como respuesta a su presencia. Se han aislado elicitores de diferente naturaleza química: polisacáridos, oligosacáridos, polipéptidos, proteínas, glicoproteínas, enzimas, lípidos y ácidos grasos (Ren y West, 1991). No obstante, los constituyentes de la pared celular de los hongos (quitina, quitosan y glucanos) y de las plantas (oligourónidos), son los elicitores con más amplio rango de acción. Las sustancias elicitoras forman parte de un sistema complejo de defensa con que el vegetal responde al estrés a que le somete el ataque de un agente patógeno biótico o abiótico (Prome, 1996).

La defensa vegetal descansa en dos estrategias coordinadas: la defensa constitutiva y la defensa inducida. La primera se encuentra siempre encendida y la segunda se expresa solamente durante la infección de un organismo patógeno.

La defensa constitutiva es la habilidad inmediata del hospedero para prevenir y limitar el reto de una infección; se construye con sustancias pre-infeccionales, las cuales pueden presentarse en altas concentraciones antes del ataque de un patógeno o bien, encontrarse en bajas concentraciones antes de la infección y en altas concentraciones después – a estas últimas se les conoce como inhibitinas-. Las sustancias constitutivas de defensa de bajo peso molecular suelen ser poco específicas y predominan en un tipo de tejido en particular. Los compuestos de defensa de alto peso molecular se encuentran en el exterior de las células, son componentes poliméricos de la cutícula y la pared celular, lectinas y enzimas con actividad endopoligalacturonasa (Ezekowitz y Hoffmann, 1996; Kuhn y Hargreaves, 1987).

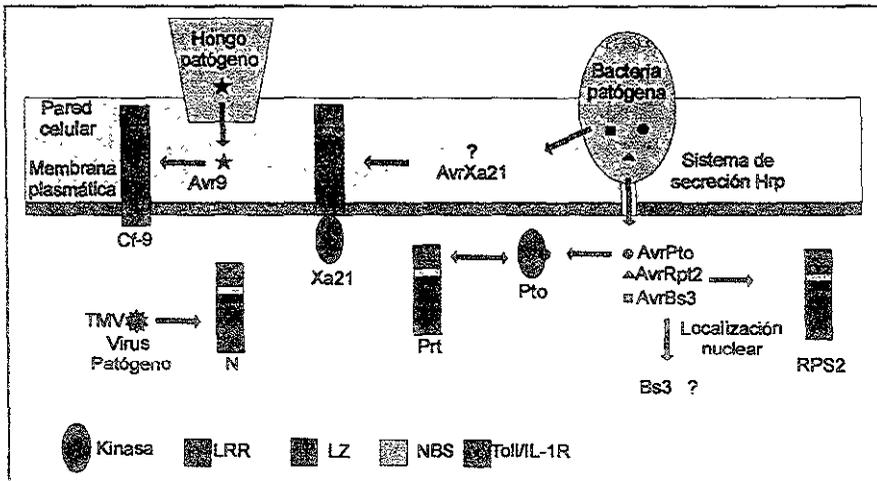
La defensa inducida se establece cuando se percibe daño físico o se detecta la presencia de un patógeno. Para esto las plantas utilizan una cascada de señales múltiples e interacciones bioquímicas complicadas, entre diferentes moléculas de reconocimiento (elicitors) y otros factores regulatorios, que inician numerosos cambios metabólicos que resultan en una variedad de respuestas de defensa, mediante la inducción coordinada de enzimas a nivel transcripcional y traduccional. (Chen *et al.*, 1995).

a) El proceso de inducción

Estudios de reconocimiento planta-microorganismo han llevado a la identificación de cuatro tipos de interacciones que desencadenan la síntesis de sustancias relacionadas con la defensa: 1) el microorganismo excreta una sustancia elicitora (del metabolismo secundario) que es reconocida por las células de la planta; 2) enzimas microbianas liberan componentes de la pared celular de la planta, los cuales actúan como elicitors; 3) las células de la planta secretan una enzima que degrada a la pared celular del microorganismo y los componentes de ésta, inducen la formación de sustancias de defensa en las células de la planta; y compuestos endógenos y constitutivos de la planta son activados o liberados como respuesta a diferentes estímulos como daño mecánico, foto-oxidación o déficit hídrico (Creelman y Mullet, 1995; Eilert, 1987).

El reconocimiento por la planta de la invasión del hospedero es a menudo determinada por la interacción llamada "gene por gene", que se da entre un gene

dominante de avirulencia en el patógeno (*avr*) y el correspondiente gene dominante (*R*) en el hospedero. Los genes *R* codifican para receptores que reconocen elicitores específicos. Algunos de estos receptores son extracelulares, otros, que reconocen pequeñas moléculas, se localizan en el citoplasma (Fig. 10). Existen en las plantas otros receptores que no son especie específicos y reconocen elicitores de amplia distribución, como los quitosacáridos y lipoquitosacáridos (Yang *et al.*, 1997).



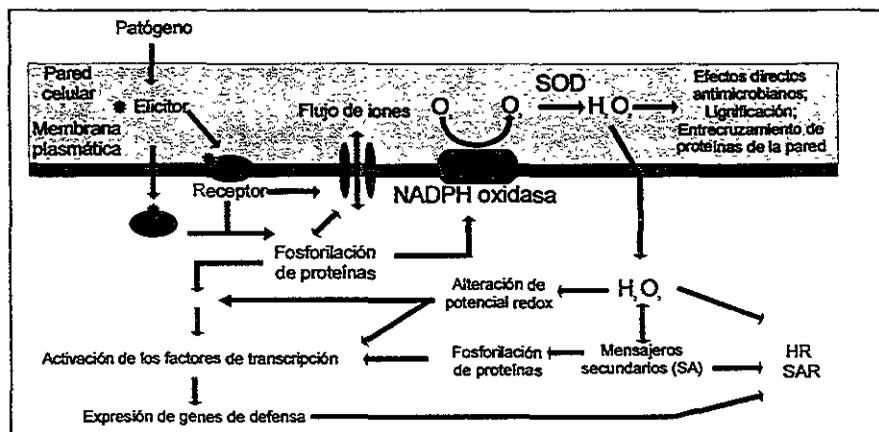
Fuente: Yang *et al.*, 1997

Fig. 10.- Elicitores raza-específicos codificados por genes de avirulencia fúngicos, bacterianos y virales, los cuales son reconocidos por los correspondientes genes vegetales de resistencia.

La transducción de señales en los sistemas elicitados responde a un modelo de dos elementos (Fig. 11), un componente unido a la membrana plasmática de las células de la planta sirve como molécula sensitiva (receptor del elicitor), un segundo componente, actúa como molécula reguladora y activa factores de transcripción que eventualmente llevan a la inducción de genes de defensa vegetal (Yang, *et al.*, 1997; Peters y Verma, 1990).

El papel exacto del etileno como regulador de la defensa vegetal no se conoce, pero los datos disponibles indican que induce la expresión de PAL -enzima que participa en la síntesis de ácido salicílico- y de genes básicos de proteínas relacionadas con la defensa, así como de algunos genes inducidos por heridas (Yang *et al.*, 1997; Johnson y Ecker, 1998; Fritig *et al.*, 1998).

La detección de la presencia de un elicitador por un detector desencadena cambios en la membrana plasmática: incrementa la permeabilidad a los iones (entra H^+ y Ca^{2+} y salen K^+ y Cl^-), produce explosiones oxidativas que llevan a la producción de intermediarios oxigenados reactivos (O_2^- , OH , H_2O_2), dependientes de la activación de la NADPH oxidasa; estimula la síntesis y liberación de óxido nítrico (NO); aumenta la demanda de oxígeno; estimula fosforilación de proteínas y genera poder reductor (Dangl, 1998; Delledonne *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1997; Berglund y Ohlsson, 1995). Estos cambios fisiológicos activan a moléculas mensajeras: etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico.



Fuente: Yang *et al.*, 1997

Fig. 11.- Modelo simplificado de la transducción de señales en las respuestas de defensa vegetal

El ácido linolénico (uno de los ácidos grasos más abundantes en la membrana de la mayoría de las plantas), es liberado en respuesta a la alteración de los canales iónicos de la membrana y a cambios fisiológicos intracelulares: ATP, AMPc y adenilación, los cuales estimulan fosforilación de proteínas. La actividad quitinasa estimula a fosfolipasas que liberan ácido linolénico. Una vez libre, el ácido linolénico

es convertido en ácido jasmónico, a través de la ruta octadecanoide, por un proceso dependiente de una lipooxigenasa. El ácido jasmónico activa genes específicos de proteínas relacionadas con la defensa (Creelman y Mullet, 1995; Payne *et al.*, 1991; Hahlbrock *et al.*, 1995).

El ácido salicílico (SA) actúa también como segundo mensajero (Klessig y Malamy, 1994). Este ácido se encuentra normalmente en las células en una forma inactiva de esta molécula como SA β -glucósido. Cuando se detecta en la membrana de las células infectadas la presencia de un elicitador, en estas células y en las células adyacentes la presencia de NO provoca que el SA tome su forma activa y se une a la enzima catalasa, y la que inhibe. Como consecuencia de la disminución de actividad de la enzima, se acumula H_2O_2 , el cual induce la transcripción del gen PR-1, que codifica para una proteína que induce a su vez, los mecanismos de la tercera línea de resistencia de la planta (Hausladen y Stamler, 1998; Chen *et al.*, 1995b; Hahlbrock *et al.*, 1995; Payne, *et al.*, 1991; Shirasu *et al.*, 1996).

La percepción inicial y la transducción temprana de señales puede ser distinta para varios elicitores microbianos, sin embargo, muchas de estas señales son probablemente integradas en una o unas cuantas rutas terminales comunes. Al final los segundos mensajeros, en un fenómeno conocido como potenciación, amplifican sinérgicamente sus efectos y desencadenan una respuesta secuenciada tanto local como general (Yang, *et al.*, 1997; Barz y Mackenbrock, 1994; Bohlmann y Eilert, 1994), mediada por una serie de procesos dinámicos organizados en tres líneas de defensa.

La primera línea de defensa es una respuesta instantánea, su finalidad es fortificar la pared celular. En y alrededor de la lesión local se forma una cápsula por depósito de nuevos materiales (calosa, lignina, fenoles insolubles y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina) y por entrecruzamiento de enzimas preexistentes (Hahlbrock *et al.*, 1995; Messner y Boll, 1993; Terras *et al.*, 1995).

La segunda línea de defensa se da a nivel local, en la zona que rodea el sitio de infección, la velocidad de respuesta es intermedia. Su finalidad es la producción y secreción de proteínas relacionadas con la defensa (RNAsas, glucanasas, quitinasas, proteinasas etc.) y la estimulación de algunas rutas del metabolismo secundario para la producción de pequeños compuestos antimicrobianos post-infeccionales. La finalidad de este proceso es estorbar el crecimiento del patógeno e impedir que la invasión avance a otras células (Galiana *et al.*, 1997).

Reunidas, la primera y segunda líneas de defensa forman lo que se conoce como respuesta hipersensible (RH). Las células vegetales que la generan mueren por efecto de los invasores o por la toxicidad de las sustancias de defensa que produjeron.

Las sustancias de defensa post-infeccionales pueden dividirse en dos categorías: las que preexisten en la planta de forma inactiva y son activadas o liberadas después de la invasión microbiana; y las sustancias que son sintetizadas *de novo* por las plantas bajo las condiciones de estrés causadas por el ataque microbiano. Estas últimas reciben el nombre de fitoalexinas (Kuhn y Hargreaves, 1987).

La estructura química de las fitoalexinas difiere grandemente de acuerdo con la familia de la planta y a veces con el género. Algunas de estas sustancias desempeñan más de un papel en la supervivencia de una planta, por eso pueden ser inducidas por estresantes abióticos como luz ultravioleta (Ensminger, 1993). En la RH las fitoalexinas actúan como retardantes del crecimiento celular o como inhibidoras de enzimas hidrolíticas producidas por el patógeno (Messner y Boll, 1993). En general, un vegetal produce varias fitoalexinas provenientes de diferentes puntos de ramificación de las rutas metabólicas (Heijden *et al.*, 1989; Kokubun *et al.*, 1995).

Una vez que la RH es activada, las señales de alerta pueden ser amplificadas a través de la generación de moléculas mensajeras (SA, H₂O₂, etileno y jasmonatos) para originar la tercera línea de defensa, que es una respuesta lenta, más amplia, que se da en órganos completos e incluso, en todo el vegetal y es conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR). Su finalidad es la activación de genes para desencadenar la producción y liberación de proteínas relacionadas con la defensa (PR), enzimas hidrolíticas específicas que actúan contra las paredes celulares de bacterias y hongos; así como de pequeños péptidos con actividad antimicrobiana (Fritig, *et al.*, 1998; Hahlbrock *et al.*, 1995; Messner y Boll, 1995; Terras *et al.*, 1995). Las proteínas vegetales PR se han agrupado en once familias de proteínas, de acuerdo con su grado de similitud de secuencias primarias (Tabla 7). Una vez establecida, la SAR no se limita a un patógeno específico, funciona contra un amplio rango de patógenos, incluidos bacterias, hongos y virus. Además, la respuesta persiste por varias semanas (Shirasu *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997).

b) Los cultivos elicitados

Montar ensayos con elicitores en plantas completas es difícil, por eso se ha optado por utilizar cultivos de células en suspensión. Las ventajas que ofrecen los cultivos elicitados son muchas: la inducción es muy rápida y se obtienen niveles de síntesis muy altos en unas cuantas horas; los metabolitos son excretados al medio de cultivo, con lo cual se facilita su extracción; es posible utilizar las células elicitadas en

biotransformaciones porque la elicitación aumenta en forma coordinada la actividad de varias enzimas, lo cual lleva a procesos más rápidos y eficientes de transformación que los obtenidos con células sin tratar. Los cultivos elicitados resultan ideales para estudios bioquímicos y moleculares porque son sistemas fácilmente manipulables, son inducibles y son fuente abundante de enzimas del metabolismo secundario (Berlín, 1997; Eilert, 1987).

Tabla 7 . Familias de proteínas vegetales antimicrobianas relacionadas con la defensa

Familia de proteínas PR	Actividad enzimática	Sitio de acción en el patógeno
PR-1	?	Membrana ?
PR-2	1,3- β -glucanasa	Pared celular, glucano
PR-3	Endoquitinasa	Pared celular, quitina
PR-4	Endoquitinasa	Pared celular, quitina
PR-5	?	Membrana
PR-6	Inhibidor de proteinasa	Proteinasa
PR-7	Proteinasa	?
PR-8	Endoquitinasa	Pared celular, quitina
PR-9	Peroxidasa	*
PR-10	RNAsa	?
PR-11	Endoquitinasa	Pared celular, quitina
Sin clasificar	α -amilasa Inhibidor de Poligalacturonasa	Pared celular α -glucano Poligalacturonasa

*Las peroxidases tienen actividad antimicrobiana indirecta, porque catalizan el entrecruzamiento oxidativo de proteínas y fenoles en la pared célula y con ello la protegen de la degradación por enzimas hidrolíticas del patógeno

Fuente: Fritig *et al.*, 1998.

Hay muchos microorganismos patógenos de plantas: virus, bacterias y hongos. Sin embargo, los organismos más utilizados como elicitores son hongos, debido a que las plantas han desarrollado sistemas complejos para detectar su presencia. En la mayoría de los casos se emplean hongos fitopatógenos que se sabe son parásitos de la planta, en especial cepas poco virulentas. No obstante, se ha descubierto que no se requiere mucha especificidad, varios hongos pueden inducir respuesta en una planta y una sola cepa puede inducir el proceso de defensa en varios géneros o familias vegetales (Eilert, 1987).

La especie utilizada de hongo depende de la naturaleza del elicitador, si es un componente de la pared celular de los hongos que se encuentra ampliamente distribuido en el reino, como la quitina, cualquier organismo que lo tenga desencadenará la respuesta de defensa, sólo si se trata de una sustancia restringida a un pequeño grupo de hongos, es necesario emplear especies asociadas con la planta.

Los homogenados de cultivos líquidos de las cepas fúngicas son la forma más empleada para efectuar pruebas de inducción. Estas preparaciones de micelio resultan adecuadas cuando los elicitores son componentes insolubles de la pared celular, pero cuando se trata de enzimas u otros componentes termolábiles del citoplasma es necesario utilizar un co-cultivo (Dixon, 1991).

La concentración del elicitore es un factor que influye fuertemente en la intensidad de la respuesta (Barz y Mackenbrock, 1994). Usualmente se requieren entre 50 y 100 mg de micelio para matraces de 250 ml con 50 ml de cultivo (Bohlmann y Eilert, 1994; Facchini y Chapell, 1992). La cantidad ideal debe determinarse experimentalmente en cada caso.

La síntesis de sustancias relacionadas con la defensa ocurre sólo cuando se tiene el ambiente adecuado (disponibilidad de precursores y condiciones de cultivo favorables). Los reguladores de crecimiento, en especial las auxinas, tienen influencia en el proceso, también lo afectan las condiciones de cultivo como iluminación, pH y temperatura (Eilert, 1987). En algunos casos, se emplean precursores metabólicos para aumentar rendimientos de un metabolito de interés, en tales casos es necesario probar si la sustancia es permeable y se incorpora al producto deseado, también debe determinarse la concentración óptima que debe adicionarse a los cultivos.

El conocimiento del tiempo ideal de tratamiento es un factor estratégico para optimizar rendimientos. El periodo mínimo de contacto para que la planta reconozca al elicitore es muy breve (2 a 20 minutos), el efecto resulta además duradero (Kolattukudy *et al.*, 1995). Horas después de que el sistema es inducido se presenta incremento de la actividad biosintética, la acumulación máxima ocurre entre las 12 horas y los cinco días de tratamiento y en general declina rápidamente después de que alcanza su valor más alto. Suele ocurrir la acumulación de un producto final, seguida de incremento en el nivel de los precursores (Hahlbrock *et al.*, 1995).

Una vez que el proceso de síntesis de sustancias de defensa ha sido inducido, estímulos adicionales no aumentan rendimiento. Los mayores incrementos de producción de metabolitos secundarios por células elicítadas se obtienen de líneas celulares con baja productividad inicial (por eso resultan más adecuadas para probar el efecto inductor de una sustancia), pero al final, los niveles de síntesis son similares en todas las líneas celulares de una misma planta. Al parecer, la cantidad máxima de un metabolito que pueden almacenar las células, está fuertemente regulada (Eilert, 1987; Holden y Yeoman, 1994).

La etapa de crecimiento en la cual es inducido el cultivo tiene influencia sobre la respuesta. La mayor producción de metabolitos inducidos suele darse en la fase exponencial, cuando las células están en crecimiento activo (Eilert, 1987; Holden y Yeoman, 1994).

10. Biotransformaciones con células vegetales

Muchas sustancias de origen vegetal que se emplean en la producción de medicamentos son obtenidas a través de largos y costosos sistemas de extracción de plantas vivas (Kutney, 1997). El problema es que los compuestos activos suelen encontrarse en muy bajas concentraciones en los extractos vegetales y a menudo su purificación es difícil y costosa (DiCosmo *et al.* 1989). Por otra parte, en muchos casos se trata de especies silvestres, con una distribución restringida y la concentración de las sustancias activas depende de la época de colecta y el estado fisiológico de las plantas (Park y Kim, 1998).

Por años, la química sintética ha intentado asumir el reto de producir por síntesis los fitoquímicos de interés industrial. No obstante, debido a la naturaleza quiral de muchos metabolitos secundarios y a su complejidad estructural inherente (a la cual deben sus propiedades únicas y actividad biológica); la síntesis química de estas sustancias no es posible o demanda procesos de síntesis muy largos, complejos y costosos (Takemoto y Achiwa, 1998; Kutney, 1993), que resultan incosteables. Como consecuencia, muchos compuestos con actividad biológica comprobada no se aprovechan o son extraídos de plantas completas⁹ a través de métodos convencionales, largos e ineficientes, que rinden productos muy caros (Toivonen, 1993; Kutney, 1993). De ahí se origina el gran interés en aprovechar la capacidad sintética de los seres vivos en procesos industriales.

Esta técnica, también conocida como biotransformación, es muy adecuada para producir grandes volúmenes de productos naturales. Ya sea que se empleen las enzimas presentes en el cultivo o se aislen de él, los catalizadores del mundo biológico ofrecen alternativas de bajo costo para elaborar sustancias valiosas, tanto nuevas como tradicionales, a partir de precursores baratos (Alfermann, 1980). Esto es posible por las ventajas que ofrece la biocatálisis sobre la catálisis química: las enzimas son altamente selectivas -en términos de diastereoselectividad- con respecto

⁹ La presión que ha ejercido esta práctica sobre las poblaciones silvestres de algunas especies, ha sido muy grande y ha puesto a muchos recursos naturales valiosos en peligro de extinción, o incluso, ha acabado con ellos.

a las sustancias sobre las que actúan; los procesos en los que participan son generalmente completados en cortos periodos de tiempo (minutos u horas); pueden dar rendimientos muy altos de los productos enantioméricamente puros; trabajan en condiciones fisiológicas, por lo cual no demandan condiciones extremas de reacción (temperatura, y/o presión), ni requieren la presencia de metales pesados; y son capaces de transformar precursores extraños, esto es, sustratos que no son normalmente producidos en las plantas de las cuales el cultivo es derivado (Nakamura *et al.*, 1995).

Por las características de la catálisis enzimática, el impacto ambiental de los procesos de síntesis biológica es bajo, ya que utilizan menores cantidades de energía, no se generan afluentes de agua caliente, ni desechos con metales pesados. Esto hace a los productos de la biocatálisis muy atractivos para el consumidor preocupado por el cuidado del ambiente y el equilibrio ecológico. Además, estos productos presentan una ventaja adicional, son considerados compuestos naturales en el mercado, porque fueron sintetizados por sistemas biológicos¹⁰.

Una de las áreas más promisorias de la biocatálisis se encuentra en el empleo conjunto de química sintética y cultivos de tejidos vegetales¹¹. En los últimos años, ha sido ampliamente reconocido el amplio potencial bioquímico de los cultivos de células vegetales, para efectuar biotransformaciones específicas de un sustrato particular, natural o sintético, que rinden productos de importancia comercial (Hamada *et al.* 1994; Cada *et al.*, 1996). Pueden conseguirse productividades muy altas, en procesos de síntesis mixta, en los cuales se adiciona a cultivos de células, un precursor químico de un metabolito secundario que normalmente produce el organismo, para sobre producir un producto natural de interés; o bien, un sustrato foráneo (un compuesto sintético análogo a un intermediario natural o un producto de otras especies), que sufre modificaciones determinadas, para llevar a la formación de una sustancia con nuevas propiedades químicas y biológicas que no está normalmente presente en el cultivo, o en la planta de la cual los cultivos celulares se originaron (Alfermann, 1980; Kutney, 1993; Akakabe y Naoshima, 1994).

¹⁰ La Roche, la principal compañía productora de vitaminas para consumo humano y animal del mundo, que tenía montados procesos de catálisis química, están montando procesos industriales con biocatálisis para vender sus productos como naturales en el mercado.

¹¹ Se hacen investigación de biotransformaciones de sustancias orgánicas con cultivos de células vegetales en más de 30 grupos de investigación localizados en diez países: Alemania, Australia, Canadá, Corea, EU, Francia, India, Italia, Japón y República Checa. La mayoría de los estudios reportados en esta área son japoneses o alemanes.

a) Especies utilizadas

Se han efectuado biotransformaciones a nivel de laboratorio, con cultivos de células vegetales de más de cuarenta especies (Tabla 8), las especies más utilizadas son: *Nicotiana tabacum*, *Catharanthus roseus* y *Daucus carota*. Se han llevado a cabo modificaciones de una amplia gama de sustratos tanto naturales como sintéticos, incluidos: monoterpenos, diterpenos, esteroides, agliconas, alcoholes, alcaloides, carotenoides, cetonas, ácidos grasos, fenoles, ésteres, flavonoides y glicósidos cardiacos.

Tabla 8. -Especies vegetales empleadas en estudios de biotransformación

Especie	Sustrato utilizado	Reacciones efectuadas	Referencia
<i>Artemisia annua</i>	Ácido artemisínico.	9- β -Hidroxilación β -D-Glicosidación	Kawamoto, <i>et al.</i> , 1998
<i>Capsicum frutescens</i>	Progesterona	20 α Reducción 14 α Hidroxilación	Alfermann y Reinhard, 1980
<i>Cannabis sativa</i>	Terpenos	Reducción	Alfermann y Reinhard, 1980
<i>Cassia didymobotrya</i>	Chalconas	Oxidación	Vitali <i>et al.</i> , 1998
<i>Catharanthus roseus</i>	Progesterona	20 β Reducción 14 α Hidroxilación	Alfermann y Reinhard, 1980
	Alcoholes piridínicos	Método de desracemización de 4 - piridil - 1 etanol a la forma (R)	Takemoto y Achiwa, 1995 Takemoto y Achiwa, 1998
	Piperitona	4 y 6 Hidroxilación adyacente C=C	Hamada <i>et al.</i> , 1994
	Monoterpenos	Introducción adyacente a C=C de grupos oxigenados	Hirata <i>et al.</i> , 1994
	Geraniol	Oxidación de alcoholes a aldehidos Isomerización Reducción de grupos ceto	Carriere, <i>et al.</i> , 1989 Nakamura <i>et al.</i> , 1995
	Monoterpenos alifáticos y cíclicos	Hidroxilación Reducción de C=C de grupos cetona	Hamada <i>et al.</i> , 1997
<i>Equisetum sp.</i>	Fenoles	Acoplamiento oxidativo	Sridhar <i>et al.</i> , 1997 Guo <i>et al.</i> , 1997
	Hidroxi - D-fenilglicina	Acoplamiento oxidativo C-C	Guo <i>et al.</i> , 1998
<i>Corydalis spp.</i>	Alcaloides (protoberberinas)	Adición de un intermediario metabólico (tirosina)	Kamigauchi <i>et al.</i> , 1994

Espece	Sustrato utilizado	Reacciones efectuadas	Referencia
<i>Crocus sativus</i>	Carotenoides	1-6 B-D-Glucosidación	Dufresne <i>et al.</i> , 1997
<i>Cheiranthus cheiri</i>	Progesterona	Reducción de dobles enlaces	Alfermann y Reinhard, 1980
<i>Daucus carota</i>	Cetonas aromáticas	α Reducción de cetonas	Akakabe y Naoshima, 1994 Yoshihiko y Naoshima, 1994 Naoshima y Akakabe, 1991 Akakabe <i>et al.</i> , 1995
	Ácido 2-oxo-4-fenilbutanoico	Reducción	Cada <i>et al.</i> , 1996
	Ácido 2-hidroxi-4-fenilbutanoico	Reducción de ésteres	Chadha <i>et al.</i> , 1996
<i>Digitalis lanata</i>	Esteroides	Glucosidación	Paper y Franz, 1989
<i>Digitalis purpurea</i>	Esteroides	Glucosidación	Paper y Franz, 1989
<i>Dioscorea deltoidea</i>	Progesterona	Reducción de dobles enlaces 3 β -Reducción	Alfermann y Reinhard, 1980
	(S)-(-) y (R)-(+)-limoneno	Hidroxilación Oxidación	Vanek <i>et al.</i> , 1999
<i>Gardenia jasmonoides</i>	Cetonas aromáticas	α Reducción de cetonas	Akakabe y Naoshima, 1994 Yoshihiko y Naoshima, 1994 Naoshima y Akakabe, 1991
<i>Glicine max</i>	Geraniol	Oxidación de alcoholes a aldehidos Isomerización	Carriere <i>et al.</i> , 1989
	Hidroxi-D-fenilglicina	Acoplamiento oxidativo	Guo <i>et al.</i> , 1998
	Etil 2-metil 3-oxobutanoato	Reducción de grupos ceto	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
<i>Hedera helix</i>	Progesterona	Reducción de dobles enlaces 3 β -Reducción	Alfermann y Reinhard, 1980
<i>Hevea brasiliensis</i>	α -Cianohidrinás	Hidroxinitriloliasas,	Hickel <i>et al.</i> , 1996
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Progesterona	Reducción de dobles enlaces 3 β , 20 β Reducción 6 β , 11 α , 14 α Hidroxilación	Alfermann y Reinhard, 1980

Especie	Sustrato utilizado	Reacciones efectuadas	Referencia
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Fitohormonas esteroidales (brasinosteroides)	C-25 y C-26 Hidroxilación 26- β - Glucosidación	Winter <i>et al.</i> , 1997
	Fitohormonas esteroidales (brasinosteroides)	Precursor metabólico (3- dihidro 24-epi- testosterona)	Kolbe <i>et al.</i> , 1998
<i>Marchantia polymorpha</i>	Esteroides (derivados de androstano)	Reducción de grupos carbonilos C-17 Hidroxilación	Hamada <i>et al.</i> , 1993
	Etil 2-metil 3- oxobutanoato	Reducción de grupos ceto	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
<i>Myrtillocactus geometrizaris</i>	Monoterpenos	Oxidación hidroxilación alílica	Gil <i>et al.</i> , 1995
<i>Mentha piperita</i>	Piperitona	7, Hidroxilación	Park <i>et al.</i> , 1994
	Terpenos	Hidroxilación Epoxidación	Park y Kim, 1998
<i>Nerium oleander</i>	Esteroides y agliconas	5 β Glicosidación	Paper y Franz, 1993
		Oxidación	
		Ciclización	
<i>Nepeta mussinii</i>	5 β -H esteroides (agliconas cardenolidos)	3-O Glucosidación	Paper y Franz, 1989
	Monoterpenos	Hidroxilación	Hallahan <i>et al.</i> , 1992
<i>Nicotiana silvestris.</i>	Cembranoides de tabaco	C- 10 y C-12 Hidroxilación Epoxidación Reducción Ciclización	Arnap <i>et al.</i> 1993b
	Dibencilbutanólidos	Ciclización	Kutney, 1997
<i>Nicotiana tabacum</i>	Terpenos	20 β Reducción 14 α Hidroxilación	Alfermann y Reinhard, 1980
	Monoterpenos	Introducción adyacente a C=C de grupos oxigenados	Hirata <i>et al.</i> , 1994
	Geraniol	Oxidación Isomerización	Carriere <i>et al.</i> , 1989
		Reducción de grupos ceto	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
Verberona	Reducción unión C-C	Hirata <i>et al.</i> , 1993	

Especie	Sustrato utilizado	Reacciones efectuadas	Referencia
<i>Nicotiana tabacum</i>	Cetonas aromáticas	α Reducción de cetonas	Akakabe y Naoshima, 1994 Yoshihiko y Naoshima, 1994 Naoshima y Akakabe, 1991
	Acetoacético ésteres	Reducción de ésteres	Naoshima <i>et al.</i> , 1989 Naoshima y Akakabe 1989
	Cetonas	Reducción de C=C adyacentes a grupos carbonilo	Shimoda <i>et al.</i> , 1995
	Monoterpenos	Oxidación hidroxilación alílica	Gil <i>et al.</i> , 1995
<i>Papaver somniferum</i>	Flavonoides (silibina)	7-O- β - D-Glicosidación	Kren <i>et al.</i> , 1998
<i>Phalaenopsis sp.</i>		Reducción de grupos ceto	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
<i>Phytolacca americana</i>		Reducción de grupos ceto	Nakamura <i>et al.</i> , 1995
<i>Pisum sativum</i> L.	Ácidos grasos (entre 7 y 18 átomos de carbono)	α Oxidación	Adam <i>et al.</i> , 1996
<i>Podophyllum peltatum</i>	Podofilotoxinas	Ciclización oxidativa	Kutney, 1997
<i>Raphanus sativus</i> L.	Hidroxi - D- fenilglicina	Oxidación (Peroxidasas)	Guo <i>et al.</i> , 1998
<i>Rosa sp.</i>	Progesterona	Reducción de dobles enlaces	Alfermann y Reinhard, 1980
	Terpenos	3 β , 20 α , 20 β Reducción Reducción	
<i>Silene alba</i>	Betalainas (papaverina isopapaverina)	Orto-dimetoxilación de grupos aromáticos Deshalogenación	Viel <i>et al.</i> , 1993
<i>Solanum aviculare</i>	(S)-(-) y (R)-(+)- limoneno	Hidroxilación Oxidación	Vanek <i>et al.</i> , 1999
<i>Solanum tuberosum</i>	Progesterona	Reducción de dobles enlaces 3 β Reducción	Alfermann y Reinhard, 1980
	5- α - H- esteroides	Glucosidación	Paper y Franz, 1989
<i>Solanum khasianum</i>	Acetovanillona	Hidroxilación de α -metilos	Mühlenbeck y Barz, 1997
<i>Solanum mammosum</i>	Salicilamida	2-O- β -D-Glucosidación	Syahrani <i>et al.</i> , 1997

Especie	Sustrato utilizado	Reacciones efectuadas	Referencia
<i>Sophora gustifolia</i>		Reducción de dobles enlaces	Alfermann, 1980
<i>Thevetia nerifolia</i>	Glicosidos cardiacos	Deglucosidación Deacetilación	Alfermann y Reinhard, 1980
<i>Tripterygium wilfordii</i>	diterpenos y triterpenos	Análogos estructurales	Kutney, 1997
<i>Vitis vinifera</i>	Cembranoides de tabaco	C-15 Hidroxilación Epoxidación	Arnab <i>et al.</i> 1993a
	Carotenoides	Glucosidación	Dufresne <i>et al.</i> , 1997
<i>Dunaliella tertiolecta</i> (Alga halófila)	Geraniol	C-OH Oxidación E/Z Isomerización C=O Reducción C=C Reducción	Cormier y Ambid, 1987
	Monoterpenos	Hidroxilación Reducción de grupos aldehído	Noma <i>et al.</i> , 1992

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con las condiciones de reacción, un sustrato específico puede ser convertido en diferentes productos. Por otro lado, un cultivo de células puede transformar diferentes sustratos (Vanek *et al.*, 1999). El patrón de biotransformación de los productos obtenidos depende de las clonas celulares empleadas (Alfermann, 1980).

Las reacciones de biotransformación con cultivos de células vegetales se han restringido a la transformación de metabolitos secundarios de origen vegetal, hay pocos ejemplos de transformación de productos foráneos sintéticamente importantes (Chadha *et al.*, 1996).

La mayor parte de los estudios reportados son pruebas a nivel laboratorio. Se han escalado a escala industrial sólo unos cuantos procesos de biotransformación con células vegetales: un proceso productivo alternativo para el *Arbutin*, agente depigmentante de Shisedo Company, Japón, que consiste en una hidroxilación de hidroquinona realizada por *C. roseus*; un proceso similar efectuado por *Raauwolfia serpentina.*; y la *digitoxina* producida por 12 β - Hidroxilación con *Digitalis lanata*. Los costos de la síntesis química de las sustancias y de los proceso de biotransformación son muy similares (Berlín, 1997).

b) Reacciones efectuadas

Las bioconversiones efectuadas con células vegetales han sido: acoplamientos oxidativos, ciclizaciones, condensaciones, epoxidaciones, des-metilaciones, desacetilaciones, desglucosidaciones, desracemizaciones, formación de ésteres, glicosidaciones, hidrólisis, hidroxilaciones regioselectivas y enantioselectivas, isomerizaciones, metilaciones, oxidaciones regioselectivas y enantioselectivas, reducciones de dobles enlaces, reducciones de funciones aldehído, reducciones de funciones carbonilo, reducciones de grupos ceto y saponificaciones.

Quizá la capacidad biosintética de los cultivos vegetales que más se ha empleado es la capacidad oxido-reductora del metabolismo primario (hidroxilaciones regioselectivas de dobles uniones de carbonos, hidroxilaciones enantioselectivas, reducciones estereoselectivas de grupos ceto y conversiones reciprocas de alcoholes cíclicos y cetonas) (Vanek *et al.*, 1999). Pero aquí, igual que en las reacciones anteriores, el empleo de cultivos microbianos presentan ventajas importantes sobre los cultivos vegetales: los cultivos microbianos utilizan medios nutritivos más simples y comparadas con los microorganismos, las células vegetales crecen muy lento y los cultivos son muy susceptibles de contaminación, lo cual las hace menos adecuadas para los largos procesos de escalamiento usados en la industria (Miersch, *et al.* 1999; Miyazawa *et al.*, 1995; Alfermann, 1980). Por eso cuando una bacteria o levadura efectúa la misma reacción que un cultivo vegetal, se elige al cultivo microbiano.

Además, la biotransformación con microorganismos ha sido extensamente aplicada a nivel industrial, para la producción de ácido aspártico, fumárico, málico y en la Inter.-convención de varios esteroides (Vanek *et al.*, 1999). Todos los fermentadores y grandes biorreactores utilizados en la industria fueron diseñados para ellos y no cumplen con las necesidades de cultivo de las células vegetales, bastante más difíciles de satisfacer.

La pregunta obvia es: ¿pueden competir las plantas en este campo con los microorganismos? La respuesta es afirmativa. Hay compuestos que requieren una orientación específica que no puede conseguirse con microorganismos o condiciones de reacción difíciles de conseguir. Por ejemplo, algunas reacciones efectuadas por microbios, requieren estrictas condiciones anaeróbicas (Cada *et al.*, 1996); existen también reacciones que no son efectuadas por los microorganismos, como la glicosidación de sustancias extrañas (Berlín, 1997). Pero sobre todo, las bondades de los cultivos de plantas se encuentran, en las especificidades sintéticas del metabolismo secundario, que se han explorado muy poco.

Las plantas a diferencia de los microorganismos, son capaces de glicosidar sustratos extraños. La formación de glucósidos conjugados es considerada un proceso de de-toxificación (Syahrani *et al.*, 1997). La presencia de sacáridos es una característica estructural importante, a la cual deben su actividad biológica muchos compuestos naturales; la glicosidación puede ser de alto valor medicinal; la adición de una molécula de glucosa a un esqueleto no polar, del carotenoide le confiere una excepcional solubilidad en agua a sustancias hidrofóbicas (Dufresne *et al.*, 1997). Los cultivos de células vegetales pueden ser una excelente herramienta para glicosidar agliconas, cardenólidos, esteroides, colesterol, cardenólidos y compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides (Vanek, *et al.*, 1999; Kren *et al.*, 1998; Alfermann, 1980).

Algunas plantas forman glicósidos cianogénicos para defenderse de predadores y parásitos, las hidroxinitriloliasas enzimas vegetales citoplásmicas -localizadas en la vacuola central de células del mesófilo y de la epidermis de las hojas- están involucradas en el metabolismo de estas sustancias. Estas enzimas se han aplicado en la síntesis de cianohidrinan enantioméricamente puras. Las cianohidrinan son importantes en síntesis porque dos grupos funcionales: el alcohol y el nitrilo, pueden ser fácilmente convertidos en un amplio rango de productos quirales: α -hidroxiácidos y ésteres; α -hidroxialdehidos y cetonas, β -aminoalcoholes y α -fluoro nitrilos. Moléculas estructurales que están presentes en gran cantidad de productos de las industrias: farmacéutica, veterinaria, agroquímica y alimenticia (Hickel *et al.*, 1996).

La conversión de fenoles libres, representa un mecanismo de detoxificación, detectado en distintos estudios, en diferentes especies vegetales (Siebert, 1996). Estas reacciones son desempeñadas por peroxidasas, enzimas ampliamente distribuidas en el reino vegetal que pueden encontrarse en vacuolas, tonoplasto, plasmalema y dentro y fuera de la pared celular. Estas enzimas tienen una amplia variedad de funciones, que se hacen evidentes por la presencia de algunas isoenzimas en diferentes compartimentos de la célula vegetal. Hay enzimas aniónicas y catiónicas. Las más ácidas se localizan en la pared celular o en sitios extracelulares, mientras las formas catiónicas se distribuyen tanto en la pared celular como en compartimentos del citoplasma (Vitali *et al.*, 1998). El acoplamiento oxidativo de fenoles es una reacción muy importante en química sintética, en especial las uniones C-O ó C-C. Las peroxidasas vegetales pueden efectuar uniones C-C, con alto rendimientos, sin necesidad de proteger grupos funcionales (Guo *et al.*, 1997).

La resolución de racematos de piridil alcoholes es importante para la industria farmacológica (Takemoto y Achiwa, 1998). Se emplean varios métodos químicos y biológicos para preparar alcoholes ópticamente activos a partir de mezclas racémicas como: resolución óptica, oxidación selectiva de un enantiómero y desracemización. Este último es el método más promisorio porque permite un 100% de conversión del racemato inicial al compuesto quiral correspondiente (Takemoto y Achiwa, 1998). La desracemización de alcoholes ópticamente activos, a través de oxidaciones sucesivas, puede efectuarse con muy alta eficiencia, por cultivos de células vegetales (Takemoto y Achiwa, 1995).

Los jasmonatos son un grupo de reguladores de crecimiento que están involucrados en varios procesos regulados por el ambiente: heridas, estrés osmótico, salinidad, contacto y presencia de un patógeno. El ácido jasmónico y sus metil-ésteres se encuentran en numerosas plantas superiores. A partir de estos componentes mayores, se forman por hidroxilación, O-glicosidación o conjugación, numerosos compuestos menores, tanto en plantas como en otros eucariontes (Miersch *et al.* 1999). La transformación de jasmonatos por cultivos de células vegetales puede llevar a la formación de nuevos compuestos químicos con actividad biológica.

Las plantas efectúan la α oxidación de ácidos grasos en enzimas unidas a membrana celular. El utilización de esta capacidad sintética de los vegetales, puede ser muy útil en química sintética porque los α -hidroxiácidos son importantes bloques de construcción para la síntesis de glicoles activos, halo ésteres y epóxidos (Adam *et al.*, 1996).

c) Biotransformaciones de terpenos

Las células vegetales son muy hábiles para transformar terpenos exógenos (Park y Kim, 1998). Las reacciones de biotransformación efectuadas con terpenos incluyen: epoxidación, glicosidación, hidroxilación, isomerización, oxidación, reducción y saponificación. Estas reacciones aprovechan tanto las capacidades anabólicas como catabólicas de las especies vegetales.

La degradación oxidativa es una ruta posible para el metabolismo de sustancias en plantas. Este mecanismo se basa en la epoxidación de uniones dobles. Pero, la oxidación de pequeños terpenos cumple también funciones anabólicas. Por ejemplo, la oxidación del escualeno por una mono-oxigenasa y la posterior ciclización por una ciclasa forma el cicloartenol, que es el primer compuesto esterooidal en las plantas (Kolbe *et al.* 1998). La glucosidación es también una ruta importante del

metabolismo de los alcoholes monoterpénicos y sus glucósidos son compuestos encontrados en aceites esenciales de plantas completas (Carriere *et al.*, 1989).

Se han hecho numerosos reportes de introducción de grupos hidroxilo a terpenos por microorganismos como *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Proactinomyces* y cultivos de células vegetales de *Nicotiana tabacum*, *Dioscorea deltoidea*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Mentha piperita*, *Nepeta mussinii* y *Solanum aviculare*, por mencionar algunos (Park *et al.* 1994; Noma *et al.*, 1992). En las hidroxilaciones y epoxidaciones de terpenos, están involucradas las enzimas citocromo P-450 monooxigenasas (Hallahan *et al.*, 1992; Park y Kim, 1998; Mühlenbeck y Barz, 1997; Hamada *et al.* 1994), enzimas involucradas en procesos de detoxificación de numerosas sustancias (Winter *et al.*, 1997).

La introducción de un grupo funcional oxigenado en alquenos es una de las más importantes reacciones de la química sintética. Hay experiencia en la biotransformación de monoterpénos y cetonas alifáticas (Cada *et al.*, 1996) por introducción de un grupo funcional oxigenado en terpenos (careno y pineno), empleando cultivos en suspensión de células vegetales (Hirata *et al.* 1994).

Los monoterpénos son muy importantes para la industria de saborizantes y fragancias. Hay mucho interés en investigar la biotransformación regioselectiva y enantioselectiva de monoterpénos naturales, para la obtención de sustancias importantes por su aroma o sabor (Arnarp *et al.* 1993b; Hamada *et al.* 1994).

d) Optimización de los sistemas de biotransformación

La biotransformación con vegetales puede realizarse con diferentes sistemas celulares: plantas completas, órganos (raíces u hojas), cultivos de callos, cultivos de células en suspensión, cultivos de raíces transformadas y cultivos de células elicidadas (Toivonen, 1993; Nakano *et al.*, 1998).

Los cultivos en suspensión son la forma más empleada, por las ventajas que tiene trabajar con sistemas homogéneos fácilmente manipulables. No obstante, no resultan la mejor opción en todos los ensayos porque no siempre se encuentran en los cultivos celulares todas las capacidades biosintéticas de la especie vegetal en cuestión. En tales casos, deben elegirse sistemas de células diferenciados. Cuando se busca aprovechar la maquinaria enzimática del metabolismo secundario, los cultivos inducidos con elicitores son el sistema más adecuado.

Existen también distintas opciones en la forma como las células se utilizan. Los ensayos de transformación pueden montarse con: células vivas en suspensión, células vivas inmovilizadas, homogenados celulares, fracciones libres de células, partes específicas de las células (fracciones microsomales, organelos, citoplasma, etc.) o con enzimas (Tabla 9).

Los sistemas a elegir dependen de los objetivos específicos de la investigación. Los homogenados de plantas completas, órganos o cultivos celulares son la forma más utilizada porque son los sistemas más fáciles de emplear, solamente hay que adicionar un amortiguador, e incluso puede emplearse algún solvente orgánico. Sin embargo, en los ensayos preliminares es mejor utilizar células vivas, porque algunas enzimas son parcialmente destruidas durante el proceso de homogenización (Arnarp *et al.* 1993b).

Los sistemas celulares conservan intactas sus enzimas. Mantener vivas a las células durante el proceso de transformación tiene ventajas, por ejemplo, no es necesario adicionar cofactores (como ATP, NADH, etc.); pero también tiene inconvenientes. Es necesario en primer lugar, introducir los sustratos a las células, situación que se complica porque muchas enzimas de interés están compartimentalizadas a nivel subcelular. Para facilitar la entrada a las células y conseguir un consumo más rápido de los sustratos, se ha intentado permeabilizar las membranas celulares con el empleo de agentes químicos como dimetilsulfóxido, o Tween 80; o por métodos físicos como electroporación (DiCosmo *et al.*, 1989). Si se adicionó un surfactante, debe determinarse su toxicidad (Noma *et al.*, 1992; Gil *et al.*, 1995). Para conseguir sistemas homogéneos de biotransformación, en el ambiente acuoso que requieren las células, se disuelven las sustancias poco solubles en agua, en algún solvente orgánico. En estos casos, es necesario emplear un solvente que no resulte tóxico para las células en las concentraciones empleadas. Si el sustrato o el producto son sustancias volátiles, se emplea extracción *in situ*, (se adiciona un solvente no miscible con agua que disuelve la sustancia en cuestión y la atrapa). Cuando se emplean sustratos exógenos, debe determinarse cual es la máxima concentración que no resulta tóxica para el cultivo.

Las células vegetales crecen muy lento en comparación con los cultivos microbianos. Para disminuir los altos costos que involucran largos periodos de crecimiento, se intenta desarrollar procesos semicontinuos de biotransformación (Kutney, 1997), reutilizando células inmovilizadas en matrices inertes de alginato de calcio (Chadha *et al.*, 1996). Las dificultades de estos sistemas son por un lado, una menor superficie de exposición, lo cual dificulta la entrada de sustratos y el confinamiento de los productos en el interior celular.

Tabla 9.- Formas celulares empleadas en biotransformaciones vegetales

Forma de cultivo	Especie	Referencia	
Hojas	<i>Mentha piperita</i>	Karp <i>et al.</i> , 1990	
	<i>Mentha spicata</i>		
	<i>Perilla frutescens</i>		
Hojas	<i>Nerium oleander</i>	Paper y Franz, 1989	
Homogenados celulares	<i>Pisum sativum</i>	Adam <i>et al.</i> , 1996	
Extractos libres de células	<i>Nicotiana tabacum</i>	Arnarp <i>et al.</i> , 1993	
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Arnarp <i>et al.</i> , 1993b	
Fracción microsomal	<i>Nepeta mussinii</i>	Hallahan <i>et al.</i> , 1992	
Células inmovilizadas	<i>Solanum khasianum</i>	Mühlenbeck, y Barz, 1997	
	<i>Daucus carota</i>	Akakabe <i>et al.</i> , 1995	
Callo disgregado	<i>Nicotiana tabacum</i>	Naoshima y Akakabe, 1991	
	<i>Daucus carota</i>	Akakabe y Nahoshima, 1994	
	<i>Gardenia jasmonoides</i>	Yoshihiko y Naoshima, 1994	
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Naoshima y Akakabe 1989	
		Naoshima <i>et al.</i> , 1989	
		Hirata <i>et al.</i> , 1993	
	<i>Catharanthus roseus</i>	Takemoto y Achiwa, 1998	
	<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Gil <i>et al.</i> , 1995	
	<i>Nicotiana tabacum</i>		
	<i>Daucus carota</i>		
Cultivos de células en suspensión	<i>Solanum mammosum</i>	Chadha <i>et al.</i> , 1996	
	<i>Catharanthus roseus</i>	Cada <i>et al.</i> , 1996	
Cultivos de células en suspensión	<i>Solanum mammosum</i>	Syahrani <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Catharanthus roseus</i>	Hamada <i>et al.</i> , 1997	
Cultivos de células en suspensión	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Winter <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Glycine max</i>	Nakamura <i>et al.</i> , 1995	
Cultivos de células en suspensión	<i>Catharanthus roseus</i>	Takemoto y Achiwa, 1995	
	<i>Marchantia polymorpha</i>		
Cultivos de células en suspensión	<i>Nicotiana tabacum</i>		
	<i>Phalaenopsis sp.</i>		
Cultivos de células en suspensión	<i>Phytolacca americana</i>		
	<i>Artemisia annua</i>	Kawamoto <i>et al.</i> , 1998	
Enzimas		Laschat, 1996	
	Peroxidasa	<i>Cassia didymobotrya</i>	Vitali <i>et al.</i> , 1998
Enzimas	Reductasa	<i>Nicotiana tabacum</i>	Shimoda <i>et al.</i> , 1995
Anticuerpos catalíticos		Laschat, 1996	
Cultivos fotoautotróficos, fotomixotróficos y heterotróficos	<i>Glycine max</i>	Carriere <i>et al.</i> , 1989	
	<i>Catharanthus roseus</i>		
	<i>Nicotiana tabacum</i>		

Fuente: Elaboración propia

Los sistemas libres de células y las preparaciones enzimáticas son más eficientes que los sistemas celulares (requieren minutos contra horas o días de las reacciones con células completas); además, la producción química basada en enzimas aisladas en solución o en sistemas inmovilizados es una tecnología establecida. Aunque la utilización de enzimas vegetales todavía no es común, el empleo de esta técnica para la producción de fitoquímicos de interés industrial es muy promisorio.

El desarrollo de sistemas eficientes de biotransformación de productos naturales con cultivos vegetales comprende los siguientes pasos:

- Elección de una especie vegetal
- Establecimiento de cultivos
- Selección y mejoramiento de líneas celulares
- Optimización de las condiciones de cultivo
 - Composición del medio
 - Biorreactores apropiados
 - Condiciones de cultivo
 - pH
 - Iluminación
 - Temperatura
 - Velocidad de agitación
- Optimización de las condiciones de biotransformación
 - Proporción ideal de masa celular
 - Suplemento óptimo del sustrato
 - Tiempo de reacción
 - Sistema celular

En los estudios de biotransformación se emplea preferentemente especies vegetales que no producen normalmente el tipo de sustancia que se pretende obtener, porque es posible aislar y caracterizar sin gran dificultad los productos (Viel *et al.*, 1993). En los estudios para encontrar una especie adecuada, los enfoques que utilizan plantas emparentadas, de la misma familia o el mismo género suelen dar buenos resultados (Kamigauchi *et al.*, 1994). El éxito en el proceso de optimización depende en gran medida del grado de conocimiento de la fisiología y bioquímica de una ruta sintética involucrada. (Berlín, 1997; Alfermann, 1980; Kutney, 1993; Neau *et al.*, 1997). La capacidad de transformación de las células vegetales es muy variable y está influenciada en gran medida de mecanismos internos de control metabólico. Hay líneas celulares con rendimientos bajos, que no pueden superar el 20% (Viel *et al.*, 1993). En cambio, hay sistemas que dan rendimientos iniciales entre 42 y 48%

(Guo *et al.*, 1998; Dufresne *et al.*, 1997). Las tasas de bioconversión están determinadas por la especie vegetal empleada. (Carriere *et al.*, 1989).

Deben determinarse las condiciones de cultivo que promueven crecimiento celular y las que fomentan la expresión de los sistemas enzimáticos de interés. El medio de cultivo, especialmente los reguladores de crecimiento utilizados y las condiciones de temperatura, iluminación, y agitación, tienen influencia en las tasas de crecimiento de las células y en la expresión de rutas biosintéticas específicas. El pH es uno de los elementos de mayor importancia durante la transformación.

Las reacciones pueden monitorearse por desaparición de sustrato y/o la cinética de acumulación de los productos (Karp *et al.*, 1990). Los ensayos suelen hacerse por duplicado o triplicado (Dufresne *et al.*, 1997). Para calcular rendimiento se emplea cromatógrafo de gases, HPLC o resonancia magnética nuclear. Para calcular los excesos enantioméricos se mide rotación óptica (Naoshima y Akakabe, 1991). Las mediciones corresponden tanto al contenido de las células como del medio de cultivo (Naoshima y Akakabe 1989; Hamada *et al.*, 1997; Vanek *et al.*, 1999). Para determinar la cinética de transformación y rastrear el destino de los sustratos en los sistemas celulares se emplean sustancias marcadas con isótopos radioactivos (Winter *et al.*, 1997; Vanek *et al.*, 1999; Kolbe *et al.* 1998).

Las estrategias para identificar a las enzimas involucradas en la biotransformación son: utilización en los ensayos de diferentes fracciones celulares y empleo de inhibidores de enzimas específicas (Winter *et al.*, 1997). Las reacciones en sistemas naturales no necesariamente requieren la participación de enzimas, pueden darse por rearreglo espontáneo (Laschat, 1996), por eso es importante establecer testigos con cultivos esterilizados en autoclave y comprobar así si se trata o no de una transformación enzimática (Syahrani *et al.*, 1997)

En caso de que el proceso con células vegetales no sea redituable, los genes que codifican para la producción de las enzimas pueden clonarse y expresarse en sistemas microbianos, que permitan la producción de la enzima a gran escala (DiCosmo *et al.*, 1989).

11. Una planta muy particular: *Piqueria trinervia*

Piqueria trinervia Cav. Es una planta silvestre de naturaleza herbácea o subarborescente perteneciente a la familia Asteraceae, que tiene pequeñas cabezuelas con ligulas

blancas y estigmas amarillos; las hojas se presentan en los nudos por pares y tienen tres venas longitudinales y márgenes aserrados.

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el territorio nacional, hay poblaciones de la planta desde Durango hasta Chiapas, también se encuentra en Centroamérica y en algunas islas del Caribe. Crece preferentemente asociada a bosques de pino – encino, en lugares abiertos y soleados, aunque también se encuentra en sucesiones secundarias, en matorrales y en terrenos agrícolas. se localiza en ecosistemas entre 920 y 4200 m sobre el nivel del mar, tanto en zonas planas como en sitios con pendiente pronunciada; se desarrolla bien en muchos tipos de suelos: regosoles, andosoles, cambisoles y tobas volcánicas ¹².

La planta ha sido usada en la medicina tradicional mexicana, desde la etapa prehispánica (Bejar *et al.*, 2000). Fue identificada en el Códice Florentino con el nombre náhuatl “Cuapupoltzin”. Recibe varios nombres comunes: Tarbadillo, Hierba de San Nicolás, Xoxonetzal, Yotoxitlic y Emphueste. En las comunidades donde se encuentra se utiliza en forma de té de las hojas y flores y en ocasiones de raíces, para combatir el tifo, la fiebre, la malaria, el tétanos y desordenes estomacales como desinterfía y diarrea.

Piqueria trinervia es una de las plantas silvestres mexicanas más estudiadas desde el punto de vista fitoquímico. Se han purificado y caracterizado varios de sus metabolitos secundarios, en particular los componentes terpénicos. Entre otros compuestos han sido reportados: α -santalal, santaolol, dihidrometoxi carquejol, isoferulol –(4-senecioato), isoferulol –(4-acetoxi-senecioato), isoferulol –(4-hidroxisenecioato, acetato de carquejilo, el diterpeno trinervinol y dos terpenos diastereoisómeros, piquerol A y piquerol B (Jiménez y González de la Parra, 1983; Soriano-García, *et al.*, 1983). Entre ellos, resulta interesante el piquerol A (Fig. 12) porque tiene un espectro de acción biológica muy amplio: presenta propiedades alelopáticas (González de la Parra *et al.*, 1981), es molusquicida (Cruz-Reyes *et al.*, 1989), acaricida (González de la Parra *et al.*, 1991) y actúa contra *Trypanosoma cruzi* (Castro, *et al.*, 1992);. La estructura molecular de este monoterpeno ha sido confirmada por cristalografía de rayos X. Esta sustancia fue aislada de plantas colectadas en las poblaciones

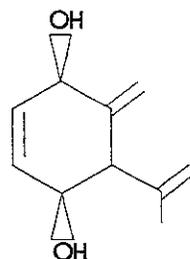


Fig. 12.- Piquerol A

¹² Estos datos son resultado de un estudio que efectuamos en el Herbario Nacional de México (MEXU)

que se encuentran al Sur de la ciudad de México. Su isomero, el piqueroi B, fue aislado de plantas de *P. trinervia* de diferentes poblaciones, localizadas en Atlacomulco, Edo. de México. Sin embargo, las sustancias responsables de las propiedades medicinales atribuidas a la planta todavía no han sido identificadas (Bejar *et al.*, 1999).

A pesar de su amplio uso en la medicina tradicional, no se cultiva *Piqueria trinervia* en ningún sitio. La eventual explotación de la planta a gran escala ejercería una presión muy fuerte sobre la especie. Para aprovechar este valioso recurso vegetal sin arriesgarlo, en nuestro grupo de trabajo, se decidió iniciar un desarrollo biotecnológico para la especie. La domesticación de la planta dentro de una estrategia que conserve la diversidad de la especie, necesariamente involucra reproducción sexual. Por eso se determinaron en primera instancia, los parámetros limitantes para la germinación de semillas de la planta. El segundo paso, fue el desarrollo de un sistema de micropropagación por una doble vía: organogénesis y embriogénesis somática (Hernández, 1996; Saad, 1996). Posteriormente se desarrolló un protocolo para obtener un cultivo de células suspensión, que produce piqueroi A en la etapa de crecimiento exponencial. Se emplearon dos estrategias para aumentar su producción: el empleo de elicitores fúngicos y la adición de precursores metabólicos (mevalonato y geraniol). En los cultivos elicitados no se detecta piqueroi A, en cambio se producen cuatro nuevas sustancias, entre ellas, un nuevo monoterpeno con actividad fungicida. El mevalonato no se incorpora a los monoterpenos de la planta, el geraniol, sí aumenta rendimientos (Saad, 1996; Liza Covantes, comunicación personal).

Piqueria trinervia es una planta que representa un sistema ideal para la biotransformación de monoterpenos porque sintetiza varios de ellos en dos metabolones¹³. Un canal metabólico es constitutivo y se expresa tanto en plantas completas como en cultivo de tejidos vegetales; el otro se induce con elicitores en sistemas de cultivo en suspensión de la planta. En el primer sistema el compuesto más abundante es el piqueroi, mientras en el segundo el compuesto más notable es una fitoalexina que presenta actividad fungicida y antibiótica.

En este trabajo estudiamos las posibilidades de biotransformación de geraniol pirofosfato - el intermediario ubicuo de la síntesis de monoterpenos en plantas - por cultivos *in vitro* de *Piqueria trinervia*, para la producción de monoterpenos. Con los objetivos que a continuación se anotan.

¹³ Procesos sintéticos y catabólicos que involucran regulación espacial, temporal y ambiental particular.

IV.- Objetivos

General

Aumentar la síntesis de dos monoterpenos: piquerol y piquerinol, por biotransformación de geranil pirofosfato en cultivos de células en suspensión, cultivos elicitados y cloroplastos aislados de *Piqueria trinervia* Cav., como primer paso para el empleo de las terpeno-ciclasas de esta planta, en la producción de metabolitos secundarios bioactivos

Específicos

- Estandarizar la síntesis química de geranil pirofosfato y geranil pirofosfato deuterado, para emplearlos como sustrato de las reacciones de biotransformación y las pruebas de actividad enzimática
- Determinar el tiempo óptimo de biotransformación de geranil pirofosfato en piquerol, por cultivos de callos en suspensión de *P. trinervia*
- Determinar el tiempo óptimo de biotransformación de geranilpirofosfato en piquerinol, por cultivos en suspensión elicitados de *P. trinervia*
- Establecer la concentración de geranilpirofosfato que debe adicionarse a los cultivos
- Estandarizar la técnica de aislamiento de cloroplastos a partir de hojas de *P. trinervia*
- Establecer un sistema de biotransformación de geranil pirofosfato en piquerol por cloroplastos de *P. trinervia*

V.- Hipótesis

1. La adición de geranil pirofosfato a cultivos de células en suspensión de *Piqueria trinervia*, incrementará la producción de piquerol, mediante la intervención de una monoterpeneo ciclase
2. Como los plastidios suelen ser el lugar de síntesis de los monoterpenos, los cloroplastos aislados de hojas de *Piqueria trinervia*, pueden ser un sistema más eficiente que los cultivos de células, para la biotransformación de geranil pirofosfato en piquerol
3. La disponibilidad de GPP es uno de los factores limitantes de la síntesis de monoterpenos, al adicionar este sustrato a los cultivos en suspensión elicitados de *Piqueria trinervia*, se aumentará la producción de piquerinol, que es la principal fitoalexina de esta planta

VI.- Materiales y métodos

1 Estrategia desarrollada

Las actividades realizadas para cubrir los objetivos planteados se cubrieron en cinco etapas (Fig. 13):

- Establecimiento de cultivos *in vitro* de *P. trinervia* y de *Fusarium moniliforme*
- Purificación y caracterización de la principal fitoalexina producida en los cultivos elicitados ;
- Síntesis de geranil pirofosfato y geranil pirofosfato deuterado;
- Experimentos de biotransformación de GPP con cultivos de células en suspensión, cultivos elicitados y cloroplastos;
- Pruebas de actividad enzimática de monoterpene ciclasas.

1) En la primera etapa se trabajó en el establecimiento de tres tipos de cultivos de *P. trinervia*:

- a) brotes,
- b) cultivos de células en suspensión
- c) y cultivos elicitados.

Todos los cultivos se generaron a partir de semillas germinadas *in vitro*. Los cultivos elicitados se indujeron con homogenados de micelio de *Fusarium moniliforme*, para lo cual se aislaron y mantuvieron cepas monospóricas de este hongo.

- 2) En la segunda etapa se aisló y caracterizó un nuevo monoterpene, el piquerinol, que es la principal fitoalexina producida en los cultivos elicitados de esta planta.
- 3) Durante la tercera etapa se estandarizó la técnica para la producción de GPP y GPP deuterado. La producción de geranil pirofosfato se realizó mediante la adición de un pirofosfato al geraniol comercial; la síntesis de geranil pirofosfato deuterado requirió del marcaje previo del geraniol con deuterio. El GPP se empleó como sustrato de los experimentos de biotransformación y el GPP deuterado para efectuar pruebas de actividad enzimática de monoterpene ciclasas.
- 4) En la cuarta etapa se realizaron las actividades centrales de esta investigación, los experimentos de biotransformación de GPP en los diferentes sistemas *in vitro*. En

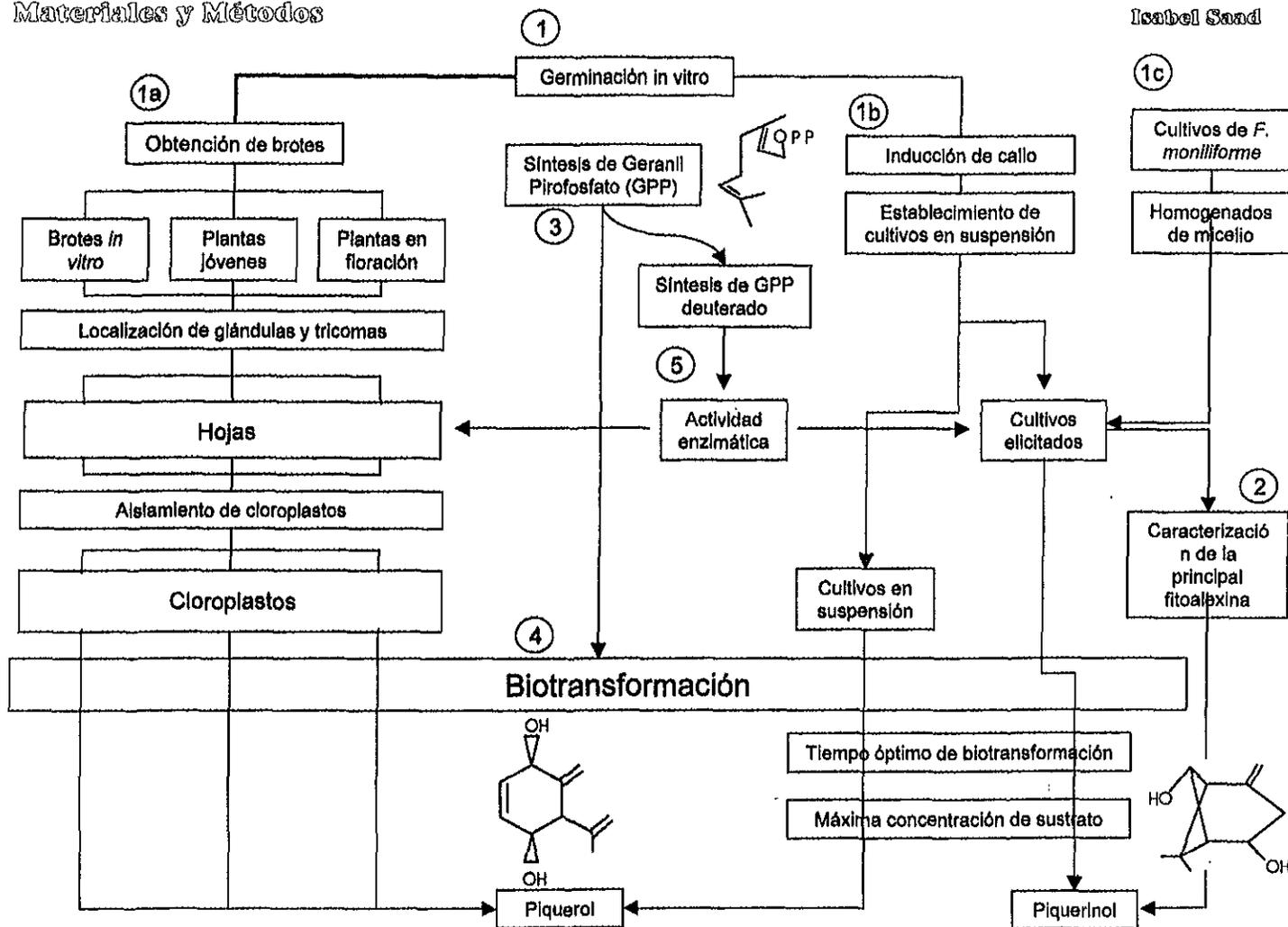


Fig. 13.- Estrategia desarrollada

primera instancia, se midió la concentración de piqueroi en diferentes órganos de la planta, en los cultivos de callos y en las células en suspensión; y de piquerinol en los cultivos elicitados sin tratar; para emplearlos como punto de referencia. Se hicieron cinco experimentos de biotransformación de GPP con cultivos de *P. trinervia*, con tres sistemas celulares: dos con cultivos de células en suspensión, dos con cultivos elicitados y uno con cloroplastos (Tabla 10). En los experimentos con los cultivos celulares se buscaba la producción de piqueroi, en los cultivos elicitados, la de piquerinol y con los cloroplastos el producto esperado era piqueroi.

Tabla 10. -Experimentos de biotransformación de GPP con cultivos de *P. trinervia*

Experimento	Objetivo	Sistema celular	Condiciones	Variables
1	Determinar el tiempo óptimo de biotransformación de GPP en piqueroi	Cultivos de células en suspensión	10 mg de GPP	Tiempo de reacción (6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas)
2	Determinar el tiempo óptimo de biotransformación de GPP en piquerinol	Cultivos de células en suspensión elicitados	10 mg de GPP	Tiempo de reacción (24,48 y 72 horas)
3	Cantidad óptima de sustrato para la biotransformación de GPP en piqueroi	Cultivos de células en suspensión	48 horas	Cantidad de sustrato (10, 20 y 30 mg)
4	Cantidad óptima de sustrato para la biotransformación de GPP en piquerinol	Cultivos de células en suspensión elicitados	72 horas	Cantidad de sustrato (10, 20 y 30 mg)
5	Etapas fenológica con mayor capacidad de biotransformación de GPP en piqueroi, en cloroplastos	Cloroplastos aislados de hojas	30 mg de GPP 48 horas	Etapas de crecimiento (brotes jóvenes, plantas jóvenes, plantas en floración)

Para realizar experimentos de biotransformación con cloroplastos fue necesario estandarizar primero la técnica de obtención de cloroplastos de hoja en tres diferentes etapas fenológicas de la planta: brotes *in vitro*, plantas en crecimiento y plantas en floración.

Presentamos los resultados de todos los experimentos también en términos de mg de producto por gramo de proteína y medimos concentración de proteínas, a todos los cultivos *in vitro* empleados y a los diferentes órganos de *P. trinervia*,

con un doble propósito poder comparar los resultados con los obtenidos en los ensayos con cloroplastos y tener una evidencia indirecta de su actividad metabólica.

- 5) Por último, en la quinta etapa, se utilizó geranil pirofosfato deuterado para detectar actividad enzimática de monoterpene ciclasas en diferentes tejidos de *P. trinervia*. Como la mayor actividad de estas enzimas se ha detectado en estructuras especializadas de almacenamiento, se realizó previamente un estudio histológico para determinar la localización de tricomas glandulares en los diferentes órganos y etapas fenológicas de *P. trinervia*. Las pruebas de actividad enzimática se realizaron en hojas de plantas jóvenes, hojas de plantas en floración, flores y cultivos en suspensión elicitados.

2 Cultivos

a) Material biológico

El material vegetal empleado en este trabajo proviene de semillas colectadas en las poblaciones de la Serranía del Ajusco. Específicamente del bosque de pino-encino localizado sobre la carretera Picacho-Ajusco, a la altura del sitio conocido como "La Virgen". Las semillas fueron colectadas en febrero de 1995 y 1996. Fueron depositadas muestras de la planta en el Herbario Nacional de México (MEXU).

Los hongos empleados como elicitores se aislaron de raíces infectadas de *Piqueria trinervia* colectadas en julio de 1993, en la misma población antes descrita. Los hongos fueron identificados en el Laboratorio de Hongos Fitopatógenos, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo. de México.

b) Medios de cultivo

En todos los cultivos vegetales realizados durante esta investigación se empleó el medio básico Murashige y Skoog (1962) (MS), al cual se le agregaron distintas concentraciones de hormonas en los diferentes experimentos efectuados. En todos los casos se ajustó el pH del medio a 5.7 con HCl y KOH 1N y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 1.5 kg/cm² de presión.

Los cultivos sólidos de los hongos se hicieron en el medio Papa Dextrosa Agar (PDA), preparado de la siguiente manera: 200g de papa pelada se rebanaron y

lavarón varias veces con agua corriente, las papas se hirvieron en 500 ml de agua destilada durante 15 minutos a 1.5 kg/cm² de presión. El líquido resultante, se filtró con una malla de acero inoxidable y se le adicionaron 14g de dextrosa y 16 gramos de agar, la mezcla se aforó a un litro con agua destilada y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 1.5 kg/cm² de presión. El medio se vertió en cajas Petri (aproximadamente 25 ml por caja), bajo condiciones estériles. Los cultivos líquidos de hongos se hicieron con el mismo medio PDA, sin agar, se adicionaron 50 ml de medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml.

c) Organogénesis

Para la inducción de brotes de *P. trinervia* se empleó MS con 1 mg/l de cinetina, se usaron como explantes secciones de 1.5 cm de tallo, obtenidos de plantas germinadas *in vitro* de 2 meses de edad. Se colocaron 3 explantes en frascos de vidrio de 125 ml que contenían 25 ml de medio sólido. Los frascos se mantuvieron en una cámara de incubación a 25 °C, en foto-periodo de 16 horas luz, bajo lámparas fluorescentes. Después de 6 semanas de cultivo las plantas se transplantaron a macetas con vermiculita y las sales del medio-MS al 50%. Los cultivos se mantuvieron en invernadero, bajo las condiciones antes descritas.

d) Elicitores fúngicos

Aislamiento de las cepas de *Fusarium moniliforme*

Se colectaron hojas y raíces de *Piqueria trinervia* aparentemente infectados. Los órganos infectados fueron fraccionados en porciones de 0.5 cm², se lavaron con una solución jabonosa y se enjuagaron con abundante agua corriente; se desinfectaron en condiciones asépticas, en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante 2 minutos; se lavaron con agua destilada y se secaron con papel secante estéril. Se sembraron cuatro fragmentos de tejido en cajas Petri con medio nutritivo PDA. Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 4 días. Transcurrido este tiempo se aislaron colonias individuales en nuevas cajas con medio nutritivo. Luego de 15 días de incubación en oscuridad, los hongos se expusieron a la luz para estimular el desarrollo de esporas.

Obtención de cepas monospóricas

Se agregaron 2 ml de agua estéril a cajas de cultivo que habían sido expuestas a la luz y que contenían esporas, se enjuagó la superficie del micelio y se retiró el agua.

Se tomaron 0.5 ml de esta suspensión y se esparcieron homogéneamente (con ayuda de una barra de vidrio) en la superficie del medio de otra caja Petri. Las cajas se mantuvieron en las condiciones antes descritas hasta que las esporas germinaron (2 ó 3 días después), entonces se tomó una porción de micelio de una de las colonias y se subcultivó en otra caja con medio nutritivo. Luego de 8 ó 12 días más, se obtuvieron colonias monospóricas.

Preparaciones de elicitores

Las cepas fúngicas aisladas se mantuvieron en medio sólido, haciendo subcultivos cada 3 ó 4 semanas. En cada subcultivo se tomó 1 cm² de micelio de la periferia de la colonia y se colocó en el centro de cajas con medio nutritivo fresco. Para establecer el cultivo líquido se adicionan dos porciones de 1 cm² de micelio en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio líquido. Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital a 150 r.p.m., bajo iluminación constante, a 25 ± 1 °C. Después de 6 a 8 días de cultivo, el micelio fue cosechado y homogenizado (Polytron, 10 min.), con la mitad del volumen del medio original, la mezcla resultante se aforó para dar una concentración final de 40 g de micelio fresco por litro. Las preparaciones con elicitores se obtuvieron vertiendo 5 ml de la mezcla resultante en tubos de vidrio y esterilizando los tubos en autoclave a 1.5 kg/cm² de presión, durante 20 min.

e) Inducción de callo

Para la inducción de callo de *P. trinervia* se utilizó medio-MS adicionado con bencil-amino-purina (BAP) (1 mg/l), ácido naftalen-acético (ANA) (1 mg/l) sacarosa (30 g/l) y de agar-agar (8.5 g). Se emplearon como explante entrenudos provenientes de plantas germinadas *in vitro* de 2 meses de edad. Se utilizaron frascos de vidrio de 125 ml que contenían 25 ml de medio sólido. Se colocaron 5 explantes por frasco. Los cultivos se mantuvieron en 16 horas luz, bajo iluminación de 0.5 watt/m² en cámara de incubación a 25 ± 1 °C.

f) Cultivo de callos en suspensión

Se inició el cultivo con callos de 6 semanas. Se agregaron 8 gramos de callo, en matraces Erlenmeyer que contenían 50 ml de medio-MS adicionado con ANA (1 mg/l), BAP (1 mg/l) y sacarosa (20 g/l) de. Los matraces se mantuvieron a 25 °C en agitadores orbitales a 100 r.p.m., bajo condiciones de iluminación constante (0.5 watt/m²), en cámara de incubación a 25 °C ± 1 °C.

Se estableció la cinética de crecimiento de los cultivos utilizando cuatro parámetros: peso fresco, peso seco, paquete celular y concentración de proteínas. Para lo cual se sembraron el mismo día todos los matraces necesarios, con 2 g de callo crecido en cultivo sólido. Las mediciones se hicieron diario los primeros cinco días y después cada cinco días, hasta el día 30 de cultivo. Para peso fresco, peso seco y paquete celular se ocupó el contenido de células total por matraz y se calculó el promedio de tres matraces. La medida del paquete celular se obtuvo centrifugando el contenido de un matraz en tubos de ensayo graduados, de 50 ml, a 3000 g, durante 15 min. La concentración de proteínas se obtuvo con la técnica de Lowry *et al.* (1978), aplicada a 100 μ l de muestra, tomada de una solución de 100 mg de callo disuelto en 2.4 ml de agua destilada. Se tomó muestra de tres matraces y se hicieron tres mediciones de cada una. Se utilizó una curva patrón con albúmina de bovino empleando concentraciones entre 12.5 y 100 μ g/ml.

g) Cultivos elicitados de células en suspensión

Los cultivos de células en suspensión de *P. trinervia* fueron inducidos con elicitores fúngicos en la etapa media de la fase de crecimiento exponencial (10 días). Se adicionó a cada matraz un tubo de preparación con elicitores de *Fusarium moniliforme*. Cada tubo de ensayo contenía 5 ml de suspensión con 200 mg de micelio fresco. Los cultivos inducidos fueron mantenidos tres días más, bajo las condiciones antes descritas.

3 Aislamiento de piquerinol

Los cultivos de células en suspensión elicitados de *P. trinervia* fueron cosechados después de 3 días. El cultivo fue filtrado con una malla de acero inoxidable (200 mesh). El medio de cultivo fue extraído tres veces con CHCl_3 . El solvente fue eliminado en un rotavapor a 70 °C. El extracto (300 mg) fue fraccionado en cromatografía de columna (Silica Gel 60 MERCK, 35-70 mesh). La columna fue eluída primero con una mezcla de éter de petróleo y EtOAc (8:2) y después con una mezcla de éter de petróleo-EtOAc- CH_2Cl_2 (5:3:2). Las fracciones 47 a 69, eluídas con esta mezcla, contenían un sólido amarillo, que fue recrystalizado con CH_2Cl_2 , el Piquerinol (3), el cual presentó un R_f de 0.28 (éter de petróleo-EtOAc; 7:3).

Caracterización de piquerinol_{1,24}

Cristales amarillos, $pf=118-120^\circ$. $[\alpha]_D^{25} + 8.35$ (CHCl_3 , c 0.30). $\text{Ir } \nu_{\text{max}}^{\text{CH}_3} \text{ cm}^{-1}$: 3357 (OH) y 1644 (C=C). $^1\text{H RMN}$, (500 MHz, CDCl_3) ppm δ : 4.70 (t, 2H, J=2.1 Hz, H-

10), 4.36 (dt, 1H, J=3.0 y 9.6 Hz, H-4), 3.73 (s, 1H, H-7), 2.95 (ddt, 1H, J=2.1, 9.6 y 19.6, H-3) 2.51 (ddt, 1H, J=9.0 Hz, H-1), 2.39 (dq, 1H, J=2.5, 19.0 y 5.0, H-2), 2.26 (d, d, 1H, J=3.6 y 6.0 Hz, H-5), 1.90 (s ancho, 1H, intercambia con D₂O), 1.58 (s, 3H, Me-8), 1.22 (s, 1H, D₂O), 1.05 (s, 3H, Me-9). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 147.64 (C-2), 109.8 (C-10), 76.6 (C-4), 74.6 (C-7), 58.8 (C-1), 54.3 (C-5), 38.9 (C-6), 35.8 (C-3), 28.7 (C-8), 25.4 (C-9). CIMS 70 eV, m/z (rel. int.): 169 (M⁺ +1), 151, 133, 123, 107, 95, 81. EMIE 70 eV, m/z (rel. int.): 150 (M⁺ -18), 135, 121, 107, 101, 92, 85 (100), 73, 55, 41, 39.

Los puntos de fusión (sin corregir) fueron determinados en un aparato Fisher-Jones. Los espectros ¹H NMR y ¹³C NMR se hicieron con espectrómetros Varian Gemini-200 y Varian UNITY-500. Se uso TMS como referencia. Los experimentos COSY, NOESY, MC y NBC se efectuaron con el programa de pulsos estándar Varian Unity-500. La secuencia BIRD fue optimizada por acoplamiento de escala corta (140 Hz., ¹JC-H). El programa de pulsos NBC fue optimizado por acoplamientos de escala larga (9.0 Hz., ³JC-H). Tanto HMQC como NBC fueron obtenidos con puntos 1024 x 256. La dimensión F2 fue ajustada a cero para conseguir una matriz de datos 1024 x 512. Las pruebas analíticas de Cromatografía de capa fina fueron efectuadas con sílica gel. Las placas de compuestos orgánicos fueron reveladas con una solución de CeSO₄ 1% en H₂SO₄ 2N y calentadas en una parrilla.

4 Síntesis de GPP y GPP deuterado

a) Síntesis de GPP

Preparación del éster pirofosfato

Se disolvieron 306 µl (1.76 mM) de geraniol (Reactivo de Aldrich) en 4 ml de acetonitrilo anhidro. A la solución de geraniol en agitación se adicionaron 1576 µl (15.7 mM) de tricloro-acetonitrilo. Después se goteó, lentamente (durante 4 horas) una solución de 1.6 mg (5.33 mM) de bis-(trietilamonio) fosfato disuelto en 120 ml de acetonitrilo anhidro. La mezcla se dejó reaccionar durante 13 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adicionaron 120 ml de una solución de NH₄OH 5 mM. Se hicieron tres extracciones con 200 ml de una mezcla de éter-hexano (1:1, v:v) y se recuperó la fase acuosa.

Síntesis del agente fosforilante: bis-(trietilamonio) fosfato

Se adicionó una solución de trietilamina [55.7 ml (40.4g) en 250 ml de acetonitrilo¹], a una solución de ácido fosfórico cristalino [19.6g (0.2 mM) en 100 ml de acetonitrilo], que permaneció en agitación constante. La mezcla se dejó reaccionar hasta que todo el ácido fosfórico se disolvió. La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente. Después de 24 horas el bis-trietilamoniofosfato precipitó en forma de cristales transparentes e incoloros. Se obtuvo un producto más reactivo cuando se dejó cristalizar lentamente y se lavó suficientemente con hexano. Los cristales se filtraron y se lavaron con 100 ml de hexano. El reactivo se usó de inmediato.

La obtención de ácido ortofosfórico cristalino se hizo con el siguiente procedimiento: Se calentaron 100 ml de ácido fosfórico comercial (H_3PO_4 al 85%), a 150 °C, en una parrilla, durante 3 horas, hasta que el volumen del ácido se mantuvo estable (75 ml). Inmediatamente después, se pasó el matraz a un recipiente con nitrógeno líquido y se mantuvo ahí hasta que el nitrógeno se evaporó. En el ácido frío, se formaron cristales muy finos, que permanecieron cuando se alcanzó la temperatura ambiente. El ácido fosfórico cristalino se almacenó en acetonitrilo a temperatura ambiente.

Purificación del GPP

Preparación de la columna.- Se dejó hidratar por una hora, en 200 ml de una solución de NH_4CO_3 , 10mM, 66 g O-dimetilaminoetil celulosa, la solución de NH_4CO_3 , se decantó para permitir que se desecharán las partículas extremadamente finas, después se adicionaron 150 ml más de NH_4CO_3 , 10mM y se ajustó el pH de la suspensión a 8.0 con HCl 1 N. Se aplicó vacío a la suspensión durante 15 minutos, para eliminar burbujas. Esta mezcla se adicionó lentamente a una columna de cristal de 25 cm de altura y 3 cm de diámetro que contenía solución de NH_4CO_3 , 10mM y se dejó empacar por gravedad bajo condiciones de goteo de 2 ml por minuto.

Se adicionó a la columna de O-dimetilaminoetil celulosa, la mezcla acuosa que contenía el geraniol fosforilado, el GPP y se eluyó con 600 ml de un gradiente lineal de 10 a 80 mM de NH_4CO_3 . Se colectaron porciones de 5 ml del eluyente en tubos de ensayo de 8 ml; el GP se encontró en los tubos 50-56 y el GPP en los tubos 60 y 66. Después de liofilizar se obtuvieron 200 mg de GPP.

¹ Para obtener acetonitrilo anhidro se destilaron 100 ml de la presentación comercial del solvente con 1g de P_2O_5 .

La presencia de GPP se detectó por cromatografía de capa fina (sílica gel, isopropanol: hidróxido de amonio: agua, 8:1:1; dos aplicaciones de 1 μ l por muestra). En este sistema el GP tiene un $R_f = 0.35$ y el GPP $R_f = 0.19$. Las placas se revelaron con molibdato ácido de amonio (Hanes y Isherwood, 1949; Moule y Greenfield, 1962). Los productos se detectan como una mancha blanca en cuanto el revelador baña la placa. Esta mancha es la evidencia de una reacción química y por eso dura unos cuantos segundos, pero permite la detección del producto. Es posible hacer que la evidencia dure unas horas si se baña a la placa cuando se seque con una solución de azul de timol (Isherwood y Hanes, 1953). Las soluciones reveladoras se prepararon de la siguiente forma: Solución de indicador universal alcalino.- Se preparó una solución al 0.1% de azul de timol en un buffer de glicinato de sodio y se adicionó el NaOH 0.1N necesario para alcanzar un pH de 10. Molibdato ácido de amonio.- Se mezclaron 5 ml de una solución al 60% (peso/peso) de ácido perclórico, 10 ml de ácido clorhídrico 1N y 25 ml de molibdato de amonio al 4%. Se aforó la mezcla a 100 ml.

Caracterización del GP y GPP

GP: ^1H RMN, (300 MHz, CDCl_3) ppm δ : 1.44 (s, 3H, H-10), 1.50 (s, 3H, H-8), 1.53 (s, 3H, H-9), 1.93 (m, 4H, H-4 y H-5), 4.29 (m, 3H, H-1), 5.03 (s, ancho 1H, H-6), 5.27 (t, 1H, H-2). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 143.6 (C-3), 136.2 (C-7), 126.7 (C-6), 123.7 (C-2), 63.51 (C-1), 41.35 (C-4), 28.18 (C-5), 27.35 (C-9), 19.50 (C-8), 18.03 (C-10).

GPP: ^1H RMN, (300 MHz, CDCl_3) ppm δ : 1.44 (s, 3H, H-10), 1.50 (s, 3H, H-8), 1.53 (s, 3H, H-9), 1.93 (s, 2H, H-4), 1.96 (s, 2H, H-5), 4.29 (m, ancho, 5H, H-1), 5.03 (s, ancho 1H, H-6), 5.27 (t, ancho, 1H, H-2). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 143.6 (C-3), 136.5 (C-7), 127.6 (C-6), 123.4 (C-2), 63.5 (C-1), 41.7 (C-4), 28.0 (C-5), 27.0 (C-9), 19.7 (C-8), 18.0 (C-10).

b) Preparación de GPP deuterado

Obtención de geraniol

La oxidación de geraniol se hizo con la técnica reportada por Croteau, *et al.*, 1994. Para aumentar rendimientos, se optimizó el tiempo de reacción y se mejoró la eficiencia efectuando la reacción a bajas temperaturas. Se hicieron reaccionar, en 87 ml de hexano redestilado, 6.6 g de MnO_2 ² y 0.5 ml de geraniol (Reactivo de Aldrich).

² Los detalles de su preparación se encuentran abajo

La reacción se efectuó entre -7 y -14 °C, en agitación constante, por 90 minutos. Transcurrido este tiempo se filtró el dióxido de manganeso con celita y se concentró el solvente en rotavapor a 70 °C. El geraniol se separó en cromatografía preparativa (sílica gel, hexano-acetato de etilo 9:1; dos corridas consecutivas). El Rf del geraniol en este sistema fue de 0.38. La sustancia se recuperó con acetato de etilo y se concentró en rotavapor a 70 °C. ¹H RMN, (300 MHz, CDCl₃) ppm δ: 1.60 (s, 3H, H-9), 1.68 (s, 3H, H-8), 2.17 (s, 3H, H-10), 2.23 (m, 4H, H-4 y H-5), 5.07 (m, 1H, H-6), 5.86 (d, 1H, J = 12.09 Hz, H-2), 10.0 (d, 1H, J = 12.09 Hz, H-1),

El MnO₂ se preparó de acuerdo con la técnica de Attenburrow (1952). 150 ml de una solución de sulfato manganoso monohidratado (84.1 g) y 117 ml de una solución de hidróxido de sodio al 40% (46.8g), se adicionaron simultáneamente, de forma muy lenta (durante una hora), a 600 ml de una solución caliente, en agitación, de permanganato de potasio (96 g). El dióxido de manganeso precipitó rápidamente, en forma de un sólido café. La agitación se continuó durante 15 minutos más, después se dejó enfriar la mezcla. El sólido se colectó con una centrífuga (2000 g durante 10 minutos) y se lavó por resuspensión con agua destilada. El polvo se lavó hasta que el agua de lavado no estuvo colorida (la reactividad del producto dependió en gran medida, de un lavado suficiente). El sólido resultante, café oscuro, se secó en un horno a 100 °C y se molió en mortero hasta conseguir un polvo fino. De esta manera resultó un óxido muy reactivo, hidratado, que contenía de 3 a 4% de agua firmemente unida.

Obtención de geraniol deuterado

Se adicionó por goteo una solución preparada con 1.6 ml de etanol absoluto y 429 mg de geraniol, a 119 mg de borohidruro de sodio deuterado (NaBD₄). La reacción se efectuó en agitación constante, a temperatura ambiente, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se transfirió la mezcla lentamente, por goteo, a 4 ml de agua fría, donde permaneció durante 30 minutos en agitación. Después se hicieron tres extracciones con 7 ml de éter-pentano. Se retiró el exceso de NaBD₄ por filtración y la mezcla de solventes se concentró en rotavapor a 40 °C. El geraniol deuterado se separó en cromatografía preparativa (sílica gel, hexano-acetato de etilo 9:1; dos eluciones consecutivas). El Rf del geraniol deuterado en este sistema fue de 0.16. ¹H RMN, (300 MHz, CDCl₃) ppm δ: 1.60 (s, 3H, H-1), 1.68 (s, 6H, H-8 y H-9), 2.06 (m, 4H, H-4 y H-5), 4.13 (d ancho, 1H, J = 12.18 Hz, H-1), 5.01 (t, 1H, H-6), 5.41 (d, 1H, J = 12.15 Hz, H-2). C₁₀H₁₇DO EMIE 70 eV, m/z (rel. int.): 155 (M⁺ + 1) (18 %), 137 (18%) (M⁺ - 18), 123, 112, 94, 69 (100%), 68, 41.

Síntesis de geraniol pirofosfato deuterado

La preparación del ester pirofosfato de hizo con la técnica que se describe arriba para el GPP sin marcar, pero empleando geraniol deuterado. La purificación y caracterización de los productos fue también la misma.

5 Biotransformación

a) Experimentos de biotransformación

Para la biotransformación de GPP con cultivos de células, se utilizaron dos sistemas: cultivos de callos en suspensión al final de la fase de crecimiento exponencial (15 días de cultivo) y callos en crecimiento exponencial (10 días de cultivo) elicitados. Los cultivos elicitados se estimularon 12 horas antes de adicionar el sustrato. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento. Se utilizaron como testigos cultivos sin el sustrato. A cada matraz se le adicionaron 10 mg del sustrato disueltos en 1 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Esta solución se esterilizó por filtración con filtros *Millipore* de 0.45 μm . Los matraces se mantuvieron a 25 °C en agitadores orbitales a 100 r.p.m., condiciones de iluminación constante (0.5 watt/m²), en cámara de incubación a 25 °C \pm 1 °C.

En los experimentos para determinar el tiempo óptimo de reacción en el sistema que produce piquero, las células se cosecharon a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento; en el sistema elicitado se cosecharon a las 24, 48 y 72 horas. Tanto en los cultivos en suspensión como en el sistema inducido con elicitores, se determinaron tiempos óptimos de reacción y la concentración de sustrato que debe emplearse.

b) Aislamiento de cloroplastos

El procedimiento empleado para aislar cloroplastos intactos de *P. trinervia* se basó en la técnica reportada por Wickham y West (1992). Se hicieron algunas modificaciones al procedimiento. Se redujo la velocidad de agitación con respecto a los protocolos convencionales, de 2000 a 1500 g y se aumentó el tiempo de centrifugación de 5 a 10 minutos. El volumen del amortiguador de extracción se aumentó al doble y se mejoró la eficiencia de obtención de cloroplastos, enfriando el amortiguador a punto de nieve. Las hojas empleadas para la purificación de los organelos, se iluminaron, con el objeto de inducir la actividad de los cloroplastos.

Se aislaron cloroplastos de tres estadios de crecimiento de plantas de *P. trinervia*: brotes jóvenes (6 semanas) inducidos *in vitro*, plantas en crecimiento activo, cultivadas a partir de brotes y plantas en floración. En los tres casos, los cloroplastos se aislaron con el procedimiento siguiente: se cortaron 30 g de hojas, se lavaron con un poco de jabón y agua corriente y se pusieron bajo iluminación en agua helada, durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se cortaron en porciones de 1 cm² y se homogeneizaron (Polytron, 10 min). con 100 ml de amortiguador de extracción (Trizma-Base 50mM, 10 mM, pH7, 10mM de MgCl₂, 1 mM de MnCl₂, 2mM de NaEDTA, 0.33M sorbitol, 50mM de citrato de sodio y 1mM de DTT) enfriado a punto de congelación (entre 1 y 2 °C), durante 13 segundos. El homogenado fue filtrado a través de 8 capas de gasa y una de algodón, que habían sido previamente humedecidas con el amortiguador frío. Los cloroplastos fueron obtenidos por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos a 4 °C. El pellet fue resuspendido con ayuda de un pincel en el buffer de extracción.

c) Experimentos de biotransformación con cloroplastos

Los cloroplastos obtenidos de 30 g de hoja se suspendieron en 25 ml de buffer de fosfatos. Para los experimentos de biotransformación se emplearon matraces de 50 que contenían 12.5 ml de la suspensión de cloroplastos. A cada matraz se le agregaron 30 mg de GPP disueltos en 0.5 ml de (NH₄)₂CO₃, 10mM. Esta solución se esterilizó por filtración con filtros *Millipore* de 0.45 µm. Los matraces se mantuvieron en agitación orbital a 100 r.p.m., bajo iluminación constante (0.5 watt/m²) a 25 °C, durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción por congelación.

d) Análisis cuantitativo y cualitativo de piquerol y piquerinol

Muestras auténticas

Para tener muestras de referencia de piquerol, se aisló la sustancia de plantas silvestres de *P. trinervia*. Las plantas se dejaron secar, se separaron hojas y flores. 400 g de este material se empacaron en una columna de vidrio y se agregó el agua destilada necesaria para cubrirlo. Después de dos días el agua se recuperó. Al extracto acuoso se hicieron dos extracciones con CH₂Cl₂. El extracto se secó con Na₂SO₄ y se concentró en rotavapor a 60 °C. En el extracto, cristalizó primero un diterpeno, el Trinervinol, que fue retirado por filtración, después se obtuvo el piquerol en forma de pequeños cristales transparentes e incoloros. La presencia de piquerol se confirmó por estudios de masas y resonancia magnética nuclear.

El piquerinol se obtuvo de cultivos elicitados de acuerdo con la metodología antes descrita (en 3).

Análisis cualitativo

La presencia de piquerol y piquerinol se detectó por cromatografía de capa fina. Los cromatofolios (sílica gel) se eluyeron en con una mezcla de hexano-acetato de etilodloruro de metileno, 5:3:2. Las muestras fueron re-disueltas con cloroformo, se aplicó en la placa 100 µg de cada muestra. Las placas se revelaron con CeSO_4 al 1%, disuelto en ácido sulfúrico 1N.

Análisis cuantitativo

Para la cuantificación de piquerol y piquerinol de los diferentes órganos de la planta y de los cultivos en suspensión y cultivos elicitados, se tomaron 10 g de tejido se molieron con nitrógeno líquido en un mortero. Después se hicieron tres extracciones por agitación (15 min) con 25 ml de cloroformo. Los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se concentraron en un rotaevaporador a 60 °C. Por último se tomó una muestra para su análisis en cromatografía de capa fina y HPTLC.

La extracción de los productos de biotransformación se hizo con el siguiente procedimiento. Transcurrido el tiempo de reacción, las células[en promedio, 11.6 g de células por matraz (peso fresco), para las células en suspensión; y 11.8 g de células por matraz (peso fresco) para los cultivos elicitados], se filtraron a través de una malla de acero inoxidable de 200 mesh, se enfriaron con nitrógeno líquido y se molieron en un mortero, después de hizo una extracción por agitación (15 min) con 50 ml de cloroformo. En el sistema elicitado se hicieron también dos extracciones al medio de cultivo, con 25 ml de cloroformo y se juntaron los extractos de células y medio provenientes del mismo matraz. Los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se concentraron en un rotaevaporador a 60 °C. Por último se tomó una muestra para su análisis en cromatografía de capa fina y HPTLC.

En el caso de las biotransformaciones con cloroplastos, la mezcla de reacción se descongeló y se hizo una extracción con 20 ml de cloroformo, por agitación durante 15 minutos. Los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y se concentraron en un rotaevaporador a 60 °C. Por último se tomó una muestra para su análisis en cromatografía de capa fina y HPTLC.

La concentración de piquerol y piquerinol en las muestras vegetales se determinó por fue determinado por cromatografía de capa fina de alta resolución (densitometría), usando un aparato CAMAG III. La longitud de UV empleada fue de 210 nm para piquerol y 207 nm para piquerinol. Las placas (sílica gel SIL 60F₂₅₄, 2mm) fueron corridas con éter de petróleo- EtOAc-CH₂Cl₂ (5:3:2) en una cámara horizontal. Las muestras fueron redisueltas con cloroformo, se aplicó en la placa 100 µg de cada muestra, y cada medición se hizo por triplicado. El valor de Rf de piquerol y piquerinol fue de 0.17 y 0.28, respectivamente. La concentración de las sustancias en las mezclas fue calculada en relación con estándares de concentración conocida purificados en nuestro laboratorio.

e) Cuantificación de clorofila

La concentración total de clorofila en los extractos de acetona al 80% de los callos de *P. trinervia* fueron calculados de acuerdo con el procedimiento espectrofotométrico de Porra *et al.*, 1989.

f) Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína realizada a los experimentos de biotransformación se hizo de acuerdo con la técnica de Lowry *et al.* (1978), aplicada a 100 µl de muestra, tomada de una solución de 100 mg de tejido disuelto en 2.4 ml de agua destilada. Se tomó muestra por triplicado y se hicieron tres mediciones de cada una. Se utilizó una curva patrón con albúmina de bovino empleando concentraciones entre 12.5 y 100 µg/ml.

6 Ensayos enzimáticos

Se hicieron pruebas para detectar actividad de monoterpeno-ciclasas en diferentes tejidos de la planta: cultivos en suspensión elicitados, hojas de brotes jóvenes, hojas de plantas cultivadas en suelo, y flores individuales. 20g de tejido se maceraron con nitrógeno líquido en la presencia de 60 ml de un amortiguador de extracción preparado con: 20 mM de MES, pH 6.3, 150 mM de sacarosa, 9 mM de citrato de sodio, 5 mM de Na₂S₂O₅, 5 mM de ditriitol y 5 mM de KH₂PO₄. La mezcla se filtró en una malla de 20 µm y se centrifugó durante 15 minutos a 15 000 g. Una concentración final de proteína de 100 µg fue adicionada a 1 ml de una mezcla de reacción que contenía 33mM de MES³, 7mM de fosfato de sodio, pH 6.3, 20 mM de MgCl₂ y 1 mM de ditriitol y 10 % de glicerol. Antes de agregar el sustrato se

³ MES = ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

adicionó 1 ml de pentano para evitar que se evaporaran los monoterpenos. Se inició la reacción con la adición de 10 mM de GPP deuterado y se mantuvo a 32 °C en agitación orbital suave (50 rpm). La reacción se paró por agitación vigorosa. La mezcla se enfrió, se extrajo el pentano y se hicieron 3 extracciones con cloroformo (1, 0.7 y 0.7 ml). El extracto se concentró a temperatura ambiente y se analizó por espectroscopia de masas.

VII.- Resultados y discusión

1 Cultivos

a) Organogénesis

Se decidió propagar a la planta por organogénesis somática porque ésta resultó ser la forma de cultivo *in vitro* que tiene mayor concentración de piquero (ver más adelante). La propagación de *P. trinervia* por organogénesis somática ya ha sido descrita (Hernández, 1996), pero fue necesario mejorar esta técnica de cultivo, porque con el protocolo reportado el porcentaje de sobrevivencia resultó muy bajo. Las variables con influencia en este sistema de propagación fueron las siguientes: edad del explante, tipo de explante y sistema de enraizamiento.

Para la formación eficiente de brotes resultó decisivo trabajar con explantes de plantas jóvenes, de 2 meses de edad o menos, a medida que la edad de las plantas aumentó, disminuyó el porcentaje de formación de brotes. Se obtienen brotes a partir de nudos, si se emplea tallo con o sin hojas. Aunque se obtiene mayor biomasa de brotes cuando se emplean tallos con hojas, se tienen también mayores problemas de oxidación y un porcentaje muy bajo de sobrevivencia en invernadero (48%). La oxidación de explantes en este sistema se debe en buena medida a la presencia de hojas en el explante, las cuales al contacto con el medio de cultivo crecen mucho, después de un tiempo se oxidan y oscurecen el medio de cultivo, razón por la cual es necesario transplantar los brotes de forma prematura. El trasplante ocasiona que se dañen las raíces aún muy delgadas que han empezado a desarrollarse espontáneamente, por lo que es necesario aplicar un tratamiento de enraizamiento y las raíces que se desarrollan por acción de ácido indol acético (AIA) no resultan funcionales en un 70% de los casos. Cuando se utiliza tallo sin hojas como explante, esto no ocurre, las plantas pueden permanecer en el frasco de 6 a 8 semanas sin que aparezcan problemas de oxidación, así pueden terminar de desarrollarse raíces funcionales, el proceso es más eficiente, rápido y económico, porque no es necesario aplicar un tratamiento de enraizamiento y la sobrevivencia obtenida es de 89%.

Las plantas se cultivaron con medio nutritivo y bajo condiciones de invernadero, para garantizar un estado fisiológico similar en todos los experimentos.

b) Cultivo de células en suspensión

Generamos la metodología para inducir el desarrollo de callos de *P. trinervia*, en un trabajo previo (Saad, 1996). Empleando esta técnica se obtiene [en medio-MS (Murashige y Skoog 1962), adicionado con ANA (1 mg/l) y BAP (1 mg/l), usando entrenudos como explantes], un callo verdoso, compacto, de rápido crecimiento. En tres semanas, 90% de los explantes generan, en promedio, 3.4 g de callo por frasco.

Este callo acumula cantidades variables de piqueroI que van de 1.3 a 6.3×10^{-3} mg/g (peso seco). Se busco algún parámetro fácilmente detectable que correlacionara con la capacidad del cultivo para producir piqueroI. Con esta intención, se midió concentración de clorofila y de piqueroI a todas a las líneas celulares obtenidas. Se encontró que los callos que contienen menos de 5.7 mg/g (peso seco) de clorofila, no acumulan ninguna cantidad detectable de piqueroI, mientras que callo con 8.7 mg/g, produce 3.0×10^{-3} mg/g (peso seco) de piqueroI A. En esta especie, igual que en otras reportadas (Banthorpe *et al.*, 1986; Croteau *et al.*, 1987; Lewisohn *et al.*, 1994) se requiere cierto grado mínimo de diferenciación (tejido con abundantes cloroplastos), para que la síntesis de terpenos se presente.

Para establecer el cultivo en suspensión, se empleó sólo callo que contenía 8 mg/g (peso seco) de clorofila o más (el 25% de las líneas celulares). Empleando callo de seis semanas, se generó un cultivo semi-disgregado, formado por pequeños callos esféricos con núcleos verdes, con una tasa específica de crecimiento de 1.84 g/día/l (peso seco) y un tiempo de duplicación de 7 días. Este callo puede generar plantas completas si se cultiva en las condiciones apropiadas. El cultivo en suspensión acumula piqueroI A (entre 1.7 y 2.1×10^{-2} mg/g, peso seco), durante la fase de crecimiento exponencial.

c) Cultivos elicitados de células en suspensión

La técnica para establecer cultivos elicitados también la desarrollamos con anterioridad (Saad, 1996). Habíamos encontrado que ocho especies de hongos aisladas de tejidos de plantas silvestres de *P. trinervia* pueden inducir respuesta de defensa en los cultivos en suspensión de la planta. Sólo habíamos hecho una determinación parcial de las cepas, en esta ocasión la determinación se hizo hasta especie. Las cepas que pueden emplearse como elicitores son: *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) G. A. De Vries, *Phoma macdonaldii* Boerema, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keills, *Rizoctonia solani* Kühn, *Fusarium poae* (Peck) Wollenw, *Fusarium moniliforme* Sheldon, *Helminthosporium pedicellatum* A. W. Henry y *Phaeoilmoyces elegans* (Corda) E. Manson & S. J. Hughes.

En este estudio, los cultivos fueron inoculados con homogenados de micelio de *Fusarium moniliforme*, para inducir respuesta de defensa, se eligió este hongo porque no es capaz de infectar a la planta y es el inductor más eficiente de respuesta de defensa en los cultivos. Las cepas de este hongo se adaptaron muy bien al cultivo líquido, alcanzaron un tiempo de duplicación de 13 h y se obtuvieron 2.6 g de micelio (peso seco) por día en cada litro de cultivo. Se requirieron sólo 0.8 mg de micelio seco para inducir la producción de 1.6 mg de Piquerol por día en 50 ml de cultivos en suspensión de *P. trinervia*. Igual que en otros sistemas inducidos con elicitores (Chappell y Nable, 1987; Ren y West, 1992), la respuesta de defensa del cultivo puede ser inducida eficientemente en cualquier momento durante la etapa de crecimiento exponencial.

Los terpenos pertenecen al grupo de metabolitos que son expresados pobremente en cultivos *in vitro*. En general los cultivos de células vegetales no producen terpenos o lo hacen en concentraciones muy bajas. No obstante, hay excepciones notables, algunos investigadores han reportado altos rendimientos de cultivos volátiles en cultivos de células (Ishiguro *et al.*, 1995; Carrier *et al.*, 1998). Tales cultivos representan una valiosa herramienta de investigación. (Nabeta *et al.*, 1990; Alfermann, 1980). La biosíntesis de monoterpenos ha sido previamente reportada en callos y en cultivos de raíces transformadas (Banthorpe *et al.*, 1986; Hilton *et al.*, 1995). También han sido usados elicitores fúngicos para estimular la síntesis de terpenos en este tipo de sistemas de cultivo, por ejemplo: monoterpenos y diterpenos en Pinaceae (Croteau *et al.*, 1987; Lewinson *et al.*, 1994); fitoalexinas diterpénicas en gramíneas y en *Ricinus communis* (Bruce y West, 1982; Ren y West, 1992; Wichham y West, 1992); y sesquiterpenos en solanáceas (Chappell y Nable, 1987; Fucchini y Chappell, 1992). La mayor parte de los estudios que se han efectuado para producir monoterpenos con cultivos elicitados son de gimnospermas (Blodgett y Stanosz, 1997) (Steele *et al.*, 1995), en particular, se ha inducido la producción de los monoterpenos constituyentes de la oleoresina de las coníferas (Lewinsohn *et al.*, 1993; Steele *et al.*, 1998). Hasta donde sabemos, este es el primer sistema que produce monoterpenos en cultivos de células en suspensión de angiospermas.

En los cultivos elicitados se excretan al medio de cultivo cuatro nuevas sustancias que no están presentes en los cultivos no elicitados, se ha comprobado ya la naturaleza fungistática de estas sustancias (Saad, 1996). El compuesto más abundante en el extracto crudo CHCl_3 del medio de cultivo, presenta un R_f idéntico al piquerol A¹ (0.23, éter de petróleo-EtOAc, 7:3), aquí se estandarizó la técnica de purificación de esta sustancia y se determinó su naturaleza química. Resultó ser un

¹ En los cultivos en suspensión inducidos con elicitores no se detecta la presencia de piquerol A.

nuevo monoterpreno: el 7 dimetil (4,1,0) bicicloheptano 3-metil 2,4 dihidroxi, el cual fue llamado piquerinol. Los tres compuestos remanentes tienen polaridad más alta y su identidad está siendo estudiada.

2 Aislamiento y caracterización del piquerinol²

El piquerinol fue aislado por cromatografía de columna del extracto CHCl_3 del medio del cultivo elicitado (Fig. 14). Su espectro de masas (Ionización Química) mostró el $\text{M}^+ + 1$ en m/z 169, que está de acuerdo con la fórmula $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$. Fragmentos de m/z 151 y 133 indican pérdida subsecuente de dos moléculas de agua. El espectro ^{13}C RMN y el experimento DEPT NMR indicaron la presencia de 2 CH_2 , 2 CH_3 y 4CH. Además la presencia de un metileno exocíclico fue deducida por las señales en δ 109.8 ($=\text{CH}_2$) y δ 147.6 (C=), así como por las señales ^1H RMN en δ 4.70 (t, 2H, $J=2.1\text{Hz}$). Un metileno alifático fue también deducido de señales en δ 2.95 (ddt, 1H, $J=2.1, 9.6$ y 19.6) y δ 2.39 (dq, 1H, $J=2.5, 5.0$ y 19.0 Hz), las cuales fueron asignadas a los H-3. Las señales correspondientes para C-3 aparecieron en δ 35.8. En el espectro ^1H RMN dos señales en δ 4.36 (dt, 1H, $J=3.0$ y 9.6 Hz) y 3.73 (s, 1H) fueron asignadas a H-4 y H-7. Los desplazamientos químicos de C-4 y C-7 (76.6 y 74.6, respectivamente) indicaron que cada uno de estos carbonos soporta un grupo hidroxilo. La presencia de estos fue evidenciada por dos singuletes (D_2O exch.) en δ 1.90 y 1.22. Los H-1 y H-5 en la cabeza del puente fueron asignadas a las señales en δ 2.51 (ddt, 1H, $J=9.0$ Hz) y 2.26 (dd, 1H, $J=3.6$ Hz, $J=6.0$ Hz), mientras sus carbonos correspondientes, C-5 and C-1, aparecieron en δ 54.3, y 58.8, respectivamente. Un carbón cuaternario en δ 38.9 (C-6) el cual soporta dos metilos, δ 1.58 (s, 3H, Me-8) y 1.05 (s, 3H, Me-9), fue revelado. Las constantes de acoplamiento de protones entre H-7 ($\delta=3.73$) y la resonancia de protones en $\delta=2.51$ (H-1) y 2.26 (H-5) son muy pequeñas, con un rango de torción aproximado de 90° . La configuración de C-7 y C-4 fue establecida con la información obtenida en los experimentos NOEdiff y NOESY. La estructura del 2-metilen-6-6- dimetilbicyclo (3,1,1) heptano-4,7 -diol o dihidroxi - β -pineno, fue completamente confirmada por los datos obtenidos con los experimentos HMQC y HMBC (Fig. 15).

² Los espectros de RMN de todos los productos analizados en esta investigación aparecen en el Apéndice.

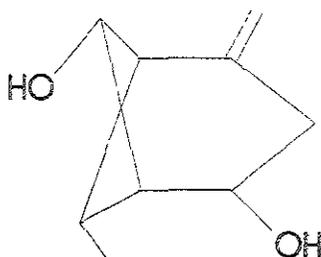


Fig. 14.- Estructura del piquerinol

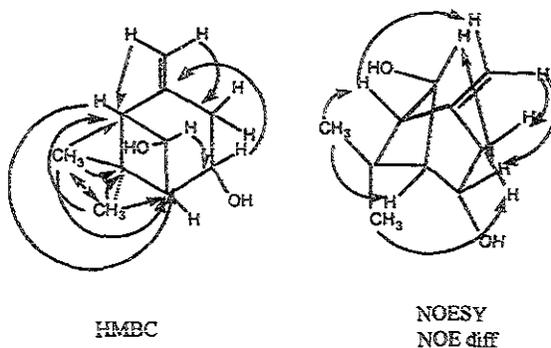


Fig. 15. Interacciones $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (^3J) obtenidas en el experimento HMBC e interacciones $^1\text{H} - ^1\text{H}$ en NOEdiff, NOESY

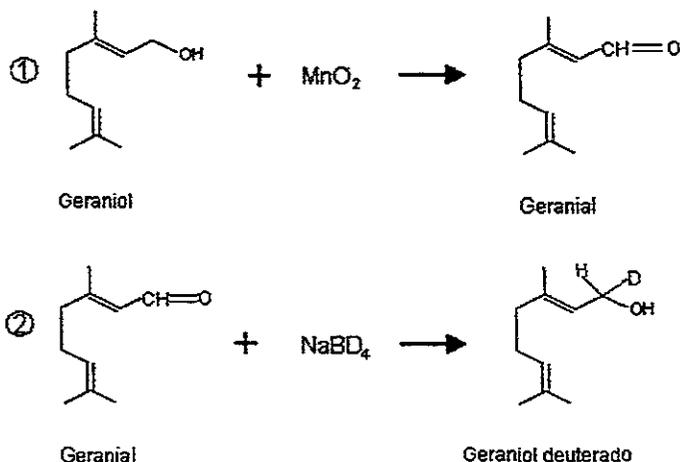
3 Síntesis de Geranil Pirofosfato

Para la síntesis de geranil-pirofosfato, se partió de la técnica descrita en la literatura (Cramer y Böhm, 1959; Cramer y Weiman, 1960; Cramer *et al.*, 1962). No obstante, muchos pasos y condiciones de reacción no están incluidas, por lo cual, para asimilar esta técnica, en cada etapa de la síntesis se optimizaron temperaturas, tiempos de reacción, solventes y sistemas de detección y purificación de los productos. Fue necesario también, sintetizar varios de los reactivos que se requieren porque no se encuentran disponibles en el mercado, tal fue el caso del MnO_2 , el ácido ortofosfórico cristalino y del bis (triethylamonio) fosfato. Finalmente se logró la síntesis del GPP mediante la optimización de seis pasos secuenciados (Fig. 16): oxidación de geraniol, purificación de geranial, reducción de geranial, purificación de geraniol, fosforilación del geraniol y purificación del GPP. Todos los pasos se describen detalladamente en la metodología.

La síntesis del GPP deuterado puede dividirse en dos grupos de actividades, las necesarias para marcar el sustrato con deuterio y las involucradas en la adición del pirofosfato. La síntesis de GPP involucró sólo el segundo grupo de actividades.

a) Marcaje del GPP con deuterio

La obtención de geraniol deuterado involucró dos reacciones: la oxidación de geraniol (Fórmula 1) y la reducción de geranial con un reactivo que contiene deuterio, el $NaBD_4$ (Fórmula 2).



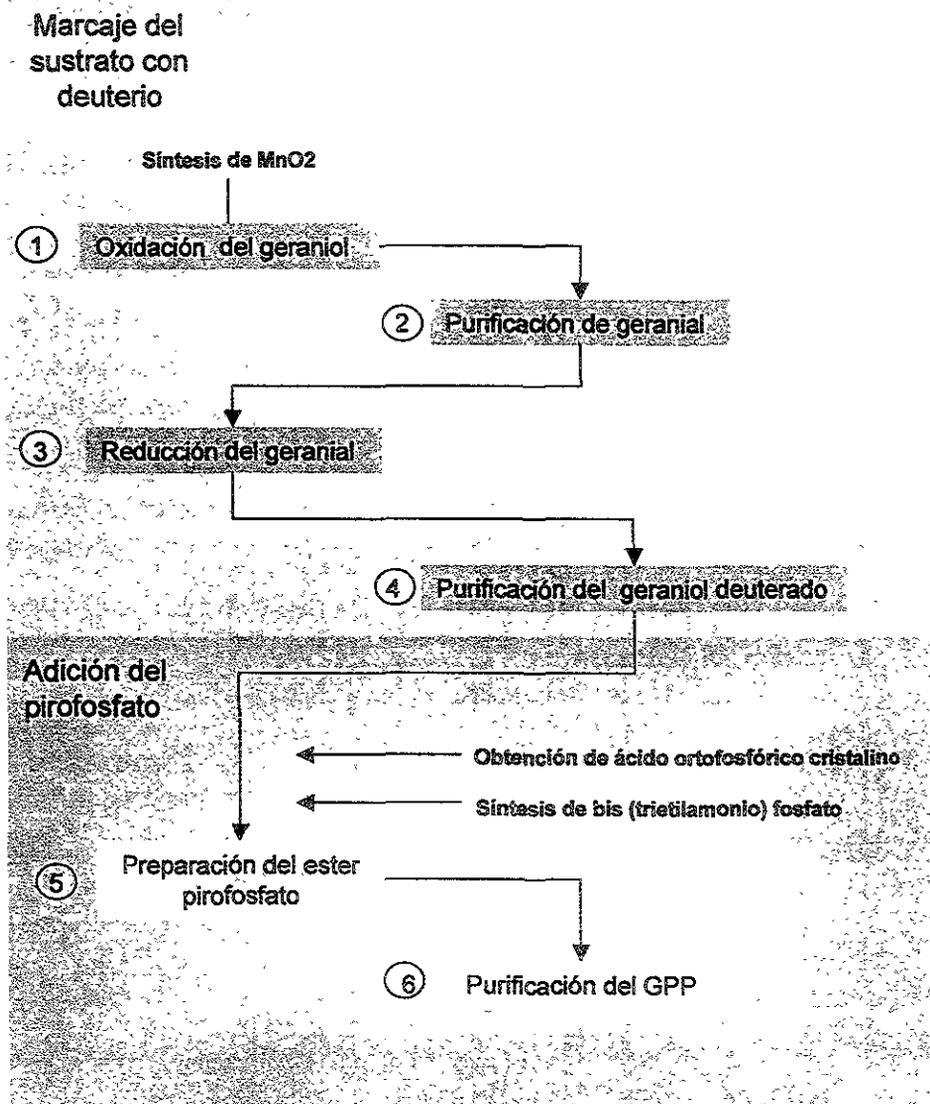


Fig. 16.- Proceso de síntesis de geranyl pirofosfato

La identidad del geranial se comprobó por el cambio de las propiedades físicoquímicas de la sustancia: disminución de polaridad, absorbancia en el ultravioleta cercano, color morado de la mancha en cromatografía de placa fina; y la aparición de una señal en 10.0 en ^1H RMN, que evidenció la presencia de un aldehído.

En general, la reducción del geranial se hizo de acuerdo con la técnica reportada por Croteau *et al.* (1994), pero se hicieron algunas modificaciones: se hizo un escalamiento de la reacción al doble ³, se optimizó el tiempo óptimo de reacción, se aumentó la proporción de solvente empleado en las extracciones, la mezcla de solventes se concentró en rotavapor a 40 °C y se eluyeron dos veces las placas de cromatografía preparativa de sílica gel, para la purificación del geraniol deuterado. Al final se obtuvo un rendimiento de 88% de geraniol deuterado y una pureza mayor al 90% (la sustancia es más pura que la presentación comercial del geraniol). La identidad del producto deuterado se verificó por el R_f del producto, que es idéntico al del geraniol comercial de 0.16. (sílica gel, hexano-acetato de etilo 9:1 y por pruebas de ^1H RMN y de espectroscopía de masas. En ^1H RMN en la señal de 4.13 ppm se ve el intercambio de uno de los hidrógenos por deuterio y en el espectro de masas se detectó la presencia de un ión molecular de 154 m/z, que es el peso molecular del geraniol deuterado.

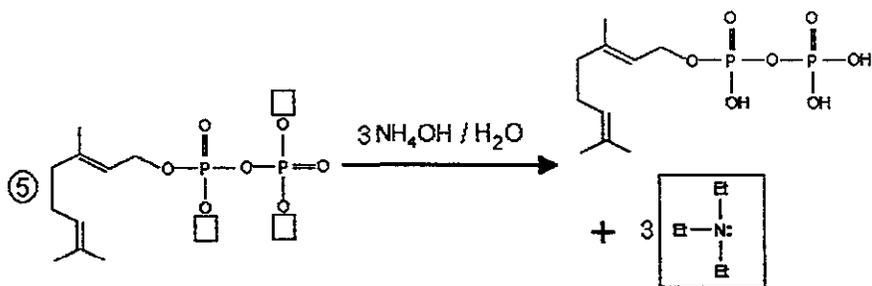
b) Adición del pirofosfato

La fosforilación del geraniol se efectuó en general con el método descrito por (Croteau *et al.*, 1994), sólo que la síntesis se escaló al doble y se establecieron las condiciones óptimas de reacción. Se obtuvo un rendimiento final de 65%.

La presencia del GP y GPP se confirmó por que presentan el mismo R_f reportado en la bibliografía (Cramer y Böhm, 1959): 0.75 para GP y 0.67 para GPP (sílica gel, n-propanol: NH_3 : amonio: agua, 6:3:1; dos aplicaciones de 1 μl por muestra), porque son solubles en agua y por espectros de ^1H RMN. Tanto para GP como para GPP, hay un desplazamiento de las señales a la derecha, por la presencia de los fosfatos. La señal de 4.29 ppm, se vuelve notablemente más ancha. La diferencia entre el monofosfato y el difosfato se hace evidente por una complejidad mayor de las señales en el caso del GPP.

La esterificación directa del ácido pirofosfórico es extraordinariamente lenta. Esta ausencia de reactividad del ácido fosfórico se debe probablemente al hecho de

³ Se duplicó la cantidad de los reactivos para que obtener suficiente producto para la fosforilación.



Se emplea tricloro-acetonitrilo (Cl_3CCN) porque bajo la acción de grupos nitrilo el ácido fosfórico puede ser esterificado por alcoholes. Se propone un mecanismo de reacción en la Fig. 17. La presencia de Cl_3CCN hace la reacción rápida y cercanamente cuantitativa. El intermediario probable es un imidoil- fosfato, el agente condensante rinde el agente fosforilante por reacción con el anión fosfato. El intermediario imidoil- fosfato, reacciona con el geraniol para dar un monoester, el cual, por intervención de otro imidoil- fosfato, produce el pirofosfato.

4 Biotransformación

a) Niveles básicos de síntesis

En primer lugar se cuantificaron las concentraciones basales de piquerol y piquerinol en plantas silvestres y plantas cultivadas y en los diferentes tipos de cultivo *in vitro* de *P. trinervia*: brotes, callos y cultivos en suspensión (Tabla 11). La presencia de piquerol sólo en tallos y hojas, sugiere la necesidad de tejidos fotosintéticos para que se efectúe la síntesis de este monoterpene. Los brotes jóvenes tienen bajos niveles de síntesis en relación con los tejidos productores de plantas silvestres. El grado de desarrollo de los plastidios parece tener influencia en los niveles de síntesis de monoterpenos porque influye en la formación y orientación de enzimas y posibles transportadores (Reil y Berger, 1997).

Se midió también la concentración de piquerinol en los cultivos elicitados a diferentes tiempos después de la inducción. Es notable que la concentración de piquerinol es dos ordenes de magnitud mayor a la presentada por el piquerol en los cultivos en suspensión. La maquinaria biosintética de monoterpenos se encuentra a menudo localizada en estructuras glandulares especializadas, en particular en los plastidios de estos órganos. Por lo cual, la complejidad y estructura de los ductos,

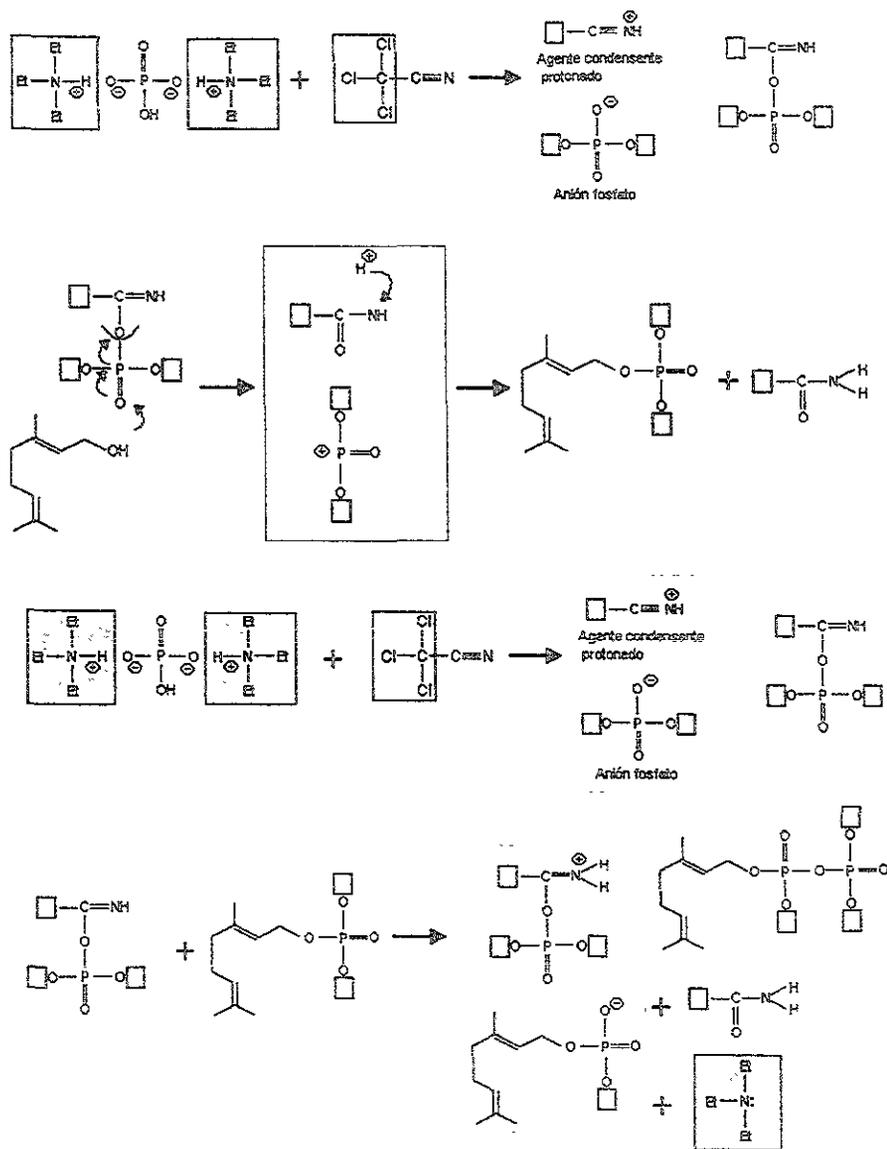


Fig. 17.- Mecanismo de la reacción de adición de pirofosfato al geraniol

cavidades, glándulas y tricomas determina, en alguna medida, el nivel de la producción. La falta de estas estructuras en los cultivos en suspensión es la principal causa de los bajos niveles de acumulación de monoterpenos en estos sistemas, porque ante la carencia de órganos especializados para el almacenamiento de aceites, no se acumulan terpenos, debido probablemente a la degradación endógena (catabolismo) de los productos recién formados. La existencia de cavidades secretoras extracelulares parece ser un prerrequisito para la producción de estas sustancias (Savage *et al.*, 1996). En cambio, las sustancias de defensa como el piquerinol se producen para excretarse y por ello pueden recuperarse en el medio de cultivo (Banthorpe *et al.*, 1986 ; Reil y Berger, 1997).

Tabla 11.- Producción de piquerol y piquerinol en plantas silvestres, plantas cultivadas, callos, cultivos en suspensión y cultivos elicitados

Tejido	Piquerol mg /g (peso seco)
Plantas silvestres	
Raíz	No detectado
Tallo	1.15000
Hojas	2.22000
Brotos jóvenes	0.31600
Hojas de plantas cultivadas	2.32000
Callos	0.00633
Cultivo en suspensión día 10	0.01700
Cultivo en suspensión día 15	0.01640
	Piquerinol mg /g (peso seco)
Cultivos elicitados	
24 h	1.97905
48 h	5.92303
72 h	0.72104

Para poder comparar los resultados de biotransformación de GPP en cloroplastos, los cuales se presentan en g de producto por mg de proteína, con los otros sistemas celulares, se determinó concentración de proteína en hojas, flores, cultivos en suspensión y cultivos elicitados de *P. trinervia* (Tabla 12). Resulta notable que las hojas jóvenes y las flores presentan una concentración de proteínas de más del doble que la que hay en la mayoría de los sistemas restantes, reflejo probable de una actividad metabólica mucho mayor. Lo contrario ocurre con los cultivos elicitados la concentración de proteínas disminuye paulatinamente a partir de la inducción, hasta llegar a poca más de un tercio de la concentración original. La actividad metabólica

durante la respuesta de defensa, es indiscutiblemente alta, lo que sucede es que se están exportando proteínas, tal vez relacionadas con la defensa, al medio de cultivo.

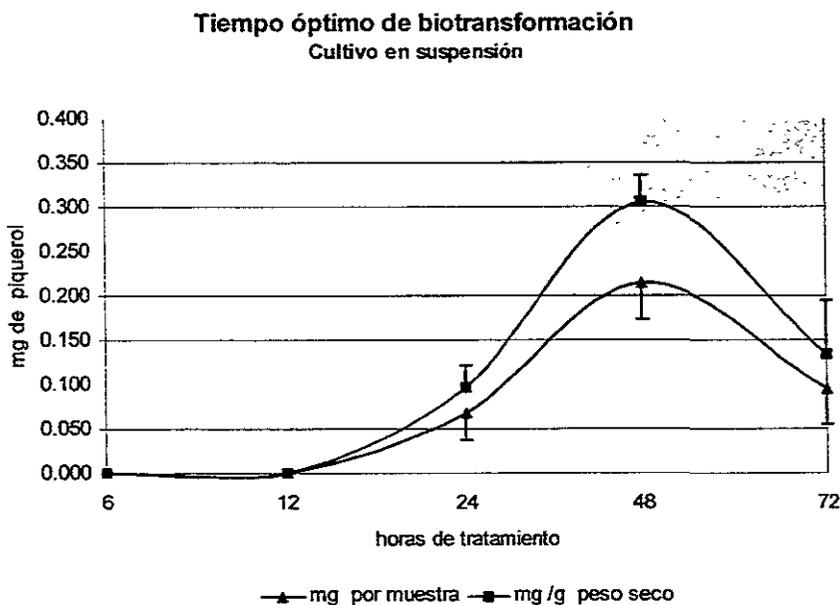
Tabla 12.- Concentración de proteínas en diferentes órganos y cultivos de *P. trinervia*

Sistema celular u órgano	Concentración mg/g
Cloroplastos de	
Brotos	9.3
Plantas jóvenes	15.9
Plantas en floración	14.2
	mg/g
Células en suspensión	15.7
Hojas jóvenes	38.8
Hojas maduras	14.1
Flores	38.4
C. elicidadas	
12 h	12.4
24 h	6.1
48 h	4.7
	mg /litro medio
Medio de cultivo 24h	394.0
Medio de cultivo 48 h	273.6

La concentración de proteína se determinó con la técnica de Lowry *et al.*, 1978.

b) Biotransformación de GPP por cultivos en suspensión

El primer experimento se realizó para determinar el tiempo óptimo de reacción para la producción de piquerol en cultivos en suspensión. Se tomaron muestras a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de reacción. La presencia de piquerol se hizo evidente a partir de las 24 horas y alcanzó su máximo nivel a las 48 horas, para caer después rápidamente (Fig. 18). Aparentemente el catabolismo de estas sustancias es muy alto, porque los niveles de producto no se mantienen ni siquiera 24 horas y después de dos días la sustancia ya no se detecta. El tiempo óptimo de biotransformación encontrado tiene una magnitud intermedia para un sistema de células vegetales, ya que los tiempos de reacción para las transformaciones con estos cultivos, varían desde unas cuantas horas (6, 9 ó 12) hasta quince o 20 días.



Los valores son promedios de 3 repeticiones

Fig. 18.- Tiempo óptimo de biotransformación de GPP en piquerol, en los cultivos de células en suspensión

El análisis de las muestras en densitometría evidenció que el sustrato (GPP) adicionado aumentó la síntesis de piquerol en los cultivos de forma importante (Tabla 13). Obteniéndose a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento, una concentración de piquerol 5.7, 17.9 y 7.9 veces superior en relación con los testigos, respectivamente. Con lo cual se comprobó la primera de nuestras hipótesis de trabajo. La alimentación de GPP, aumento la acumulación de piquerol porque los cultivos tienen monotерpeno ciclasas activas.

La densitometría como técnica de medición resulta muy adecuada para este sistema porque permite medir rápidamente una gran cantidad de muestras. Si se hace un número suficiente de repeticiones, al menos tres para cada muestra pueden obtenerse un error estándar bajo. No existe posibilidad de que las mediciones confundan a los dos terpenos piquerol y piquerol porque en el sistema empleado [éter de petróleo- EtOAc-CH₂Cl₂ (5:3:2)] se separan bien, el valor de R_f de piquerol y piquerol fue de 0.17 y 0.28, respectivamente. Tampoco puede confundirse a los productos con el sustrato, aunque el GPP absorbe en el ultravioleta en 200 nm y el piquerol y piquerol en 207 y 210 nm, respectivamente, el GPP es una sustancia

muy soluble en agua (el medio en que se realizan las biotransformaciones es acuoso) y no es extraída por el cloroformo, que es la sustancia empleada para extraer al piquerol y piquerinoí, además, el GPP no corre con la solución eluyente empleada.

Tabla 13.- Producción de piquerol en diferentes tiempos después de la adición del GPP¹ a los cultivos en suspensión²

Tiempo de reacción	mg/ muestra	mg /g peso fresco	mg /g peso seco	mg/g proteína
Células en suspensión sin GPP ³	0.01190	0.00103	0.01700	0.06535
6 h	nd*	nd	nd	nd
12 h	nd	nd	nd	nd
24 h	0.06769	0.00584	0.09670	0.37169
48 h	0.21343	0.01840	0.30490	1.17194
72 h	0.09425	0.00812	0.01346	0.51751
96 h	nd	nd	nd	nd

¹ Se adicionaron 10 mg de GPP por matraz

² Se emplearon células en suspensión de 10 días

³ Se emplearon testigos para cada tiempo de reacción, pero aparece un solo valor porque la concentración del piquerol en los cultivos en suspensión no varía entre el día 10 y el día 14 de cultivo.

* no detectado

Tabla 14.- Concentración óptima de sustrato para la obtención de piquerol por biotransformación en cultivos de células en suspensión¹

GPP ² mg	mg por muestra	mg /g peso fresco	mg /g peso seco	mg/g proteína
Células en suspensión sin GPP ³	0.01190	0.00103	0.01700	0.06535
10	0.19156	0.01651	0.27365	1.05183
20	0.19836	0.01710	0.28336	1.08917
30	0.28797	0.02482	0.41138	1.58121

¹ Se emplearon células en suspensión de 10 días

² Se adicionaron 10 mg de GPP por matraz

³ Se emplearon testigos para cada tiempo de reacción, pero aparece un solo valor porque la concentración del piquerol en los cultivos en suspensión no varía entre el día 10 y el día 14 de cultivo.

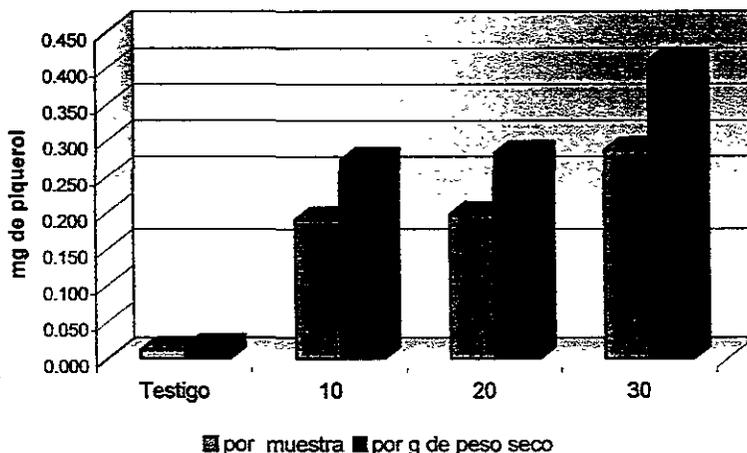
En cuanto al sustrato, no fue necesario realizar pruebas de toxicidad porque se trata de una sustancia que la planta produce y como es soluble en agua, no fue necesario emplear solventes orgánicos. Se probó con 10, 20 y 30 mg de sustrato, se obtuvieron los mejores resultados con 30 mg de GPP (Tabla 14). La acumulación de piquerol cuando se adicionó esta cantidad de sustrato fue 24.2 veces mayor en

relación con los testigos (Fig. 19). No obstante, el rendimiento total es muy bajo, sólo se convierten en piquerol 0.31 mg de los 10 mg del sustrato adicionado (Tabla 15).

Tabla.15.- Eficiencia de transformación de piquerol en cultivos en suspensión

Experimento	Condiciones	mg por muestra	Testigo mg por muestra	Diferencia
1	24 h	0.06769	0.01190	0.05579
	48 h	0.21343	0.01190	0.20153
	72 h	0.09425	0.01190	0.08235
3	10 mg de GPP	0.19156	0.01190	0.17966
	20 mg de GPP	0.19836	0.01190	0.18646
	30 mg de GPP	0.28797	0.01190	0.27607

Concentración óptima de sustrato
Cultivos en suspensión



Los datos son promedio de tres repeticiones

Fig. 19.- Concentración óptima de sustrato para la biotransformación de GPP en piquerol en cultivos de células en suspensión

Como el pirofosfato no se incorpora al producto, sólo deben considerarse el 49 % del GPP adicionado. La eficiencia de transformación es de cualquier forma muy baja, la

producción de piquerol empleando la concentración más alta de sustrato, 30 mg de GPP (0.411 mg/g de biomasa seca), es inferior a los niveles encontrados en plantas completas (Tabla 11). La transformación tan pobre de GPP en piquerol pueden deberse a la combinación de tres circunstancias: una concentración muy baja de las enzimas en los cultivos en suspensión, la aportación del sustrato a varios productos (algunos tal vez volátiles) y el catabolismo muy rápido de los monoterpenos, ante la falta de estructuras especializadas de almacenamiento en los cultivos *in vitro*.

c) Biotransformación de GPP por cultivos elicitados

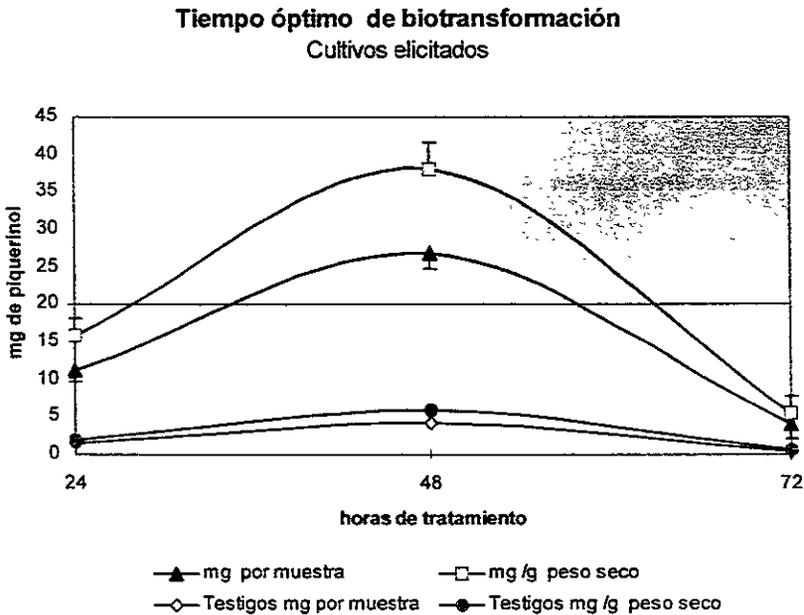
En base a los resultados de biotransformación de GPP en los cultivos en suspensión, el experimento para determinar tiempo óptimo de reacción en el sistema elicitado, se efectuó sólo con 24, 48 y 72 horas de reacción. Con estos tiempos se obtuvieron producciones 8.8, 6.4 y 7.7 veces mayores en relación con los testigos, respectivamente. En este caso, sí hay diferencias notables en la producción básica de piquerinol a las 24, 48 y 72 h después de la inducción; por tanto, la eficiencia de transformación para cada tiempo de reacción, tiene que compararse con valores distintos (Tabla 16). El aumento de piquerinol a las 48 horas, es el más bajo porque la mayor acumulación del producto en los cultivos elicitados sin tratar, se da a las 48 horas y el nivel básico de síntesis es muy alto, pero en este tiempo de tratamiento

Tabla 16.- Producción de piquerinol en cultivos elicitados de *P. trinervia* a diferentes tiempos después de la adición de GPP ¹

Tiempo	mg por muestra	mg /g peso fresco	mg /g peso seco	mg/g prot.
Células elicitadas sin GPP 24 h	1.40	0.12	1.98	9.55
Células elicitadas sin GPP 48 h	4.19	0.36	5.92	28.59
Células elicitadas sin GPP 72 h	0.51	0.04	0.72	3.48
24 h	11.20	0.95	15.82	76.37
48 h	26.88	2.28	37.97	183.24
72 h	3.94	0.33	5.56	26.85

¹ La adición del sustrato se hizo 12 h después de la inducción; se adicionaron 10 mg de GPP. Los resultados son promedio de tres repeticiones

ocurre la mayor acumulación del monoterpene. El resultado fue similar al encontrado con cultivos en suspensión, el tiempo óptimo de reacción es 48 horas (Fig. 20).



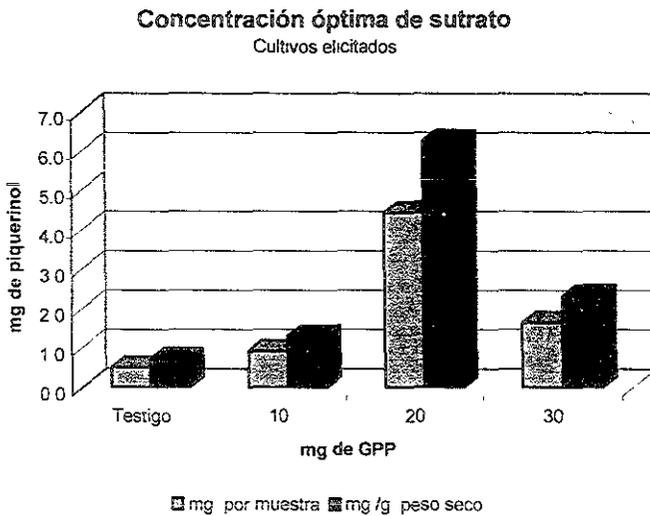
Los datos son promedio de tres repeticiones

Fig. 20.- Tiempo óptimo de transformación de GPP en piquerinol en los cultivos elicitados de *P. trinervia*

En el experimento para determinar la concentración óptima de sustrato en los sistemas elicitados, se obtuvo la mejor respuesta con 20 mg de GPP por matraz (Fig. 21). Con una eficiencia de producción de piquerinol 8.7 veces mayor en relación con los testigos (Tabla 17). Con 30 mg de sustrato, el nivel de acumulación de piquerinol no se sostiene. Este experimento (que fue simultáneo al anterior) se hizo con 72 h de reacción. Se eligió este tiempo porque en estudios previos con el sistema elicitado (Saad, 1996), la máxima acumulación de fitoalexinas totales se da a las 72 horas. Hubiera sido más conveniente realizarlo a las 48 horas. De cualquier forma los resultados son válidos porque a pesar de que los niveles de síntesis bajan de forma importante en los testigos después de 24 horas, la proporción en los niveles de síntesis debe conservarse.

La adición del precursor metabólico a los cultivos elicitados aumento los niveles de piquerinol presentes en los tejidos, esto prueba nuestra tercera hipótesis, este sustrato es un metabolitos escaso en el ambiente celular, incluso en el caso de los cultivos elicitados, que tienen una concentración alta de enzimas y una distribución preferencial de precursores.

La elicitación provoca cambios considerables en el metabolismo celular, durante la respuesta de defensa vegetal el GPP se dirige de forma prioritaria a las sustancias relacionadas con la defensa y el piquerinol es una de ellas⁴. Por ejemplo, en los cultivos elicitados, a las 24 horas de inducción ya no se detecta piquerol, que es una sustancia con menor actividad funguicida que el piquerinol. Ante estas circunstancias de menor reparto, el sistema, tal vez es más sensible y se inhibe con altas concentraciones de sustrato.



Los resultados son promedio de tres repeticiones

Fig. 21.- Concentración óptima de sustrato para la biotransformación de GPP en piquerinol por los cultivos elicitados

⁴ Estudios fitoquímicos previos de *P. trinervia* (Saad, 1996), demostraron que en esta planta algunos terpenos y en particular el piquerinol tienen actividad funguicida

Los diferentes monoterpenos de una planta pueden sintetizarse de una enzima o de más de una. El trabajo del laboratorio del Dr. Croteau⁵ ha generado evidencias para ambas posibilidades (Vogel *et al.*, 1996), limoneno sintasa cataliza la síntesis de un producto predominante (Wheeler *et al.*, 1990), mientras pineno sintasa y γ -terpineno sintasa generan múltiples productos (Alonso y Croteau, 1991). En *Piqueria trinervia*, la similitud en el tiempo de respuesta del sistema enzimático que produce piquerol y el que produce piquerinol podría sugerir que se trata de la misma ciclasa. Hay otras evidencias que apuntan en este sentido. A pesar de su arquitectura básica aparentemente distinta, tanto el piquerol como el piquerinol pueden sintetizarse por una sola enzima. En la Fig. 22 se propone un mecanismo de reacción esencialmente idéntico para los dos monoterpenos, basado en el mecanismo propuesto para la síntesis de β -pineno (Croteau, 1987). Ocurre ionización inicial y migración del PP, para llevar a la formación de un isómero alílico terciario (+)-(3S)- linalil difosfato (LPP); la doble unión 2,3 rota y en seguida se da una segunda ionización del cisoide antiendo conformero del el linalil intermediario, la cual genera un catión monocíclico (4S)- β -terpenil, después ocurre ciclización electrofílica y un rearrreglo, que puede llevar a la formación de dos isómeros: el esqueleto básico del piquerinol o del β -pineno. En el caso del piquerol, ocurren dos rearrreglos más por cambio de carga positiva, antes de que el catión terminal sea desprotonado a una olefina o capturado por agua o el anión difosfato. Todo lo anterior ocurriría en las ciclasas. La adición de grupos hidroxilo a los monoterpenos básicos, estaría a cargo de enzimas transformantes, tal vez pertenecientes a las citocromo 450 oxidorreductasas.

Tabla 17.- Concentración óptima de sustrato en la biotransformación de GPP en piquerinol por cultivos elicitados

GPP mg	mg por muestra	mg /g peso fresco	mg /g peso seco	mg/g prot.
0	0.51050	0.04326	0.72104	3.47991
10	0.92209	0.07814	1.30238	6.28558
20	4.44073	0.37633	6.27221	30.27108
30	1.64892	0.13974	2.32898	11.24017

La adición del sustrato se hizo
Los datos son promedio de tres repeticiones
El tiempo de reacción fue de 72 h

⁵ El Dr. Croteau es el líder del grupo de investigación más importante de bioquímica de monoterpenos que existe en el mundo, se ha dedicado a la investigación de estas sustancias naturales por más de 30 años. En la bibliografía de esta investigación se incluyen 28 citas de su trabajo.

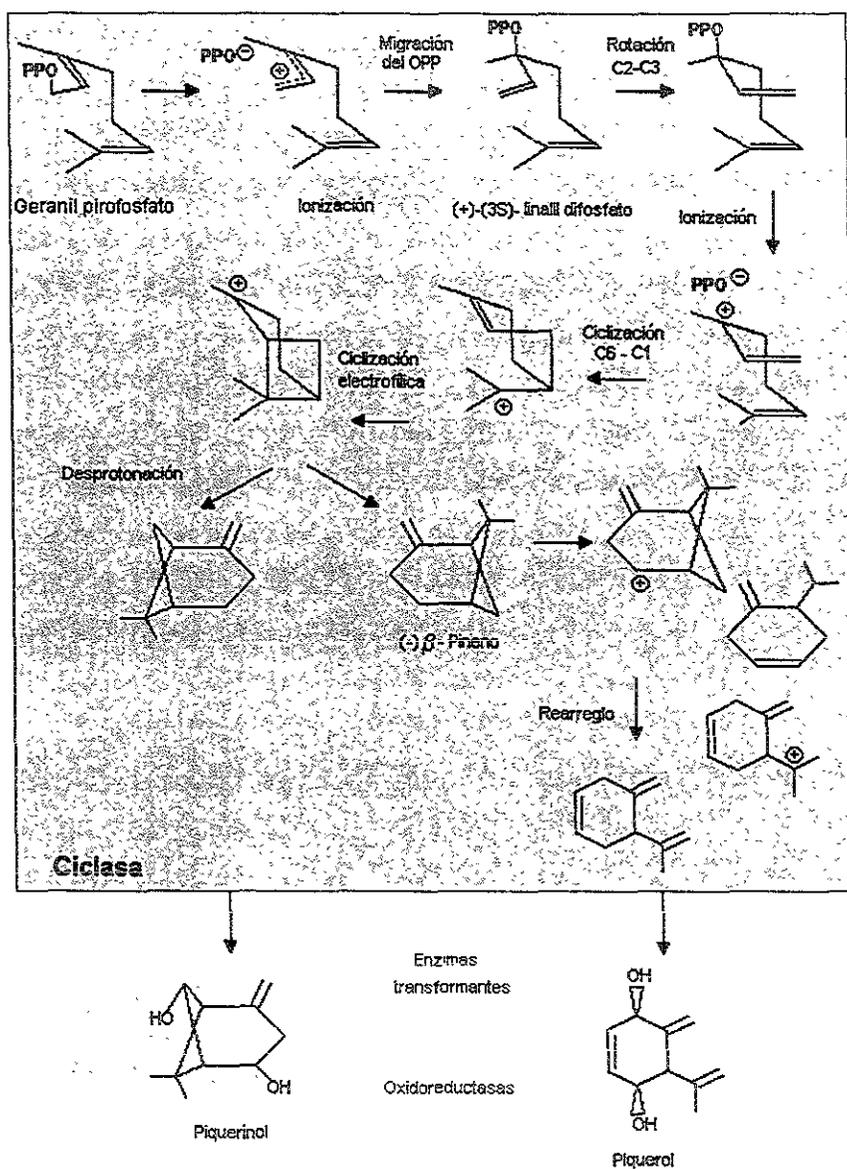


Fig. 22.- Mecanismo propuesto para la síntesis de piquerol y piquerinol a partir de GPP

Pero el hecho de que la síntesis de las dos moléculas pudiera partir del mismo catión monocíclico, no necesariamente indica que se trata de una sola enzima capaz de catalizar múltiples conversiones, pudieran ser enzimas diferentes con gran similitud funcional, porque las terpeno sintasas del metabolismo secundario, están a menudo representadas por familias de genes multicopia que codifican para enzimas funcionalmente idénticas (Bohlman *et al.*, 1998). Tal vez la evidencia más importante de que se trata de una sola enzima, se encuentre en la virtual desaparición del piquerol durante la respuesta de defensa de la planta, para favorecer la aparición de piquerinol, que es un agente fungicida más activo que el piquerol (Saad, 1996). Un aumento a nivel transcripcional de las tasas de síntesis de la piquerinol sintasa, solamente bajarían los niveles de síntesis de piquerol, no lo harían desaparecer. Posiblemente una sola enzima sintetice las dos moléculas, piquerol en condiciones normales y piquerinol durante la respuesta de defensa, debido a cambios en la capacidad catalítica relacionados con modificación alostérica o covalente de la enzima, regulados a nivel post-transcripcional (Gershenzon y Croteau, 1990).

El hecho de que el esqueleto básico de estas moléculas sea el β - pineno o su isómero, puede estar indicando una cercanía importante con la β -pineno sintasa aislada de coníferas. Sin embargo, las monoterpeno ciclasas de gimnospermas suelen ser catalítica y estructuralmente distintas a las terpeno ciclasas de angiospermas, Las sintasas de gimnospermas requieren iones monivalentes, en especial K^+ y prefieren como cofactor Mn^{2+} o Fe^{2+} sobre el Mg^{2+} y tienen un valor de pH óptimo alto. (Bohlmann *et al.*, 1997). En *Abies grandis* se encontró que la pineno sintasa, enzima de 71.5 kDa, es más parecidas a otras ciclasas de la planta de otros grupos de terpenos, que a otras ciclasas de monoterpenos de angiospermas (Gijzen *et al.*, 1992; Gijzen *et al.*, 1991). No obstante, el hecho de en *P. trinervia* se produzcan terpenos con un esqueleto básico idéntico al β -pineno, sugiere que debe haber algún grado de similitud. La única forma de saber si las monoterpeno sintasas de *P. trinervia* y las ciclasas de coníferas tienen un origen evolutivo común, o se trata de convergencia evolutiva; sería aislar las enzimas de *P. trinervia* y determinar su secuencia de aminoácido y compararlos con los reportados para la β -pineno sintasa aislada de gimnospermas.

d) Experimentos de biotransformación con cloroplastos

Los cloroplastos aislados se analizaron bajo microscopio de contraste de fases, para identificar cloroplastos intactos y detectar la presencia de otros fragmentos celulares

contaminantes. Con el procedimiento empleado se aislaron cloroplastos enteros, prácticamente puros, había sólo alguno que otro núcleo contaminante que no interfería con los objetivos de esta investigación. Para fines de esta investigación, no era necesario aislar cloroplastos con las dos membranas íntegras porque las enzimas de interés no están asociadas a membrana, se comportan como enzimas solubles y la membrana interna es el sitio específico en el cual se regula el transporte de metabolitos entre el citosol y el cloroplasto (Stitt, 1997) por medio de translocadores proteicos específicos; por eso no fue necesario comprobar la existencia de las dos membranas.

Los experimentos de biotransformación con cloroplastos se efectuaron con 48 horas de reacción, en base a los resultados de biotransformación con células completas. En los tres sistemas empleados: cloroplastos de brotes, plantas jóvenes y plantas en floración, se formaron los dos monoterpénos (Tabla 18). Aumentó de forma considerable la producción de piquerol, en relación con los testigos, 3.9 veces en las plantas jóvenes, 130.8 veces en los brotes y 341 veces en las plantas en floración. El piquerinol no se detectó en los testigos y alcanzó niveles importantes de síntesis en los tres sistemas, pero mucho más bajos que los encontrados para piquerol, evidenciando que la ciclasa de piquerol tiene una mayor afinidad por el sustrato o se encuentra en una mayor concentración en los cloroplastos de hoja. Para los dos monoterpénos, el sistema más eficiente fue el de plantas en floración, lo cual sugiere la idea del posible papel de estas sustancias como atrayentes de polinizadores. El segundo sistema por sus eficiencia, también para los dos monoterpénos, fueron los cloroplastos aislados de brotes.

La eficiencia tan alta de transformación de GPP en cloroplastos (Fig. 23) sugiere que este es el lugar de síntesis de monoterpénos en *P. trinervia*. La síntesis de monoterpénos está generalmente asociada con plastidios (leucoplastos y cromoplastos) más que con cloroplastos (McGarvey & Croteau, 1995), pero en esta planta, se encontró una correlación muy interesante entre la presencia de clorofila en los callos y su capacidad de sintetizar piquerol (ver resultados de cultivos de células en suspensión). Aparentemente, los monoterpénos se forman en esta planta a través de la ruta de la deoxixilulosa, porque hay evidencias de que, generalmente en las plantas superiores esta ruta opera en plastidios (Mettal *et al.*, 1988; Guo y Wagner, 1995; Sun y Kamiya, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1996; Reil y Berger, 1997) y porque estudios previos en nuestro laboratorio comprobaron que el mevalonato no se incorpora al piquerol⁶.

⁶ Liza Covantes. comunicación personal

Tabla 18.- Biotransformación con cloroplastos

Cloroplastos de	mg por muestra	Piquerol	
		Proteínas mg / muestra	mg/g proteína
Brotos sin GPP	0.00070	10.15661	0.06924
Plantas jóvenes sin GPP	0.00939	16.28230	0.57659
Plantas en floración sin GPP	0.00154	14.16774	0.10865
Brotos	0.08437	9.31732	9.05551
Plantas jóvenes	0.03577	15.87901	2.25259
Plantas en floración	0.52528	14.17864	37.04700

Cloroplastos de	mg por muestra	Piquerinol	
		Proteínas mg / muestra	mg/g proteína
Brotos sin GPP	nd		
Plantas jóvenes sin GPP	nd		
Plantas en floración sin GPP	nd		
Brotos	0.01202	9.31732	1.28977
Plantas jóvenes	0.00853	15.87901	0.53738
Plantas en floración	0.04071	14.17864	2.87141

Los resultados son promedio de tres repeticiones

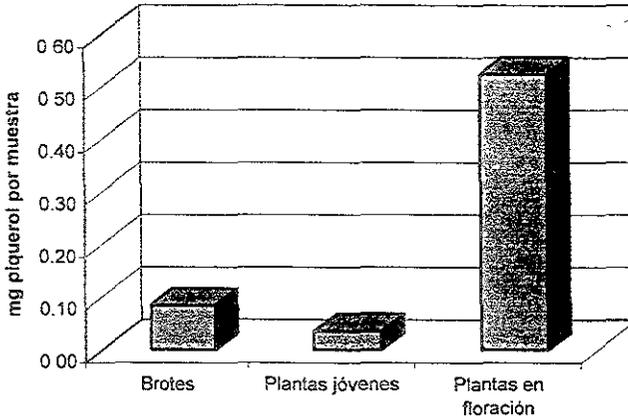
Se adicionaron 30 mg de sustrato

El tiempo de reacción fue de 48 h

El transporte de productos metabólicos finales no es común en el reino vegetal. Normalmente los compuestos terpénicos son sintetizados y acumulados en el tejido donde se ocupan (Funk *et al.*, 1992; Wink, 1997). En general se asume que los terpenos que son acumulados en los tricomas glandulares son sintetizados ahí, porque los tricomas pueden acumular precursores marcados como sacarosa, acetato y mevalonato y se ha comprobado que estas estructuras son el único sitio de síntesis de monoterpenos en plantas como la menta (Savage *et al.*, 1994 ; McGeady y Croteau, 1995). No obstante, se sabe que en ocasiones, los alcoholes monoterpénicos son transportados como glicósidos (Gershenzon *et al.*, 1989). Es posible que en *Piqueria trinervia*, los monoterpenos se sinteticen en los cloroplastos de las hojas y después sean transportados a los tricomas de la flor. Si esto es así, debe existir un sistema de transporte de estas sustancias, del cloroplasto a las estructuras de almacenamiento. Gracias a ese sistema, es posible que en los cloroplastos aislados el piquerol se excrete al medio de cultivo. Regresando al lugar de síntesis, dada la

Biotransformación con cloroplastos

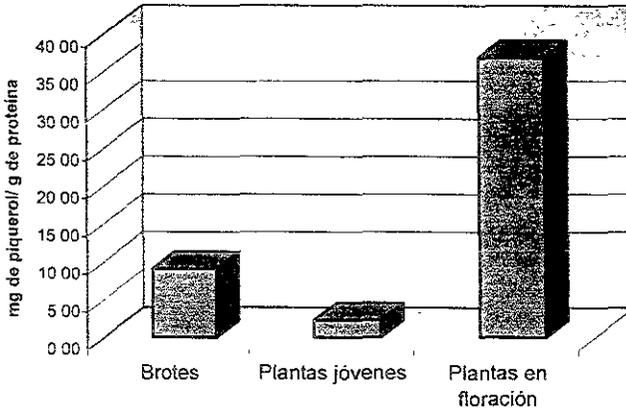
Rendimiento por muestra



A

Biotransformación con cloroplastos

Rendimiento por g de proteína



B

Los resultados son promedio de tres repeticiones

Fig. 23.- Eficiencia de biotransformación con cloroplastos. A.- mg de piquero por muestra. B.- mg de piquero por gramo de proteína

concentración más alta de proteínas encontrada en flores (Tabla 12), reflejo de una actividad biosintética intensa, puede pensarse que los monoterpenos también se sintetizan ahí.

Las concentraciones tan bajas de monoterpenos en los cloroplastos sin tratar pueden explicarse por tres posibles razones: la primera es que los bajos niveles de producción de estos sistemas se deben, más que a su capacidad biosintética, a la carencia de estructuras de almacenamiento, no se acumulan terpenos, debido a la degradación endógena (catabolismo) de los productos recién formados (Banthorpe *et al.*, 1986); la segunda es que el flujo metabólico de la ruta de isoprenoídes en plastidios, está controlado por disponibilidad de GPP; y la tercera que los monoterpenos sintetizados ahí son transportados a otro sitio.

Aunque la eficiencia de transformación de los cloroplastos es muy alta, la unidad experimental es muy pequeña (12.5 ml de suspensión). En el mejor sistema, cloroplastos de plantas en floración, se está incorporando a los dos monoterpenos menos de un miligramo de GPP por muestra. Aunque los cloroplastos son un sistema más simple que los cultivos en suspensión y el reparto del GPP debe ser menor que en células completas, la competencia por el sustrato no se elimina porque también diterpenos, carotenoides, fitol y plastoquinona son formados en cloroplastos (Yamaguchi *et al.*, 1996; Reil y Berger, 1997; Eisenreich *et al.*, 1998). Aun considerando el reparto entre varios metabolitos, 30 mg de GPP por muestra parece ser demasiado. Dados los resultados, la concentración de sustrato que puede ser aprovechada por esta cantidad de cloroplastos (g de proteína) debe ser mucho menor.

e) Los sistemas probados

Se lograron todos los objetivos inicialmente planteados en esta investigación: se estandarizó la técnica para sintetizar GPP y GPP deuterado; se determinó el tiempo óptimo de reacción y la concentración necesaria de sustrato tanto para el sistema de cultivos en suspensión, como para el sistema elicitado; y se estableció sistema de biotransformación de GPP con cloroplastos de *P. trinervia*. Los resultados de todos los experimentos de biotransformación realizados, se resumen en la Tabla 19.

Resultaba muy complicado pesar los cloroplastos sin dañarlos, por eso se prefirió medir concentración de proteínas por muestra. Este sistema de medición resulta válido porque la eficiencia terminal obtenida en relación con los testigos, es idéntica a la que resulta cuando se utilizan mg de producto por g de biomasa seca (Tabla 20 y Tabla 21). Para poder comparar los resultados de los experimentos de

biotransformación de cloroplastos con los otros sistemas probados Presentamos los resultados de todos los experimentos también en términos de mg de producto por gramo de proteína.

Tabla 19. –Resultados de los experimentos de biotransformación de GPP con cultivos de *P. trinervia*

Experimento	Sistema celular	Condiciones	Resultado
1	Cultivos de células en suspensión	10 mg de GPP	Tiempo óptimo de biotransformación de GPP en piquerol: 48 horas
2	Cultivos de células en suspensión elicitados	10 mg de GPP	Tiempo óptimo de biotransformación de GPP en piquerinol: 48 horas
3	Cultivos de células en suspensión	48 horas	Cantidad requerida de sustrato 30 mg /matraz
4	Cultivos de células en suspensión elicitados	72 horas	Cantidad requerida de sustrato 20 mg /matraz
5	Cloroplastos aislados de hojas	30 mg de GPP 48 horas	Etapa de crecimiento con mayor capacidad de biotransformación de GPP en piquerol y piquerinol en cloroplastos: Plantas en floración

Los cloroplastos resultaron ser una opción mucho mejor que los cultivos en suspensión, para obtener piquerol por biotransformación de GPP. Se obtuvieron rendimientos más de 23 veces mayores, con un volumen de reacción cuatro veces menor. Esto prueba nuestra tercera hipótesis de trabajo, los cloroplastos son un sistema más eficiente de transformación porque son el sitio de síntesis de los monoterpenos de la planta y ahí la concentración relativa de monoterpeno sintasas es alta.

Los cultivos elicitados mostraron una gran eficiencia de producción de piquerinol. En forma basal, estos cultivos, incluso sin adición de GPP, tienen la mejor tasa de producción de un monoterpeno en la planta, este es también el sistema de biotransformación más eficiente de todos los sistemas probados, se obtienen valores de productividad muy altos, más de 180 mg por gramo de proteína. Los cultivos inducidos con elicitores son un sistema ideal cuando se trata de aprovechar la maquinaria biosintética del metabolismo secundario, porque se

aumenta drásticamente la actividad de rutas biosintéticas clave para la defensa vegetal y suelen ser la mejor opción para el aislamiento y caracterización de enzimas de rutas metabólicas y la clonación de sus genes (Taticek, 1991; Kutney, 1997; Towers y Ellis, 1995; Dixon et al., 1996). Los cloroplastos son menos eficientes que los cultivos elicitados para producir piquerínol. Sin embargo, sería muy interesante aislar cloroplastos de cultivos elicitados; probablemente en estos sistemas, el piquerínol es el monoterpeno más abundante.

En la mayor parte de los sistemas probados la concentración relativa de las monoterpenos ciclasas involucradas es muy baja. Una proporción mínima del sustrato adicionado se transforma en los productos. En la mayoría de los casos, el aumento de producción de monoterpenos en las muestras es menor a 1 mg. Sólo en los cultivos elicitados se obtuvieron rendimientos de transformación importantes, entre 30 y 90%. Este es sin duda, el sistema con la mayor concentración relativa de las enzimas de interés.

Tabla 20.- Eficiencia de transformación por peso seco de los sistemas celulares utilizados

Piquerol

Experimento	Testigo* mg /g (peso seco)	Sistema celular	Variables	mg /g (peso seco)	Aumento de concentración **
1	0.01700	Cultivos de células	24 h	0.09670	5.7
	0.01700		48 h	0.30490	17.9
	0.01700		72 h	0.13464	7.9
3	0.01700	Cultivos de células	10 mg de GPP	0.27365	16.1
	1.01700		20 mg de GPP	0.28337	16.7
	0.01700		30 mg de GPP	0.41138	24.2

Piquerínol

Experimento	Testigo mg /g (peso seco)	Sistema celular	Variables	mg /g (peso seco)	Aumento de concentración
2	1.97905	Cultivos elicitados	24 h	15.82294	8.0
	5.92303		48 h	37.96806	6.4
	0.72104		72 h	5.56258	7.7
4	0.72104	Cultivos elicitados	10 mg de GPP	1.30238	1.8
	0.72104		20 mg de GPP	6.27221	8.7
	0.72104		30 mg de GPP	2.32898	3.2

* Los testigos son los cultivos sin GPP

** El aumento de concentración se calculó en relación con los testigos

Tabla 21.- Eficiencia de transformación por gramo de proteína de los sistemas empleados

Piquerol					
Experimento	Testigo* mg /g de proteína	Sistema celular	Variables	mg /g de proteína	Aumento de concentración**
1	0.06535	Cultivos de células	24 h	0.37169	5.7
	0.06535		48 h	1.17194	17.9
	0.06535		72 h	0.51751	7.9
3	0.06535	Cultivos de células	10 mg de GPP	1.05183	16.1
	0.06535		20 mg de GPP	1.08917	16.7
	0.06535		30 mg de GPP	1.58121	24.2
5	0.06924	Cloroplastos	Brotos	9.05551	130.8
	0.57659		Plantas jóvenes	2.25259	3.9
	0.10865		Plantas floración	37.04700	341.0
Piquerinol					
Experimento	Testigo mg /g de proteína	Sistema celular	Variables	mg /g de proteína	Aumento de concentración
2	9.55133	Cultivos elicitados	24 h	76.36501	8.0
	28.58588		48 h	183.24226	6.4
	3.47991		72 h	26.84625	7.7
4	3.47991	Cultivos elicitados	10 mg de GPP	6.28558	1.8
	3.47991		20 mg de GPP	30.27108	8.7
	3.47991		30 mg de GPP	11.24017	3.2
5	nd	Cloroplastos	Brotos	1.28977	
	nd		Plantas jóvenes	0.53738	
	nd		Plantas floración	2.87141	

* Los testigos son los cultivos sin GPP

** El aumento de concentración se calculó en relación con los testigos

nd= no detectado

El aumento en los niveles de producción de monoterpenos por la adición de GPP, en todos los sistemas probados, parece indicar que el GPP es un metabolito escaso y por lo tanto, las tasas de síntesis de los monoterpenos deben estar controladas en alguna medida por disponibilidad de este sustrato. La regulación del flujo de precursores intermediarios y cofactores en los distintos compartimientos celulares resulta un importante sistema de control del metabolismo secundario, conocida como inhibición por alimentación (Plaxton, 1997; McGarvey y Croteau, 1995).

5 Actividad enzimática

La mejor opción para producir monoterpenos por biotransformación de GPP es el empleo de enzimas aisladas, de esta forma pueden disminuirse mucho los tiempos de transformación; además, los problemas de competencia de sustrato y catabolismo de productos desaparecen. A cambio deben conseguirse condiciones fisiológicas de reacción y suministrar cofactores necesarios. Condiciones que en este caso pueden satisfacerse sin problema. Las monoterpeno ciclasas tienen pocos requerimientos, necesitan un ión metálico divalente (generalmente Mg^{2+} o Mn^{2+}), como cofactor, tienen un valor de punto isoeléctrico cercano a 5.0 y un pH óptimo a una unidad de la neutralidad y son operacionalmente solubles.

Sintetizamos GPP deuterado con una doble intención: emplearlo en experimentos de biotransformación y detectar actividad enzimática de piquerol y piquerinol ciclasas, para llegar a su eventual purificación.

Las monoterpeno ciclasas se encuentran en muy bajas concentraciones en los tejidos de las plantas, incluso en la etapa de desarrollo en que son más activas, además siempre hay otras enzimas, como las fosfohidrolasas derivadas del mesófilo de las hojas (Chappell, 1995; McGarvey y Croteau, 1995), que se encuentran en concentraciones mucho mayores y que por lo tanto pueden competir con ventaja por el sustrato (GPP). Estas limitantes hacen a las ciclasas enzimas muy difíciles de purificar. La solución ha sido emplear tejidos muy enriquecidos con las enzimas. Los monoterpenos aparecen dentro de estructuras secretorias en ciertos órganos de la planta como hojas y flores, en momentos particulares del desarrollo del vegetal (Lewinsohn et al., 1993; Gleizes et al., 1980; Chappell, 1995; Gershenzon y Croteau, 1990; McGarvey y Croteau, 1995; Loreto et al., 1996). En la mayoría de las plantas herbáceas, las enzimas relacionadas con la síntesis de monoterpenos se localizan en los tricomas glandulares de las hojas (Savage et al., 1994; McGeedy y Croteau, 1995; Gershenzon et al., 1989; Karp et al., 1990; Hallahan et al., 1998; Croteau, 1987). Todas las monoterpeno ciclasas que han sido descritas, se purificaron invariablemente de

tricomas glandulares, obtenidos rasurando hojas de la planta en cuestión. Con la intención de seguir esta estrategia se hicieron estudios bajo microscopio estereoscópico, de plantas de *P. trinervia* en diferentes etapas de desarrollo, para detectar estructuras glandulares especializadas.

a) Búsqueda de tricomas en los diferentes estadios de crecimiento de *P. trinervia*

En *P. trinervia* no aparecen tricomas en hojas y tallo antes de los dos meses de edad (Tabla 22). Después de esta etapa, cuando empiezan a formarse los márgenes aserrados en las hojas, aparecen en el valle de cada margen unos cuantos tricomas transparentes de 3 a 4 células de largo. Hacia los cuatro meses de edad aparecen tricomas escasos, además de en los márgenes aserrados de las hojas, en las nervaduras del envés de la hoja y en los nudos del tallo. En esta etapa de crecimiento vegetativo pueden apreciarse dos columnas opuestas de tricomas en el tallo. Puede decirse que los tricomas son escasos en toda la planta durante la fase vegetativa. En la punta de los márgenes de las hojas aparecen glándulas abultadas y redondas con una pequeña depresión en el centro. Cuando la planta entra en la etapa reproductora y florece, lo cual ocurre independientemente de la edad cuando

Tabla 22.- Presencia de glándulas y tricomas glandulares en diferentes etapas fenológicas y órganos de *P. trinervia*

Etapa fenológica	Órgano	Distribución	Abundancia
Plántula	No detectadas		
Plantas jóvenes (2 a 4 meses)	Hoja	Tricomas glandulares - En el valle de los márgenes aserrados	Escasos
	Plantas en crecimiento (más de 4 meses)	Hoja	Tricomas glandulares - En el valle de los márgenes aserrados - En el envés de las nervaduras
Tallo		Glándulas - En la punta de los márgenes aserrados	Una glándula en cada punta
		Tricomas glandulares - En los nudos - Formando dos hileras opuestas	Escasos
Plantas en floración	Tallo	Tricomas glandulares - En las regiones cercanas a las inflorescencias	Abundantes
	Flores	Tricomas glandulares - Receptáculo floral, pétalos y estigma	Muy abundantes

disminuyen la temperatura y el fotoperiodo, a finales de octubre y principios de noviembre., se desarrolla en la parte del tallo cercana a las inflorescencias una mayor cantidad de tricomas. Cuando ocurre la antesis, la flor completa es un conjunto de glándulas, en especial el receptáculo floral que es un cilindro verde, cubierto por completo de largos tricomas, los pétalos y el estigma tienen también gran cantidad de tricomas. Por lo anterior, es probable que sean las flores el principal sitio de almacenamiento de monoterpenos en esta planta. Hay otros reportes de acumulación de monoterpenos en órganos específicos de la flor (Dudareva *et al*, 1996), en estos casos, la función biológica de estas sustancias, suele ser la atracción de polinizadores.

b) Pruebas de actividad enzimática

La opción empleada para monitorear actividad de estas enzimas es el empleo de GPP marcado con tritio. Sintetizar geranyl pirofosfato tritiado requiere instalaciones especiales y reactivos muy caros. Una opción para detectar actividad enzimática sin emplear isótopos inestables, es el empleo de sustratos marcado con deuterio y la cuantificación de productos en gases masas.

Se hicieron pruebas para detectar actividad de monoterpeno ciclasas en diferentes tejidos de la planta empleando GPP deuterado: cultivos en suspensión elicitados, hojas de brotes jóvenes, hojas de plantas cultivadas en suelo y flores individuales. La actividad se detecta por la presencia de los productos, piquerol y piquerinol. Se efectuaron estudios de espectroscopía de masas a los extractos crudos CHCl_3 (los espectros de masas se encuentran en el anexo). En los espectros de masas de todos los cultivos que sintetizan piquerol, aparece una señal m/z 167, que corresponde al peso molecular del piquerol deuterado. En el caso de las flores hay un aumento notable de la abundancia relativa en relación con los testigos (muestras sin GPP) de 25% a 40%. En las hojas de brotes y hojas de plantas maduras, hay un pequeñísimo aumento de abundancia relativa, en relación con los testigos de 38 a 41 y de 27 a 30%, respectivamente. En el espectro de masas de los cultivos elicitados, aparece esta misma señal con una abundancia relativa de 27% en los testigos y de 30% en los cultivos tratados. Estos resultados sugieren que los el sustrato deuterado se está incorporando al piquerol y no al piquerinol, no obstante, los aumentos de abundancia relativa de las señales, en los sistemas tratados con GPP, son muy pequeñas y las muestras muy complejas, para que estos datos sean concluyentes. Para tener resultados más sólidos, sería necesario escalar la reacción, purificar los productos y analizarlos por gases-masas. Tarea que abordaremos más adelante.

VIII.- Conclusiones

1. Se mejoró el protocolo para obtención de brotes *in vitro* empleando tallos sin hojas de dos meses de edad cultivados en medio MS con 1 mg/l de cinetina . En el mismo medio se formaron primero brotes y después raíz.
2. De los cultivos en suspensión de *P. trinervia* inducidos con elicitores fúngicos se aisló y caracterizó un nuevo monoterpeno: el 2-metilen-7,7-dimetil biciclo [3,3,1] heptano -4,6-diol, o Piquerinol.
3. Se estandarizó la técnica de obtención de geraniol marcado con deuterio: la síntesis involucró cuatro pasos sucesivos: oxidación de geraniol, purificación de geraniol, reducción de geraniol y purificación de geraniol deuterado.
4. Se estandarizó la síntesis del geranil pirofosfato y geranil pirofosfato marcado con deuterio, mediante la optimización de tres pasos consecutivos: síntesis de bis-trietilamoniofosfato, fosforilación del geraniol y purificación del GPP.
5. En *P. trinervia* los tricomas glandulares son escasos en toda la planta durante la fase vegetativa. Durante la floración se desarrollan tricomas en la parte del tallo cercana a las inflorescencias y la flor completa es un conjunto de glándulas, en especial el receptáculo floral.
6. El tiempo óptimo de biotransformación de geranil pirofosfato en piquerol por cultivos de callos en suspensión de *P. trinervia* fue de 48 horas
7. La concentración de GPP que debe adicionarse a los cultivos en suspensión para su transformación en piquerol debe ser 30 mg/matraz.
8. En los experimentos de biotransformación con cultivos en suspensión de *P. trinervia* se obtuvo una producción de piquerol de 0.41 mg/ g de biomasa seca (28.8 mg/g de proteína) que representa una sobreproducción de 24.2 veces, en relación con los testigos.
9. El tiempo óptimo de biotransformación de geranil pirofosfato en piquerinol por cultivos de callos en suspensión de *P. trinervia*, inducidos con elicitores, fue de 48 horas

10. La concentración de GPP que debe adicionarse a los cultivos en suspensión elicitados para su transformación en piquerinol debe ser 20 mg/matraz.
11. En los experimentos de biotransformación con cultivos en suspensión de *P. trinervia*, inducidos con elicitores, se obtuvo una producción de piquerinol de 38.0 mg/ g de biomasa seca (183.2 mg/g de proteína) que representa una sobreproducción de 6.4 veces, en relación con los testigos y una eficiencia de transformación del 90%.
12. Se estandarizó la técnica de aislamiento de cloroplastos de hojas de *P. trinervia*.
13. En los experimentos de biotransformación con cloroplastos se produjeron piquerol y piquerinol. En todos los casos, el piquerol fue el producto más abundante.
14. Las plantas en floración proporcionaron los cloroplastos con mayor capacidad de transformación de GPP en piquerol y piquerinol.
15. Los cloroplastos resultaron un sistema de biotransformación de GPP en piquerol mucho más eficiente que los cultivos en suspensión
16. En los experimentos de biotransformación con cloroplastos, se obtuvo una producción de piquerol de 37.0 mg/g de proteína, que representa una sobreproducción de 341.0 veces, en relación con los testigos.
17. Los cloroplastos resultaron un sistema de biotransformación de GPP en piquerinol mucho menos eficiente que los cultivos en suspensión inducidos con elicitores.
18. En los experimentos de biotransformación con cloroplastos, se obtuvo una producción de piquerinol de 2.9 mg/g de proteína.
19. Los cultivos elicitados de *P. trinervia* resultaron ser el sistema más eficiente, de los tres empleados, para transformar GPP en un monoterpeneo.

IX.- Consideraciones finales

Los terpenos pertenecen al grupo de metabolitos que son pobremente expresados en cultivos *in vitro*. En general los cultivos de células vegetales no producen terpenos o lo hacen en concentraciones muy bajas. El cultivo en suspensión empleado para la biotransformación de GPP en piquerol, presentó una respuesta típica. Las enzimas se encontraban en bajas concentraciones y los metabolitos se acumularon muy poco debido a la carencia de estructuras especializadas de almacenamiento y a una degradación endógena muy rápida. Los niveles de producción fueron tan bajos, que se aumentó mucho la síntesis cuando se adicionó el precursor metabólico, pero la acumulación final fue menor a la obtenida en plantas completas. En cambio, los otros dos sistemas utilizados en esta investigación son realmente muy prometedores.

La capacidad catalítica de los cloroplastos aislados de plantas en floración es muy buena y puede aumentarse aún más. En realidad, los resultados aquí mostrados son sólo una aproximación inicial a un sistema que permite mejoras considerables. Podrían aumentarse mucho los rendimientos si se determinan: los tiempos de reacción de forma más precisa; las concentraciones máximas de sustrato, los parámetros ambientales que favorecen la reacción.

Es muy probable que durante la biotransformación con cloroplastos, los productos se liberen al medio nutritivo, porque aparentemente en esta planta los monoterpenos se sintetizan en cloroplastos y después se transportan a estructuras especializadas de almacenamiento. Si esto es así, los cloroplastos podrían inmovilizarse y mediante la utilización de extracción *in situ*, montar un sistema semicontinuo de aprovechamiento, que elevaría enormemente la productividad.

Este sistema puede ser también una valiosa herramienta de investigación. Antes de que los cloroplastos sean una opción real para la producción comercial de monoterpenos tienen que responderse muchas preguntas: cuál es la permeabilidad de la membrana interna a precursores metabólicos y productos; cuáles son los cofactores necesarios; cuál es el papel de las enzimas presentes en el organelo (las ciclasas, la preniltransferasa que sintetiza predominantemente GPP, la isopentenilpirofosfato isomerasa y la geraniol transferasa) en la regulación del flujo metabólico para la síntesis de terpenos; si existe algún sistema transportador de terpenos y cómo funciona; cómo influye la diferenciación de plastidios en la formación y orientación de enzimas.

Los cloroplastos son además, en esta planta, la opción más viable para medir actividad enzimática y/o aislar enzimas relacionadas con la síntesis de monoterpenos. Ha sido posible aislar monoterpeno ciclasas gracias a la utilización de preparaciones de glándulas y tricomas, que son rasurados de la superficie de tallos y hojas. En *Piqueria trinervia*, los tricomas glandulares son abundantes sólo en los pétalos de la flor, pero en esta planta las flores son muy pequeñas y se encuentran fuertemente adheridas a las inflorescencias, por lo que resultan un sistema muy difícil de manipular.

Una posibilidad muy interesante tanto para la eventual utilización de cloroplastos para biotransformaciones a nivel comercial, como para realizar estudios bioquímicos de la síntesis de terpenos, sería la transformación genética de cloroplastos con genes de enzimas de ciclasas para dar una expresión constitutiva de las enzimas dentro del organelo. La transformación de cloroplastos es una técnica bien establecida y debido a la similitud de las enzimas, existen sondas que permiten aislar de forma relativamente sencilla, las ciclasas de cualquier planta. La ingeniería de rutas metabólicas se ha hecho con la intención de obtener plantas transgénicas con alta producción de un metabolito. Los resultados de muchos de estos experimentos no han sido tan formidables como se esperaba. Un sistema de biotransformación que emplee organismos (u organelos) modificados genéticamente, daría sin duda rendimientos muy altos porque habría grandes concentraciones de enzimas y disponibilidad ilimitada de sustratos.

Los cultivos elicitados de *P. trinervia* resultaron ser el mejor sistema de los tres empleados en esta investigación. Es muy eficiente y fácilmente reproducible. Se trata de un sistema mucho más acabado que el de cloroplastos. Puede inducirse con homogenizados de ocho especies de hongos deuteromicetes y con sustancias de diferente naturaleza química, se conoce la cantidad requerida de elicitor por gramo de cultivo, se sabe en qué etapa de crecimiento del cultivo debe inducirse, se conoce el tiempo óptimo de biotransformación y la cantidad de sustrato que debe adicionarse por matraz, se sabe también que se producen cuatro fitoalexinas, que los productos son excretados al medio de cultivo y que las células no pueden reutilizarse. El conocimiento básico más importante de este sistema que falta determinar, es la naturaleza química y actividad biológica de las tres fitoalexinas restantes.

El reto tecnológico más importante de este sistema para aprovechar cabalmente su capacidad catalítica es la obtención de líneas celulares sobreproductoras. Todo lo que se sabe del sistema se ha estado trabajando con callos en suspensión más que

con cultivos de células disgregadas. En cada ocasión los cultivos se establecen con callos inducidos de novo. La dificultad de estos cultivos es que tienen una enorme heterogeneidad genética, que impide establecer condiciones óptimas. La obtención de una línea celular en esta especie es muy difícil porque existe una producción de fenoles muy alta, las líneas celulares tienden a oxidarse rápidamente. Pueden obtenerse cultivos en suspensión embriogénicos, de rápido crecimiento fácilmente, pero estas líneas celulares no producen terpenos. Hemos conseguido dos veces líneas celulares con las características deseadas, son cultivos con tasas muy rápidas de crecimiento, sumamente sensibles, que demandan condiciones de cultivo muy controladas, que no hemos podido satisfacer.

Hay muchos estudios de biotransformación de terpenos, pero prácticamente ninguno aprovecha la capacidad catalítica del metabolismo secundario. Los cultivos elicitados brindan una excelente oportunidad en este sentido. El cultivo que aquí trabajamos ofrece muchas otras capacidades catalíticas: a partir de la inducción con elicitores, excreta al medio de cultivo grandes concentraciones de proteínas, la actividad de peroxidasas es muy alta y produce también compuestos glicosidados. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se establece un cultivo en suspensión, inducible, que produce monoterpenos, por esta razón puede convertirse en un modelo adecuado para el estudio del metabolismo de monoterpenos.

X.- Bibliografía

1. Adam, W., Lazarus, M., Saha-Möller, C. y Schreier, P. (1996). Enantioselective α Hydroxylation of Carboxylic Acids with Molecular Oxygen Catalyzed by the α Oxidation Enzyme System of Young Leaves (*Pisum sativum*): A substrate selective study. *Tetrahedron: Asymmetry*. 7(8): 2287-2292.
2. Akakabe, Y. y Naoshima Y. (1994). Biotransformation of acetophenone with immobilized cells of carrot, tobacco and gardenia. *Phytochemistry*. 35(3): 661-664.
3. Akakabe, Y., Takahashi, M., Kamezawa, M., Kikuchi, K., Tachibana, H., Ohtani, T. y Naoshima, Y. (1995). Biocatalytic preparation of chiral alcohols by enantioselective reduction with immobilized cells of carrot. *J. Chem.Soc. Perkin Trans. 1*: 1295-1298.
4. Alfermann, A. (1980). Biotransformation by plant tissue cultures. *Bulletin de la Société Chimique de France*. 12: 35-45.
5. Alonso, W. y Croteau, R. (1991). Purification and characterization of the monoterpene cyclase γ -terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 286(2): 511-517.
6. Alonso, W., Rajaonarivony, J., Gershenzon, J. y Croteau, R. (1992). Purification of 4S-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*). *The Journal of Biological Chemistry*. 267(11): 7582-7587.
7. Andrews, D. y Rachubinski, R. (1990). Secretion and organelle biogenesis: Problems in targeting proteins to specific subcellular compartments. *En Tip growth in plant and fungal cells*. J.B. Heath (ed.) Academic Press. Inc. 317-335.
8. Arigoni, D., Cane, D., Shim, J., Croteau, R. y Wagschal, K. (1993). Monoterpene cyclization mechanisms and the use of natural abundance deuterium NMR Short cut or primrose path. *Phytochemistry*. 32(3): 623-631.
9. Arnarp, J., Chu, W., Enzell, C., Hewitt, G., Kutney, J., Li, K., Milanova, R., Nakata, H., Nasiri, A. y Tsuda, T. (1993a). Tobacco chemistry 78. Biotransformations of tobacco cembranoids using plant cell cultures of *Nicotiana sylvestris*. *Acta Chemica Scandinavica*. 47: 793-798.
10. Arnarp, J., Chu, A., Enzell, C., Hewitt, G., Kutney, J., Li, K., Milanova, R., Nakata, H., Nasiri, A. y Tsuda, T. (1993b). Tobacco chemistry 77. * Biotransformations of a major tobacco cembratrienediol using plant cell cultures of *Nicotiana sylvestris*. *Acta Chemica Scandinavica*. 47: 689-694.

11. Amarp, J., Chu, W., Enzell, C., Hewitt, G., Kutney, J., Li, K., Milanova, R., Nakata, H., Nasiri, A y Okada, Y. (1993c). Tobacco chemistry 76. *Biotransformation of tobacco isoprenoids using plant cell cultures of *Tripterygium wilfordii*. *Acta Chemica Scandinavica*. 74:683-688.
12. Attenburrow, J., Cameron, A., Chapman, J., Evans, R., Hems, B., Jansen, A. y Walker, T.(1952) *J. Chem. Soc.*, 1094.
13. Back, K. y Chappell, J. (1995). Cloning and Bacterial Expression of a sesquiterpene cyclase from *Hyoscyamus muticus* and its molecular comparison to related terpene cyclases. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(13): 7375-7381.
14. Banthorpe, D., Grey, T., Poots, I. Fordham, W. (1986). Monoterpene metabolism in cultures of *Rosa* species. *Phytochemistry*. 25(10): 2321-2326.
15. Barz, W. y Mackenbrock, U. (1994). Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpan in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 38: 199-211.
16. Bejar, E., Reyes-Chilpa, R. y Jiménez-Estrada M. (2000). Bioactive compounds from selected plants used in XVI century Mexican traditional medicine. En: *Studies in Natural Products Chemistry*. Volumen 24 Bioactive Natural Products (Part E)(Atta-ur-Rahman, ed.). Amsterdam: Elsevier Science Publishers. pp 799-844.
17. Bell E (1981) The Physiological Role(s) of Secondary (Natural) Products. En: *The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise*, Vol 7 (Stumpf, P y Conn E eds.). Academic Press Inc. USA. pp 1-19.
18. Bell, E. (1980). The Possible Significance of Secondary Compound in Plants. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. Secondary Plant Products*. (Bell E y Charlwood B, eds.) Springer-Verlag, New York. pp 11-21.
19. Bennett, J. (1995). From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. *Can. J. Bot.* 73(Suppl. 1): S919-S924.
20. Berglund, T y Ohlsson, A. (1995). Defensive and secondary metabolism in plant tissue cultures, with special reference to nicotinamide, glutathione and oxidative stress. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*. 43: 137-145.
21. Berlin, J. (1997). Secondary Products from Plant Cell Cultures. En: *Biotechnology. Vol 7* (Rehm H y Reed G eds.) Weinheim: VCH pp 593-640.
22. Blodgett, J. y Stanosz, R. (1997). Monoterpene and phenolic compounds concentrations in water-stressed red pine inoculated with *Sphaeropsis sapinea*. *Biochemistry and Cell Biology*. 88(3): 245-251
23. Bohlmann, J. y Eilert, U. (1994). Elicitor induced secondary metabolism in *Ruta graveolens* L. Role of chorismate utilizing enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 38: 189-198.

24. Bohlmann, J., Meyr-Gauen, G. y Croteau, R. (1998). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic análisis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 4126-4133.
25. Bohlmann, J., Steele, C. y Croteau, R. (1997). Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). *The Journal of Biological Chemistry*. 272(35): 21784-21792.
26. Borg-Karlson, A., Valterova, I. y Nilsson, A. (1994). Volatile compounds from flowers of six species in the family Apiaceae: Bouquets for different pollinators? *Phytochemistry*. 35(1): 111-119.
27. Bush, L., Wilkinson, H. y Schardl, C. (1997). Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiol*. 114: 1-7.
28. Carrier, D., Beek, T., Heijden, R. y Verpoorte, R. (1998). Distribution of Ginkgolides and Terpenoid Biosynthetic activity in *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry*. 48(1): 89-92.
29. Carriere, F., Gil, G., Tapie, P. y Chagvardieff, P. (1989). Biotransformation of geraniol by photoautotrophic, photomixotropic and heterotrophic plant cell suspensions. *Phytochemistry*. 28(4): 1087-1090.
30. Cartayrade, A., Neau, E., Sohier, C., Balz, J., Carde, J. y Walter, J. (1997). Ginkgolide and bilobalide biosynthesis in *Ginkgo biloba*. I: Sites of synthesis, translocation and accumulation of ginkgolides and bilobalide. *Plant. Physiol. Biochem.* 35(11): 859-868.
31. Castro, C., Jiménez, M. y González-De Parra. (1992). Inhibitory Effect of Piqueroi A on the Growth of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Planta med.* 58: 281-282.
32. Cavalier-Smith, T. (1992). Origins of secondary metabolism. En: *Secondary metabolites: their function and evolution* (Chadwick D y Wiley J eds.) Ciba Foundation Symposium 171. pp 64- 79.
33. Cline, H. y Henry, R. (1996). Import and routing of nucleos-encoded chloroplast proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 1-26.
34. Colby, S., Alonso, W., Katahira, E., McGarvey, D. y Croteau, R. (1993). 4S-Limonene Synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). *The Journal of Biological Chemistry*. 268(31): 23016-23024.
35. Colby, S., Crock, J., Dowdle-Rizzo, B., Lemaux, P. y Croteau, R. (1998). Germacrene C syntase from *Lycopersicon esculentum* cv.VFNT Cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 2216-2221.
36. Cormier, F. y Ambid, C. (1987). Extractive bioconversion of geraniol by a *Vitis vinifera* cell suspensión employing a two-phase system. *Plant Cell Reports* 6. 427-430

37. Cramer, F. y Böhm, W. (1959). Synthese von Geranyl- und Farnesyl-pyrophosphat. *Angew.Chem.* 71(24): 775.
38. Cramer, F. y Weiman, G. (1960). Trichloroacetonitrile, a Selective Reagent for Esterification of Phosphoric acid. *Chemistry and Industry*, January 9:46.
39. Cramer, F., W. Rittersdorf y W. Böhm. (1962) Synthese von Phosphorsäureestern und Pyrophosphorsäureestern del Terpenalkohole. *Ann.Chem.* 654: 180-188.
40. Crawford, D. (1990). The chloroplast genome and plant systematics. En: *Plant Molecular Systematics*. John Wiley and Sons. USA. pp. 272-305.
41. Creelman, R., y Mullet, J. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 4114-4119.
42. Croes, A., Jacobs, J., Arroo, R. y Wullems, G. (1994). Thiophene biosynthesis in tagetes roots: molecular versus metabolic regulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 38: 159-165.
43. Croteau, R. (1991). Metabolism of monoterpenes in mint (*Mentha*) species. *Planta Med.* 57: S10-S14
44. Croteau, R. (1987). Biosynthesis and catabolism on monoterpenoids. *Chem. Rev.* 87:929-954.
45. Croteau, R. Alonso, W. Koeppe, A. y Jhonson, M. (1994). Biosynthesis of Monoterpenes: Partial Purification, Characterization and Mechanism of Action of 1,8-Cineolo Synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 309 (1)184-192.
46. Croteau, R. y Karp, F. (1979). Biosynthesis of monoterpenes: Preliminary characterization of bornyl pyrophosphate synthetase from sage (*Salvia officinalis*) and Demostration thath Geranyl Pyrophosphate is the preferred substrate for cyclization. *Arch. Biochem. Biophys.* 198(2): 512-522.
47. Croteau, R. y Karp, F. (1976). Biosynthesis of monoterpenes: Enzimatic conversion of Neryl Pyrophosphate to 1,8-Cineole, α -Terpineol, and cyclic monoterpene hydrocarbons by a cell-free preparation from sage (*Salvia officinalis*). *Arch. Biochem. Biophys*176: 734-746.
48. Croteau, R., Burbott, A. y Loomis, W. (1972). Apparent energy deficincy in Mono- and Sesqui-Terpene biosynthesis in peppermint. *Phytochemistry.* 11:2937-2948.
49. Croteau, R., Felton, N. y Wheeler, J. (1985). Stereochemistry at C-1 of Geranyl Pyrophosphate and Neryl Pyrophosphate in the Cyclization to (+)-and(-)-Bornyl Pyrophosphate. *The Journal of Biological Chemistry.* 260(10): 5956-5961.
50. Cruz, R., Anaya, A., Gavilanes-Ruiz, M., Sánchez S. y Jiménez, M. (1990). Effect of diacetyl piqueroI en H⁺-ATPase activity of microsomes from *Ipomea purpurea*. *Journal of Chemical Ecology.* 16(7): 2253-2261.

51. Cruz-Reyes, A., Chavarín, C., Campos, M., Taboada J y Jiménez, M. (1989). Actividad molusquicida del Piquerol A aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 84 (1): 35-40.
52. Chadha, A., Manohar, M., Soundararajan, T. y Lokeswari, T. (1996). Asymmetric Reduction of 2-Oxo-4-Phenylbutanoic Acid Ethyl Ester by *Daucus carota* cell cultures. *Tetrahedron: Asymmetry.* 7(6): 1571-1572.
53. Chappell, J. (1995). Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 521-547.
54. Chasan, R. (1995). Eliciting phosphorylation. *The Plant Cell.* 7:495-497.
55. Chen, X., Chen, Y., Heinstejn, P. y Davisson, J. (1995). Cloning, expresion, and characterization of (+)-d- cadinene synthase: A catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 324(2): 255-266.
56. Chen, Z., Malamy, J., Henning, J., Conrath, U., Sánchez-Casas, P., Silva, H., Ricigliano, J. y Klessing, D. (1995). Induction modification and traduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4134-4137.
57. Dangl J. (1998). Plants just say NO to pathogens. *Nature.* 394: 525-527.
58. Danon, A. (1997). Translational Regulation in the chloroplast. *Plant Physiol.* 115: 1293-1298.
59. Davis, E., Tsuji, J., Davis, G., Pierce, M. y Essenberg, M. (1996). Purification on (+) δ -cadineno synthase, a sesquiterpene cylase from bacteria-inoculated cotton foliar tissue. *Pytochemistry.* 41(4): 1047-1055.
60. Dayhoff, M. y Schwartz, R. (1980). Early Biological Evolution Derived from Chemical Structures. En: *Biological Chemistry of Organelle Formation* (Bücher Th Shebald W y Weiss H eds.) Springer-Verlag. Aemania, pp 71-91.
61. Delledonne, M., Xila, Y., Dixon, R. y Lamb, C. (1998). Mitric oxide functions as a signal in plant disease resístanse. *Nature.* 394: 585-588.
62. Dethier, M. y De Luca, V. (1993). Partial purification on an N-Methyltransferase involved in vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry.* 32(3): 673-678.
63. DiCosmo, F., Facchini, P. y Kraml, M. (1989). Cultures plant cells - the chiminal factory within. *Chemistry in Britain*, October: 1001-1004.
64. Dixon, R. (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 41: 339-367.
65. Dixon, R. (1991). *Plant Cell Culture. The practical approach.* Series Oirl Press. Oxford, England. pp 15-20, 91-96.
66. Dixon, R., Lamb, C., Masound, S., Sewalt, V. y Paive, N. (1996). Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic

- manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses-a review. *Gene*. 179: 61-71.
67. Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V. y Pichensky, E. (1996) Evolution of Floral Plant Scent in *Clarkia*: Novel Patterns of S-Linalool Synthase Gene Expresión i the *C. breweri* Flower. *The Plant Cell*. 8: 1137-1148.
 68. Dudley, M., Dueber, M. y West, C. (1986). Biosynthesis of the macrocyclic diterpene casbene in castor bean (*Ricinus communis* L.) *Plant Physiol*. 81:335-342.
 69. Dudley, M., Green, T. y West, C. (1986). Biosynthesis of the macrocyclic diterpene casbene in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings. *Plant Physiol*. 81:343-348.
 70. Dufresne, C., Cormier, F. y Dorion, S. (1997). In vitro fomation of Crocetin Glucosyl Esteres by *Crocus sativus* callus extract. *Planta Medica*. 163: 150-153.
 71. Eilert, U. (1987). Elicitation: Methodology and Aspects of Application. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 4. Academic Presss, Inc. pp 154-196.
 72. Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M. y Bacher, A. (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & Biology*. 5: R221-R233.
 73. Emes, M. y Dennis, D. (1997). Regulation by Compartamentalization. En: *Plant Biochemistry* (Dey, P. y Harborne, J., eds). Academic Press. Londres. pp 353-385.
 74. Endo, T. y Suga, T. (1992). Stereochemistry in the biosynthesis of Geranyl Diphosphate by Geranyl Diphosphate Synthase from *Pelagonium roseum*. *Phytochemistry*. 31(%): 1565-1568.
 75. Ensminger, A. (1993). Control of developmente in plant and fungi by far-UV radiation, *Physiol. Plant..* 88: 501-508.
 76. Ezekowitz, R. y Hoffmann, J. (1996). Innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 8: 1-2.
 77. Facchini, P. y Chapell, J. (1992). Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 11088-11092.
 78. Feron, G., Clastre, M. y Ambid, C. (1990). Prenyltransferase compartamentation in cells of *Vitis vinifera* cultivated in vitro. *FEBS*. 271(1,2): 236-238.
 79. Fischer, K., Kammerer, B, Gutensohn, M., Arbinger, B., Weber, A., Häusler, R. y Flüge, U. (1997). A new class of plastidic phosphate translocators: A putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *The Plant Cell*. 9: 453-462.
 80. Fritig, B., Heitz, T. y Legrand, M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*. 10: 16-22.

81. Fu, T (1998). Safety considerations for food ingredients produced by plant cell and tissue culture. *Chemtech*, January: 40-45
82. Funk, C., Koepf, A. y Croteau, R. (1992). Catabolism of camphor in tissue cultures and leaf disk of common sage (*Salvia officinalis*). *Arch. Biochem. Biophys.* 294(1): 306-313.
83. Funk, C., Lewinsohn, E., Vogel, B., Steele, C. y Croteau, R. (1994). Regulation of Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*). Coordinate induction of monoterpene and diterpene cyclases and two cytochrome P450-Depended diterpenoid hydroxylases by stem wounding. *Plant Physiol.* 106: 999-1005.
84. Galiana, E., Bonnet, P., Conrod, S., Keller, H., Panabieres, F., Ponchet, A. y Ricci, P. (1997). RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiol.* 115: 1557-1567.
85. Gatehouse, J (1997). Regulation of Gene expression in Plants. En: *Plant Biochemistry* (Dey P. Y Harborne J., eds) Academic Press, Londres. pp 353-385.
86. Gershenzon, J. Y Croteau, R. (1990). Regulation of monoterpene biosynthesis in higher plants. En: *Biochemistry of Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids*, Vol. 4 (Tower, N y Stafford, D., eds.) Plenum press, New York. pp 99-160.
87. Gershenzon, J., Maffei, M. Y Croteau, R. (1989). Biochemical and Histochemical Localization of Monoterpenes in the Glandular Trichomes of Spearmint (*Mentha spicata*). *Plant. Physiol.* 89: 1351-1357.
88. Gijzen, M., Lewinsohn, E. y Croteau, R. (1991). Characterization of the constitutive and wound-inducible monoterpene cyclases of Grand Fir (*Abies grandis*). *Arch. of Biochem. Biophys.* 289(2): 267-273.
89. Gijzen, M., Lewinsohn, E. y Croteau, R. (1992). Antigenic cross-reactivity among monoterpene cyclases from Grand Fir and induction of these enzymes upon stem wounding. *Arch. Biochem. Biophys.* 294(2): 670-674.
90. Gil, G. Ferreira, P. y Bullard, C. (1995). Biotransformation of Δ^2 -Carene by callus tissues. *Phytochemistry.* 38(3): 629-631.
91. Gleizes, M., Pauly, G., Bernard-Dagan, C. y Jacques R. (1980). Effects of light on terpene hydrocarbon synthesis in *Pinus pinaster*. *Physiol. Plant.* 50:16-20.
92. González de la Parra, M., Anaya, A., Espinosa, F., Jiménez, M. & Castillo, R. (1981). Allelopathic potential of *Piqueria trinervia* (Compositae) and *Piquerols A* and *B*. *J. Chemistry Ecology.* 7(3), 509-515.
93. González de la Parra, M., Chávez, D., Jiménez-E., M. y Ramos, C. (1991). Acaricidal potential of *Piquerol A* and *B* against *Boophilus microplus*. *Pestic. Sci.* 33, 73-80.
94. Goodwin, T. y Mercer, E. (1988). *Introduction to plant biochemistry*. 2nd De. Pergamon press, Londres, Inglaterra. Capítulo 11, 400-470.

95. Gottlieb, O. (1990). Phytochemicals: Differentiation and Function. *Phytochemistry*, 29 (6): 1715-1724.
96. Gray, M. (1991). Origin and evolution of plastid genomes and genes. En: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press, Inc. pp. 303-323.
97. Guo, H., Chang, Z., Yang, R., Guo, D. Y Zheng, J (1998). Anthraquinones from hairy root cultures of *Cassia obtusifolia*. *Phytochemistry*. 49(6): 1623-1625.
98. Guo, Z. Y Wagner, G. (1995). Biosynthesis of cembratrienols in cell-free extracts from trichomes of *Nicotiana tabacum*. *Plant Science*. 110: 1-10.
99. Guo, Z., Machiya, K., Ma, Y. y Sih, C. (1998). Enzymatic oxidative coupling of hydroxyphenylglycine derivatives. *Tetrahedron Letters*. 39: 5679-5682.
100. Guo, Z., Salamonczy, G., Han, K., Machiya, K. y Shi, C. (1997). Enzymatic oxidative phenolic coupling. *J. Org. Chem*. 62: 6700-6701.
101. Hahlbrock, K., Scheel, D., Legermann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. y Schmelzer, E. (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 4150-4157.
102. Hallahan, D., Dawson, G., West, J. y Wallsgrave, R. (1992). Cytochrome P-450 catalysed monoterpene hydroxylation in *Nepeta mussinii*. *Plant Physiol. Biochem*. 30(4): 435-443.
103. Hallahan, D., West, J., Smiley D. y Pickett J. (1998). Nepetalactol oxidoreductase in trichomes of the catmint *Nepeta racemosa*. *Phytochemistry*. 48(3): 421-427.
104. Hamada, H., Fuchikami, Y., Ikematsu, Y., Hirata, T., Williams, H. y Scott, I. (1994). Hydroxylation of piperitone by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*. 37(4): 1037-1038.
105. Hamada, H., Naka, S. y Kurban, H. (1993). Stereoselective reduction in the biotransformation of androstane derivatives by cell suspension cultures of *Marchantia polymorpha*. *Chemistry Letters*: 2111-2112.
106. Hamada, H., Yasumun, H., Fuchikami, Y., Hirata, T., Sattler, I., Williams, H. y Scott, I. (1997). Biotransformation of geraniol, nerol and (+)- and (-) carvone by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*. 44(4): 615-621.
107. Hanes, C. y Isherwood, F. (1949). Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature*. 164(4183): 1107- 1113.
108. Hausladen, A. y Stamler, J. (1998). Nitric oxide in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 10345-10347.
109. Hebert, R. (1989). *The biosynthesis of Secondary Metabolites*. 2ª Edición. Chapman and Hall, Gran Bretaña. pp1-15.
110. Heijden, R., Threlfall, D., Verpoorte, R. y Whitehead, I. (1989). Regulation and Enzymology of Pentacyclic Triterpenoid Phytoalexin Biosynthesis in Cell

- Suspension Cultures of *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry*. 28(11): 2981-2988.
111. Heijne, G. (1994). Signals for Protein Targeting into and across Membranes. En: *Subcellular Biochemistry*, Volumen 22: Membrane Biogenesis (Maddy, A. y Harrys, J., eds.) Plenum Press. New York. pp 1-13.
 112. Heintze, A., Görlach, J., Leuschner, C., Hoppe, P., Hagelstein, P. Schulze-Siebert, D. y Schultz, G. (1990). Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. *Plant Physiol*. 93: 1121-1127.
 113. Hendriks, R. y Fuller, S. (1994). Compartments of the Early Secretory Pathway. En: *Subcellular Biochemistry*, Volumen 22. Membrana Biogénesis (Maddy, H. y Harris, J., eds.) Plenum Press, New York. pp 101-141.
 114. Hernández, M (1996). Micropropagación de *Piqueria trinervia* Cav. y su sobrevivencia en suelos derivados de cenizas volcánicas del Ajusco, México, en condiciones de invernadero. México, D.F. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. pp 70.
 115. Hickel, A., Hasslacher, M. y Griengl, H. (1996). Hydroxynitrile lyases: Functions and properties. *Physiologia Plantarum*. 98: 891-898.
 116. Hirata, T., Ikeda, Y., Izumi, S., Shimoda, K., Hamada, H. y Kawamura, T. (1994). Introduction of oxygenated functional group into 3-carene and 2-pinene by cultured cells. *Phytochemistry*. 37(2): 401-403.
 117. Hirata, T., Izumi, S., Shimoda, K. y Hayashi, M. (1993). Stereochemistry in the reduction of the C=C bond of verbenone with a reductase from the cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. 1426-1427.
 118. Holden, P. y Yeoman, M. (1994). Variation in the growth and biosynthetic activity of cloned cell cultures of *Capsicum frutescens* and their response to an exogenously supplied elicitor. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture*. 38:31-37.
 119. Hrazdina, G. (1992). Biosynthesis of Flavonoids. En: *Plant Polyphenols* (Heminway, E. y Laks, P., eds) Plenum Press, New York. pp 61-68.
 120. Isherwood, F. y Hanes, C. (1953). Separation and estimation of organic acids on paper chromatograms. *Biochem J*. 55: 824.
 121. Ishiguro, K., Nakajima, M., Fukumoto, H. y Isoi K. (1995). Xanthone substituted with an Irregular Monoterpene in Cell Suspensión Cultures of *Hypericum patulum*. *Phytochemistry*. 39(4): 903-905.
 122. Jiménez, M. & González de la Parra, M. (1983). Nuevo alcohol diterpénico aislado de *Piqueria trinervia*. *Rev. Latinoam. Quím*. 14, 20-23.
 123. Johnson, P y Ecker, J. (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular Perspective. *Annu. Rev. Genet*. 32: 227-54.
 124. Joyard, J., Block, M., Pineau, B y Douce, R. (1992). Pigments of the envelope membranes. En: *Regulation of Chloroplast Biogenesis* (Arygyroundi, J., ed.) Nato ASI Series: Life Science, Vol 226. Plenum Press. E. U. pp 18-21.

125. Kamigauchi, M. y Iwasa, K. (1994). *Corydalis* spp. : In vitro culture and the biotransformation of protoberberines. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. 26. Medicinal and Aromatic Plants VI* (Bajaj, S. ed.) Springer-Verlag. Berlin. pp94-105.
126. Karp, F., Mihaliak, A., Harris, J. y Croteau, R. (1990). Monoterpene biosynthesis: Specificity of the Hydroxylations of (-)- Limonene by enzyme preparations from Peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 276(1): 219-226.
127. Kawamoto, H., Asada, Y., Sekine, H. y Furuya, T. (1998). Biotransformation of artemisinic acid by cultured cells of *Artemisia annua*. *Phytochemistry.* 48(8): 1329-1333.
128. Keegstra, K. (1997). Transport of proteins into chloroplasts. En: *Plant Metabolism, 2ª Edición* (Denis D, Turpin D, Lefebvre D y Layzell D, eds.) Longman, Singapore. pp. 373-381.
129. Keegstra, K. (1997). Transport of proteins into chloroplasts. En: *Plant Metabolism* (Denis, D., Turpin, D., Lefebvre, D., y Layzell, D., eds.) Longman, Londres. pp 373-381.
130. Kirk, J y Tilney-Bassett, R. (1978). The biosynthetic capabilities of plastids. Part I: Synthesis of pigments and lipids. En: *The plastids: The chemistry, structure, growth and inheritance*. Elsevier-North Holland Biomedical Press. Holanda. pp. 615-669.
131. Klessig, D. y Malamy, J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology.* 26:1439-1458.
132. Kokubun, P., Harborne, J., Eagles, J. y Waterman, P. (1995). Antifungal biphenyl compounds are the phytoalexins of the sapwood of *Sopbus aucuparia*. *Phytochemistry.* 40(1): 57-59.
133. Kolattukudy, P., Rogers, L., Li, D., Hwang, C. y Flaishman, M. (1995). Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA:* 92: 4080-4087.
134. Kolbe, A., Schneider, B., Porcel, A. Y Adam, G. (1998). Metabolic inversión of the 3-Hydroxy function of brassinosteroids. *Phytochemistry.* 48(3): 467-470.
135. Kren, V., Minghetti, A., Sedmera, P., Havlicek, V., Prikrylova, V. y Crespi-Perellino, N. (1998). Glucosilation of silbyn by plant cell cultures of *Papaver somniferum* var. *setigerum*. *Phytochemistry.* 47(2): 217-220.
136. Kuhn, P. y Hargreaves, J. (1987). Antifungal substances from herbaceous plants. En: *Fungal infection of plants* (Pregg, G. y Ayres, P., eds.). Symposium of the British Mycological Society. Cambridge University Press. pp 193-218.
137. Kutney, J. (1993). Plant cell culture combined with chemistry: A powerful route to complex natural products. *Acc. Chem. Res.* 26: 559-566.
138. Kutney, J. (1997). Plant cell culture combined with chemistry-routes to clinically important compounds. *Pure & Appl. Chem.* 69(3): 431-436.

139. Laschat, S. (1996). Pericyclic reactions in biological systems – Does nature know about the Diels- Alder reactions? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35(3): 289-291.
140. Lesburg, C., Zhai, G., Cane, D. y Christianson, D. (1997). Crystal structure of Pentalenene Synthase Mecanistic Insights on terpenoid cyclization reactions in biology. 277: 1820
141. Lewinsohn, E., Gijzen, M., Muzika, R., Barton, K. y Croteau, R. (1993). Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*) Saplings and Mature Trees: Modulation of this wound response by lighth and water stresses. *Plant Physiol.* 101: 1021-1028.
142. Lewinsohn, E., Worden, E. y Croteau, R (1994). Monoterpene cyclases in grand fir callus cultures: Modulation by elicitors and growth regulators. *Phytochemistry.* 36(3): 651-656.
143. Loreto, F., Ciccioli, P., Brancaleoni, E., Cecinato, A., Frattoni, M. y Sharkey, T. (1996). Different sources of reduced carbon contribute to form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9966-9969.
144. Lowry, et al. (1978). *Anal. Biochem.* 87: 206.
145. Mau, C. y West, C. (1994). Cloning of Casbene synthase cDNA: Evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plantas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 9: 8497-8501.
146. Mavituna F. (1992). Applications of plant biotechnology in industry and agriculture. En: *Recent Advances in Biotechnology.* F. Vadan-Sukan y S. Sukan (eds.), 209-226.
147. McGarvey, D. y Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell.* 7: 1015-1026.
148. McGeady, P. y Croteau, R. (1995). Isolation and characterization of an active-site peptide from monoterpene cyclase labeled with a mechanism-based inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 317(1): 149-155.
149. Messner, B. Boll, M. (1993). Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material en a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 34:261-269.
150. Mettal, U., Boland, W., Beyer, P. y Kleinig, H. (1988). Biosynthesis of monoterpene hydrocarbons by isolated chromoplasts from daffodil flowers. *Eur. J. Biochem.* 170: 613-616.
151. Miersch, O., Porzel, A. y Wasternack, C. (1999). Microbial conversion of jasmonates – hydroxylations by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry.* 50: 1147-1152.
152. Miyazawa, M. Nobata, M., Hyakumachi, M. (1995). Biotransformation of (+)- and (-)- Camphorquinones by fungi. *Phytochemistry.* 39(3): 569-573.

153. Morandi, D. (1996). Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant and Soil*. 185: 241-251.
154. Moule, H. y Greenfield, S. (1963). The paper chromatography of esters of phosphoric and phosphorous acids. *J. Chromatog.* 11: 77-83.
155. Mühlenbeck, U. y Barz, W. (1997). Cytochrome P450-dependent formation of a-Hydroxiacetovanillone from acetovanillone in *Solanum khasianum*. *Phytochemistry*. 44(5): 865-867.
156. Mullet, J. (1997). Molecular biology of photosynthesis in higher plants. En: *Plant Metabolism*, 2ª Edición (Denis D, Turpin D, Lefebvre D y Layzell D, eds.) Longman, Singapore. pp. 260-273.
157. Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473- 497.
158. Nabeta, K., Ara, Y., Aoki, Y. y Miyake M. (1990). Biosynthesis of monoterpenes and sesquiterpenes in *Larix leptolepis* callus from deuterated mevalonates. *Journal of Natural Products*. 53(5):1241-1248.
159. Nakamura, K., Miyoshi, H., Sugiyama, T. y Hamada, H. (1995). Diastereo- and enantio- selective reduction of Ethyl 2-Methy 3-Oxobutanoate by plant cell cultures. *Phytochemistry*. 40(5): 1419-1420.
160. Nakano, K., Yoshida, C., Furukawa, W., Takaishi, Y. y Shishido, K. (1998). Terpenoids in transformed root culture of *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry*. 49(6): 1821-1824.
161. Naoshima, Y. y Akakabe, Y. (1989). Biotransformation of some keto esters through the consecutive reuse of immobilized *Nicotiana tabacum* cells. *J. Org. Chem.* 54(17): 4237-4239.
162. Naoshima, Y. y Akakabe, Y. (1991). Biotransformation of aromatic ketones with cell cultures of carrot, tobacco and gardenia. *Phytochemistry*. 30(11): 3595-3597.
163. Naoshima, Y., Akakabe, Y. y Watanabe, F. (1989). Biotransformation of acetoacetyl esters with immobilized cells of *Nicotiana tabacum*. *Agric. Biol. Chem.* 53(2): 545-547.
164. Neau, E., Cartayrade, A., Balz, J., Carde, J y Walter, J. (1997). Ginkgolide and bilobalide biosynthesis in *Ginkgo biloba*. II: Identification of a possible intermediate compound by using inhibitors of cytochrome P-450 dependent oxygenases. *Plant. Physiol. Biochem.* 35(11): 869-879.
165. Nemethy, E., Skrukrud, C., Piazza, G. y Calvin, M. (1983). Terpenoid biosynthesis in *Euphorbia* Latex. *Biochimica and Biophysica Acta*. 760:343-349.
166. Nickelsen, J., Tiller, K., Fiebig, C., Eisermann, A. y Link, G. (1992). Transcriptional and Post-Transcriptional Determinants of Chloroplast

- Biogenesis. En: *Regulation of Chloroplast Biogenesis* (Arygyroundi, J., ed.) Nato ASI Series: Life Science, Vol 226. Plenum Press. E. U. pp 165-173.
167. Noma, Y., Akehi, E., Miki, N. y Asakawa, Y. (1992). Biotransformation of terpene aldehydes, aromatic aldehydes and related compounds by *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry*. 31(2): 515-517.
168. Norman, M., Liebl, R. y Widholm, J. (1990). Site of clamazone action in tolerant-soybean and susceptible-cotton photomixotrophic cell suspension cultures. *Plant Physiol*. 94. 704-709.
169. Palmer, J. (1991). Plastid Chromosomes: Structure and evolution. En: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press, Inc. pp. 5-43.
170. Paper, D. y Franz, G. (1993). XVI Nerium spp. *In vitro* culture and the production of secondary metabolites. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 21. Medicinal and Aromatic Plants IV* (Bajaj, Y. ed.). pp 233-247.
171. Paper, D. y Franz, G. (1989). Glycosylation of cardenolide aglycones in the leaves of *Nerium oleander*. *Planta Medica*. 55. 30-33.
172. Park, S. y Kim, S. (1998). Modified monoterpenes from biotransformation of (-) isopiperinone by suspension cell culture of *Mentha piperita*. *J. Nat. Prod.* 61: 354-357.
173. Park, S., Chae, Y., Lee, H., Lim, Y. y Kim, S. (1994). Production of (-)-7-Hydroxyisopiperitenone by a suspension cell culture of *Mentha piperita*. *Planta Med.* 60: 374-375.
174. Payne, G., Bringi, U., Prince, C y Schuler, M. (1991). *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Hanser Publishers, New York. pp 25-39, 147-163, 329-335.
175. Peters, N. y Verma, D. (1990). Phenolic compounds as regulators of gene expresión en plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 3: 4-8.
176. Plaxton, W. (1997). Metabolic Regulation. En: *Plant Metabolism*, 2ª edición, Capítulo V. (Denis, D., Turpin, D., Lefebvre, D. y Layzell, D., eds.) Longman, Singapore. pp 50-68.
177. Porra, R., Thompson, W. y Kriedemann, P. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equation for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*. 975: 384-394.
178. Prome, J. (1996). Signalling events elicited in plants by defined oligosaccharide structures. *Current Opinion in Structural Biology*. 6: 671-678.
179. Pyun, H., Wagschal, K., Jung, D., Coates, R. y Croteau, R. (1994). Stereochemistry of the proton elimination in the formation of (+)- and (-)- α -Pinene by monoterpene cyclases from Sage (*Salvia officinalis*). *Arch. Biochem. Biophys.* 308(2): 488-496.

180. Rajaonarivony, J., Gershenzon, J. y Croteau, R. (1992). Characterization and Mechanism of (4S)-Limonene Synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita*). *Arch. Biochem. and Biophys.* 296(1): 49-57.
181. Ren, Y. y West, C. (1991). Elicitation of Diterpene Biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiol.* 99:1169-1178.
182. Romo, J., Romo, A., Quijano, L. y Díaz, E. (1970). Los componentes terpenoides de *Piqueria trinervia* Cav. *Revista Latinoamericana de Química.* 2: 72-81.
183. Saad, I. (1996). Efecto de elicitors sobre la producción de metabolitos secundarios en *Piqueria trinervia* Cav. Tesis de maestría en biotecnología. UACPyP, UNAM. pp 76.
184. Satterwhite, M., Wheeler, C. y Croteau, R. (1985). Biosynthesis of monoterpenes. *The Journal of Biological Chemistry.* 260(26): 13901-13908.
185. Savage, T., Hamilton, B. y Croteau, R. (1996). Biochemistry of short-chain alkanes. *Plant Physiol.* 110: 179-186.
186. Savage, T., Hatch, M. y Croteau, R. (1994). Monoterpene synthases of *Pinus contorta* and related conifers. *The Journal of Biological Chemistry.* 269(6): 4012-4020.
187. Schmit, S. (1993). Toward a Biochemical Definition of the Endosomal Compartment Studies Using Free Flow Electrophoresis. En: *Subcellular Biochemistry*, Volumen 19. Endocytic Compartment: Identification and Characterization (Bergeron, J. y Harris, J., eds.) Plenum Press. E.U.
188. Shimoda, K., Ito, D., Izumi, S. y Hirata, T. (1995). Novel reductase participation in the syn-addition of hydrogen to the C=C bond of enones in the cultures of *Nicotiana tabacum*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1.* 355-358.
189. Shirasu, K., Dixon, R. y Lamb, C. (1996). Signal transduction in plant immunity. *Current Opinion in Immunology.* 8: 3-7.
190. Siebert, M., Sommer, S., Li, S., Wang, Z., Severin, K. y Heide, L. (1996). Genetic engineering of plant secondary metabolism. *Plant Physiol.* 112: 811-819.
191. Smirnov, N. (1995). Metabolic flexibility in relation to the environment. En: *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimation* (Smirnov N, ed) Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, EU. pp 1-16.
192. Soriano-García, M., Jiménez, M., González, M., Hernández, A., Scharz M. y Campana, C. (1983). Crystal and molecular structure of Piquerol A: A potent growth inhibiting factor. *Chem. Lett.*, 617-620.
193. Sridhar, M., Vadivel, S. y Bhalerao, T. (1997). Novel horseradish peroxidase catalysed enantioselective oxidation of 2-Naphthols to 1,1' - Binaphthyl -2,2' - diols. *Tetrahedron Letters.* 38(32): 5695-5696.

194. Starks, C, Back, K., Chappell, J. y Noel, J. (1997). Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by Tobacco 5-epi-aristoiochene synthase. *Science*. 277: 815-1820.
195. Steele, C., Kathoh S., Bohlmann, J. y Croteau, R. (1998). Regulation of Oleoresinosis in Gran Fir (*Abies grandis*): Differential transcriptional control of monoterpene, sesquiterpene, and diterpene synthase genes in response to wounding. *Plant Physiol*. 116: 1497-1504.
196. Steele, C., Lewinsohn, E. Croteau, R. (1995). Induced oleoresin biosynthesis in grand fir a defense against bark beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 4164-4168.
197. Stevens, K., Jurd, L. y Manners, G. (1972). Transformation of geraniol in aqueous acid solutions. *Tetrahedron*. 28:1939-1944.
198. Stitt, M. (1997). The flux of carbon between the chloroplast and cytoplasm. En: *Plant Metabolism*, 2ª Edición (Denis D, Turpin D, Lefebvre D y Layzell D, eds.) Longman, Singapore. pp. 382-400.
199. Strack, D. (1997). Phenol Metabolism. En: *Plant Biochemistry*. (Dey, P. y Harborne, J., eds) Academic Press. Londres. pp 387-416.
200. Sun, T. y Kamiya, Y. (1994). The Arabidopsis GAL Locus Encodes the cyclase ent-Kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *The Plant Cell*.6:1509-1518.
201. Sur, S., Tuljupa, F. y Sur, L. (1991). Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. *Journal of Chromatography*. 542: 451-458.
202. Syahrani, A., Indrayanto, G., Sutarjadi y Wilkins, A. (1997). Bioconversion of salicylamide by cell suspension cultures of *Solanum mammosum*. *Chem. Pharm Bull*. 45(3): 555-557.
203. Takemoto, M y Achiwa, K. (1995). The synthesis of optically active pyridyl alcohols from the corresponding racemates by *Catharanthus roseus* cell cultures. *Tetrahedron: Asymmetry*. 6(12): 2925-2928.
204. Takemoto, M. Y Achiwa, K. (1998). Bioconversion of optically active pyridyl alcohols from the corresponding racemates with plant cell cultures. *Chem. Pharm. Bull*. 46(4): 577-580.
205. Takemoto, M. Y Achiwa, K. (1998). Deracemization of racemic 4-pyridyl - 1-ethanol by *Catharanthus roseus* cell cultures. *Phytochemistry*. 49(6): 1627-1629.
206. Taticek, R., Moo-Young, M. y Legge, R. (1991). The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24:139-158.
207. Terras, F., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N., Osborn, R., Kester, A., Rees, S., Torrekens, S., Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. y

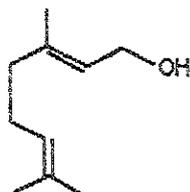
- Broekaert, W. (1995). Small cystein-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*. 7:573-588.
208. Toivonen, L. (1993). Utilization of hair root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.* 9: 12-20.
209. Towers, G. Y Ellis, S. (1995). Secondary metabolism in plant tissue cultures transformed with *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. En: *Genetically modified foods. Safety Aspects*. Capítulo 6(Engel, K., Kakeoka, G. y Teranishi, R., eds.) ACS Symposium Series, 605, USA. pp 56-63.
210. Vanek, T., Valterová, I. y Vaisar, T. (1999). Biotransformation of (S)- (-)- and (R)-(+)- limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* plant cells. *Phytochemistry*. 50: 1347-1351.
211. Viel, C., Bister-Miel, F. y Guignard, J. (1993). XXII *Silene alba* (white campion): *In vitro* culture and benzylisoquinoline alkaloids biotransformation. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. 26. Medicinal and Aromatic Plants IV* (Bajaj, S. ed.) Springer-Verlag. Berlin. pp 327- 338.
212. Vitali, A., Botta, B., Delle Monache, G., Zappitelli, S., Ricciardi, P., Melino, R. y Giardina, B. (1998). Purification and partial characterization of a preoxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies. *Biochem. J.* 331: 513-519.
213. Vogel, b., Wildung, M., Vogel, G. y Croteau, R. (1996). Abietadiene synthase from Gran gir (*Abies grandis*). *The Journal of Biological Chemistry*. 271(38). 23262-23268.
214. Wheeler, C. y Croteau, R. (1987). Monoterpene cyclases: electronic requirements for substrate binding and ionization. *The Journal of Biological Chemistry*. 262(17): 8213-8219.
215. Wheeler, C. y Croteau, R. (1988). Monoterpene cyclases: Physicochemical Features Required for Pyrophosphate Binding Determined from inhibition by structural analogs. *Arch. Biochem. and Biophys.* 260(1): 250-256.
216. Wheeler, C., Mihaliak, C. y Croteau, R. (1990). Uncompetitive Inhibition of monoterpene cyclases by an analog of the substrate Geranyl Pyrophosphates and inhibition of monoterpene biosynthesis *in vivo* by an analog of geraniol. *Arch. Biochem. and Biophys.* 279(2): 203-210.
217. Wickham, K. y West, C. (1992). Biosynthesis of rice phytoalexins. identification of putative diterpene hydrocarbons precursors. *Archives of Biochemistry and biophysics*. 293(2): 320-332.
218. Wildung, M. y Croteau, R. (1996). AcDNA clone for taxadieno sunthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(16): 9201-9204.
219. Wink, M. (1997). Special Nitrogen Metabolism. En: *Plant Biochemistry*. (Dey, P. y Harborne, J., eds). Academic Press. Londres. pp 439-484.

220. Winter, J., Schneider, B., Strack, D. y Adam, G. (1997). Role of a cutochrome P-450-dependent monooxygenase en the hydroxylation of 24-epi-brassinolide. *Phytochemistry*. 45(2): 233-237.
221. Wise, M., Savage, T., Katharina, E. y Croteau, R. (1998). Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*). *The Journal Biological Chemistry*. 273(24): 14891-14899.
222. Yamaguchi, S., Saito, T., Abe, H., Yamane, H., Murofushi, N. y Kamiya, Y. (1996). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme ent-kaurene synthase B from pumpkin (*Curcubita maxima* L.). *The Plant Journal*. 10(2): 203-213.
223. Yang, Y., Shah, J. y y Klessig, D. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development*. 11: 1621-1639.

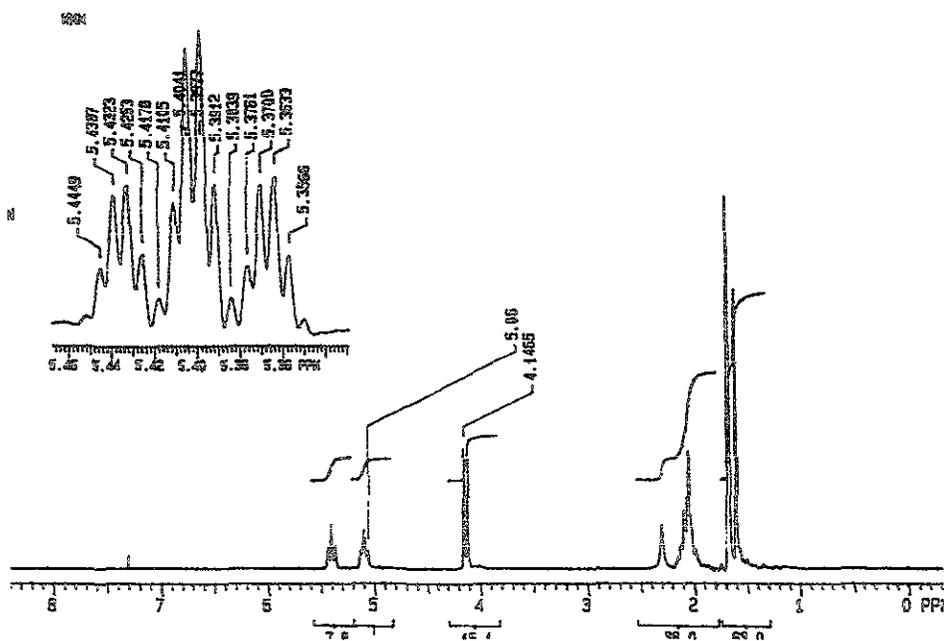
XI.- Apéndice 1. Espectros de RMN y masas

	<i>Página</i>
<i>H¹ RMN del geraniol</i>	140
<i>H¹ RMN del geranial</i>	141
<i>H¹ RMN del geraniol deuterado</i>	142
<i>Espectro de masas del geraniol deuterado</i>	143
<i>H¹ RMN del GP</i>	144
<i>C¹³ RMN del GP</i>	145
<i>H¹ RMN del GPP</i>	146
<i>C¹³ RMN del GPP</i>	147
<i>H¹ RMN del piquerinol</i>	148
<i>C¹³ RMN del piquerinol</i>	149
<i>Infrarrojo del piquerinol</i>	150
<i>Espectro de masas del piquerinol</i>	151
<i>Experimento Cosy del piquerinol</i>	152
<i>BQG del piquerinol</i>	153
<i>Experimento Hetcor del piquerinol</i>	154
Actividad enzimática	
<i>Espectro de masas del piquerol</i>	155
<i>Espectro de masas extracto Flores, testigos</i>	156
<i>Espectro de masas extracto Flores, tratadas</i>	157
<i>Espectro de masas extracto hojas de brotes, testigos</i>	158
<i>Espectro de masas extracto hojas de brotes, tratadas</i>	159
<i>Espectro de masas extracto hojas, testigos</i>	160
<i>Espectro de masas extracto hojas, tratadas</i>	161
<i>Espectro de masas extracto cultivos elicitados testigos</i>	162
<i>Espectro de masas extracto cultivos elicitados, tratados</i>	163

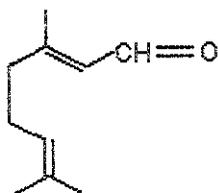
H¹ RMN del geraniol



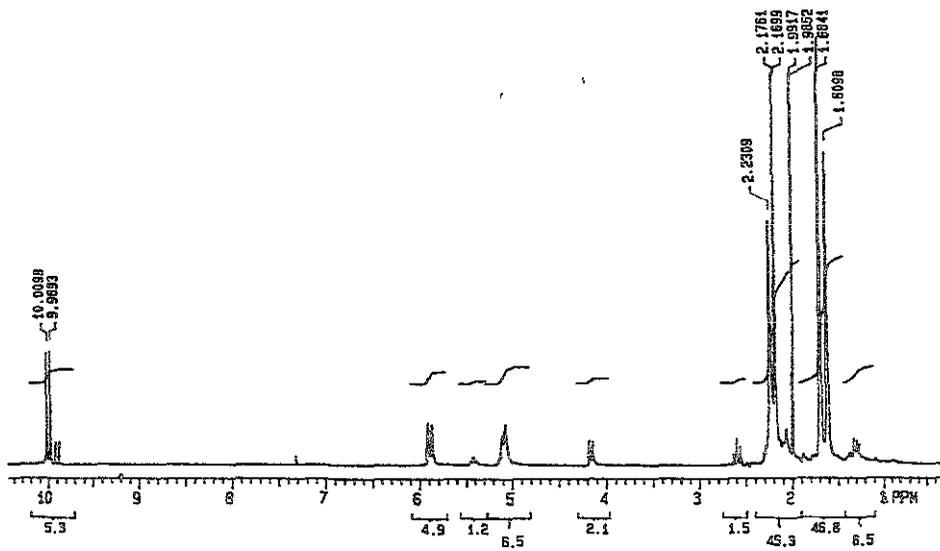
Geraniol



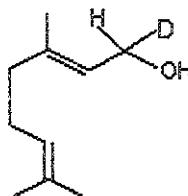
H¹ RMN del geranial



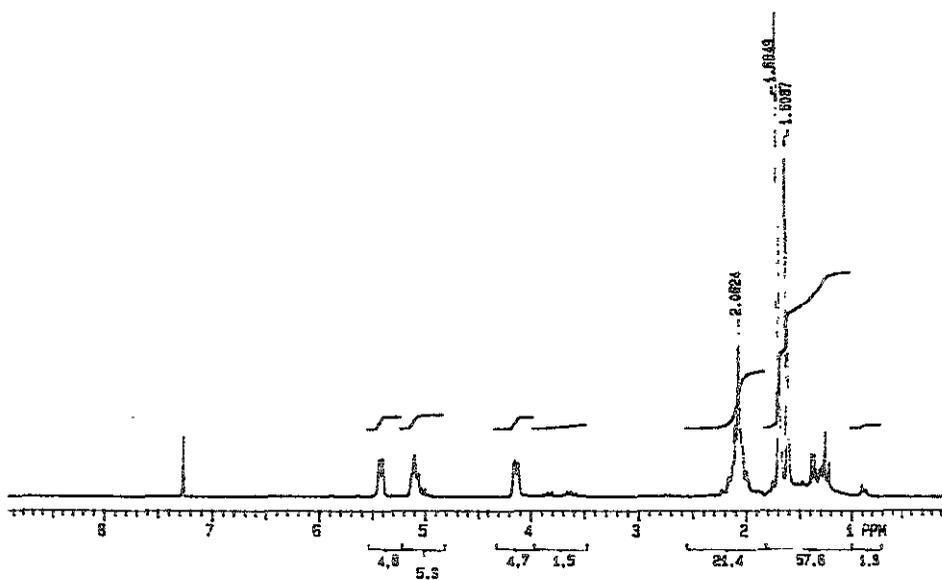
Geranial



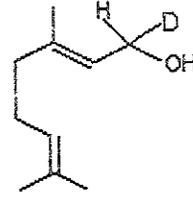
H¹ RMN del geraniol deuterado



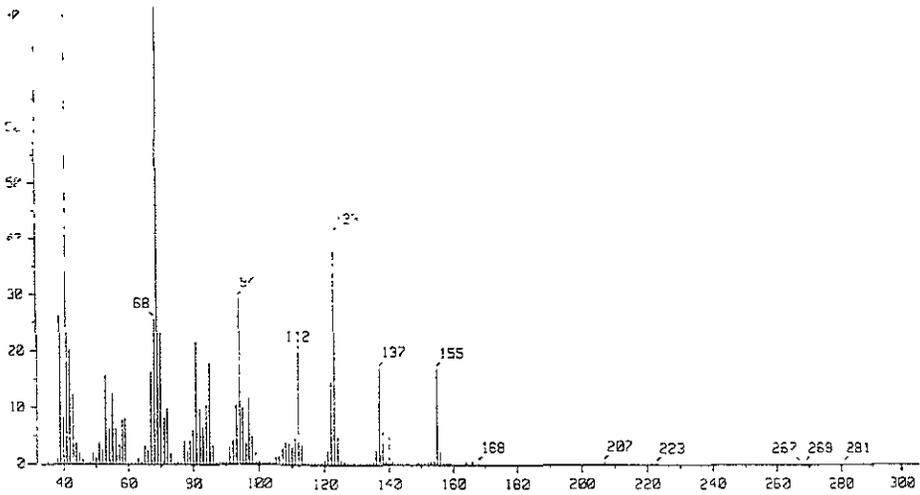
Geraniol deuterado



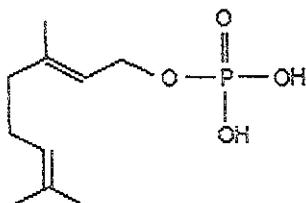
Espectrometría de masas del geraniol deuterado



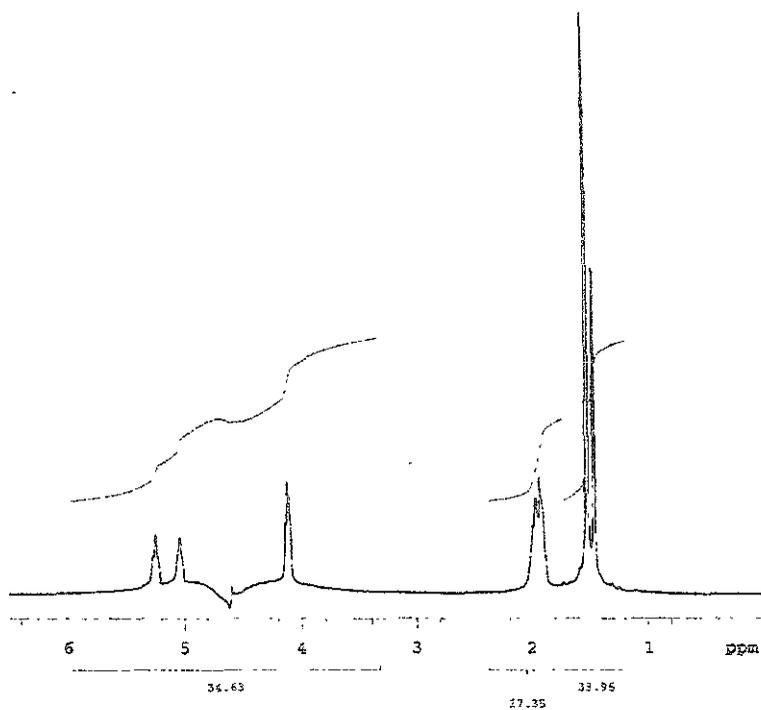
Geraniol deuterado



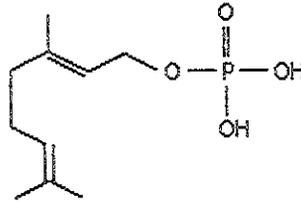
*H*¹ RMN del GP



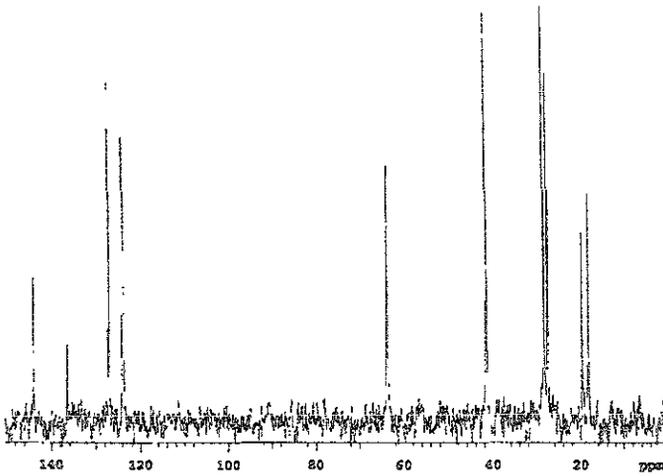
Geraniil monofosfato



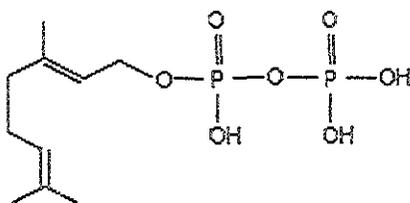
C¹³ RMN del GP



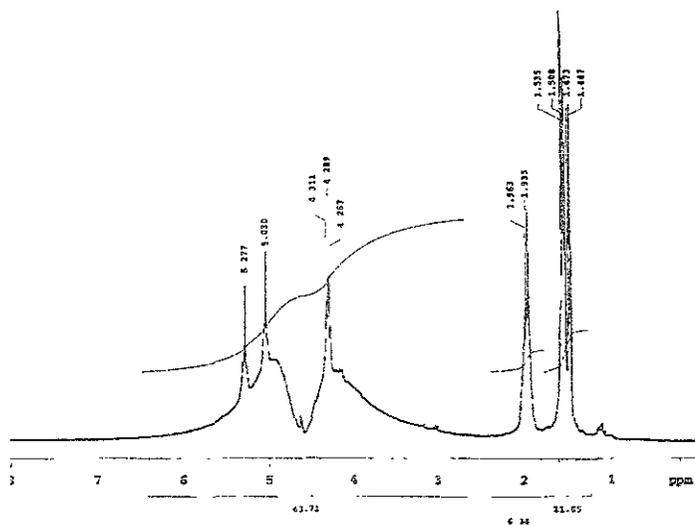
Geranil monofosfato



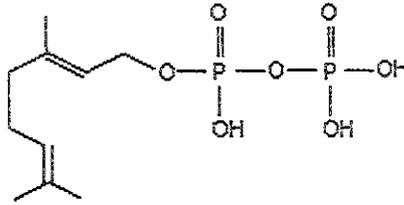
*H*¹ RMN del GPP



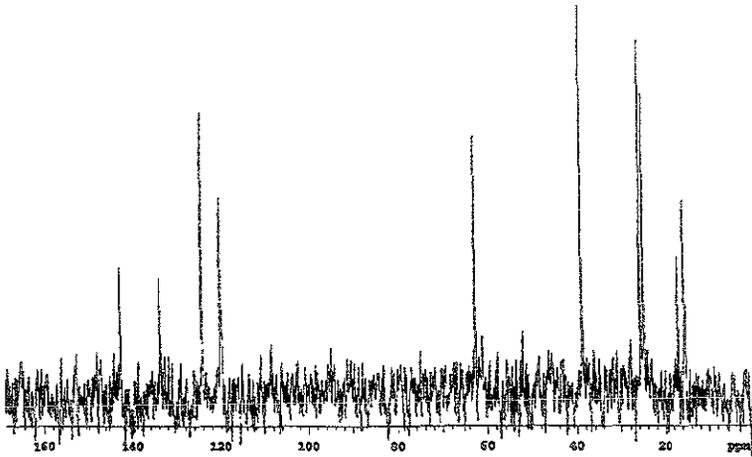
Geranyl pirofosfato



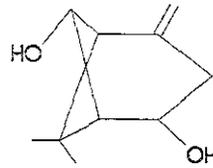
C¹³ RMN del GPP



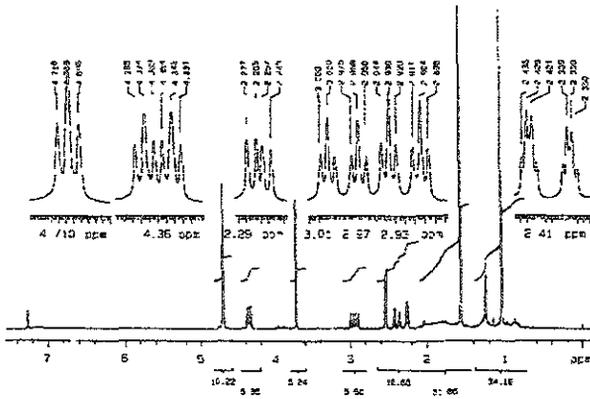
Geraniil pirofosfato



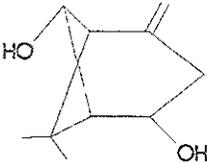
H¹ RMN del piquerinol



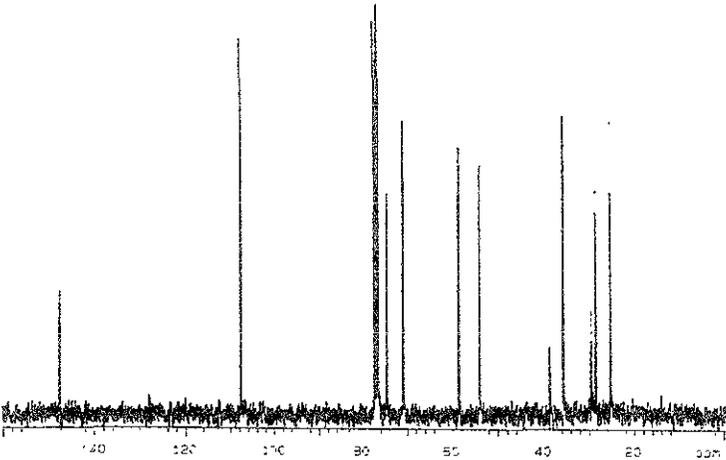
Piquerinol



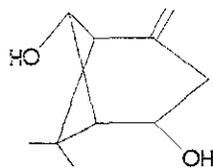
C¹³ RMN del piquerinol



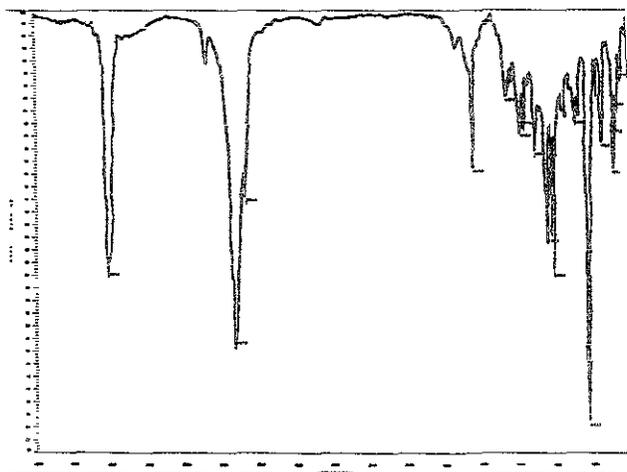
Piquerinol



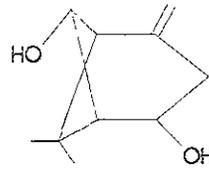
Infrarrojo del piquerinol



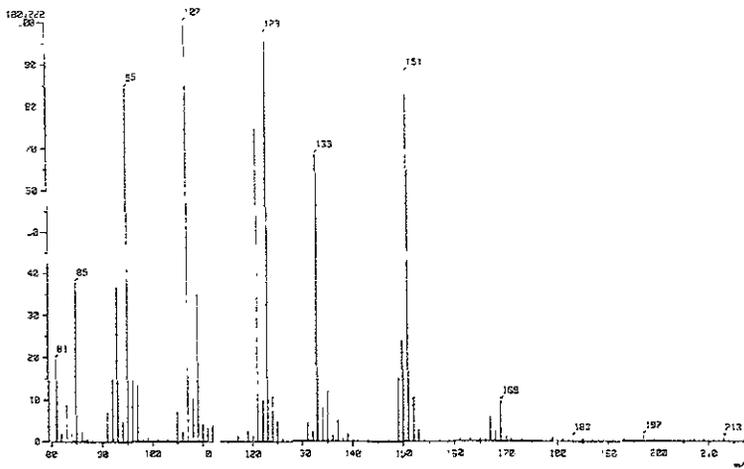
Piquerinol



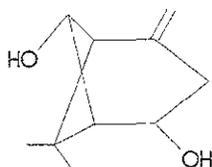
Espectro de masas del piquerinol



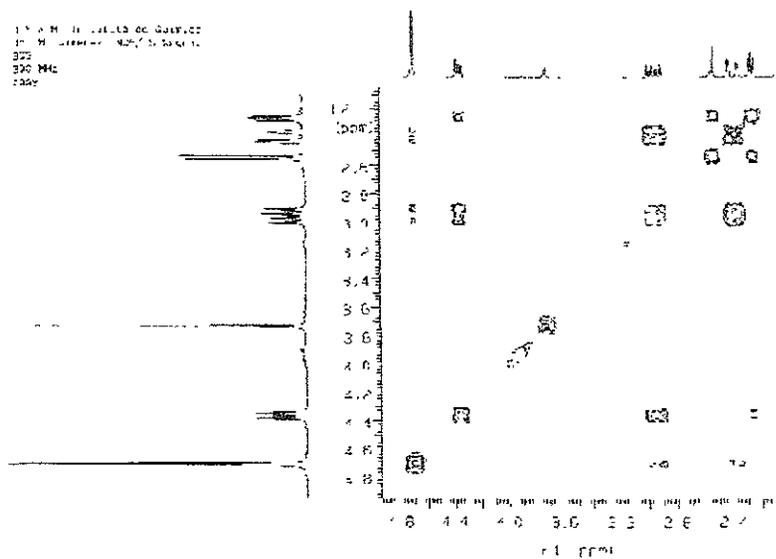
Piquerinol



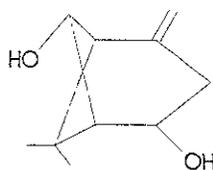
Experimento Cosy del piquerinol



Piquerinol

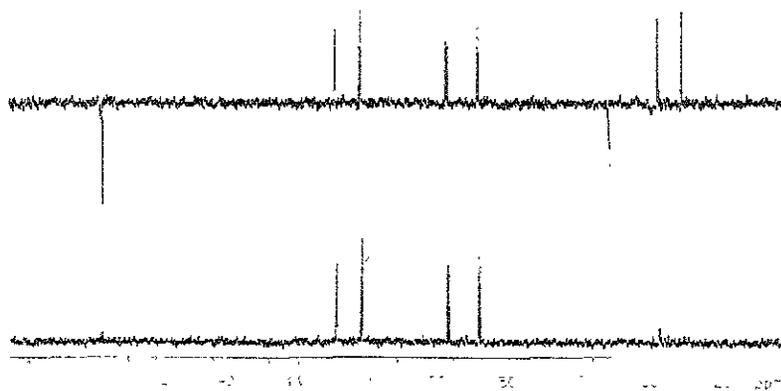


Experimento BQG del piquerinol

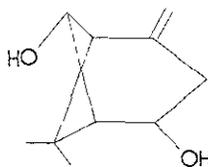


Piquerinol

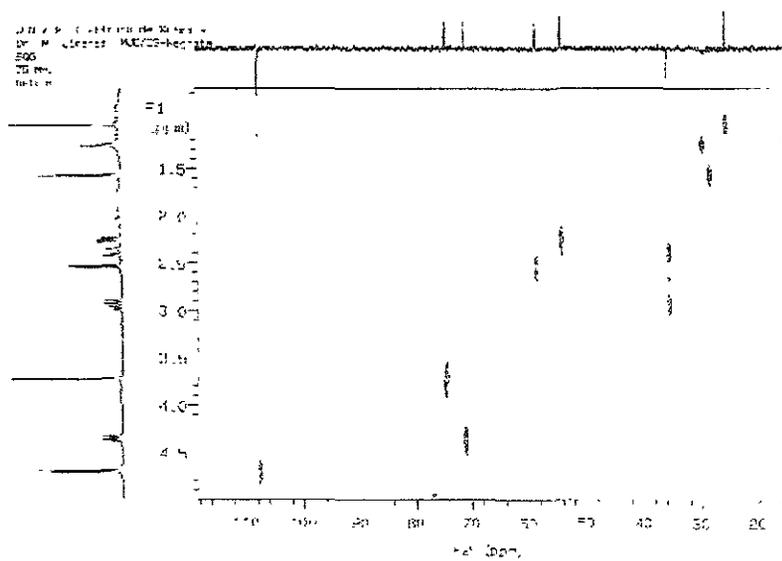
UNIA M. Instituto de Química
 Dr. M. L. García M. B. / 2008-2010
 HSA
 14. 28



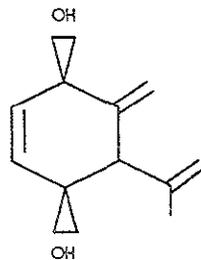
Experimento Hetcor del piquerinol



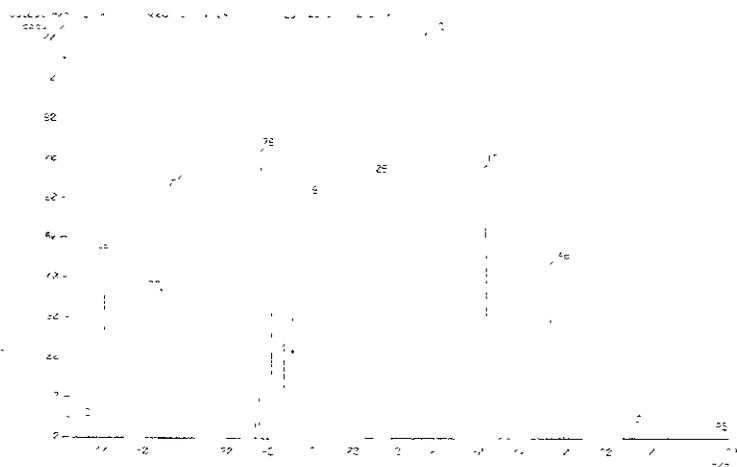
Piquerinol



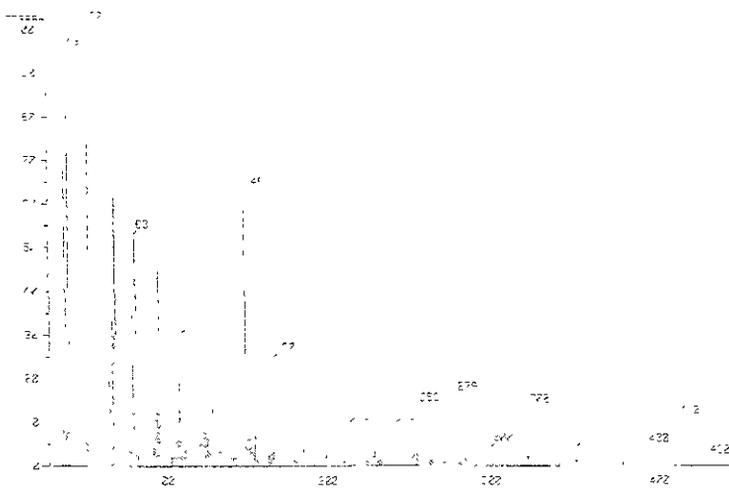
Espectro de masas del piquerol



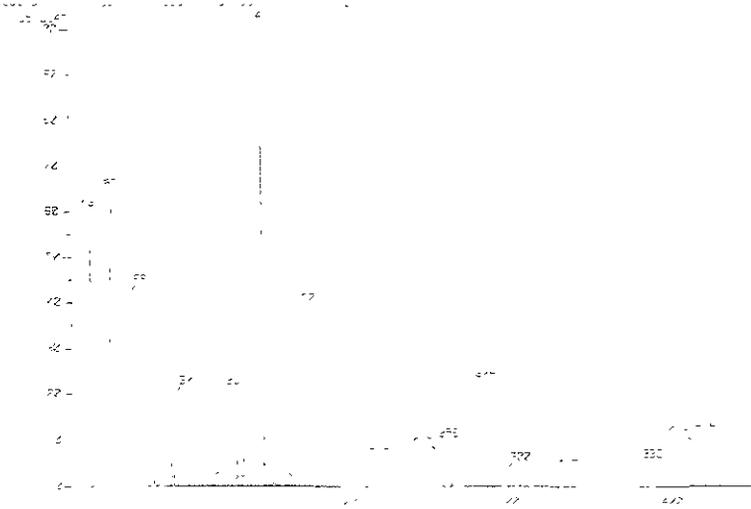
Piquerol



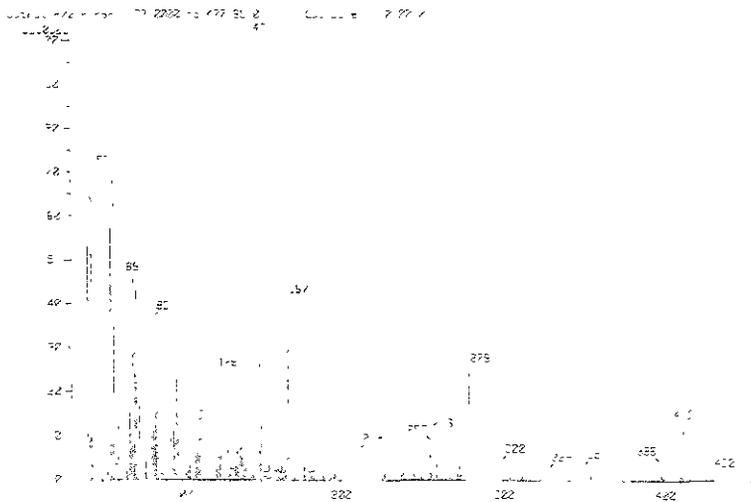
Espectro de masas extracto Flores, testigos



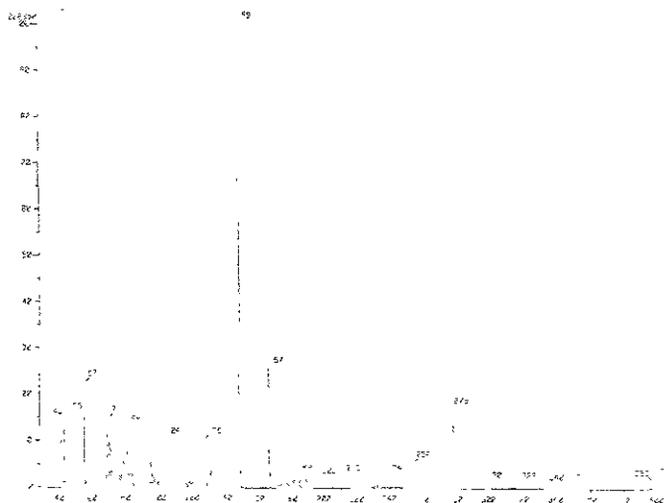
Espectro de masas extracto hojas de brotes, testigos



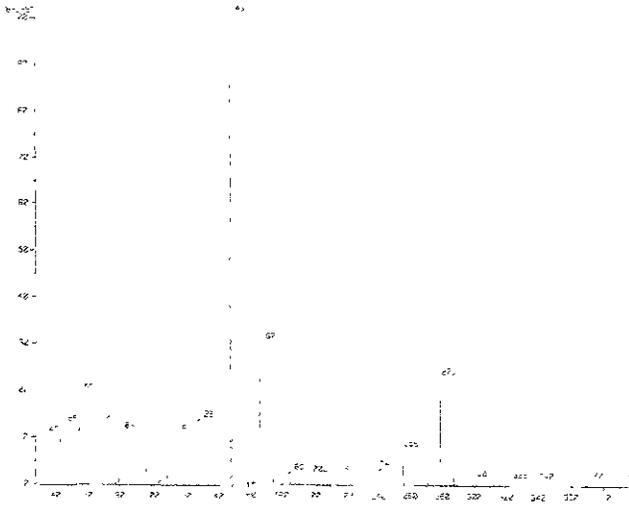
Espectro de masas extracto hojas de brotes, tratadas



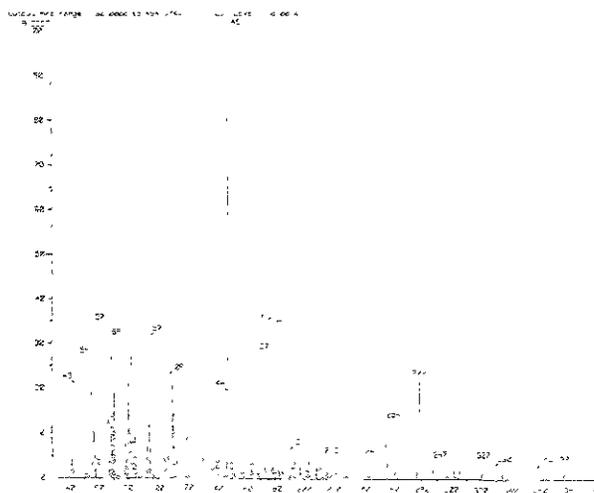
Espectro de masas extracto hojas, testigos



Espectro de masas extracto hojas, tratadas



Espectro de masas extracto cultivos elicitados testigos



Espectro de masas extracto cultivos elicitados, tratados

