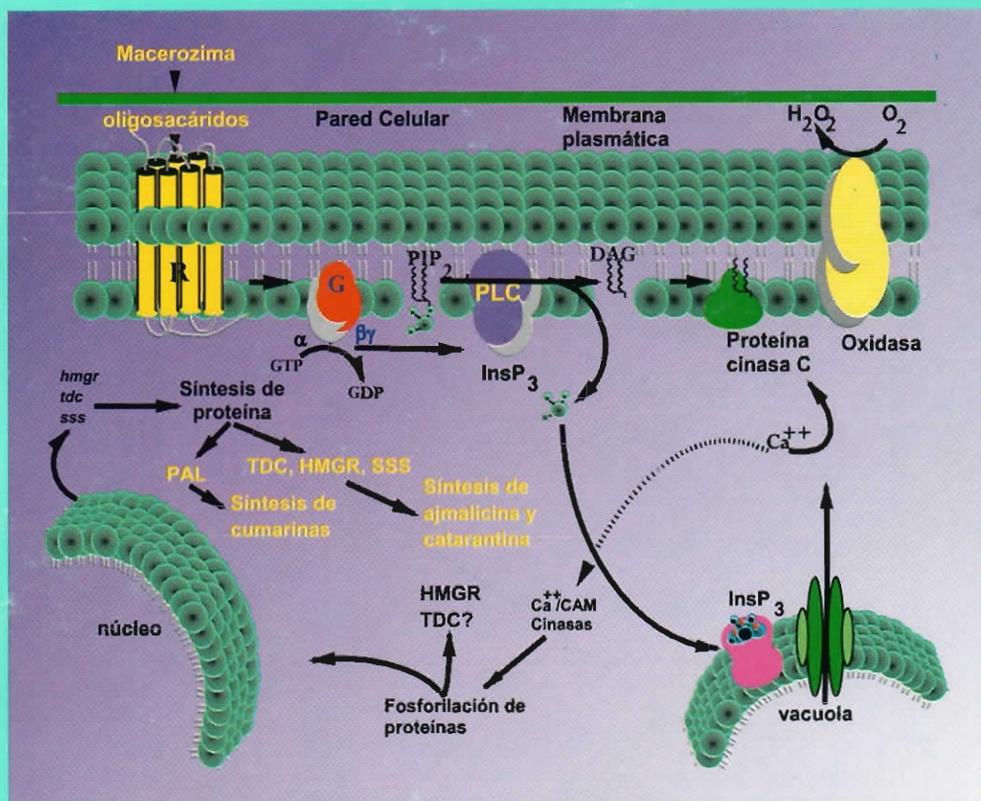


DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.



Oscar Alberto Moreno Valenzuela

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.





DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Regulación de la vía de síntesis de
los alcaloides indólicos en raíces
transformadas de *Catharanthus roseus*.

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:

Oscar Alberto Moreno Valenzuela

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México
15 de abril 1999

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biología Experimental del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.



DEDICATORIAS

Tu que dejaste de lado
tus propios sueños
para que yo pudiera
realizar los míos,
por eso y por mucho más
en donde estés. gracias papá.

Tu fortaleza y tu inteligencia
para resolver los problemas
son un ejemplo a seguir.
A ti también gracias, mamá.

No ha sido fácil para ti seguirme
en esta locura que nos inspira a
dedicarnos a la ciencia,
gracias por aguantarme tanto tiempo, a tí Miriam,
te dedico de manera especial esta tesis,
también es tu obra.

Hablando de locuras,
a esas pequeñas traviesas
que son fuente de inspiración.
Para ustedes Iris y Tania.

A mis hermanos, que aunque no entienden
porque no me dedico
a algo más "productivo"
siempre me han brindado su apoyo.

A mis amigos de toda la vida,
Beto y Esteban,
que aunque nos vemos muy poco,
sigo contando con su amistad incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán en la Unidad de Biología Experimental, bajo la dirección del Dr. Víctor M. Loyola Vargas, a quien agradezco su apoyo.

De manera especial quiero agradecer a la Dra. Teresa Hernández por su exhaustiva revisión a este manuscrito.

El trabajo se enriqueció de manera importante gracias a las observaciones y comentarios de los miembros de mi comité, los Drs. Lourdes Miranda, Felipe Vázquez, Gregorio Godoy, Neftali Ochoa, Luis González de la Vara, Teresa Hernández y Víctor Loyola. Mi más sincero agradecimiento a todos ellos.

En las buenas y en las malas (en el posgrado son más las malas que las buenas) siempre se cuenta con los amigos. A Miriam, Rafael, Manuel, Ileana, Germán e Ivón, gracias por los consejos y por las discusiones que hemos tenido.

El trabajo experimental contó con la colaboración de Marcela Méndez, Miriam Monforte, Armando Muñoz, Yereni Minero y Rosy Galaz. Gracias a todos ellos.

Las ideas e hipótesis surgen en el trabajo cotidiano, al leer un artículo, al discutir un tema en especial, pero a Julián se le ocurren a cada momento sólo que no tiene tiempo para realizarlas todas. Julián, te agradezco sinceramente todas tus sugerencias.

Quiero dar mi agradecimiento a todos los compañeros y amigos del laboratorio, a Armando, Aldo, Blondy, Lizbeth, Marcela, Luis Carlos, Nacho, César, Yereni, Ligia, y a todos los que de alguna manera u otra colaboraron en la realización de este trabajo.

A las autoridades del Centro de Investigación Científica de Yucatán, ya que gracias a su programa de apoyo al posgrado varios de nosotros hemos podido por fin culminar con el doctorado.

Este trabajo fue apoyado económicamente por el CONACYT con los proyectos 3016-N9306 y 4023-N, por la International Foundation for Science proyecto C/2236-2 y una beca del CONACYT para Oscar Moreno Valenzuela (88208).

ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
AIA: ácido indol acético
AMPc: monofosfato de adenosina ciclico
ANA: ácido naftalénacético
ARN: ácido ribonucleico
ATP: trifosfato de adenosina
B₅: medio de Gamborg
6-BAP: 6-bencilaminopurina
DAG: diacilglicerol
2,4-D: ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
GA₃: ácido giberélico
GDP: difosfato de guanosina
GTP: trifosfato de guanosina
HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa
IBA: ácido indolbutírico
IP: inositol monofosfato
IP₂: inositol difosfato
IP₃: inositol trifosfato
IPP: isopentenil pirofosfato
kDa: kilodaltones
K_m: constante de Michaelis-Menten
PAL: fenilalanina amonio liasa
PI: fosfatidilinositol
pl: punto isoeléctrico
PIP: fosfatidilinositol 4, monofosfato
PIP₂: fosfatidilinositol 4,5, bifosfato
PKC: proteína cinasa C
PLC: fosfolipasa C
SS: estrictosidina sintasa
TDC: triptofano descarboxilasa.

Contenido

	Resumen	1
	Abstract	3
	Introducción	4
Capítulo I	Antecedentes	7
	<i>Catharanthus roseus</i>	7
	Biosíntesis de los alcaloides indólicos	7
	Diferenciación y síntesis de los alcaloides indólicos	12
	Efecto de los inductores sobre la producción de los metabolitos secundarios	16
	Compartimentalización y almacenamiento de los alcaloides	19
	Triptofano descarboxilasa (TDC)	22
	Estrictosidina sintasa (SSS)	26
	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (HMGR)	27
	Fosfolipasa C (PLC) en las plantas	32
	Mecanismos de activación de la PLC	34
	Respuesta de la PLC a los inductores	35
	Hipótesis	37
	Objetivos	37
Capítulo II	Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in <i>Catharanthus roseus</i> hairy roots	51
Capítulo III	Role of phospholipase C in the regulation of secondary metabolism in response to elicitors in <i>Catharanthus roseus</i> hairy roots	62
Capítulo IV	Discusión, Conclusiones y Perspectivas	76

Resumen

El nivel de diferenciación celular tiene una función muy importante en la regulación de la síntesis de los metabolitos secundarios en los cultivos de tejidos vegetales, por lo que en la primera parte de este trabajo, se estudió la función de la diferenciación en la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos en *Catharanthus roseus* empleando como modelo experimental raíces transformadas que fueron sometidas a un proceso de desdiferenciación-rediferenciación. Las raíces transformadas se cultivaron en el medio de Phillips y Collins (1979), al cual se le modificó el contenido de micronutrientes (5 veces más que el control) (Coello-Coello, comunicación personal). Bajo estas condiciones, se obtuvieron de manera directa células en suspensión a partir de las raíces y posteriormente, estas células en suspensión fueron interconvertidas a raíces al cultivarlas en el medio en que originalmente se mantienen a las raíces (B_5 a la mitad de su fuerza iónica). El contenido de alcaloides totales fue 5 veces más bajo en los cultivos de células en suspensión comparadas con las raíces originales, pero cuando se regeneraron raíces a partir de las células en suspensión, los niveles de alcaloides fueron muy similares al control. La actividad de las enzimas triptofano descarboxilasa (TDC, E.C. 4.1.1.28), estrictosidina sintasa (SSS, E.C. 4.3.3.2) y 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (HMGR, E.C.1.1.1.34) disminuyeron hasta niveles basales en los cultivos desdiferenciados. Al regenerar las raíces, el nivel de actividad de la HMGR fue muy similar al de las raíces originales; mientras que las actividades de la TDC y de la SSS sólo fueron el 5% y el 30%, respectivamente de la actividad enzimática del control. Este hecho sugiere que el nivel de diferenciación celular regula la acumulación de los alcaloides y la expresión de algunas de las enzimas involucradas en su síntesis.

En el estudio de la regulación de las vías de síntesis de los alcaloides indólicos, los inductores bióticos se han utilizado muy ampliamente, ya que pueden estimular un aumento, no sólo en el contenido de estos compuestos, sino también en la actividad de algunas de las enzimas que participan en estas vías. Durante la segunda etapa del proyecto, se estudió el efecto de la macerozima sobre la producción de alcaloides totales, los niveles de ajmalicina y de cumarinas, así como también sobre las actividades de la TDC y de la fenilalanina amonio liasa (PAL, E.C. 4.3.1.5). La macerozima estimuló, de manera dependiente de la dosis, un aumento en la acumulación de los metabolitos secundarios. La ajmalicina aumentó en un 90% y los alcaloides totales en un 30% en relación al control. La actividad de la TDC aumentó hasta en un orden de magnitud cuando las raíces fueron tratadas con 1% (P/V) de macerozima, mientras que la actividad de la PAL aumentó aproximadamente 4 veces. Se analizó la posible función de la fosfolipasa C (PLC, E.C. 3.1.4.3) como componente del mecanismo de transducción de señales en respuesta a la inducción con macerozima y se encontró que la macerozima regula de manera indirecta (generando oligosacáridos al hidrolizar la pared celular de las raíces transformadas) a la actividad de la PLC en forma bifásica, dependiendo de la concentración de macerozima utilizada. La inducción de la actividad de la PLC con el tratamiento con la macerozima dependió de la duración del tratamiento. Después de 30 min de adicionado el inductor, la actividad de la PLC aumentó en un 300%. Por último, cuando se adicionó neomicina, un inhibidor de la actividad de la PLC, al medio de cultivo de las raíces

transformadas, ya fuera sola o en combinación con la macerozima, se encontró una inhibición en el aumento del contenido de ajmalicina provocado por la inducción. En resumen, los resultados demostraron que el tratamiento con la macerozima estimuló de manera significativa la producción de metabolitos secundarios, la actividad de algunas de las enzimas que participan en su síntesis y sugieren una posible función de la PLC en la regulación del metabolismo secundario en respuesta a la inducción en las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.

Abstract

Catharanthus roseus hairy roots accumulate higher levels of indole alkaloids when compared to cell suspension cultures. Hairy roots were interconverted to dedifferentiated cells by manipulating the culture medium. Using 5 times the concentration of micronutrients employed by Phillips and Collins (1979), resulted in the formation of cell suspensions from the hairy roots. The alkaloid content was 5-fold lower in the cell suspensions compared to the control, but when roots were regenerated, the alkaloid content regained its former level. Furthermore, the formation of cell suspensions from hairy roots was accompanied by a reduction of tryptophan decarboxylase (TDC, E.C. 4.1.1.28) and strictosidine synthase (SSS, E.C. 4.3.3.2) activities to less than 5% and 30% of their former activities, respectively. 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMGR, E.C. 1.1.1.34) activity was similar in the control and in the regenerated line.

The effect of macerozyme on indole alkaloid and coumarin accumulation, and in the induction of TDC and phenylalanine ammonia-lyase (PAL, E.C. 4.3.1.5) activities and their relationship with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phospholipase C (PLC, E.C. 3.1.4.3) activity on *Catharanthus roseus* hairy roots was investigated. Increasing concentrations of macerozyme induced an increase in indole alkaloid and coumarin accumulation. There was a 10-fold increase in TDC and 4-fold in PAL activities in hairy roots treated with 1% macerozyme (W/V). The effect of macerozyme on PLC activity depends on the concentration used. In a dose-response experiment PLC activity decreased 38% with 0.5% macerozyme, whereas it increased 40% with 1% macerozyme when compared to control. This effect was determined by the exposure time to macerozyme. Shortly stages after macerozyme addition, PLC activity increased up to two fold with 1 % macerozyme. The addition of neomycin, a PLC inhibitor, prevented the increment in alkaloid production, induced by macerozyme.

Introducción

La capacidad de las células de regular la velocidad de sus procesos metabólicos en respuesta a cambios internos o ambientales es una característica fundamental inherente a todos los organismos. El hecho de que la célula pueda regular su metabolismo es necesario para conservar la estabilidad de su ambiente intracelular, lo cual a su vez es esencial para mantener un funcionamiento eficiente. La magnitud del flujo de metabolitos a través de una vía metabólica puede depender de la actividad de cada una de las enzimas involucradas. La célula puede utilizar dos mecanismos básicos para regular la velocidad de reacción de una enzima en particular: regulación gruesa y regulación fina (Plaxton, 1993).

El control metabólico grueso se efectúa en períodos de tiempo largos (por ejemplo, de horas a días) y utiliza un gran gasto de energía. Este tipo de control puede ser aplicado a una o a todas las enzimas involucradas en una vía metabólica en particular y se activa principalmente durante la diferenciación celular o en la adaptación de los organismos a cambios ambientales. El total de la cantidad de una enzima depende de la velocidad de biosíntesis contra la de degradación. Cualquier alteración en la velocidad de la transcripción, la traducción, el procesamiento y la degradación del ARN o la proteólisis pueden considerarse como mecanismos de regulación gruesa (Plaxton, 1993).

La regulación metabólica fina es generalmente rápida (por ejemplo, de segundos a minutos). Operando sobre las enzimas de pasos limitantes en una vía, el control fino evita que exista un caos dentro de la célula; además, puede actuar como transductor de señales capaz de sensar un requerimiento metabólico momentáneo de la célula y de esta manera, modular la velocidad de flujo de metabolitos a través de varias vías. Algunos ejemplos de mecanismos de regulación fina son los siguientes: la alteración en la concentración del sustrato, la variación en el pH intracelular, la regulación alostérica y la modificación covalente (Plaxton, 1993).

En las plantas, al igual que en los animales, es de suma importancia conocer cómo se regulan los diferentes procesos metabólicos. A diferencia de los animales, las plantas, debido a su inmovilidad, han desarrollado una variedad de mecanismos para percibir e integrar las señales ambientales como la luz, la gravedad, el viento, el agua y la estructura del suelo; además, han desarrollado barreras físicas y producen compuestos antimicrobianos como parte de sus mecanismos de defensa. Estas señales externas son posteriormente llevadas hacia el interior de las células vegetales e integradas con señales internas para generar la respuesta adecuada a cada estímulo. Una planta en la que se han realizado una gran cantidad de estudios de regulación metabólica es *Catharanthus roseus*. Esta planta representa un modelo experimental muy interesante, debido a que en la biosíntesis de los alcaloides indólicos que produce se involucran un gran número de pasos en diferentes organelos, muchos de los cuales aún no se han dilucidado. Uno de los modelos más utilizados para realizar los estudios de regulación metabólica es el cultivo de tejidos *in vitro* (Van der Heijden *et al.*, 1989; Vázquez-Flota *et al.*, 1994), debido a las ventajas que posee sobre el cultivo de las plantas en el campo, como son la facilidad de manejo, la manipulación de las condiciones del cultivo y sobre todo que dichos cultivos pueden

ser inducidos a producir más alcaloides y a sobreexpresar a las enzimas involucradas en su biosíntesis, lo que facilita su estudio (Moreno-Valenzuela *et al.*, Capítulo III).

Uno de los objetivos iniciales del cultivo de células vegetales era la producción comercial de diferentes metabolitos secundarios; sin embargo, esa idea se tuvo que abandonar, dado que los cultivos desdiferenciados presentan la desventaja de ser poco estables en relación a la síntesis de metabolitos. Esto probablemente sea debido a su inestabilidad genética, lo que puede provocar que se presenten en bajas concentraciones o en ocasiones estar ausentes, lo que los hace un sistema experimental de poca confiabilidad para la producción de metabolitos secundarios de importancia económica (Deus-Neumman y Zenk, 1984). Por otro lado, las propiedades de los cultivos en suspensión son impredecibles, observándose una gran variación entre diferentes líneas de una misma especie, lo que se refleja en el rango de alcaloides producidos (Kurz *et al.*, 1985).

Otra pregunta fundamental que se ha abordado con gran interés en el estudio del metabolismo de las plantas es ¿Cómo se lleva a cabo la transducción de señales del exterior al interior de la célula vegetal? En plantas se han identificado moléculas, que al igual que en las células animales, sirven de acopladores de la señal en respuestas a estrés, inductores y a reguladores del crecimiento. Estos transductores incluyen al calcio, al AMP cíclico y a los fosfoinosítidos. Estos últimos compuestos están involucrados en la transducción de señales en animales en respuesta a factores externos, como los factores del crecimiento (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1991), los neurotransmisores y las hormonas (Berridge *et al.*, 1983). En las plantas se han encontrado a todos los elementos para que se lleve a cabo la vía de los fosfoinosítidos (Rincón y Boss, 1990; Sandelius y Somarin, 1990). Estudios recientes sugieren que la vía de los fosfoinosítidos está implicada en la transducción de señales como respuesta al ataque de patógenos (Kamada y Muto, 1994; Kurosaki *et al.*, 1987; Toyoda *et al.*, 1992).

Varios factores externos modulan la síntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus*. Uno de ellos es el nivel de organización celular de los cultivos, ya que se ha observado que los callos derivados de plántulas sólo producen cantidades muy pequeñas de vinblastina, y al regenerar brotes a partir de los callos, la acumulación de este alcaloide fue similar al de las plántulas originales (Datta y Srivatava, 1997). La vindolina, que es uno de los precursores de los alcaloides diméricos, fue sintetizada únicamente en los brotes derivados de callos, mientras que los callos no la produjeron (Constabel *et al.*, 1982). En el CICY se cuantificaron los niveles de alcaloides indólicos en cultivos con diferentes niveles de diferenciación y se encontró lo siguiente: células en suspensión (0.8 mg/g de peso seco) ⇒ callos (1.4 mg/g de peso seco) ⇒ raíces transformadas (9-14 mg/g de peso seco) ⇒ hojas y raíces de planta (12-18 mg/g de peso seco) (Monforte-González, datos no publicados). Estos datos indican la importancia del grado de diferenciación sobre la cantidad de alcaloides que pueden acumular los cultivos.

Una estrategia que se ha utilizado para solucionar el inconveniente del estudio de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos en los cultivos desdiferenciados es el uso de inductores, los cuales son compuestos que estimulan a las células a aumentar la cantidad de los metabolitos secundarios que producen y también, inducen un aumento en la actividad de las enzimas que participan en su biosíntesis. Mediante esta

estrategia, en células en suspensión de *C. roseus* se han estudiado la actividad de enzimas consideradas clave en la ruta de los alcaloides indólicos, así como su relación con la producción de estos compuestos (Eilert *et al.*, 1987; Nef *et al.*, 1991; Seitz *et al.*, 1989). En las raíces transformadas de *C. roseus* línea J1, se demostró que la macerozima, una enzima que hidroliza a la pared celular de las raíces, estimuló un aumento del 90% en la síntesis de la ajmalicina, en relación al control (Vázquez-Flota *et al.*, 1994). Esto sugiere que en los cultivos diferenciados también se podría estar induciendo la actividad de algunas de las enzimas consideradas clave en la biosíntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus*.

En el presente trabajo se estudiaron los dos factores, así como su relación con la regulación de la síntesis de los alcaloides indólicos. El modelo experimental utilizado fue el de las raíces transformadas de *C. roseus*. Para analizar el efecto del estadio de diferenciación, se utilizó un modelo que ha sido reportado en la literatura, el de dediferenciación-diferenciación. Los objetivos para los que se ha utilizado son varios. En *Catharanthus roseus* (Jung *et al.*, 1995) y en *Armoracea rusticana* (Repunte *et al.*, 1993) se le ha propuesto como una fuente de inóculo para los biorreactores, y de esta manera eliminar los problemas que implica el inocular con las raíces transformadas. En Solanáceas (Flores y Filner, 1985; Medina-Bolívar *et al.*, 1995) y en *C. roseus* (Navarrete-Loeza, 1995), se le ha propuesto como una herramienta para seleccionar líneas que produzcan gran cantidad de alcaloides, ya que las células en suspensión generadas de las raíces, pueden ser tratadas con análogos de aminoácidos, y posteriormente se puede regenerar a las raíces y seleccionar líneas resistentes a estos compuestos, que sobreproduzcan a los alcaloides (Medina-Bolívar *et al.*, 1995). En este trabajo se utilizó este modelo para estudiar tanto la regulación por el nivel de diferenciación de algunas de las enzimas que participan en la vía de síntesis de los alcaloides indólicos, como la producción de dichos compuestos.

En el segundo caso, se estudió el efecto de la adición de macerozima al medio de cultivo de las raíces transformadas y su relación con la biosíntesis de los alcaloides indólicos, así como con la actividad de dos enzimas consideradas como claves en el metabolismo secundario, la TDC y la PAL. Así mismo, se analizó la posible relación de la respuesta de las raíces a la inducción con la macerozima y la actividad de la PLC, una enzima que genera segundos mensajeros a partir de fosfolípidos de la membrana plasmática, como respuesta a varios estímulos externos. Los resultados obtenidos sugieren una posible relación de la PLC en la regulación de la síntesis de los alcaloides indólicos.

Capítulo I

Antecedentes

***Catharanthus roseus*.** La importancia de *C. roseus* radica en que produce alrededor de 200 alcaloides indólicos, muchos de los cuales tienen aplicación farmacológica, como la ajmalicina y la serpentina, cuyo costo individual alcanza los 2,000.00 dólares por kilogramo y su requerimiento anual es de 5 toneladas por año (Van der Heijden *et al.*, 1989). Sin duda alguna, los alcaloides más importantes que produce *C. roseus* son los alcaloides diméricos vinblastina y vincristina, los cuales son utilizados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer; sin embargo, en cultivos *in vitro* estos alcaloides sólo se han obtenidos en concentraciones muy bajas (Hoffmann *et al.*, 1982). El costo alcanzado en el mercado por la vinblastina es de un millón de dólares por kg con una producción anual de 12 kg; mientras que la vincristina alcanza un costo de 3.5 millones de dólares por kg y su producción anual es de únicamente 1 kg (Veltkamp *et al.*, 1985).

El total de la producción de estos alcaloides se obtiene a través de su extracción a partir de plantas, cuyo rendimiento es de aproximadamente 1 kg de alcaloides totales por tonelada de materia seca. La producción en el campo enfrenta una serie de problemas que dificultan la obtención de los alcaloides, como son el ataque de plagas y enfermedades, las condiciones del medio ambiente, el almacenamiento y el transporte de las plantas, lo que puede ocasionar bajas tasas de extracción y aún la pérdida total de la producción.

Los bajos rendimientos de los alcaloides en la planta, combinado con su alto precio en el mercado, han provocado una investigación intensiva en busca de métodos alternativos para la producción comercial de dichos metabolitos, como la síntesis o semisíntesis química (Kutney *et al.*, 1988) y el cultivo de tejidos vegetales. A pesar de los grandes esfuerzos que se han realizado para lograr el éxito en la producción comercial de los alcaloides indólicos en *C. roseus* en cultivos *in vitro*, hasta el momento no se ha conseguido, debido principalmente al desconocimiento de la regulación de la vía de síntesis de estos compuestos.

Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Los precursores para la síntesis de los alcaloides indólicos provienen de dos vías independientes: la vía del mevalonato y la vía del shikimato. La secologanina se deriva del metabolismo primario a través de la vía de los terpenos. Esta vía se inicia con la condensación de dos moléculas de acetil coenzima A por la acción de la acetil CoA tiolasa, para dar como producto acetil acetil coenzima A. La 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintasa convierte al acetil CoA en 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A, compuesto a partir del cual se sintetiza el mevalonato (Fig. 1). En los animales, éste es el paso limitante en la síntesis del colesterol y se cree que en las plantas podría ser también un importante punto de regulación en la síntesis de los alcaloides y de otros compuestos derivados del isopreno; sin embargo, estudios recientes sugieren que el IPP que las células utilizan como precursor para la síntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus* podría provenir de la ruta alterna denominada triosa fosfato/piruvato (Contin *et al.*, 1998).

Mediante la acción de dos cinasas, la mevalonato cinasa y la mevalonato-5-fosfato cinasa, dos grupos fosfato se añaden al mevalonato para dar

como producto el mevalonato-5-pirofosfato. Luego de una descarboxilación se obtiene el isopentenilpirofosfato, compuesto a partir del cual se sintetizan una gran variedad de productos de gran importancia para la célula vegetal como las clorofilas, los carotenoides, el ácido giberélico, los monoterpenos, etc.

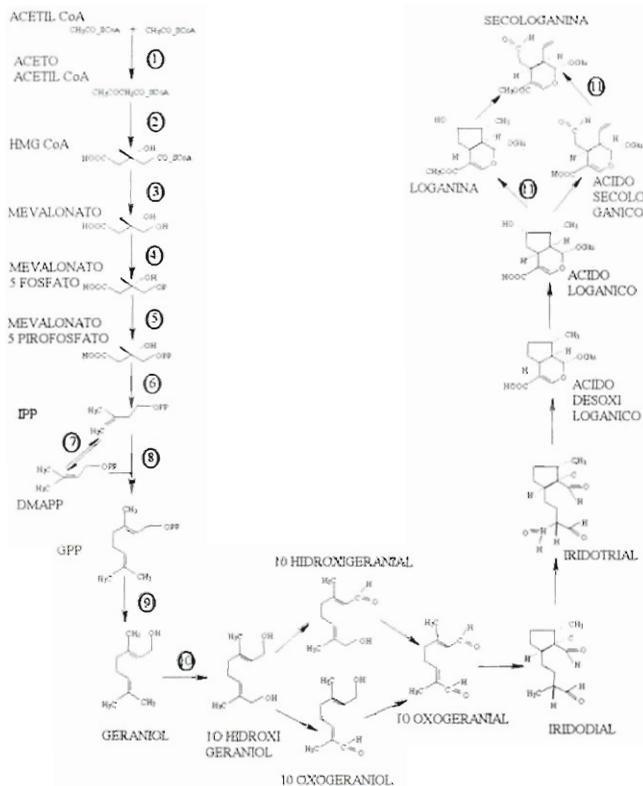


Figura 1. Vía de síntesis de la secologanina a partir del mevalonato. HMGCoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA; IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: 3,3-dimetilalil pirofosfato; GPP: geranilpirofosfato. 1: acetoacetil-CoA tiolasa; 2: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa; 3: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa; 4: mevalonato cinasa; 5: mevalonato-5-fosfato cinasa; 6: mevalonato-5-pirofosfato descarboxilasa; 7: isopentenil pirofosfato isomerasa; 8: geranil pirofosfato sintasa; 9: geranil pirofosfatasa; 10: geraniol-10-hidroxisilasa; 11: ácido logánico-metil transferasa. (Gershenzon y Croteau, 1989; Meijer *et al.*, 1993).

En la interfase entre el metabolismo primario y el secundario, el geranil pirofosfato es convertido en geraniol, monoterpeno a partir del cual se forma la secologanina. El geraniol es hidroxilado en la posición 10 por la

geraniol-10-hidroxilasa, la cual es una monooxigenasa dependiente del citocromo P-450, que se encuentra unida a membrana del retículo endoplásmico y requiere de O₂ y de NADPH (Madyashta *et al.*, 1976). El 10-hidroxigeraniol es oxidado al aldehído correspondiente por una monoterpeno alcohol óxido-reductasa en presencia de NAD(P)⁺ (Madyashta y Coscia, 1979). El 10-oxogeraniol es ciclizado por una monoterpeno ciclasa, paso que puede constituir otro punto de regulación de la vía. A partir de este punto existen entre cinco y siete pasos hasta la síntesis de la secologanina (Fig. 1) y sólo una enzima ha sido identificada, la ácido logánico metil transferasa, la cual transfiere al grupo metilo de la S-adenosil metionina al ácido logánico o al ácido secologánico (Madyashta *et al.*, 1973).

El precursor indólico, la triptamina, se sintetiza a partir del triptofano (Fig. 2) en una reacción catalizada por la enzima triptofano descarboxilasa (TDC). La condensación de la triptamina y la secologanina, llevada a cabo por la enzima estrictosidina sintasa (SS) (Stöckigt y Zenk, 1977) da lugar a la formación de la estrictosidina-O-glucosa, la cual es desglucosilada por la estrictosidina glucosidasa para obtener finalmente a la estrictosidina (Fig. 2).

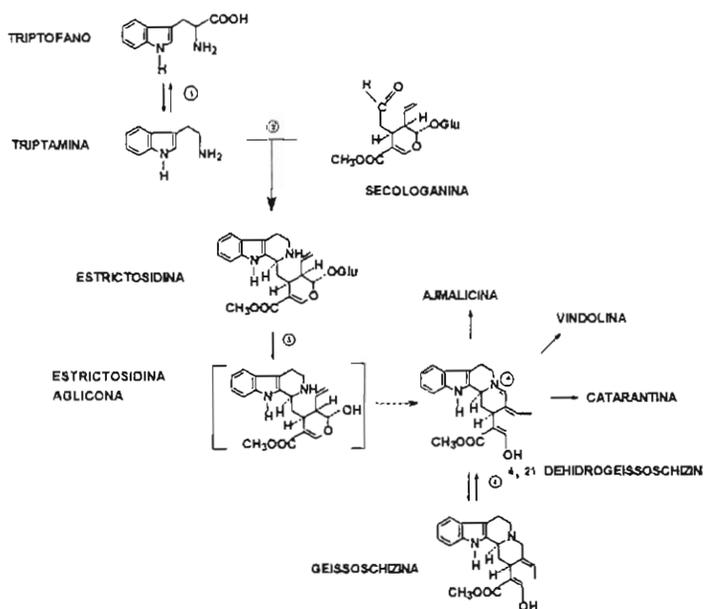


Figura 2. Ruta de biosíntesis de la estrictosidina y algunos de sus productos. 1: triptofano descarboxilasa; 2: estrictosidina sintasa; 3: estrictosidina b-glucosidasa; 4: geissoschizina deshidrogenasa. (Meijer *et al.*, 1993).

A partir de este punto, la vía de síntesis de los alcaloides indólicos no ha sido estudiada con profundidad y no se conocen todas las reacciones que dan lugar a los alcaloides indólicos; sin embargo, se sabe que la strictosidina es convertida en 4,21-deshidrogeissoschizina, pasando por varios intermediarios inestables. La vía se ramifica desde la 4,21-deshidrogeissoschizina para dar lugar a los cerca de 200 alcaloides conocidos en *C. roseus*. Este compuesto puede ciclizarse de manera espontánea para dar lugar a la catenamina o bien, puede ser reducido enzimáticamente a geissoschizina, la cual puede ser el precursor de alcaloides como la vindolina y la catarantina (Fig. 3), aunque esta parte de la vía no se conoce con certeza. La reducción de la geissoschizina es reversible, y la ramificación de la vía podría ocurrir a partir de una modificación diferente a la ciclización de la catenamina (De Luca, 1993).

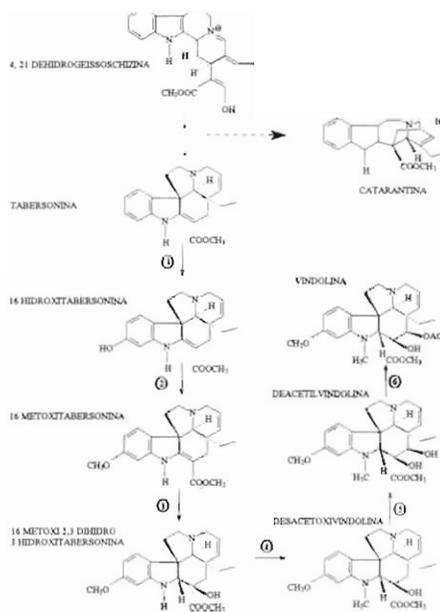


Figura 3. Biosíntesis de la vindolina y de la catarantina. 1: tabersonina 16 hidroxilasa; 2: S-adenosil-L-metionina; 16-hidroxitabersonina O-metiltransferasa; 3: hidroxilasa no caracterizada; 4: S-adenosil-L-metionina; 2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina-N-metiltransferasa; 5: deacetilvindolina 4-hidroxilasa; 5: acetilCoenzima A: desacetilvindolina-O-acetiltransferasa.

Además, se ha sugerido que la ciclización que da lugar a la catenamina es catalizada por la catenamina ciclasa (Meijer *et al.*, 1993). La catenamina es posteriormente reducida para dar lugar a la ajmalicina y, por otro lado, la forma imino

de la catenamina se reduce para dar origen a la tetrahidroalstonina (Hemscheidt y Zenk, 1985) (Fig 4).

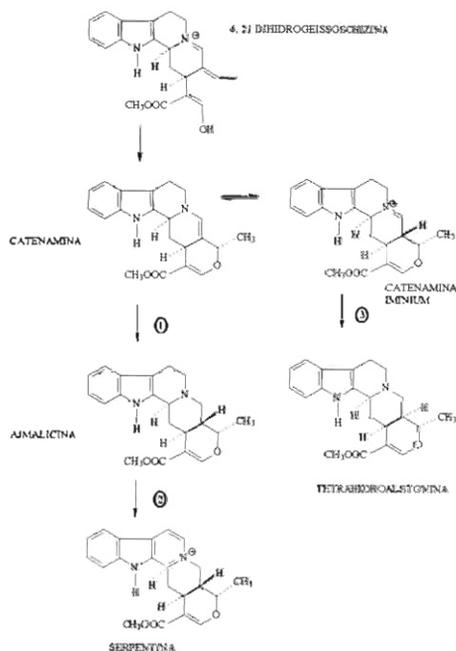


Figura 4. Biosíntesis de la ajmalicina y de la serpentina. 1: catenamina reductasa; 2: peroxidasa; 3: tetrahidroalstonina sintasa.

En la síntesis de los alcaloides diméricos están involucradas la vindolina y la catarantina, que se condensan para formar la 3', 4'-anhydrovinblastina, precursor inmediato de los alcaloides diméricos (Fig. 5). Se ha sugerido que sean peroxidasa vacuolares las que llevan a cabo la conjugación de la vindolina y la catarantina, así como la oxidación de la 3', 4'-anhydrovinblastina y la síntesis de los alcaloides diméricos. Estas peroxidasa no son específicas, ya que en experimentos *in vitro* se encontró que la peroxidasa obtenida de rábano rusciano puede catalizar todas las reacciones descritas anteriormente (Endo *et al.*, 1987; Endo *et al.*, 1988; Kutney, 1987).

Debido a que la síntesis de los alcaloides diméricos puede ser llevada a cabo por peroxidasa no específicas de la ruta de los alcaloides indólicos, la limitante en la acumulación de estos compuestos en el cultivo de tejidos podría ser la disponibilidad de los precursores monoméricos. La catarantina ha sido encontrada en todo tipo de

cultivos *in vitro*, pero la vindolina por lo regular no se acumula, debido principalmente a que la actividad de algunas de las enzimas involucradas en su síntesis se encuentra regulada por factores ambientales, como la luz y la etapa de desarrollo, o bien, se expresan en ciertos tipos celulares e incluso en órganos específicos (Vázquez-Flota y De Luca, 1998).

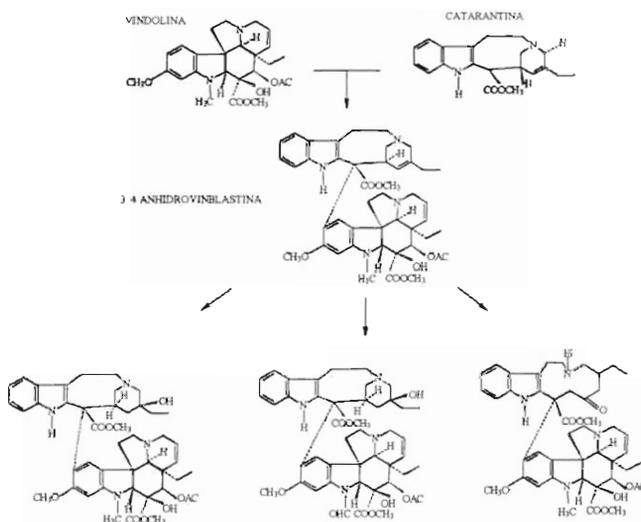


Figura 5. Biosíntesis de los alcaloides dimericos vincblastina y vincristina a partir de la vindolina y la catarantina.

Diferenciación y síntesis de metabolitos secundarios. El desarrollo de las plantas involucra al crecimiento y a la diferenciación. El crecimiento se refiere a los cambios cuantitativos que ocurren durante el desarrollo y que pueden ser definidos como cambios irreversibles en el tamaño de una célula, de un órgano o de un organismo completo. La forma externa de un órgano es el resultado de un crecimiento diferencial a lo largo de ciertos ejes. Durante el desarrollo, aparecen no sólo cambios cuantitativos en el número y el arreglo de las células de diferentes órganos, sino que también se llevan a cabo cambios cualitativos entre las células, tejidos u órganos, proceso que se denomina diferenciación (Wareing y Phillips, 1981), el cual se puede dividir en dos niveles: el primero se refiere a cambios en la forma, la estructura y la función de una sola célula, llamada citodiferenciación. Estos cambios en la velocidad y

el tipo de división celular (de crecimiento a diferenciación) da como resultado modificaciones en la organización subcelular y en el metabolismo. El segundo nivel de diferenciación se caracteriza por cambios cualitativos en la organización de las células (más de una), hasta formar estructuras morfológicamente definidas (Lindsey y Yeoman, 1983). En un término más amplio, se puede definir a la diferenciación como cualquier situación en la que las células meristemáticas generan dos o más tipos de células, tejidos u órganos que son cualitativamente diferentes uno del otro (Wareing y Phillips, 1981).

Durante los últimos 15 años, los grupos que han trabajado en el metabolismo secundario han aportado evidencia que apoya la hipótesis de que se requiere cierto grado de diferenciación para que se lleve a cabo la síntesis de determinados compuestos (Flores y Filner, 1985). Los tejidos de la planta que producen metabolitos secundarios, en ocasiones pierden esa capacidad durante el proceso de desdiferenciación en callos o en células en suspensión (Endo et al., 1987). Una de las razones de esta pérdida es que las plantas poseen estructuras especializadas, las cuales pueden ser los sitios de síntesis o de acumulación de metabolitos secundarios y los cultivos de células vegetales generalmente no poseen dichas estructuras. En las especies de *Mentha*, las hojas tienen glándulas epidérmicas, las cuales son los lugares donde se sintetizan los monoterpenos; asimismo, en estas células se acumulan estos productos que pueden ser citotóxicos (Dörnerburg y Knorr, 1995). Las células en suspensión derivadas de estas especies no tienen la capacidad de acumular altos niveles de monoterpenos debido principalmente a que no poseen las glándulas mencionadas. Bajo las condiciones apropiadas, logradas generalmente variando la combinación y la concentración de fitoreguladores, se pueden inducir diferentes tipos de cultivos. Estos pueden ser brotes diferenciados, embriones somáticos o cultivo de raíces. Los cultivos de brotes de *Mentha* regenerados a partir de cultivos desdiferenciados recuperaron su capacidad de sintetizar y acumular monoterpenos (Dörnerburg y Knorr, 1995).

Otros ejemplos de lo anterior son la síntesis de alcaloides derivados de tropano en raíces rediferenciadas a partir de callos de *Atropa belladonna* (Collinge y Yeoman, 1986), la producción de alcaloides morfínicos durante la embriogénesis somática de *Papaver somniferum* (Galewesky y Nessler, 1986), y la acumulación de cardenólidos en embriones somáticos de *Digitalis lanata* (Greidziak et al., 1990). La hiosciamina, un alcaloide derivado del tropano, se acumula solamente en sistemas organizados, tales como las raíces transformadas, y sólo está presente en cantidades trazas o está completamente ausente en los cultivos de callos (Flores y Filner, 1985).

En *C. roseus*, la biosíntesis de los alcaloides indólicos y su dependencia del grado de diferenciación está muy poco estudiada. Se ha propuesto que la diferenciación de compartimentos de almacenamiento, como las células laticíferas, son esenciales para la producción de estos metabolitos secundarios (De Luca et al., 1986). Estudios sobre la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides diméricos han demostrado que los pasos finales son modulados por diferentes mecanismos ambientales y de desarrollo, y que las enzimas clave son sintetizadas sólo en fases de crecimiento muy particulares (Endo et al., 1987). La vinblastina, un alcaloide dimérico, se acumuló sólo en cantidades traza en cultivos de callos derivados de plántulas de *C. roseus*, mientras que en las plántulas se produjeron cantidades considerablemente

altas (12 µg/g de peso seco). Cuando se regeneraron brotes a partir de los callos, la acumulación de la vinblastina fue muy similar a la de las plántulas (Datta y Srivastava, 1997).

La vindolina, una de las subunidades de los alcaloides diméricos, fue sintetizada y acumulada en brotes derivados de callos de *C. roseus*, mientras que éstos últimos no la produjeron (Constabel *et al.*, 1982). Los cultivos de células en suspensión de *C. roseus* poseen actividad enzimática de tabersonina-16-hidroxilasa (T16H), y de AdoMet: 16-hidroxitabersonina-O-metiltransferasa (16-OMT), las dos enzimas que catalizan las dos primeras reacciones que convierten a la tabersonina en vindolina (St-Pierre y De Luca, 1995), pero no poseen actividad de las enzimas involucradas en los últimos pasos de la síntesis de vindolina (De Carolis *et al.*, 1990; De Luca *et al.*, 1987), lo cual podría explicar porque las células en suspensión no son capaces de acumular la vindolina (Vázquez-Flota *et al.*, 1997).

En el CICY se han generado cultivos celulares de *C. roseus* con diferentes grados de diferenciación (Fig. 6) y se ha determinado que los niveles de alcaloides totales en las raíces en cultivo son, por lo menos, un orden de magnitud mayor que en los cultivos de células en suspensión, sugiriendo que la diferenciación o el nivel de organización celular o tisular podría influir en el control de la síntesis de los alcaloides (Ciau-Uitz *et al.*, 1994).

En vista de lo anterior, diferentes grupos en el mundo se han dado a la tarea de dilucidar cómo se regula esta vía tan compleja, en la que participan una gran cantidad de enzimas, muchas de las cuales no se han caracterizado. Las estrategias que se han utilizado son diversas; entre ellas el uso de cultivo de células en suspensión, el cultivo de embriones, el cultivo de células inmovilizadas, el cultivo de brotes y de plántulas recién germinadas (De Luca *et al.*, 1988); sin embargo, el bajo nivel de alcaloides, así como la baja actividad de las enzimas involucradas en la vía dificultan su estudio.

Otro modelo experimental que se ha utilizado para solventar el problema que representan los cultivos desdiferenciados es el de las raíces transformadas, las cuales son obtenidas por transformación genética mediante la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. Las raíces transformadas presentan ciertas ventajas cuando son comparadas con cultivos de células en suspensión: poseen un rápido crecimiento, el cual es independiente de fitoreguladores exógenos; presentan una elevada estabilidad genética; producen altos niveles de metabolitos secundarios y además, tienen capacidad biosintética muy similar a las de las raíces u otros órganos de las plantas (Kato *et al.*, 1989; Parr y Hamill, 1987). Recientemente se han reportado altos rendimientos en la producción de metabolitos secundarios en raíces transformadas en varios laboratorios (Flores y Filner, 1985; Hamill *et al.*, 1989; Ishimaru *et al.*, 1990; Kamada *et al.*, 1986; Sauerwein *et al.*, 1991; Yoshikawa y Furuya, 1987).

Las raíces transformadas de *C. roseus* poseen la capacidad de acumular alcaloides indólicos en cantidades muy similares a los de las raíces de las plantas (Bhadra *et al.*, 1993; Ciau-Uitz *et al.*, 1994; Parr *et al.*, 1988; Toivonen *et al.*, 1989). Además, sintetizan alcaloides que no han sido reportados en las plantas, como por ejemplo, la O-acetilvalesamina (Toivonen *et al.*, 1989) y la 19(S)-epimisilina (Peraza-Sánchez *et al.*, 1998). Las raíces transformadas de *C. roseus* también poseen la capacidad de sintetizar a la vindolina, aunque las cantidades que acumularon fueron

al menos un orden de magnitud menor al encontrado en las hojas de las plantas (Bhadra *et al.*, 1993). La enzima Adenosil-metionina: 2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina-*N*-metiltransferasa (NMT) la cual constituye uno de los pasos limitantes en la síntesis de la vindolina en los cultivos desdiferenciados, se encuentra asociada a la membrana del tilacoide; sin embargo, se ha cuantificado su actividad en etioplastos de plántulas cultivadas en la oscuridad (De Luca *et al.*, 1988). La vindolina producida por estas raíces transformadas podría ser el resultado de la actividad de la NMT localizada en los etioplastos o proplástidos de estos órganos cultivados *in vitro* (Bhadra *et al.*, 1993).

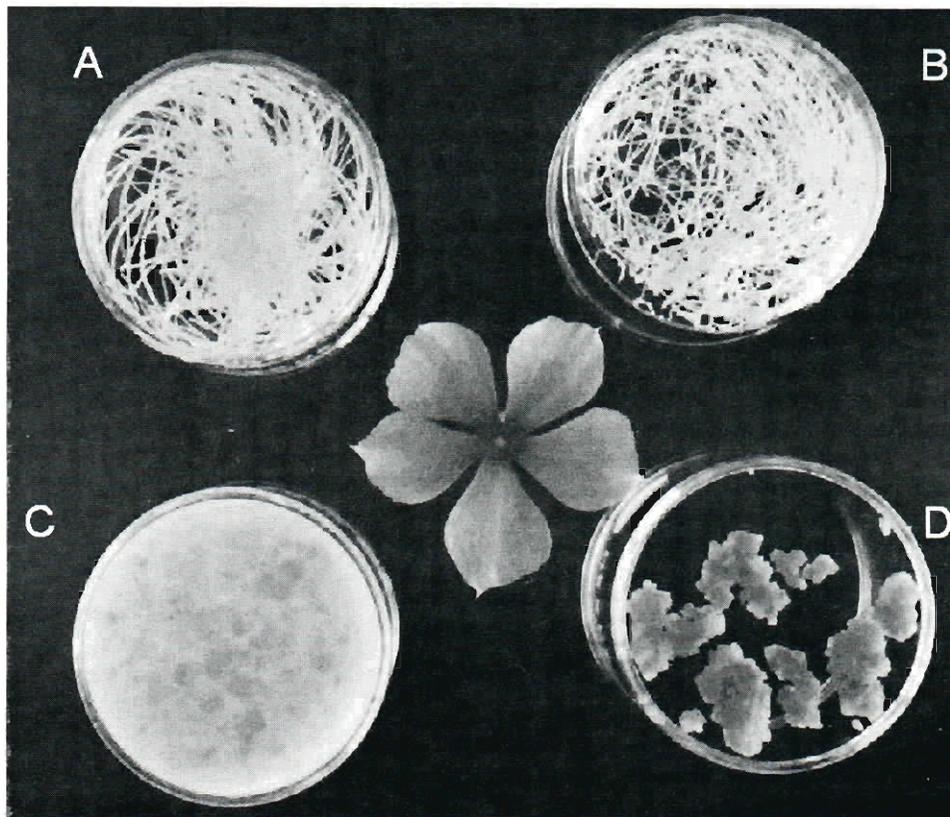


Figura 6. Cultivos celulares de *C. roseus* obtenidos en nuestro laboratorio. A. Raíces transformadas, línea J1. B. Raíces normales. C. Células en suspensión. D. Callos mixotrópicos. Al centro de la figura se muestra una flor de *C. roseus*.

Las raíces transformadas, dadas las características antes mencionadas, aunado al hecho de que se puede inducir un aumento en la acumulación de estos metabolitos utilizando inductores bióticos (Vázquez-Flota *et al.*, 1994), constituyen un excelente modelo para estudiar la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos.

Las raíces transformadas constituyen un buen sistema experimental para estudiar la correlación entre la expresión del metabolismo secundario y la organización celular. La producción de los alcaloides derivados del tropano disminuyeron dramáticamente cuando las raíces transformadas de *Hyosciamus muticus* fueron inducidas a formar callos después de ser transferidas a un medio con fitorreguladores (Flores y Filner, 1985). Estos callos regeneraron raíces al cultivarlos en un medio libre de fitorreguladores. Las raíces regeneradas recuperaron la capacidad de sintetizar alcaloides, los cuales alcanzaron los niveles de las raíces originales (Flores y Filner, 1985). En *C. roseus* se generaron líneas de cultivos desdiferenciados a partir de raíces transformadas utilizando dos estrategias (Navarrete-Loeza, 1995). La primera consistió en agregar AIA y 6-BAP al medio de cultivo y la segunda fue una modificación de la fuente nitrogenada. El medio de cultivo que se utiliza para mantener a las raíces transformadas contiene 12.5 mM de nitrato y 1 mM de amonio. Al modificar la composición de la fuente nitrogenada a 25 mM de nitrato y 12.5 mM de amonio más 4.5% de sacarosa se observó la formación de células desdiferenciadas a partir de las raíces transformadas. A partir de las células en suspensión se obtuvieron 30 líneas de raíces regeneradas, 18 del tratamiento con fitorreguladores y 12 con el tratamiento con la modificación en la fuente nitrogenada. De estas líneas, sólo dos tuvieron una mayor acumulación de alcaloides que la línea original, las dos generadas con el tratamiento con AIA y 6-BAP (Navarrete-Loeza, 1995).

La variación somaclonal que se genera con la conversión de las raíces a células en suspensión puede ser utilizada, para que después de regeneradas las raíces, se seleccionen líneas que sobreproduzcan a los alcaloides. Durante el estadio de células en suspensión se podrían utilizar agentes selectivos, como análogos de aminoácidos, lo que podría dar como resultado la obtención de líneas con una alta producción de los alcaloides (Flores y Filner, 1985; Navarrete-Loeza, 1995).

Jung y colaboradores (1995) propusieron que el sistema intercambiable de raíces-células-raíces de *C. roseus* podría representar un proceso simplificado para la producción a gran escala de raíces transformadas, ya que puede ser utilizado como fuente de material para eliminar el inconveniente de inocular y transferir tejidos diferenciados a fermentadores de gran tamaño. Además, este sistema puede ser utilizado en el estudio de la rizogénesis (Jung *et al.*, 1995).

Un objetivo que ha sido planteado, pero al momento no ha sido abordado, es el uso de este sistema para estudiar la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos (Navarrete-Loeza, 1995), y la importancia del estadio de desarrollo sobre dicha regulación, el cual fue uno de los objetivos del presente trabajo.

Efecto de los inductores sobre la producción de metabolitos secundarios.

Una estrategia que ha sido ampliamente utilizada para el estudio de las vías de biosíntesis de metabolitos secundarios es el uso de inductores producidos principalmente por microorganismos patógenos. Esta estrategia se basa en que la interacción de una planta con éstos puede desencadenar una serie de mecanismos de defensa, entre los cuales se encuentra la síntesis de compuestos con acción antimicrobiana. El más estudiado de estos mecanismos es la producción de fitoalexinas (del griego phyton: planta; alexin: substancia protectora), moléculas de

bajo peso molecular que son sintetizados por la célula vegetal en respuesta a una invasión microbiana (Érsek y Király, 1986). La gran mayoría de las fitoalexinas que han sido aisladas provienen de las dicotiledóneas. Se ha encontrado que las fitoalexinas que se sintetizan por una sola familia de plantas poseen una estructura similar; si bien es posible que una planta pueda acumular diferentes tipos de fitoalexinas en respuesta al tipo específico de inductor, como por ejemplo, en el caso de las familias de las solanáceas y las leguminosas, las fitoalexinas predominantes son sesquiterpenoides e isoflavonoides, respectivamente (Barz *et al.*, 1988; Érsek y Király, 1986).

La biosíntesis de las fitoalexinas hasta ahora conocidas involucra tres rutas metabólicas básicas: la vía del acetato-mevalonato, la vía del acetato-malonato y la vía del shikimato. Entre las fitoalexinas generadas por alguna de estas rutas, se encuentran diterpenos, poliacetilenos, dihidrofenantrenos, tiofenos, estilbenos y cumarinas. No obstante sus diferencias estructurales, estos compuestos poseen algo en común, que no se detectan en células vegetales antes de una infección. Este hecho sugiere que es necesario que exista el ataque de patógenos para que la planta inicie su biosíntesis (Barz *et al.*, 1988; Érsek y Király, 1986). Las moléculas que provocan que las células vegetales sintetizen fitoalexinas han sido denominadas "inductores" (su término en inglés es "elicitors"). Estas moléculas pueden provenir de virus, bacterias, hongos o de la planta misma e incluyen polisacáridos, proteínas, lípidos, glucoproteínas, ácidos grasos insaturados, fragmentos de pectina y fragmentos celulósicos, entre otros (Barz *et al.*, 1988; DiCosmo y Misawa, 1985; Érsek y Király, 1986).

El uso de inductores puede facilitar el estudio de las rutas de síntesis de los metabolitos secundarios, como los alcaloides indólicos, ya que las líneas celulares que sólo producen cantidades traza de estos compuestos pueden ser estimuladas a sintetizar mayores cantidades de alcaloides y además, se puede estimular un aumento en la actividad de las enzimas involucradas en su síntesis (DiCosmo *et al.*, 1987). La adición de homogenados de *Pythium aphanidermatum* y de *Micromucor isabellina* a callos de *C. roseus* provocaron un aumento de alrededor de 250 veces en la acumulación de la ajmalicina y de la catarantina. El control producía cantidades traza de estos compuestos (DiCosmo *et al.*, 1987). El efecto de los inductores es altamente dependiente de la edad de los cultivos, ya que mientras más edad tuvieron los callos, menor fue el aumento en la acumulación de los alcaloides (DiCosmo *et al.*, 1987; Eilert *et al.*, 1987). Esta respuesta podría ser un reflejo de los diferentes estados fisiológicos de las células cultivadas *in vitro*.

La concentración del inductor es otro factor que afecta la respuesta de los cultivos celulares. Los inductores puros pueden ejercer su acción con muy pequeñas cantidades, mientras que cuando se utilizan homogenados fúngicos, se requieren de altas concentraciones de hasta el 5% (P/V) del inductor (Eilert, 1986). En células en suspensión de *C. roseus*, la adición de 2% (P/V) de homogenados de *Phytophthora cactorum* provocó el mayor aumento en la acumulación de la ajmalicina, mientras que la adición al medio de cultivo de sólo 10 mg/l de celulasa (una enzima que hidroliza a la celulosa de la pared celular) causó un aumento de dos veces en el contenido de ajmalicina, con relación a las células no tratadas (Garnier *et al.*, 1996). Por otro lado, la macerozima (500 mg/l) provocó un aumento de 3.5 veces en la acumulación de la triptamina. El aumento en los niveles de la triptamina no provocó un aumento

generalizado de los alcaloides, ya que la serpentina aumentó en dos veces en relación al control, mientras que la acumulación de la ajmalicina disminuyó (Garnier *et al.*, 1996). La ajmalicina es el precursor de la serpentina, por lo que el tratamiento con macerozima podría estar estimulando la producción y acumulación de este último, induciendo la actividad de la enzima responsable de su síntesis. En raíces transformadas de *C. roseus*, la adición de 0.05% de macerozima provocó un aumento del 90% de la ajmalicina en relación al control (Vázquez-Flota *et al.*, 1994).

La macerozima es una mezcla comercial de pectinasas, las cuales cumplen una importante función durante los primeros instantes de una invasión de un hongo a una planta (Hahn *et al.*, 1981). Estas enzimas hidrolizan a la pectina de la pared celular, facilitando con esto la invasión de los patógenos a la planta. La actividad de estas enzimas aparentemente "preparan" a los hongos para secretar a otras enzimas hidrolíticas, como las pectato liasas y las pectín liasas (Hahn *et al.*, 1981). Se han encontrado evidencias que estas enzimas liberan oligogalacturónidos de diferentes tamaños, de los cuales los compuestos por 10 a 13 monómeros son los que poseen mayor actividad como inductores (Jin y West, 1984).

Se ha propuesto que los inductores aceleran el proceso fisiológico o molecular que provoca la liberación de los alcaloides indólicos (Nef *et al.*, 1991). La adición de homogenados de *Pythium vexans* a cultivos de células en suspensión de *C. roseus* provocó que el 100% de la catarantina producida por los cultivos fuera liberada al medio de cultivo. Esta excreción del alcaloide no puede ser causada por la muerte celular, ya que la serpentina y la ajmalicina continuaron acumulándose dentro de las células (Nef *et al.*, 1991). La distribución diferencial de la catarantina y de la ajmalicina no puede ser explicada en términos del mecanismo de transporte de los alcaloides, el cual es regulado por un cambio en el pH y dependiente del pK de los compuestos, ya que el pK de la ajmalicina es 6.3 y el de la catarantina es 6.8. El uso combinado de homogenados fúngicos (extractos de *Aspergillus niger*) y un inhibidor de la PAL (el ácido transcinámico) estimuló una redistribución de los alcaloides indólicos en *C. roseus*. Mientras que en los cultivos tratados con el homogenado fúngico el 60% de los alcaloides se acumularon dentro de las células, al combinar al hongo y al inhibidor se provocó que el 90% de los alcaloides fueran excretados al medio de cultivo (Godoy-Hernández y Loyola-Vargas, 1991). Estos resultados sugieren que existe un mecanismo de transporte de los alcaloides mucho más complejo que la disminución del pH propuesto por Bouyssou y colaboradores (1987), y probablemente incluya a traslocadores específicos para cada alcaloide, el cual controla el flujo transmembranal y la acumulación de los alcaloides en *C. roseus* (Deus-Neuman y Zenk, 1986; Nef *et al.*, 1991).

El modo de acción de los inductores ha sido objeto de estudio en los últimos años y se ha encontrado que éstos interaccionan con receptores de la membrana plasmática de la célula vegetal y, de esta manera, desencadenan los mecanismos de transducción de señales que promueven la defensa de las plantas (Cosio *et al.*, 1990; Nürnberger *et al.*, 1994). La existencia de estos sitios específicos de unión en la membrana ha sido documentada para inductores de tipo glucano derivados de *P. megasperma* en cultivos de células en suspensión de soya. En este trabajo se demostró que el inductor se une a una proteína de 70 kDa que posee una alta afinidad por esta molécula (Cosio *et al.*, 1990). Además, se ha encontrado otro receptor para

un oligourónido derivado de la pared vegetal, el cual ha sido parcialmente caracterizado (Farmer *et al.*, 1991).

Por otra parte se ha demostrado la existencia de receptores específicos para oligopéptidos, como es el caso de un péptido de trece aminoácidos derivado de *P. megasperma* que se une a una proteína de 40 kDa de la membrana plasmática de células en suspensión de perejil (Nürberger *et al.*, 1994). Este oligopéptido es capaz de inducir la actividad de enzimas involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas como la fenilalanina amonio liasa y la 4-cumarato:coenzima A ligasa, así como la síntesis de fitoalexinas. El mecanismo propuesto por medio del cual se lleva a cabo la transducción de señales en respuesta específica a este inductor se muestra en la figura 7 (Nürberger *et al.*, 1994). El inductor se une a un receptor de la membrana plasmática y a partir de este evento, la célula enciende el mecanismo de transducción de señales, activando la formación de radicales libres y el flujo de iones en el plasmalema, lo cual desencadena una serie de fosforilaciones que van amplificando la señal, hasta llegar al núcleo, en donde activa la expresión de genes relacionados con los mecanismos de defensa (Fig. 7).

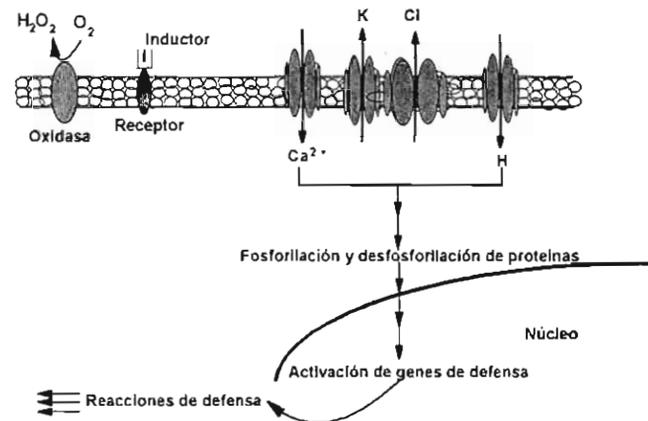


Figura 7. Modelo hipotético de la cascada de transducción de señales en respuesta a la inducción en perejil (tomado de Nürberger *et al.*, 1994). I: inductor.

Compartimentalización y almacenamiento de los alcaloides. La vacuola de las plantas tiene una función central en el almacenamiento de una gran variedad de metabolitos, incluyendo ácidos orgánicos, azúcares y metabolitos secundarios (Leigh, 1983; McCaskill *et al.*, 1988). La acumulación en la vacuola de cationes como el Na^+ o el Ca^{2+} y el malato, está íntimamente relacionada con el gradiente de pH establecido a través del tonoplasto por ATPasas y por pirofosfatasa (McCaskill *et al.*, 1988). Los alcaloides son aminas de bajo peso molecular, su forma neutra es lipofílica y son

almacenados en la vacuola como sales no permeables, debido al bajo pH del lumen de la vacuola (McCaskill *et al.*, 1988; Neumann *et al.*, 1983).

El mecanismo involucrado en el transporte y almacenamiento de los alcaloides no está del todo claro y se han propuesto dos hipótesis. Por un lado, existen evidencias que sugieren que el mecanismo de transporte requiere de energía, utiliza acarreadores específicos e involucra a una bomba de protones "antiport" (Deus-Neumann y Zenk, 1984, 1986; Yamamoto *et al.*, 1987; Blom *et al.*, 1991). El otro mecanismo también requiere de protones ("atrapamiento de iones"), pero con una función totalmente diferente. Los alcaloides se encuentran subdivididos, en base a sus propiedades químicas, dependientes del pH, en neutros (no protonados) y en cargados (protonados) (Blom *et al.*, 1991). La forma neutra difunde libremente a través de las membranas, mientras que la forma protonada no puede transportarse de esta manera (Renaudin *et al.*, 1985). Este modelo implica que, cuando existen varios compartimentos celulares, hay una distribución balanceada de los alcaloides en cada compartimento, y la forma protonada, que no puede difundir, se queda atrapado en el organelo celular más ácido (Renaudin *et al.*, 1985). En cultivos celulares, con base en este modelo, se pueden considerar dos compartimentos, el medio extracelular y la vacuola. La concentración de protones en el resto de la célula es aproximadamente la misma que la de la vacuola (Renaudin *et al.*, 1985). El rango de concentración de los alcaloides depende de la diferencia entre el pH del medio extracelular y el pH de la vacuola: mientras mayor sea la diferencia (mientras más ácido el interior de la célula), mayor cantidad de alcaloides indólicos se pueden acumular en las células (Renaudin *et al.*, 1985).

Evidencias a favor de este modelo ha sido presentada por varios grupos. En cultivos de células en suspensión de *C. roseus*, se estudió la toma de la triptamina (pK= 10.2), la tabernantina (pK= 8.1) y de la ajmalicina (pK= 6.3), aumentando el pH del medio extracelular (Renaudin, 1981; Renaudin y Guern, 1982). La tabernantina es un alcaloide indólico que no es sintetizado por *C. roseus* y se escogió por su pK intermedio entre la triptamina y la ajmalicina.

Cada alcaloide fue tomado por las células hasta alcanzar un equilibrio entre las células y el medio en unas pocas horas. La cantidad de cada alcaloide que fue incorporado dependió de su pK. La triptamina, con el pK más alto, fue el compuesto que se acumuló en mayor cantidad en las células, mientras que la ajmalicina fue el que se acumuló en menor cantidad (Renaudin, 1981; Renaudin y Guern, 1982). La tabernantina fue internalizado libremente por las células, lo que sugiere que en *C. roseus* no se requiere de acarreadores específicos para el transporte de los alcaloides indólicos (Renaudin, 1981; Renaudin y Guern, 1982). Las células de *C. roseus* también tienen la capacidad de incorporar a la cinchonamina y a la quinolina, dos alcaloides indólicos sintetizados por *Cinchona robusta*. La acumulación se dió en función del pH del medio extracelular: mientras más básico el pH del medio, mayor fue la incorporación de los alcaloides. La cinética de acumulación de los dos alcaloides fue similar en *Cinchona* y en *Catharanthus*, lo que sugiere que la internalización y la acumulación de los alcaloides en ambas especies es causada por la difusión libre (no hay acarreadores involucrados) y el atrapamiento de iones (Blom *et al.*, 1991).

Al analizar la distribución de la ajmalicina y de la serpentina entre el medio extracelular e intracelular en células en suspensión de *C. roseus* evaluadas durante la

fase exponencial del crecimiento, donde el pH vacuolar fue de 6.7 y el pH del medio fue de 6.2, se reportó que en el medio de cultivo se encontraba del 25 al 50% de la ajmalicina total y sólo del 2 al 6% de la serpentina total (Renaudin *et al.*, 1985). De acuerdo al modelo de atrapamiento de iones, el alcaloide con el pK más alto, la serpentina (pK= 10.8) se acumuló en mayor cantidad dentro de las células (Renaudin *et al.*, 1985).

La importancia de la difusión simple y el atrapamiento de iones fue cuestionada por Deus-Neuman y Zenk (1982). Las vacuolas aisladas de *C. roseus* incorporaron los alcaloides sintetizados por esta planta, mientras que las vacuolas de *Daucus carota* (una planta que no produce alcaloides) no pudieron tomar los alcaloides de *C. roseus*. El transporte de los alcaloides en la vacuola fue un mecanismo activo, que probablemente requería de energía y fue sensible a la temperatura y al pH del medio (Deus-Neuman y Zenk, 1984). En vacuolas aisladas de *Fumaria capreolata* se demostró que la internalización de los alcaloides depende de energía, ya que el ATP estimuló hasta en siete veces este mecanismo. Asimismo, los inhibidores de las ATPasas, el DCCD y el DIDS inhibieron el transporte de los alcaloides, lo que sugiere la existencia de bombas que generan un potencial eléctrico en la membrana (Deus-Neuman y Zenk, 1986).

En protoplastos de hoja de *C. roseus* se analizó la incorporación de cuatro alcaloides indólicos, la vindolina, la ajmalicina, la tabersonina y la vinblastina, todos ellos sintetizados por *C. roseus*, y dos alcaloides que no son sintetizados por esta planta, la morfina y la nicotina (McCaskill *et al.*, 1988). Los protoplastos tuvieron la capacidad de incorporar todos los alcaloides utilizados. La incorporación de los cuatro alcaloides de *C. roseus* fue bifásica, caracterizada por una toma inicial rápida, seguida por una fase lineal lenta. La velocidad de la asimilación en las dos fases dependió de cada alcaloide. En contraste, la toma de la morfina y de la nicotina fue monofásica (McCaskill *et al.*, 1988). La evidencia de la difusión simple de los alcaloides estuvo dada por la cinética de incorporación de la nicotina y la dependencia de la concentración y el pH de la toma inicial de la vindolina (McCaskill *et al.*, 1988).

La segunda fase de la incorporación de la vindolina fue inhibida con la adición de azida de sodio al medio de cultivo de los protoplastos, mientras que la toma de la ajmalicina no se vió afectada por este inhibidor. En el caso de la vindolina, aparentemente se requiere de un mecanismo de incorporación dependiente de energía, mientras que el transporte de la ajmalicina no lo requiere (McCaskill *et al.*, 1988).

Los datos presentados en esta sección aportan evidencias de que en la incorporación de los alcaloides indólicos están involucrados los dos mecanismos de transporte y acumulación de los alcaloides, la difusión simple y el "atrapamiento de iones" por un lado, y un mecanismo de transporte activo, que requiere de energía y de transportadores específicos, por el otro. El funcionamiento de cada uno de los mecanismos depende del alcaloide en particular que vaya a ser transportado y almacenado. Estos resultados resaltan la complejidad en la regulación de la vía de los metabolitos secundarios.

Triptofano descarboxilasa (TDC). La TDC cataliza la descarboxilación del triptofano a triptamina (Fig. 2). Esta enzima ha sido aislada y purificada a homogeneidad aparente a partir de cultivos en suspensión (Alvarez-Fernandez *et al.*, 1989; Noé *et al.*, 1984; Pennings *et al.*, 1989) y de raíces transformadas de *C. roseus* (Islas-Flores, 1994). A partir de la proteína pura, se han obtenido anticuerpos policlonales (Islas-Flores, 1994; Pennings *et al.*, 1989). La TDC es una proteína soluble, tiene un peso molecular de alrededor de 110 kDa, está constituida por dos subunidades idénticas de 55 kDa cada una, que contiene dos moléculas de piridoxal por holoenzima, y su punto isoeléctrico estimado es de 5.9 (Pennings *et al.*, 1989).

Debido a que es una enzima que une al metabolismo primario con el secundario, su función se considera como un punto clave en el control de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos. Por esta razón, ha sido ampliamente estudiada en diferentes sistemas experimentales, con diferentes niveles de diferenciación celular, los cuales han aportado evidencia contradictoria en cuanto a su importancia en la regulación de la síntesis de los alcaloides indólicos. Por un lado, existen evidencias que sugieren que es un paso limitante, como lo indican los resultados encontrados en plántulas de *C. roseus*, en donde se demostró que la TDC se encuentra bajo estricto control durante el desarrollo (De Luca *et al.*, 1986). La acumulación de la tabersonina, un precursor de la vindolina, coincidió con el pico de mayor actividad de la TDC en las plántulas (De Luca *et al.*, 1988).

Los cultivos de células en suspensión tienen la capacidad de responder a estímulos externos con cambios en la expresión de algunos genes (Godijn *et al.*, 1992; Ozeki *et al.*, 1990; Pasquali *et al.*, 1992), lo que puede dar como resultado una alteración en la síntesis de metabolitos secundarios, entre otras reacciones metabólicas. La TDC es una enzima a la que se le puede modificar su expresión y los niveles de actividad enzimática utilizando diversos factores. La transferencia de células en suspensión de *C. roseus* de un medio de mantenimiento a un medio de producción de alcaloides indólicos (el cual se caracterizaba por un alto contenido de sacarosa y bajo contenido de fosfatos) provocó un aumento en la acumulación de estos compuestos. Bajo estas condiciones, dicho incremento coincidió con una mayor actividad de la TDC (Knobloch *et al.*, 1981).

Otro estímulo que provoca un aumento en la actividad de la TDC es la adición de homogenados de *Pythium aphanidermatum* a cultivos en suspensión de *C. roseus*. El aumento en la actividad de la TDC fue seguida por un aumento en la síntesis de los alcaloides (Eilert *et al.*, 1987; Seitz *et al.*, 1989). Pretratamientos con cicloheximida, un inhibidor de la traducción, previno la inducción de la actividad de la TDC, así como también evitó el aumento en la síntesis de los alcaloides (Eilert *et al.*, 1987), lo que sugiere que los homogenados fúngicos promueven una síntesis *de novo* de la enzima (Seitz *et al.*, 1989).

La densidad celular en cultivos de células en suspensión es otro factor que puede modular a la actividad de la TDC (Moreno *et al.*, 1993). Células en suspensión de *C. roseus* fueron cultivadas en un medio de crecimiento (control) y en un medio de producción de los alcaloides, usando dos densidades de inóculo, una por abajo y otra por arriba del inóculo utilizado en el control. La baja densidad celular utilizada en el medio de producción provocó un rápido aumento en la actividad de la TDC, el cual fue precedente a un aumento en la acumulación de la ajmalicina (Moreno *et al.*, 1993).

Los cultivos con baja densidad celular tuvieron de dos a tres veces más actividad de la TDC que los cultivos con alta densidad celular (Moreno *et al.*, 1993).

A pesar de estas evidencias a favor de la importancia de la TDC en la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos, existen algunos reportes en la literatura que sugieren que la actividad de la TDC no representa un punto limitante en la biosíntesis de estos compuestos. La línea C20 de células en suspensión de *C. roseus* se cultivó en tres medios diferentes y se cuantificó la actividad de la TDC y la producción de la ajmalicina y de la serpentina. La actividad de la TDC fue muy similar en los tres medios de cultivo utilizados; sin embargo, la acumulación de la ajmalicina y de la serpentina varió grandemente (Mérillon *et al.*, 1986). Por otro lado, en tres líneas de células en suspensión de *C. roseus* cultivadas en el mismo medio, no se observó una correlación entre la actividad de la TDC y la síntesis de los alcaloides indólicos (Doireau *et al.*, 1987), ya que mientras la enzima alcanzó su máximo de actividad al inicio de la fase estacionaria, y fue muy similar en las tres líneas celulares estudiadas, la acumulación de la ajmalicina y de la serpentina no coincidieron con la máxima actividad de la TDC y su contenido varió de línea a línea (Doireau *et al.*, 1987).

Uno de los motivos de estas discrepancias entre la actividad de esta enzima y la acumulación de los alcaloides indólicos, podría ser la heterogeneidad en la morfología celular entre las condiciones estudiadas. En células en suspensión de *C. roseus* se demostró que la producción de la ajmalicina, de la secologanina y la serpentina fue inestable debido a las diferencias en la morfología celular de los cultivos (Deus-Neumann y Zenk, 1984; Dougall, 1987). En otro caso, en cultivos celulares de *C. roseus* derivados de protoplastos, se separaron células con diferencias morfológicas fácilmente distinguibles, unas con aspecto esférico y otras cilíndricas. Las células esféricas acumularon menor cantidad de ajmalicina y de catarantina que las células cilíndricas (Kim *et al.*, 1994). La inestabilidad debida al estado de desdiferenciación de los cultivos celulares podría ser otra de las causas de la falta de correlación entre la actividad de la TDC y la síntesis de los alcaloides indólicos.

La transformación genética es otra herramienta que se ha utilizado para dilucidar el papel regulatorio de la TDC en la biosíntesis de los alcaloides indólicos. En cultivos de callos de *C. roseus* que fueron transformados con *A. tumefaciens*, cuyo plásmido contenía el gen de la *tdc*, bajo la regulación del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, se encontró que su sobreexpresión provocó un aumento en los niveles de proteína de la TDC, en su actividad enzimática y en los niveles de triptamina; sin embargo, no se observó un aumento en la acumulación de los alcaloides indólicos (Meijer *et al.*, 1993). Estos resultados sugieren que la TDC no es el único paso limitante en la biosíntesis de los alcaloides. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que la proteína con actividad de TDC sobreexpresada no se localice en el citosol como la enzima nativa, o bien que los resultados obtenidos sean consecuencia del estado tumorigénico de los callos de *C. roseus* (Meijer *et al.*, 1993).

A nivel molecular, el gen *tdc* fue aislado a partir de una biblioteca de ADNc obtenida de plántulas de *C. roseus* de 7 días de edad utilizando anticuerpos anti-TDC (De Luca *et al.*, 1989). Esta ADNc codifica para una proteína compuesta por 500 aminoácidos, con un peso molecular de 56 kDa, el cual es muy similar al peso estimado por SDS-PAGE (Alvarez-Fernández *et al.*, 1989; Islas-Flores, 1994). En el genoma de *C. roseus*, la TDC es codificada por un copia simple (Goddijn *et al.*, 1992),

y su expresión está regulada por diversos factores, como las auxinas, la inducción con hongos y el nivel de desarrollo (Aerts *et al.*, 1992; De Luca *et al.*, 1988; Goddijn *et al.*, 1992; Pasquali *et al.*, 1992).

En cultivo de células en suspensión se observó que la eliminación de las auxinas del medio daba como resultado un aumento en los niveles de transcritos de *tdc* (Goddijn *et al.*, 1992). Al adicionar de nuevo auxinas (AIA y ANA) al medio, se observó que los niveles de transcritos de *tdc* disminuyeron de manera transitoria, y después de 24 h de que se agregaron los fitorreguladores, los cultivos recuperaron los niveles de *tdc* originales.

Los ARNm de *tdc* tienen una vida media muy corta, de aproximadamente una hora, lo que sugiere que la transcripción de *tdc* representa un punto importante de regulación de la enzima (Goddijn *et al.*, 1992). Por otro lado, la adición de 2,4-D tuvo un efecto más prolongado sobre la disminución de los niveles de *tdc*. Después de tres días de tratamiento con el 2,4-D, los niveles de transcritos de *tdc* no recuperaron los altos niveles observados con AIA y ANA. La lenta degradación de este fitorregulador sintético puede ser la causa de que los niveles de *tdc* se mantuvieran bajos con este tratamiento (Goddijn *et al.*, 1992). Esta regulación negativa de *tdc* no es específica para las células en suspensión, ya que también se observó el mismo efecto en raíces transformadas de *C. roseus* (Goddijn *et al.*, 1992).

La respuesta a nivel de transcripción de *tdc* fue rápida (la disminución de *tdc* ocurrió a los 15 min después de que se adicionó el ANA a las células en suspensión) e independiente de la síntesis de proteína (Goddijn *et al.*, 1992; Pasquali *et al.*, 1992), lo que sugiere que estos fitorreguladores podrían regular la actividad de factores de transcripción preexistentes, por ejemplo, mediante fosforilaciones/defosforilaciones (Pasquali *et al.*, 1992).

El metabolismo secundario se expresa en tejidos y órganos diferenciados durante etapas específicas del desarrollo de una planta, y se encuentra reprimido e incluso ausente en células desdiferenciadas, por lo que su expresión se correlaciona con el crecimiento y la diferenciación (Ozeki *et al.*, 1990). En los cultivos de células en suspensión, los metabolitos secundarios se acumulan preferentemente en la fase estacionaria y en menor cantidad durante la fase activa del crecimiento (Sakuta y Komamine, 1987). Debido a que las auxinas estimulan la proliferación celular y reprimen la expresión de genes involucrados en la síntesis de los alcaloides indólicos como *tdc* y *sss* en células en suspensión de *C. roseus* (Goddijn *et al.*, 1992; Pasquali *et al.*, 1992), y de los fenilpropanoides como *pal* y *chs* en células en suspensión de zanahoria (Ozeki *et al.*, 1990), se sugiere que estos fitorreguladores podrían funcionar como un "interruptor" que regula el cambio del crecimiento celular a la síntesis de metabolitos secundarios en cultivos de células en suspensión y en raíces transformadas (Goddijn *et al.*, 1992).

El gen *tdc* se expresa en todos los órganos de la planta de *C. roseus*, y los mayores niveles de ARNm de este gen fueron encontrados en las raíces, mientras que su menor expresión se encontró en las hojas (Pasquali *et al.*, 1992). En raíces de plántulas de *C. roseus*, tratadas con 2,4-D y con IBA, se encontró que la actividad de la TDC y de la proteína que inmunoreaccionó con los anticuerpos anti-TDC aumentó con relación a las plántulas no tratadas. Estas raíces presentaron alteraciones morfológicas (Aerts *et al.*, 1992). El desarrollo anormal de las radículas y la inducción

específica de la actividad en estos órganos podría sugerir una posible relación entre la morfología de la raíz y la inducción de la TDC (Aerts *et al.*, 1992).

Los resultados contrastantes obtenidos con las auxinas son difíciles de explicar, y sugieren que no se pueden hacer generalizaciones con los resultados obtenidos en dos sistemas experimentales tan diferentes fisiológicamente, como los cultivos de células en suspensión y las plántulas de *C. roseus*. Sin embargo, el hecho de que las auxinas produzcan, además de división celular, diferenciación anormal de las radículas tratadas con 2,4-D, podría sugerir que esta diferenciación sea la causa de que aumente la actividad de la TDC (Aerts *et al.*, 1992).

La expresión del gen de la TDC es también regulado durante la diferenciación y el desarrollo (De Luca *et al.*, 1988), así como por inductores fúngicos (Pasquali *et al.*, 1992; Roewer *et al.*, 1992). El ARNm de la TDC aparece de manera transitoria durante el desarrollo de plántulas de *C. roseus*. En las plántulas de 3-4 días de edad se observó un aumento de 6 veces en la cantidad de transcritos, cuantificados por densitometría, con relación a las plántulas de 2 días de edad y posteriormente disminuyeron en un 50% en el día 6 de desarrollo de la plántula (Rower *et al.*, 1992). La aparición de los transcritos de *tdc* en las plántulas en el día 3 y su disminución en el día 6 hasta en un 50%, correlacionó con la aparición transitoria de una proteína inmunorreactiva de 55 kDa, la cual coemigró en un gel de SDS-PAGE con el antígeno purificado de la TDC (Alvarez-Fernández *et al.*, 1989). La aparición de esta proteína inmunorreactiva coincidió con los períodos en los cuales la actividad de la TDC fue más alta en las plántulas (Alvarez-Fernández *et al.*, 1989). El anticuerpo anti-TDC también detecta otras proteínas inmunorreactivas (de 49, 63, 67 y 73 kDa), las cuales correlacionan con la aparición de la actividad de TDC en las radículas de plántulas tratadas con auxinas (Aerts *et al.*, 1992). Las evidencias inmunológicas sugieren que las bandas de 63 y 67 kDa podrían ser proteínas ubiquitinadas (Alvarez-Fernández y De Luca, 1994). La TDC es un dímero de 110 kDa con dos subunidades idénticas de 55 kDa, y se ha sugerido que la actividad de la TDC es regulada por el equilibrio entre el dímero activo y el monómero inactivo (Alvarez-Fernández *et al.*, 1989), el cual es susceptible a la inactivación irreversible. Cuando el equilibrio es llevado hacia el monómero inactivo, la proteína puede ser ubiquitinada y degradada, en un proceso que requiere de ATP (Alvarez-Fernández y De Luca, 1994; De Luca, 1993).

Los datos presentados en este apartado sugieren que la TDC se encuentra bajo estricto control transcripcional postranscripcional y postraducciona, cuya función es regular la producción de triptamina, uno de los precursores de la síntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus* (De Luca, 1993). A pesar de la facilidad de manipular las condiciones de cultivo y la producción de los alcaloides indólicos en las células en suspensión, los resultados obtenidos, en ocasiones son difíciles de interpretar, ya que por tratarse de células desdiferenciadas, son cultivos muy inestables y cualquier variación puede modificar la producción de alcaloides, la expresión y la actividad de las enzimas involucradas en la vía de síntesis de estos compuestos, lo que puede llevar a conclusiones equivocadas. En una ruta metabólica tan compleja como lo es la de la biosíntesis de los alcaloides indólicos, es sumamente difícil que la regulación recaiga en una sola enzima, por lo que un pequeño aporte de la TDC es importante para la regulación global de la ruta biosintética.

Estrictosidina sintasa (SSS). La strictosidina sintasa (SSS) cataliza la condensación de la L-triptamina y de la 3- β -secologanina y genera como producto dos epímeros, un isovincósido (la strictosidina) y un vincósido (Cordell, 1974), de los cuales el isovincósido es el precursor universal de los alcaloides indólicos (Stöckigt y Zenk, 1977).

La SSS ha sido identificada en ocho especies de la familia Apocynaceae, las cuales producen alcaloides indólicos. La enzima es un monómero con un peso molecular estimado entre 34 y 38 kDa, y aparentemente no requiere cofactores.

La enzima fue purificada por primera vez a partir de células en suspensión de *C. roseus* y no se encontró evidencia de la presencia de isoformas (Treimer y Zenk, 1979). El pH óptimo fue 6.8 y su K_m aparente fue de 2.3 mM para la triptamina y de 3.4 mM para la secologanina. La enzima purificada de *Rawolfia serpentina* (Hampp y Zenk, 1988) presentó grandes similitudes con la proteína purificada de *C. roseus*. Al igual que en *C. roseus*, no se encontró la presencia de isoformas.

La primera evidencia de la presencia de isoformas fue encontrada en células en suspensión de *C. roseus*, donde la enzima fue purificada a homogeneidad y se encontraron 7 isoenzimas (Pfitzner y Zenk, 1989), de las cuales cuatro pudieron ser separadas por su punto isoelectrónico, variando entre 4.3 y 4.9. Además, se demostró que la enzima está glucosilada, por lo que se sugiere que las diferentes isoformas pueden poseer diferentes cadenas de carbohidratos (Pfitzner y Zenk, 1989). En *Cinchona robusta* se encontraron 4 isoformas de la SSS, todas ellas como monómeros, con un peso molecular entre 33 y 35 kDa y a diferencia de la enzima encontrada en *C. roseus*, el pI de las cuatro isoformas varía entre 6.5 y 7.5 (Stevens *et al.*, 1993).

La secuencia del ARNm obtenido en *C. roseus* demostró que éste codifica para un péptido de 352 aminoácidos con un peso molecular estimado de 39.093 kDa. Se ha demostrado que la SSS es codificada por un sólo gen, por lo que las diferentes isoformas encontradas en *C. roseus* y las otras Apocináceas estudiadas son el resultado de la modificación postraduccional de un precursor simple (Pasquali *et al.*, 1992). La comparación de la secuencia del amino terminal de la enzima purificada con la secuencia obtenida a partir del ARNm indica que el producto primario de la traducción contiene un péptido señal de 31 aminoácidos (Pasquali *et al.*, 1992), el cual dirige a la proteína hacia su destino final, que en este caso es la vacuola (Stevens *et al.*, 1993).

Existen evidencias que sugieren que la SSS no constituye un paso limitante en la síntesis de los alcaloides indólicos. La enzima no está regulada por el grado de desarrollo ni su expresión es tejido específica, ya que se encontró que las 6 isoformas de la enzima se expresaban por igual en células en suspensión, hojas, tallos y raíces transformadas (De Waal *et al.*, 1995). En plántulas de *C. roseus*, la actividad de la SSS no se encuentra bajo estricto control de desarrollo, como es en el caso de la TDC (De Luca *et al.*, 1988). El pico de la máxima actividad de la TDC coincidió con el aumento de la acumulación de los alcaloides, mientras que la máxima actividad de la SSS no correlacionó con esta acumulación (De Luca *et al.*, 1988). Sin embargo, a nivel transcripcional, la expresión de los genes *sss* y *tdc* están regulados por los mismos factores (Pasquali *et al.*, 1992), lo que sugiere que la actividad de estas dos enzimas podría estar bajo regulación postraduccional.

Otra evidencia que sugiere que la SSS no es el factor limitante en la síntesis de los alcaloides indólicos es el hecho de que al transferir células en suspensión de *C. roseus* de un medio de mantenimiento a un medio que induce la producción de los alcaloides (8% de sacarosa), se observó un aumento en la acumulación, el cual fue precedido por un aumento en la actividad de la TDC; sin embargo, bajo estas condiciones, la actividad enzimática de la SSS se mantuvo constante (Kutchan, 1993).

Por el contrario, una correlación positiva entre la actividad de la SSS y la producción de los alcaloides se encontró en callos de *C. roseus* transformados con el gen de esta enzima. Bajo condiciones normales, las líneas celulares de *C. roseus* producen cantidades muy pequeñas de estos compuestos, de alrededor de 50 mg/L (Canel *et al.*, 1998). Sin embargo, cuando se transformaron callos con el gen *sss*, los cultivos presentaron un aumento en la actividad enzimática de la SSS y en la acumulación de los alcaloides (200 mg/L). Este tipo de correlación ha sido encontrado también en tejidos de *Cinchona ledgeriana* (Aerts *et al.*, 1990; 1994) y en plántulas de *C. roseus* (Aerts *et al.*, 1994).

Al igual que en el caso de la TDC, los resultados obtenidos acerca de la función de la SSS en la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides no son contundentes, ya que, por un lado, existen evidencias a favor de que es una enzima altamente regulada por diferentes factores, tales como la diferenciación y los inductores, y por otro, estos mismos factores no provocan cambios en la actividad de la enzima. A pesar de la gran cantidad de estudios realizados sobre la SSS, al momento su participación como una enzima clave en la síntesis de los alcaloides indólicos no es clara, de ahí la importancia de continuar realizando trabajos que aporten evidencias a favor o en contra acerca de su función regulatoria.

3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A reductasa (HMGR). En eucariotes, todos los isoprenos, incluyendo los esteroides y las ubiquinonas tienen como precursor común al isopentenil pirofosfato, el cual se deriva de la acetil coenzima A. Dentro de la vía de los isoprenos en animales, el ácido mevalónico es el precursor clave. Lo anterior ha sido demostrado con base en las siguientes evidencias: a) la reducción del 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG CoA) a mevalonato (Fig 8), catalizada por la HMGR, es una reacción que representa el principal paso de regulación en la biosíntesis del colesterol (Goldstein y Brown, 1990) y b) la cantidad de proteína de la HMGR está regulada por derivados esteroides y no esteroides del mevalonato a nivel de la transcripción (Liscum *et al.*, 1983; Osborne *et al.*, 1985), la traducción (Nakanishi *et al.*, 1988; Peffley y Gayen, 1997), y la estabilidad de la enzima (Correll y Edwards, 1994; Nakanishi *et al.*, 1988). Además, la HMGR se regula por fosforilación (Omikumar *et al.*, 1994) y por mecanismos alostéricos (Roitelman y Shechter, 1984). Esta regulación multivalente da como resultado un mecanismo de control muy sensible que responde a los niveles de colesterol y coordina el metabolismo de los isoprenos para asegurar la disponibilidad de los productos esteroides y no esteroides (Goldstein y Brown, 1990).

En las plantas, el mevalonato es utilizado como precursor de una gran variedad de compuestos derivados del isopreno, los cuales tienen una función muy importante en el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo. Estos compuestos incluyen fitoreguladores (citocininas, ácido giberélico y ácido abscísico), pigmentos

fotosintéticos, fitotoxinas, fitoalexinas, alcaloides indólicos y una gran variedad de compuestos terpénicos. De hecho, se han reportado alrededor de 22,000 compuestos derivados del isopreno en las plantas (Bach, 1995; Chappell, 1995; Rodríguez-Concepción y Grisse, 1999) (Fig. 8). Sin embargo, a pesar de la importancia de los isoprenos, los mecanismos que controlan su biosíntesis aún no se conocen con claridad y no se han identificado el paso o los pasos limitantes de esta vía (Chappell, 1995; Chappell, 1995a; Re *et al.*, 1995).

Es muy probable que, al igual que en células animales, en las plantas la síntesis del mevalonato sea el primer paso limitante en la síntesis de estos metabolitos. La HMGR ha sido aislada y purificada de mamíferos y aves y se ha encontrado que se trata de una enzima monomérica de 90-97 kDa de peso molecular, mientras que la enzima de *Pseudomonas* y de levadura tiene un peso de 260-280 kDa y está formada posiblemente por cuatro subunidades idénticas (Bach *et al.*, 1986).

El primer reporte de la purificación de la HMGR en las plantas se realizó en plántulas de rábano (Bach *et al.*, 1986), donde al igual que en otros eucariotes, se trata de una enzima asociada a la membrana. A diferencia de los datos anteriores, la HMGR presentó un peso aparente de 180 kDa con cuatro subunidades de 45 kDa cada una (Bach *et al.*, 1986). En papa se encontró que la enzima poseía un peso molecular de 111 kDa y que estaba compuesta por dos subunidades de 55 kDa cada una (Kondo y Oba, 1986). En el caso de *Hevea brasiliensis*, se encontró que la enzima es un tetramero de peso molecular de aproximadamente 176 kDa, muy similar al peso encontrado en plántulas de rábano. La diferencia en el peso podría deberse a que la enzima pudo haber presentado una degradación proteolítica durante su solubilización o durante la purificación (Wuititsuwannakul *et al.*, 1990).

El hecho de que existan diferencias notables entre las HMGR purificadas, sugiere que podrían tratarse de isoenzimas. La caracterización de la HMGR ha sido difícil por el hecho de que se trata de una enzima unida a la membrana, lo cual complica su purificación.

Una alternativa ampliamente utilizada para caracterizar a la HMGR ha sido la clonación de los genes que codifican para esta enzima. En contraste con los sistemas animales estudiados, en donde un solo gen codifica para la enzima, en las plantas se ha demostrado que existe una familia de genes que codifican para las isoenzimas de la HMGR. El número de genes varía de planta a planta; por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se han reportado dos genes, mientras que en papa se han descrito al menos nueve genes (Dale *et al.*, 1995) (Cuadro 1).

El ADNc para la HMGR obtenido de *Arabidopsis thaliana* codifica para una proteína de 592 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 63.605 kDa (Caelles *et al.*, 1989), mientras que en *C. roseus* se encontró que el ADNc codifica para un péptido de 601 aminoácidos con un peso molecular de 64.106 kDa (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1992). El peso molecular predicho para *Hevea brasiliensis* a partir del ADNc fue de 59 kDa (Chye *et al.*, 1992). Los datos anteriores junto con los datos obtenidos en la purificación de la enzima a partir de papa (Kondo y Oba, 1986) sugieren que la enzima posee monómeros de alrededor de 55-60 kDa y que podría tratarse de una proteína dimérica.

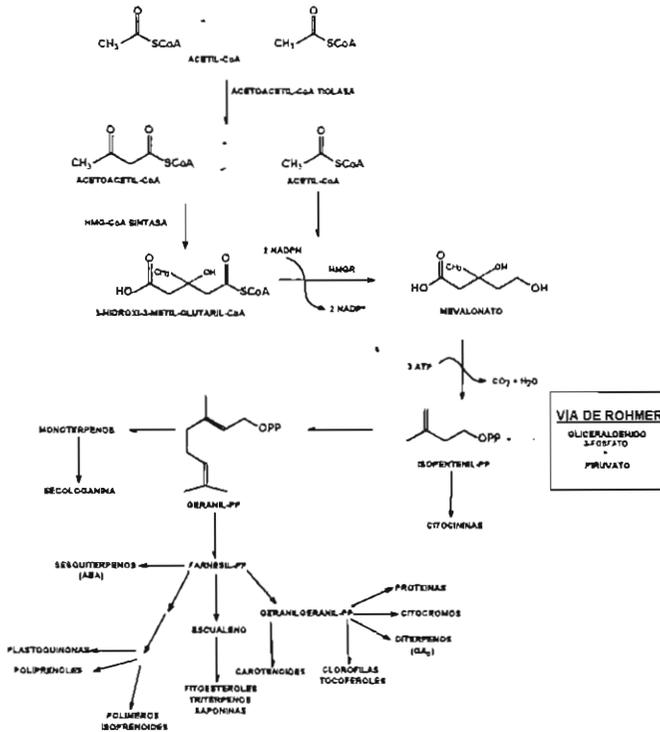


Figura 8. Biosíntesis de los isoprenos en células vegetales. El isopentenil pirofosfato (IPP) es el precursor de una gran variedad de compuestos de suma importancia para las células vegetales como reguladores del crecimiento, fitoesteroles, clorofilas, alcaloides, etc. y se puede derivar de dos vías: la del acetato mevalonato y de la vía de Rohmer.

Con base en la secuencia de aminoácidos predicha a partir de las clonas de ADNc, se ha propuesto un modelo estructural para la HMGR en las plantas, el cual consiste de una región amino-terminal (altamente divergente entre las clonas), un dominio de anclaje a la membrana muy conservado, que contiene dos secuencias hidrofóbicas que cruzan dos veces la membrana, a diferencia de la de los animales donde cruza siete veces la membrana, una pequeña región de unión (divergente) y una región C-terminal con un dominio catalítico conservado (Dale *et al.*, 1995).

A nivel de actividad enzimática, se ha encontrado que existe una relación entre la actividad de la HMGR y la síntesis de los sesquiterpenos. Los niveles de la actividad enzimática aumentan justo antes de la acumulación de las fitoalexinas derivadas de los sesquiterpenos en las raíces de *Ipomoea batatas* (Gershenson y Croteau, 1990), en células en suspensión de *Solanum tuberosum* (Oba *et al.*, 1985) y en células en

suspensión de tabaco (Vogeli y Chappell, 1988). Además, tratamientos que reducen la actividad de la HMGR, como la irradiación con luz blanca o la aplicación de mevinolina (un inhibidor de la actividad de la HMGR), reducen la acumulación de los sesquiterpenos en tubérculos de papa y en células en suspensión de tabaco (Chappell y Nable, 1987; Stermer y Bostock, 1987). Por otro lado, la adición de fragmentos de pared de diferentes especies de *Phytophthora* o de celulasa obtenida de *Trichoderma viride* a células en suspensión de tabaco provocaron un aumento en la acumulación del sesquiterpeno capsidiol precedida por un aumento en la actividad de la HMGR (Chappell *et al.*, 1991).

En contraste con lo que se sabe en células animales, en plantas aún es controversial el papel de la HMGR en la biosíntesis de los isoprenoides. El descubrimiento reciente de una vía alterna para la producción de isoprenos en las plantas (Einsenreich *et al.*, 1996; Lange *et al.*, 1998; Lichtenhaler *et al.*, 1997), resalta la pregunta de si la actividad de la HMGR es requerida para la síntesis de todos los productos finales de la ruta de los terpenos (Rodríguez-Concepción y Gruissem, 1999).

En las células vegetales, los carotenos, el fitol, las plastoquinonas, los monoterpenos (Lichtenhaler *et al.*, 1997) y los diterpenos son sintetizados y acumulados en los plástidos (Lange *et al.*, 1998), mientras que los esteroides son sintetizados en el citoplasma y el retículo endoplásmico (Disch *et al.*, 1998; Lichtenhaler *et al.*, 1997). Por otro lado, la mevinolina inhibe la síntesis de los esteroides en las plantas (Bach y Lichtenhaler, 1983; Narita y Gruissem, 1989), sin embargo, la biosíntesis de las clorofilas, los carotenoides y la plastoquinona-9 no son afectados por este inhibidor (Bach y Lichtenhaler, 1983; Narita y Gruissem, 1989). El ácido araquidónico (AA), un inductor de origen fúngico provocó un aumento en la actividad de la HMGR y de la síntesis de los carotenoides en jitomate (Rodríguez-Concepción y Gruissem, 1999). Al adicionar la mevinolina al jitomate, se inhibió la actividad de la HMGR, pero no se observó ningún efecto sobre el aumento en la acumulación de los carotenoides causada por el AA (Rodríguez-Concepción y Gruissem, 1999). Recientemente se ha demostrado que la luteína, un β -caroteno, el fitol y la plastoquinona-9 en *Hordeum vulgare*, *Daucus carota* y *Lemma gibba*, respectivamente, son sintetizados a partir del IPP derivado de la vía de Rohmer (Fig. 8), una ruta independiente de la del acetato-mevalonato (Lichtenhaler *et al.*, 1997).

Esta nueva ruta fue descubierta en eubacterias (Rohmer *et al.*, 1993) y después se demostró que está presente en el alga verde *Scenedesmus obliquus* (Schwender *et al.*, 1996), y se inicia con la condensación del gliceraldehído-3-fosfato con el piruvato (Fig. 8) para producir 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato, el cual es convertido, después de varios pasos, en el IPP (Zeidler *et al.*, 1997).

Los resultados presentados en esta sección sugieren que la actividad de la HMGR no es necesaria para la biosíntesis de los isoprenoides que son sintetizados en los plástidos, en donde se utiliza al IPP generado por la vía alterna de Rohmer. Entre estos compuestos se incluyen a los carotenoides, a las plastoquinonas, al fitol, a los diterpenos y para nuestro especial interés, a los monoterpenos. La secologanina es un monoterpeno, el cual se consideraba que se derivaba de la vía del acetato-mevalonato, pero con las consideraciones hechas sobre la ruta alterna del IPP, al momento no está claro cuál es su origen, por lo que es necesario realizar diversos experimentos para elucidar de qué ruta se deriva (adición de precursores

marcados, de inhibición de la HMGR, etc.), y determinar con claridad si la HMGR tiene una función regulatoria clave en la biosíntesis de los alcaloides indólicos. En células en suspensión de *C. roseus*, mediante la adición de [1-¹³C] glucosa, se demostró que la secologanina se deriva de la vía alterna y no de la vía del acetato-mevalonato (Contin *et al.*, 1998).

Cuadro 1. Genes que codifican para la HMGR en diferentes especies vegetales, su número y su posible función.

Especies	Genes	Posibles funciones	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	Constitutivo; meristemo e inflorescencia	Enjuto <i>et al.</i> , 1994; 1995
<i>Catharanthus roseus</i>	2 o más	Síntesis de isopreno	Maldonado-Mendoza <i>et al.</i> , 1992; Burnett <i>et al.</i> , 1993
<i>Hevea brasiliensis</i>	3	Biosíntesis del hule; constitutivo	Chye <i>et al.</i> , 1992
<i>Lycopersicon esculentum</i>	3 o más	Biogénesis de membrana; maduración del fruto	Denbow <i>et al.</i> , 1996
<i>Nicotiana tabacum</i>	2 o más	Defensa	Weissenborg <i>et al.</i> , 1995
<i>Oryza sativa</i>	2	Biosíntesis de fitoalexinas	Nelson <i>et al.</i> , 1994
<i>Partenium argentatum</i>	varios	Biosíntesis del hule	Ji <i>et al.</i> , 1993
<i>Pisum sativum</i>	5	No determinados	Weissenborg <i>et al.</i> , 1995
<i>Raphanus sativus</i>	2 o más	Plántulas etioladas y meristemos	Völlack <i>et al.</i> , 1994
<i>Solanum tuberosum</i>	4 o más	Síntesis de esteroides	Choi <i>et al.</i> , 1992; 1994
<i>Triticum aestivum</i>	4 o más	Constitutivo; tejido meristemático	Aoyagi <i>et al.</i> , 1993

Fosfolipasa C en las plantas. La función del recambio de fosfoinosítidos en la transducción de señales a través de la membrana plasmática ha sido ampliamente estudiada en células animales (Yotsushima *et al.*, 1993). Diferentes fosfolípidos de la membrana pueden ser hidrolizados por fosfolipasas para generar segundos mensajeros; quizá el más conocido de dichos fosfolípidos es el fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂), el cual es hidrolizado por la fosfolipasa C (PLC) dando como productos el inositol trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG) (Fig. 9) El IP₃ es liberado hacia el citosol, para después unirse a receptores localizados en almacenes intracelulares de calcio y provocar la liberación del mismo hacia el citosol. El DAG permanece en la membrana, donde activa a la proteína cinasa C (PKC).

En células animales existen al menos tres familias de proteínas con actividad de PLC, todas ellas monoméricas: las PLCβ de alrededor de 150 kDa, las PLCγ de alrededor de 145 kDa y las PLCδ de aproximadamente 85 kDa. Cada una de las familias está formada por varios miembros (Lee y Rhee, 1995; Rhee y Choi, 1992). Del grupo de las PLCβ se han identificado al menos 5 miembros, los cuales se clasifican agregando un número después del caracter griego, como por ejemplo, PLCβ1, etc. Para la familia de las PLCγ se han identificado dos miembros y la familia de las PLCδ posee al menos cuatro miembros (Lee y Rhee, 1995; Rhee y Choi, 1992).

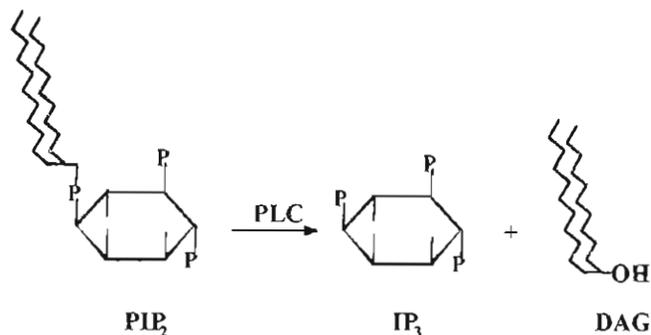


Figura 9. Reacción catalizada por la fosfolipasa C (PLC). PIP₂, fosfatidilinositol -4,5-bisfosfato; IP₃, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol.

Se ha demostrado que muchos de los componentes de la vía de transducción de señales mediada por los fosfoinosítidos identificados en mamíferos, tienen similitudes estructurales y funcionales con sus equivalentes en células vegetales (Shi *et al.*, 1995). En plantas se ha cuantificado la actividad enzimática de la PLC y, con base en sus características se han podido identificar dos grupos principales. Las PLC

del tipo I son proteínas solubles, prefieren al PI sobre el PIP y el PIP₂ como sustrato y requieren de concentraciones milimolares de calcio libre para alcanzar su máxima actividad *in vitro* (Yotsushima *et al.*, 1992). Las PLC de tipo II se encuentran asociadas a la membrana e hidrolizan preferentemente al PIP y al PIP₂ (Melin *et al.*, 1987), y a diferencia de la forma soluble, es activada por concentraciones micromolares de calcio (De los Santos-Briones *et al.*, 1997; Melin *et al.*, 1987; 1992; Pical *et al.*, 1992).

La PLC ha sido semipurificada de diferentes especies vegetales y se han identificado isoformas con diferentes características. En la fracción soluble de extractos de células en suspensión de arroz se encontró que la PLC poseía un peso molecular de alrededor de 50 kDa y la enzima estaba compuesta por un polipéptido simple, con un punto isoeléctrico de 6.3 (Yotsushima *et al.*, 1992). La proteína de la fracción membranal poseía un peso molecular de 42 kDa y su punto isoeléctrico fue de 5.1 (Yotsushima *et al.*, 1993). En raíces de avena se encontraron cuatro isoformas, dos en la fracción soluble y dos en la fracción membranal, con un peso molecular entre 50-70 kDa (Huang *et al.*, 1995).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado tres loci para la PLC: *atplc1*, *atplc2* y *atplc1S*. El *atplc1S* codifica para una proteína de 561 aminoácidos y con un peso molecular de aproximadamente 64 kDa. Este producto tiene una estructura única que codifica para una región N-terminal muy corta y poco conservada, a diferencia de las PLC β , γ y δ , las cuales codifican para una región N-terminal larga (Hirayama *et al.*, 1995). Además, la *atplc1S* posee dominios tipo "EF-hand" y dominios X y Y. Estas diferencias estructurales podrían reflejar diferencias en la regulación de este gen o bien en la distribución subcelular de la enzima (Hirayama *et al.*, 1995). La expresión de este gen fue inducida por estrés ambiental como deshidratación, alta salinidad y baja temperatura, lo que sugiere que este gen participa en las respuestas al estrés (Hirayama *et al.*, 1995).

El gen *atplc1* presentó una alta homología con los genes de la PLC δ de animales y levaduras. El gen codifica una proteína de 533 aminoácidos y posee una región con dos dominios altamente conservados y con gran similitud a la PLC de animales (Yamamoto *et al.*, 1995). Estudios de expresión y eliminación del gen de animales demostraron que estos dos dominios son esenciales para la actividad catalítica de la enzima (Yamamoto *et al.*, 1995). El gen no se expresa en las plántulas jóvenes de *Arabidopsis* y sólo es detectable en bajos niveles en los brotes, lo que sugiere que podría estar regulado por desarrollo (Yamamoto *et al.*, 1995).

La secuencia del gen *atplc2* tiene una gran similitud con el gen *atplc1S* y la estructura de ambos es muy similar a la de la PLC δ de animales. El *atplc2* posee los dominios X y Y presentes en otras PLC, pero en contraste con la *atplc1S* no tiene el dominio "EF-hand" en la secuencia que codifica para la región N-terminal. Esta divergencia en la estructura podría reflejar diferencias en la función de las dos PLCs (Hirayama *et al.*, 1997). Otra diferencia importante entre los dos genes es que el *atplc2* se expresa constitutivamente y su expresión no es modificada por condiciones de estrés ambiental (Hirayama *et al.*, 1997).

En plantas de soya se identificó el gen *plc1*, que codifica para una proteína de 600 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 68.8 kDa. El gen posee los dos dominios X y Y altamente conservados de la PLC de animales (Shi *et al.*, 1995). La secuencia entre estos dos dominios es de 80 aminoácidos y puede ser dividida en dos

regiones. La primera tiene un alto porcentaje de aminoácidos ácidos. La segunda región contiene un dominio putativo de unión de calcio del tipo "EF-hand", el cual se encuentra generalmente hacia el lado 5' del dominio X de las PLCs de animales y levaduras. Esta característica sugiere que la isoenzima PLC1 podría pertenecer a una nueva familia de PLC (Shi *et al.*, 1995). Al momento no se tienen datos acerca de cómo se regula este gen.

De células guarda de papa se clonaron tres genes de la PLC: *stplc1*, *stplc2* y *stplc3*. El *stplc1* codifica para una proteína de 596 aminoácidos, el *stplc2* para una proteína de 565 aminoácidos y el *stplc3* para una de 585 aminoácidos. El peso molecular relativo varía entre 64.294 y 67.766 kDa y el punto isoeléctrico entre 5.27 y 6.19. Las tres isoformas tienen los dominios característicos X y Y encontrados en las otras PLCs, además de un dominio tipo C₂ (Kopka *et al.*, 1998).

A diferencia de las PLCs de soya (Shi *et al.*, 1995) y de *Arabidopsis thaliana* (Hirayama *et al.*, 1995), las PLCs aisladas en papa no contienen el dominio tipo "EF-hand". El calcio podría unirse a residuos cargados del centro reactivo de la enzima, el cual está altamente conservado en todas las PLCs. Una segunda posibilidad es que el dominio regulatorio del calcio podría encontrarse en el dominio tipo C₂. El dominio tipo C₂ podría regular la actividad de la enzima interviniendo en la interacción con la membrana de las enzimas PLC, las cuales son principalmente anfipáticas (Essen *et al.*, 1996).

Los genes que han sido clonados en las tres especies mencionadas presentan una gran similitud con la PLC δ , encontrada en animales y levaduras. Una característica importante de este grupo es que la PLC se activa por concentraciones nanomolares de calcio (Hirayama *et al.*, 1995; Kopka *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1995).

Las PLC semipurificadas y clonadas de plantas presentan una serie de diferencias importantes entre ellas, tanto en la estructura, en la regulación bioquímica y en la expresión del ARN. Dichas diferencias sugieren que, al igual que en animales, los diferentes grupos de isoenzimas participan en la cascada de transducción de señales involucradas en la regulación de diferentes procesos fisiológicos o bioquímicos en las plantas.

Mecanismos de activación de la PLC. El sistema de los fosfoinosítidos fue descubierto en células de mamíferos por J.M. Berridge, R.F. Irvine, R.H. Michell y sus colaboradores en la década de los 80's (Berridge e Irvine, 1989). Los estudios realizados hasta el momento indican que el sistema de los fosfoinosítidos se encuentra presente en prácticamente todos los organismos eucariotes. A través de la regulación del calcio intracelular, los fosfoinosítidos regulan una gran variedad de procesos celulares.

Las señales externas que llegan a la célula, son percibidas por receptores que se encuentran en la membrana plasmática y con esto se inicia una cascada donde la información fluye de un componente a otro hasta que el sistema efector final es activado. La formación del IP₃ puede ser activada por dos vías, una iniciada por una familia de receptores acoplados a proteínas G (Taylor *et al.*, 1991; Yotsushima *et al.*, 1993) y la otra activada por receptores ligados a cinasas de tirosina directa o indirectamente (Goldschmit-Clermont *et al.*, 1991; Nishibe *et al.*, 1990). Estos dos mecanismos están acoplados a requerimientos GTP o ATP, y transducen la señal que

activa a la PLC e hidroliza al precursor lipídico fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), dando como productos de la reacción al IP₃ y al DAG (Goldschmit-Clermont *et al.*, 1991; Nishibe *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1991; Yotsushima *et al.*, 1993).

La vía de transducción de señales asociada a receptores acoplados a proteínas G posee tres componentes que son: el receptor acoplado a las proteínas G heterotriméricas, las cuales activan a la PLC. Los receptores de este tipo se caracterizan por poseer 7 dominios transmembranales (Alberts *et al.*, 1994; Kuang *et al.*, 1996). Estos segmentos interactúan entre sí y forman una cavidad donde se une el agonista. Este hecho activa a las proteínas G (Alberts *et al.*, 1994; Kuang *et al.*, 1996), que son el siguiente componente de la vía de transducción de señales. Las proteínas G están compuestas por tres subunidades: α , β y γ . Cuando las proteínas G heterotriméricas se encuentran asociadas, una molécula de GDP se encuentra unida a ellas. Después de que la célula percibe un estímulo, se da un intercambio de GDP por el GTP, lo que provoca que la subunidad α se disocie del complejo $\beta\gamma$. La subunidad α es un regulador de otras enzimas, entre ellas la PLC (Alberts *et al.*, 1994; Legendre *et al.*, 1992), el cual sería el tercer componente de esta vía. La subunidad α de las proteínas G posee actividad de GTPasa; por lo que cuando el estímulo finaliza, se hidroliza el GTP y las subunidades se reasocian (Alberts *et al.*, 1994; Legendre *et al.*, 1992).

La otra vía responsable de estimular la generación del IP₃ se inicia con receptores con actividad de cinasa de tirosina, los cuales transmiten la información a través de la interacción directa con la forma γ de la PLC (Goldschmit-Clermont *et al.*, 1991; Nishibe *et al.*, 1990). En plantas, a la fecha no se han detectado receptores membranales con actividad de cinasas de tirosina; sin embargo, se ha reportado la presencia de proteínas que se fosforilaban en tirosina en fracciones membranales y solubles de extractos de raíces transformadas de *C. roseus*, por lo que no se descarta la posibilidad de que alguna de ellas pudiera fosforilar en tirosina a la fosfolipasa C en las plantas (Rodríguez-Zapata y Hernández-Sotomayor, 1998).

Respuesta a los inductores. Las células vegetales tienen un sistema de percepción muy sensible como respuesta a una variedad de señales, como la luz UV, el etileno, e inductores endógenos y exógenos (Darvill y Albersheim, 1984). Después del reconocimiento del estímulo, un gran número de reacciones se inician, algunas de ellas relacionadas con los mecanismos de resistencia de las plantas: flujo de iones a través de la membrana plasmática, generación de especies reactivas de oxígeno (explosión oxidativa), fosforilación de proteínas específicas, activación de enzimas involucradas en el reforzamiento de la pared vegetal, activación transcripcional de numerosos genes de defensa, inducción de la síntesis de fitoalexinas, muerte celular localizada en el sitio de la infección e inducción de la resistencia sistémica adquirida en órganos distantes del sitio de la infección (Bent, 1996; Crute y Pink, 1996; Dangl *et al.*, 1996; Hammond-Kosack y Jones, 1996; Ryals *et al.*, 1996). El estímulo es percibido por receptores con alta afinidad, los cuales se encuentran en la membrana plasmática (Cosio *et al.*, 1990; Nürberger *et al.*, 1994; Schmidt y Ebel, 1987). Si es necesario que la molécula que provoca el estímulo se una a un receptor en la membrana plasmática para desencadenar las respuestas de defensa en las plantas, entonces, la generación de segundos mensajeros que transmitan la señal del

plasmalema al núcleo es esencial. Se ha propuesto que el Ca^{2+} y el AMPc tienen una función crucial en la transducción de señales en respuesta a la inducción (Kurosaki *et al.*, 1987).

Existen evidencias que sugieren que los fosfoinosítidos están implicados en la cascada de transducción de señales como respuesta al ataque de patógenos (Kamada y Muto 1994; Kurosaki *et al.*, 1987; Toyoda *et al.*, 1992). La adición de homogenados fúngicos a cultivos de células en suspensión de *D. carota* indujo un aumento en los niveles del inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y de la actividad de la fosfolipasa C. Correlacionado con este aumento, se observó un aumento en la síntesis de metoximiélinina, una fitoalexina que se sintetiza en zanahoria como respuesta a estímulos externos, en este caso en particular, como respuesta a los hidrolizados de pared de hongo (Kurosaki *et al.*, 1987). Sin embargo, el papel de los fosfoinosítidos en la cascada de señales en respuesta a la inducción no está del todo claro, ya que la adición de inductores fúngicos a cultivos en suspensión de perejil o de soya no estimularon un cambio en los niveles de los fosfoinosítidos (Strasser *et al.*, 1986). Estas divergencias podrían ser consecuencia de las diferencias entre las especies de las plantas analizadas o en los sistemas experimentales utilizados.

Dos enzimas involucradas en la síntesis del PIP_2 , la fosfatidil-inositol cinasa y la fosfatidil-inositol-4- fosfato cinasa aumentaron su actividad en la membrana plasmática de células en suspensión de chícharo después de la adición de homogenados de un hongo patógeno (Toyoda *et al.*, 1992). Los niveles del IP_3 también aumentaron en células en cultivo de chícharo al ser tratadas con inductores (Toyoda *et al.*, 1993). Otra evidencia en favor de que los fosfoinosítidos participan en la cascada de señales en respuesta a la inducción se encontró en células en suspensión de tabaco. La adición de fragmentos de pared de hongos a dichos cultivos provocó un aumento en la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), una enzima involucrada en la síntesis de los fenilpropanoides. Dicho aumento correlacionó con un aumento en el recambio de los fosfoinosítidos (Kamada y Muto 1994).

La revisión aquí presentada sugiere que el recambio de los fosfoinosítidos son parte fundamental en la cascada de señales en respuesta a los inductores; sin embargo, los componentes de este sistema no han sido claramente identificados, entre ellos, las cinasas que generan a los fosfolípidos, el tipo de fosfolipasa que los hidroliza, y la cascada que se desencadena en respuesta a los segundos mensajeros, de ahí la activa investigación en este campo. Por lo tanto, el interés de este trabajo se centra en dilucidar si la PLC participa en la cascada de señales en respuesta a la inducción con macerozima en las raíces transformadas de *C. roseus*, así como su posible función en la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos.

Objetivos Generales

HIPOTESIS I. Si el grado de diferenciación tiene una función importante en la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos, entonces al desdiferenciarse las raíces a células en suspensión es de esperarse que el nivel de alcaloides indólicos y la actividad de las enzimas involucradas en su síntesis sea diferente al de los cultivos diferenciados y que al rediferenciarse de nuevo a raíces recuperen los niveles encontrados en las raíces originales.

OBJETIVO I. Evaluar el efecto del grado de diferenciación sobre la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos en raíces transformadas de *C. roseus*.

Objetivos particulares

1) Generar el modelo de desdiferenciación-rediferenciación a partir de la línea J1 de raíces transformadas de *C. roseus* modificando la composición del medio de Phillips y Collins (1979).

2) Evaluar el patrón de alcaloides (cuantitativa y cualitativamente) en cada una de las etapas del proceso de desdiferenciación-rediferenciación.

3) Evaluar la actividad de las enzimas TDC, HMGR y SSS durante cada una de las etapas del proceso.

HIPOTESIS II. Si la fosfolipasa C está involucrada en la transducción de señales que desencadenan los mecanismos de defensa de las plantas en respuesta al ataque de patógenos, y los alcaloides indólicos pueden formar parte de este mecanismo, entonces es de esperarse que la adición de inductores a cultivos de raíces transformadas de *C. roseus* modifique la actividad de la PLC, así como la síntesis de los alcaloides.

OBJETIVO II. Determinar si la fosfolipasa C (PLC) participa en la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos bajo condiciones de inducción con macerozima.

Objetivos particulares

1) Evaluar el efecto de la adición de macerozima al medio de cultivo de raíces transformadas de *C. roseus* sobre la producción de alcaloides indólicos. Realizar experimentos de dosis respuesta y de curso-temporal.

2) Determinar el efecto de la adición de macerozima al medio de cultivo de raíces transformadas de *C. roseus* sobre la excreción de cumarinas. Realizar experimentos de dosis respuesta y de curso-temporal

3). Evaluar el efecto de la macerozima sobre la actividad de la TDC, la PAL y la PLC.

4) Determinar el efecto de la adición de neomicina al medio de cultivo sobre la producción de alcaloides indólicos.

Bibliografía

- Aerts R.J., A.M. Alarco and V. De Luca. Auxins induce tryptophan decarboxylase activity in radicles of *Catharanthus* seedlings. *Plant Physiol.* **100**: 1014-1019 (1992).
- Aerts R.J., D. Gisi, E. De Carolis, V. De Luca and T.W. Baumann. Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloid in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J.* **5**: 635-643 (1994).
- Aerts R.J., T. Van der Leer, R. Van der Heijden and R. Verpoorte. Developmental regulation of alkaloid production in *Cinchona* seedling. *J. Plant Physiol.* **136**:86-91 (1990).
- Alberts B., D. Bray, J. Lewis; M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. Molecular Biology of the Cell. 3th edition Garland Publ. Inc. New York-London. pp 1294 (1994).
- Alvarez-Fernández J. and V. De Luca. Ubiquitin-mediated degradation of tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **36**: 1123-1128 (1994).
- Alvarez-Fernández J., T.G. Owen, W.G.W. Kurz and V. De Luca. Immunological detection and quantitation of tryptophan decarboxylase in developing *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol.* **91**: 79-84 (1989).
- Aoyagi K., A. Beyou, K. Moon, L. Fang and T. Ulrich. Isolation and characterization of cDNA encoding wheat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Physiol.* **102**: 623-628 (1993).
- Bach T.J. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants: a review. *Lipids* **30**: 191-202 (1995).
- Bach T.J., D.H. Rogers and H. Rudney. Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings. *Eur. J. Biochem.* **154**: 103-111 (1986).
- Bach T.J. and H.K. Lichtenhaler. Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation. *Physiol. Plant.* **59**: 50-60 (1983).
- Bhadra R., S. Vani and J. V. Shanks. Production of indole alkaloid by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 581-592 (1993).
- Barz W., S. Daniel, W. Hinderer, U. Jaques, H. Kessmann, J. Koster, C. Otto and K. Tiemann. Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant cell culture. In: Applications of plant cell and tissue culture. Wiles J. (ed.). Batha Press Ltd., Bath, Avon. pp. 178-198 (1988).
- Bent A. F. Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* **8**: 1757-1771 (1996).
- Berridge M.J., R.M.C. Dawson, C.P. Downes, J.P. Heslop and R.F. Irvine. Changes in the levels of inositol phosphate after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* **212**: 473-482 (1983).
- Berridge M.J. and R.F. Irvine. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**: 197-205 (1989).
- Blom T.J.M., M. Sierra, T.B. Van Vliet, M.E.I. Franke-van Dijk, P. De Koning, F. Van Iren, R. Verpoorte and K.R. Libbenga. Uptake and accumulation of ajmalicine

- into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and its conversion into serpentine. *Planta* **183**: 170-177 (1991).
- Boyssou H., A. Parailleux and G. Marigo.** The role of pH gradients across the plasmalemma of *Catharanthus roseus* and its involvement in the release of alkaloids. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **10**: 91-99 (1987).
- Burnett R.J., I.E. Maldonado-Mendoza, T.D. McNight and C.L. Nessler.** Expression of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Campotheca acuminata* is differentially regulated by wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* **103**: 41-48 (1993).
- Caelles C., A. Ferrer, L. Balcells, F. G. Hegardt and A. Boronat.** Isolation and structural characterization of cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Mol. Biol.* **13**: 627-638 (1989).
- Canel C., M. I. Lopes-Cardoso, S. Whitmer, L. Van der Fits, G. Pasqualli, R. Van der Heijden, J.H. Hoge and R. Verpoorte.** Effect of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta* **205**: 414-419 (1998).
- Ciau-Uitz R., M.L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, B. Chi, L.M. Pacheco and V.M. Loyola-Vargas.** Indole alkaloid production by transformed and non transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In vitro Cell Dev. Biol.* **30P**: 84-88 (1994).
- Collinge M.A. and M.M. Yeoman.** The relationship between tropane alkaloid production and structural differentiation in plant cell cultures of *Atropa belladonna* and *Hyoscyamus muticus*. In: Secondary metabolism in plant cell culture. Morris P., H. Scragg, A. Stafford and M.W. Fowler (eds). Cambridge University Press, London. pp. 82-88 (1986).
- Constabel F., P. Gaudet La Prairie, W.G.W Kurz and J.P. Kutney.** Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures XII. Biosynthetic capacity of callus from original explants and regenerated shoots. *Plant Cell Rep.* **1**: 139-142 (1982).
- Contin A., R. Van der Heijden, A.W.M. Lefeber and R. Verpoorte.** The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/piruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett.* **434**: 413-416 (1998).
- Cordell G.A.** The biosynthesis of indole alkaloids. *Lloydia* **37**: 219-298 (1974).
- Correll C.C. and P.A. Edwards.** Mevalonic acid-dependent degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**: 633-638 (1994).
- Cosío E.G., T. Frey, R. Verduyn, J. Van Boom and J. Ebel.** High-affinity binding of a synthetic heptagluco-side and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Lett.* **271**: 223-226 (1990).
- Crute I. R. and D. A. C. Pink.** Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *Plant Cell* **8**: 1747-1755 (1996).
- Chappell J.** Biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Annu. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 521-547 (1995).
- Chappell J.** The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* **107**: 1-6 (1995a).

- Chappell J. and R. Nable.** Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol.* **85**: 469-473 (1987).
- Chappell J., C. VonLanken and U. Vogelí.** Elicitor-inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity is required for sesquiterpene accumulation in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol.* **97**: 693-698 (1991).
- Choi D., R.M. Bostock, S. Audiushko and D.F. Hildebrand.** Lipid derived signals that discriminate wound and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes and the antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2329-2333 (1994).
- Choi D., B.L. Ward and R.M. Bostock.** Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* **4**: 1333-1344 (1992).
- Chye M.L., C.T. Tan and N.H. Chua.** Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1*, and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol. Biol.* **19**: 473-484 (1992).
- Crute I. R. and D. A. C. Pink.** Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *Plant Cell* **8**: 1747-1755 (1996).
- Dale S., M. Arró, B. Becerra, N.G. Morrice, A. Boronaf, D.H. Hardie and A. Ferrer.** Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur. J. Biochem.* **233**: 506-513 (1995).
- Dangl J. L., R. A. Dietrich and M. H. Richberg.** Death don't have no mercy: cell death in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807 (1996).
- Darvill A.G. and P. Albersheim.** Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 243-275 (1984).
- Datta A. and P.S. Srivastava.** Variation in vinblastine production by *Catharanthus roseus* during *in vivo* and *in vitro* differentiation. *Phytochemistry* **46**: 135-137 (1997).
- De Carolis E., F. Chan, J. Balsevich and V. De Luca.** Isolation and characterization of a 2-oxoglutarate dependent dioxygenase involved in the second-to-last step in vindoline biosynthesis. *Plant Physiol.* **94**: 1323-1329 (1990).
- De Luca V.** Enzymology of indole alkaloid biosynthesis. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Lea P.J. (ed.) Academic Press Limited, San Diego, Vol **9**: 345-368 (1993).
- De Luca V., J.A. Alvarez-Fernández, D. Campbell and W.G.W. Kurz.** Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **86**: 447-450 (1988).
- De Luca V., J. Balsevich, R.T. Tyler, U. Eilert, B.D. Panchuk and W.G.W. Kurz.** Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic

- pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* **125**: 147-156 (1986).
- De Luca V., J. Balsevich, R.T. Tyler and W.G.W. Kurz. Characterization of a novel N-methyltransferase (NMT) from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **6**: 458-461 (1987).
- De Luca V., C. Marineau and N. Brisson. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2582-2586 (1989).
- De Los Santos-Briones C., J.A. Muñoz-Sánchez, J. Chin-Vera, V.M. Loyola-Vargas and S.M.T. Hernández-Sotomayor. Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate phospholipase C activity during the growing phase of *Catharanthus roseus* transformed roots. *J. Plant Physiol.* **150**: 707-713 (1997).
- Denbow C.J., S. Lang and C.L. Cramer. The N terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. Sequence microsomal targeting, and glycosylation. *J. Biol. Chem.* **271**: 9710-9715 (1996).
- Deus-Neumann B. and M.H. Zenk. Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 1965-1974 (1982).
- Deus-Neumann B. and M.H. Zenk. Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Med.* **50**: 427-431 (1984).
- Deus-Neumann B. and M.H. Zenk. Accumulation of alkaloids in plant vacuole does not involve an ion-trap mechanism. *Planta*: **167**: 44-53 (1986).
- De Waal A., A.H. Meijer and R. Verpoorte. Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: Purification and characterization of multiple forms. *Biochem. J.* **306**: 571-580 (1995).
- DiCosmo F., A. Quesnel, M. Misawa and S.G. Tallevi. Increased synthesis of ajmalicine and catharanthine by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* in response to fungal culture-filtrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **14**: 101-106 (1987).
- DiCosmo F. and M. Misawa. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends Biotechnol.* **3**: 318-322 (1985).
- Disch A., A. Hemmerlin, T.J. Bach and M. Rohmer. Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem. J.* **331**: 615-621 (1998).
- Doireau P., J.M. Mérillon A. Guillot, M. Rideau, J.C. Chenieux and M. Brillard. Time-course studies on indole alkaloid accumulation and changes in tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities: a comparison in three strains of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.* **53**: 364-367 (1987).
- Dörnenburg H. and D. Knorr. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell culture. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 674-684 (1995).
- Dougall D.K. Chemicals from plant cell cultures: Yields and variations. In: *Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties*. Zaitlin M., P. Day and A. Hollaender (eds). Academic Press, New York. pp. 627-642 (1987).
- Eilert U. Elicitation: methodology and aspects of applications. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol.4. Cell Culture in Phytochemistry.

- Constabel F. and I.K. Vasil (eds.). Academic Press, Co., San Diego, Cal. U.S.A., pp. 153-196 (1986).
- Eilert U., V. De Luca, F. Constabel and W.G.W. Kurz. Elicitor-mediated induction of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **254**: 491-497 (1987).
- Einsenreich W., B. Menhard, P.J. Hylands, H.M. Zenk and A. Bacher. Studies on the biosynthesis of taxol: the texane carbon skeleton is not of mevalonate origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6431-6436 (1996).
- Endo T., A.E. Goodbody and M. Misawa. Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.* **53**: 479-482 (1987).
- Endo T., A.E. Goodbody, J. Vukovic and M. Misawa. Enzymes from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures that couple vindoline and catharanthine to form 3', 4'-anhydrovinblastine. *Phytochemistry* **27**: 2147-2149 (1988).
- Enjuto M., L. Balcells, N. Campos, C. Caelles, M. Arró and A. Boronat. *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 927-931 (1994).
- Enjuto M., V. Lumbreras, C. Marin and A. Boronat. Expression of the *Arabidopsis HMG2* gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell* **7**: 517-527 (1995).
- Érsek T. and Z. Király. Phytoalexins: warding-off compounds in plants? *Physiol. Plant.* **86**: 343-346 (1986).
- Essen L.O., O. Perisic, R. Cheung, M. Katan and R.L. Williams. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C d. *Nature* **380**: 395-602 (1996).
- Farmer E.E., T.D. Moloshok, M.J. Saxton and C.A. Ryan. Oligosaccharine signaling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**: 3140-3145 (1991).
- Flores H.E. and P. Filner. Hairy roots of Solanaceae as a source of alkaloids. *Plant Physiol.* **77**: 12s (1985).
- Galewsky S. and C.L. Nessler. Synthesis of morphinane alkaloids during opium poppy somatic embryogenesis. *Plant Sci.* **45**: 215-222 (1986).
- Garnier F., C. Depierreux, G. Petit-Paly, S. Hamdi, J.-C. Chénieux and M. Rideau. Induction of the accumulation of tryptamine and phenols by endogenous elicitors in cell suspension cultures of periwinkle. *J. Plant Physiol.* **148**: 701-706 (1996).
- Gershenzon J. and R. Croteau. Regulation of monoterpene biosynthesis in higher plants. In: Biochemistry of the mevalonic pathway of terpenoids. Towers G.N.H. and H.A. Stafford (eds). Plenum Press. New York. pp. 99-160 (1989).
- Goddijn O.J.M., R.J. De Kam, A. Zanetti, R.A. Schilperoort and J.H.C. Hoge. Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol. Biol.* **18**: 1113-1120 (1992)
- Godoy-Hernández G. and V.M. Loyola-Vargas. Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **10**: 537-540 (1991).

- Goldstein J.L. and M.S. Brown. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425-430 (1990).
- Goldschmidt-Clermont P.J., J.W. Kim, L.M. Machesky, S.G. Rhee and T.D. Pollard. Regulation of phospholipase C- γ -1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* **251**: 1231-1233, (1991).
- Gredziak N., B. Diettrich, and M. Luckner. Batch cultures of somatic embryos of *Digitalis lanata* in gaslift fermenters. Development and cardenolide accumulation. *Planta Med.* **56**: 175-178 (1990).
- Hamill J.D., R.J. Robins and M.J.C. Rhodes. Alkaloid production by transformed roots cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Planta Med.* **55**: 354-357 (1989).
- Hammond-Kosack K. E. and J. D. G. Jones. Resistance gene-dependent plant defense response. *Plant Cell* **8**: 1773-1791 (1996).
- Hampp N. and M.H. Zenk. Homogeneous strictosidine synthase from cell suspension cultures of *Rawolfia serpentina*. *Phytochemistry* **27**: 3811-3815 (1988).
- Hahn M.G., A.G. Darvill and P. Albersheim. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexins accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* **68**: 1161-1169 (1981).
- Hemscheidt T. and M.H. Zenk. Partial purification and characterization of a NADPH dependent tetrahydroalstonine synthase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **4**: 216-219 (1985).
- Hirayama T., C. Ohto, T. Mizoguchi and K. Shinozaki. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3903-3907 (1995).
- Hirayama T., N. Mitsukawau, D. Shibata and K. Shinozaki. *AtPLC2*, a gene encoding phosphoinositide-specific phospholipase C, is constitutively expressed in vegetative and floral tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **34**: 175-180 (1997).
- Hoffmann W., K.H. Kubeczka and F.C. Czygan. Ein Verbessertes Verfahren zur Isolierung und Quantitativen Bestimmung von Vincalcolublastin aus Intakten Pflanzen und Gewebekulturen von *Catharanthus roseus* G. Don. *Z. Naturforsch.* **38**: 201-206 (1982).
- Huang C.H., B.F. Tate, R.C. Crain and G.G. Coté. Multiple phosphoinositide-specific phospholipase C in oat roots: characterization and partial purification. *Plant J.* **8**: 257-267 (1995).
- Ishimaru K., H. Sudo, M. Satake, Y. Matsunaga, Y. Hasegawa, S. Takemoto and K. Shimomura. Amarogentin, amaroswerin and four xanthenes from hairy root cultures of *Swertia japonica*. *Phytochemistry* **29**: 1563-1565 (1990).
- Islas-Flores I.R. Obtención de anticuerpos policlonales contra la triptofano descarboxilasa (TDC, EC 4.1.1.20) de raíces transformadas de *Catharanthus roseus* cultivadas *in vitro*. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Mérida/CICY, Mérida, Yuc. Mex. (1994).
- Ji W., C.R. Benedict and M.A. Foster. Seasonal variations in rubber biosynthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and rubber transferase activities in *Parthenium argentatum* in the Chihuahuan desert. *Plant Physiol.* **103**: 535-542 (1993).

- Jin D.F. and C.A. West. Characteristics of galacturonic acid oligomers as a elicitors of casbene synthetase activity in castor bean seedling. *Plant Physiol.* **74**: 989-992 (1984).
- Jung K.H., S.S. Kwak, C.Y. Choi and J.R. Liu. An interchangeable system of hairy root and cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* for indole alkaloid production. *Plant Cell Rep.* **15**: 51-54 (1995).
- Kamada H. and S. Muto. Protein kinase inhibitors inhibit stimulation of inositol phospholipid turnover and induction of phenylalanine ammonia-lyase in fungal elicitor-treated tobacco suspension culture cells. *Plant Cell Physiol.* **35**: 405-409 (1994).
- Kamada H., H. Okamura, M. Satake, H. Harada and K. Shimomura. Alkaloid production by hairy roots culture of *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.* **5**: 239-242 (1986).
- Kato R., H. Kamada and M. Asashima. Effects of high and very low magnetic field on the growth of hairy roots of *Daucus carota* and *Atropa belladonna*. *Plant Cell Physiol.* **30**: 605-608 (1989).
- Kim S.W., K.H. Jung, S.S. Kwak and J.R. Liu. Relationship between cell morphology and indole alkaloid production in suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **14**: 23-26 (1994).
- Knobloch K.H., B. Hansen and J. Berlin. Medium induced formation of indole alkaloids and concomitant changes of interrelated enzyme activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Z. Naturforsch.* **36c**: 40-43 (1981).
- Kondo K. and K. Oba. Purification and characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase from potato tubers. *J. Biochem.* **100**: 967-974 (1986).
- Kopka J., C. Pical, J.E. Gray and B.M. Rober. Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol.* **116**: 239-250 (1998).
- Kuang Y., Y. Wu, A. Smarcka H. Jiang and W. Dianqing. Identification of a phospholipase C $\beta 2$ region that interacts with G $\beta\gamma$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2964-2968 (1996).
- Kurosaki F., Y. Tsurusawa and A. Nishi. Breakdown of phosphatidylinositol during the elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Plant Physiol.* **85**: 601-604 (1987).
- Kurz W.G.W., K.B. Chatson and F. Constabel. Biosynthesis and accumulation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* cultivars. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Neumann K.H.A., W. Barz and E. Reinhard (eds.) Springer-Verlag, Heilderberg, Berlin. pp. 143-153 (1985).
- Kutchan T.M. Strictosidine: From alkaloid to enzyme to gene. *Phytochemistry* **32**: 493-506 (1993).
- Kutney J.P. Studies in plant tissue culture. The synthesis and biosynthesis of indole alkaloids. *Heterocycles* **25**: 617-640 (1987).
- Kutney J.P., C.A. Boulet and L.S.L. Choi. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell culture. XV. Synthesis of bisindole alkaloids by use of immobilized enzyme systems. *Heterocycles* **27**: 621-628 (1988).

- Lange B.M., M.R. Wildung, D. McCaskill and R. Croteau.** A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**: 2100-2104 (1998).
- Lee S.B. and S.G. Rhee.** Significance of PIP₂ hydrolysis of phospholipase C isoenzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 183-189 (1995).
- Legendre L., P.F. Heinstejn and P. Low.** Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 20140-20147 (1992).
- Leigh R.A.** Methods, progress and potential for the use of isolated vacuoles in studies of solute transport in higher plant cells. *Physiol. Plant.* **57**: 390-396 (1983).
- Lichtenhaler H.L., J. Schwender, A. Disch and M. Rohmer.** Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplast proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**: 271-274 (1997).
- Lindsey K. and M.M. Yeoman.** The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.* **34**: 1055-1065 (1983).
- Liscum L., R.D. Cummings, R.G.W. Anderson, G.N. Martino, J.L. Goldstein and M.S. Brown.** 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase: a transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked high mannose oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 7165-7169 (1983).
- Madyastha K.M. and C.J. Coscia.** Detergent-solubilized NADPH-cytochrome C (P-450) reductase from the higher plant, *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.* **254**: 2419-2427 (1979).
- Madyastha K.M., R. Guarnaccia, C. Baxter and C.J. Coscia.** S-adenosyl-L-methionine: loganic acid methyltransferase. A carboxyl-alkylating enzyme from *Vinca rosea*. *J. Biol. Chem.* **248**: 2497-2501 (1973).
- Madyastha K.M., T.D. Meehan and C.J. Coscia.** Characterization of cytochrome P-450 dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant *Vinca rosea*. *Biochem.* **15**: 1097-1102 (1976).
- Maldonado-Mendoza I.E., R.J. Burnett and C. Nessler.** Nucleotide sequence of cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **100**: 1613-1614 (1992).
- McCaskill D.G., D.L. Martin and I. Scott.** Characterization of alkaloid uptake by *Catharanthus roseus* (L.) G. Don protoplasts. *Plant Physiol.* **87**: 402-408 (1988).
- Medina-Bolivar F. and H. E. Flores.** Selection for hyoscyamine and cynamoyl putrescine overproduction in cell and root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Physiol.* **108**: 1553-1560 (1995).
- Meijer A.M., R. Verpoorte and J.H.C. Hoge.** Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Res., Special Issue.* **3**: 145-164 (1993).
- Melin P.M., M. Sommarin, A.S. Sandelius and B. Jergi.** Identification of Ca²⁺-stimulated polyphosphoinositide phospholipase C in isolated plant plasma membranes. *FEBS Lett.* **223**: 87-90 (1987).

- Melin P.M., C. Pical, B. Jergi and M. Sommarin.** Polyphosphoinositide phospholipase C in wheat root plasma membrane. Partial purification and characterization. *Biochem. Biophys. Acta* **1123**: 163-169 (1992).
- Mérillon M., P. Doireau, A. Guillot, J.C. Chénieux and M. Rideau.** Indole alkaloid accumulation and tryptophan decarboxylase activity in *Catharanthus roseus* cells cultured in three different media. *Plant Cell Rep.* **5**: 23-26 (1986).
- Moreno P.R.H., J.E. Schlatmann, R. Van der Heijden, W.M. Van Gulik, H-J-G. ten Hoopen, R. Verpoorte and J.J. Heijden.** Induction of ajmalicine formation and related enzyme activities in *Catharanthus roseus* cells: Effect of inoculum density. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 42-47 (1993).
- Nakanishi M., J.L. Goldstein and M.S. Brown.** Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: mevalonate-derived products inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. *J. Biol. Chem.* **263**: 8929-8937 (1988).
- Narita J.O. and W. Gruissem.** Tomato hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* **1**: 181-190 (1989).
- Navarrete-Loeza M.** Diseño de estrategias para la selección de variantes de interés a partir de una línea de raíces transformadas de *Catharanthus roseus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yuc. Mex. (1995).
- Nef C., B. Rio and H. Chrestin.** Induction of catharanthine synthesis and stimulation of major indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant Cell Rep.* **10**: 26-29 (1991).
- Nelson A.J., P.W. Doerner, Q. Zhu and C.J. Lamb.** Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene that is elicitor-inducible. *Plant Mol. Biol.* **25**: 401-412 (1994).
- Neumann D., G. Krauss, M. Heike and D. Groger.** Indole alkaloid formation and storage in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.* **48**: 20-23 (1983).
- Nishibe S., M.I. Wahl, S.M.T. Hernández-Sotomayor, N.K. Tonks, S.G. Rhee and G. Carpenter.** Increase of the catalytic activity of phospholipase C- γ 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* **250**: 1253-1256 (1990).
- Noé W., C. Mollenschott and J. Berlin.** Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogeneous protein. *Plant Mol. Biol.* **3**: 281-288 (1984).
- Nürnberg T., Nennstiel D., T. Jabs, W.R. Sacks, K. Hahlbrock and D. Scheel.** High affinity binding of fungal oligopeptide to parsley plasma membranes triggers multiple defense response. *Cell* **78**: 449-460 (1994).
- Oba K. K. Kondo, N. Doke and I. Uritani.** Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in potato tubers after slicing, fungal infection or chemical treatment, and some properties of the enzyme. *Plant Cell Physiol.* **26**: 873-880 (1985).
- Omkumar R.V., B.G. Darnay and V.W. Rodwell.** Modulation of Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity by phosphorylation. Role of serine 871. *J. Biol. Chem.* **269**: 6810-6814 (1994).

- Osborne T. F., J.L. Goldstein and M.S. Brown. 5' end of HMG CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. *Cell* **42**: 203-212 (1985).
- Ozeki Y., K. Matsui, M. Sakuta, M. Matsuoka, Y. Ohashi, Y. Kano-Murakami, N. Yamamoto and Y. Tanaka. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during anthocyanin synthesis and by transfer effect in carrot cell suspension cultures. *Physiol. Plant.* **80**: 379-387 (1990).
- Parr A.J. and J.D. Hamill. Relationship between *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots and intact, uninfected *Nicotiana* plants. *Phytochemistry* **26**: 3241-3245 (1987).
- Parr A.J., A.C.J. Peerless, J.D. Hamill, N.J. Walton, R.J. Robins and M.J.C. Rhodes. Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **7**: 309-312 (1988).
- Pasquali G., O.J.M. Goddijn, A. De Waal, R. Verpoorte, R.A. Schilperoort, J.H.C. Hoge and J. Memelink. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol. Biol.* **18**: 1121-1131 (1992).
- Peffley D.M. and A.K. Gayen. Inhibition of squalene synthase but not squalene cyclase prevents mevalonate-mediated suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase synthesis at a posttranscriptional level. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**: 251-260 (1997).
- Pennings E.J.M., B.W. Groen, J.A. Duine and R. Verpoorte. Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* is a pyridoxo-quinoprotein. *FEBS Lett.* **255**: 97-100 (1989).
- Peraza-Sánchez S., M.M. Gamboa-Angulo, C. Erosa-López, I. Ramírez-Erosa, F. Escalante-Erosa, L.M. Peña-Rodríguez and V.M. Loyola-Vargas. Production of 19(S)-epimisine by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Nat. Prod. Lett.* **11**: 217-224 (1998).
- Pfützner U. and M.H. Zenk. Homogeneous strictosidine synthase isoenzymes from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.* **55**: 525-530 (1989).
- Phillips G.C. and G.B. Collins. *In vitro* tissue culture of select legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci.* **19**: 59-64 (1979).
- Pical CH., A.S. Sandelius, P.M. Melin and M. Somarin. Polyphosphoinositide phospholipase C in plasma membrane of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* **100**: 1296-1303 (1992).
- Plaxton W.C. Metabolic regulation. In: Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Dennis D.T. and D.H. Turpin (eds). Longman Scientific & Technical, London. pp. 28-34 (1993).
- Re E.B., D. Jones and R.M. Learned. Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* **7**: 771-784 (1995).
- Renaudin J.P. Uptake and accumulation of an indole alkaloid ¹⁴C-tabernanthine, by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and *Acer pseudoplatanus* L. *Plant Sci. Lett.* **22**: 56-69 (1981).

- Renaudin J.P., S.C. Brown and J. Guern.** Compartmentation of alkaloids in a cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*: a reappraisal of the role of pH gradients. In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. K. H. Neumann, W. Barz and E. Reinhard (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp 124-131 (1985).
- Renaudin J.P. and J. Guern.** Compartmentation mechanisms of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Veg.* **20**: 533-547 (1982).
- Repunte V.P., M. Kino-Oka, M. Taya and S. Tone.** Reversible morphology change of horseradish hairy roots cultivated in phytohormone-containing media. *J. Ferment Bioeng.* **75**:271-275, (1993).
- Rhee S.G. and K.D. Choi.** Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **267**: 12393-12396 (1992).
- Rincón M. and W.F. Boss.** Second-messenger role of phosphoinositides. In: Inositol metabolism in plants. Morrè D.J., W.F. Boss and F.A. Loewus (eds.). Wiley-Liss, New York pp. 173-200 (1990).
- Rodríguez-Concepción M. and W. Grisse.** Arachidonic acid alters tomato HMG expression and fruit growth and induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase-independent lycopene accumulation. *Plant Physiol.* **119**: 41-48 (1999).
- Rodríguez-Zapata L.C. and S.M.T. Hernández-Sotomayor.** Evidence of protein-tyrosine kinase activity in *Catharanthus roseus* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Planta* **204**: 70-77 (1998).
- Rohmer M., M. Knani, P. Simonin, B. Sutter and H Salm.** Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**: 517-524 (1993).
- Roitelman J. and I. Shechter.** Regulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* **259**: 870-877 (1984).
- Roewer I., C. Nessler and V. De Luca.** Transient induction of tryptophan decarboxylase (TDC) and strictosidine synthase (SSS) genes in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **11**: 86-89 (1992).
- Ryals J. A., H. U. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H. Y. Steiner and M. D. Hunt.** Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819 (1996).
- Sakuta M. and A. Komamine.** Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Constabel F. and I.K. Vasil (eds.). San Diego Academic Press Co., San Diego. [pp. 97-114 (1987).
- Sandelius A.S. and M. Somarin.** Membrane-localized reactions involved in phosphoinositide turnover in plants. In: Inositol metabolism in plants. Morrè D.J., W.F. Boss and F.A. Loewus (eds.) Wiley-Liss Inc., New York, pp. 139-161 (1990).
- Sauerwein M., T. Yamasaki and K. Shimomura.** Hernandulcin in hairy root cultures of *Lippia dulcis*. *Plant Cell Rep.* **9**: 579-581 (1991).
- Schmidt W.E. and J. Ebel.** Specific binding of a fungal phytoalexin elicitor to membranes from soybean *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4117-4121 (1987).
- Schwender J., M. Seemann, H.K. Lichtenhaler and M. Rohmer.** Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side chain of chlorophylls and

- plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* **316**: 73-80 (1996).
- Shi J., R. González and M.K. Bhattacharyya.** Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant J.* **8**: 381-390 (1995).
- Seitz H.U., V. De Luca and W.G.W. Kurz.** Elicitor-mediated induction of phenylalanine ammonia-lyase and tryptophan decarboxylase: Accumulation of phenols and indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **18**: 71-78 (1989).
- St.-Pierre B. and V. De Luca.** A cytochrome P-450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **109**: 131-139 (1995).
- Strasser H., C. Hoffmann, H. Grisebach and U. Matern.** Are polyphosphoinositides involved in signal transduction of elicitor-induced phytoalexin synthesis in cultured plant cells? *Z. Naturforsch.* **41c**: 7171-724 (1986).
- Stermer B.A. and R.M. Bostock.** Involvement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. *Plant Physiol.* **84**: 404-408 (1987).
- Stevens L.H., C. Giroud, E. Pennings and R. Verpoorte.** Purification and characterization of strictosidine synthase from a cell suspension culture of *Cinchona robusta*. *Phytochemistry* **33**: 99-106 (1993).
- Stöckigt J. and M.H. Zenk.** Isovincoside (strictosidine), the key intermediate in the enzymatic formation of indole alkaloids. *FEBS Lett.* **79**: 233-237 (1977).
- Taylor S.J., H.Z. Chae; S.J. Rhee and J.H. Exton.** Activation of the β 1 isozyme of phospholipase C by α subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* **350**: 516-518 (1991).
- Toivonen L., J. Balsevich and W.G.W. Kurz.** Indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **18**: 79-93 (1989).
- Toyoda K., T. Shiraishi, H. Yoshloka, T. Yamada, Y. Ichinose and H. Oku.** Regulation of polyphosphoinositides metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* **33**: 445-452 (1992).
- Toyoda K., T. Shiraishi, T. Yamada, Y. Ichinose and H. Oku.** Rapid changes in polyphosphoinositides metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol.* **34**: 729-735 (1993).
- Treimer J.F. and M.H. Zenk.** Purification and properties of strictosidine synthase, a key enzyme in indole alkaloid formation. *Eur. J. Biochem.* **101**: 225-233 (1979).
- Van der Heijden R., R. Verpoorte and H.J.G. ten Hoopen.** Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* **18**: 231-280 (1989).
- Vázquez-Flota F., E. De Carolis, A-M. Alarco and V. De Luca.** Molecular cloning and characterization of desacetoxylvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Mol. Biol.* **34**: 935-948 (1997).

- Vázquez-Flota F. and V. De Luca. Developmental and light regulation of desacetoxycarotenoid 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Evidence of a multilevel regulatory mechanism. *Plant Physiol.* **117**: 1351-1361 (1998).
- Vázquez-Flota F., O.A. Moreno-Valenzuela, M.L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello and V.M. Loyola-Vargas. Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy roots cultures. Medium optimization and elicitation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **38**: 273-279 (1994).
- Veltkamp E., H. Breteler, H. Huizing and M.A. Bertola. Plant biotechnology in the Netherlands-Industrial use of plant cells: requirements and possibilities (studierapport 14g). Het Belang van Industriële Plantabiotechnologie, The Hague, pp. 9-29 (1985).
- Vogeli U. and J. Chappell. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitors. *Plant Physiol.* **88**: 1291-1296 (1988).
- Völlack K.U., B. Dittrich, A. Ferrer, A. Boronat and T.J. Bach. Two radish genes for 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase isozymes complement mevalonate auxotrophy in a yeast mutant and yield membrane-bound active enzyme. *J. Plant Physiol.* **143**: 479-487 (1994).
- Wareing P.F. and I.D.J. Phillips. Growth & Differentiation in Plants. 3rd edition. Pergamon Press, Oxford. pp. 1-20 (1981).
- Weissenborg D.L., C.J. Denbow, M. Laine, S.S. Lang, Z. Yang, X. Yu and C.L. Cramer. HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: molecular specialization within a complex pathway. *Physiol. Plant.* **93**: 393-400 (1995).
- Wuititsuwannakul R., D. Wuititsuwannakul and P. Suwanmanee. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **29**: 1401-1403 (1990).
- Yamamoto H., M. Susuki, Y. Suga, H. Fukui and M. Tabata. Participation of an active system in berberine-secreting cultured cells of *Thalictrum minus*. *Plant Cell Rep.* **6**: 356-359 (1987).
- Yamamoto Y.T., M.A. Conkling, I.M. Sussex and V.F. Irish. An *Arabidopsis* cDNA related to animal phosphoinositide-specific phospholipase C genes. *Plant Physiol.* **107**: 1029-1039 (1995).
- Yoshikawa T. and T. Furuya. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **6**: 449-453 (1987).
- Yotsushima K., K. Nakamura, T. Mitsui and I. Igaue. Purification and characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in suspension-cultured cells of rice (*Oriza sativa* L.). *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1247-1251 (1992).
- Yotsushima K., T. Mitsui, T. Takaoka, T. Hayakawa and I. Igaue. Purification and characterization of membrane bound inositol phospholipid-specific phospholipase C from suspension-cultured rice (*Oriza sativa* L.) cells. *Plant Physiol.* **102**: 165-172 (1993).
- Zeidler J.G., K. Hartmut, H. Lichtenhaler, U. May and F.W. Lichtenhaler. Isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway? *Z. Naturforsch.* **C52**: 15-23 (1997).

Capítulo II

EFFECT OF DIFFERENTIATION ON THE REGULATION OF INDOLE ALKALOID PRODUCTION IN *Catharanthus roseus* HAIRY ROOTS

Moreno-Valenzuela O. A., R. M. Galaz-Avalos, Y. Minero-García and V. M. Loyola-Vargas

This chapter was published in *Plant Cell Report* (1998) 18 (1-2): 99-104.

ABSTRACT

In vitro cultures of hairy root derived from *Catharanthus roseus* accumulate higher levels of indole alkaloids as compared to cell suspension cultures. Hairy roots have been interconverted to undifferentiated cells by manipulating the culture medium. Using 5 times the concentration of micronutrients as for Phillips and Collins (1979) resulted in the formation of cell suspensions from the hairy roots. The alkaloid content was 5 times lower in the cell suspensions when compared to the control, but when roots were regenerated the alkaloid content regained the former level. Also the formation of cell suspensions from hairy roots was accompanied by a reduction of the tryptophan decarboxylase and the strictosidine synthase activity to less than 5% and 30% respectively. The 3-hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activity was the same in the cell suspension and in the regenerated line.

Key words: *Catharanthus roseus*, differentiation, hairy roots, tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase, 3-hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase.

Abbreviations: TDC: tryptophan decarboxylase; SS: strictosidine synthase; HMGR: 3-hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase; PC Phillips and Collins (1979) medium; PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride).

INTRODUCTION

During the last decade, the effect of cell organisation on the formation and accumulation of secondary metabolites in plant cell and tissue cultures has been well documented (Lindsey and Yeoman, 1983; Flores, 1987). In general, it has been recognised that a cell culture which does not accumulate secondary metabolites, will do so when induced to differentiate into tissue/organs. Some examples are the occurrence of tropane alkaloids in roots differentiated from callus of *Atropa belladonna* and *Hyoscyamus muticus* (Collinge and Yeoman, 1986), production of morphinane alkaloid during somatic embryogenesis of *Papaver somniferum* (Galewsky and Nessler, 1986), synthesis of indole alkaloids in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus* (Endo *et al.*, 1987), and accumulation of cardenolides during *Digitalis lanata* somatic embryogenesis (Greidziak *et al.*, 1990).

Hyoscyamine has been shown to only accumulate in organised systems, such as hairy roots, and is present only in trace amounts; it is completely absent in undifferentiated systems such as callus cultures (Flores, 1987). Transformed roots of *C. roseus* accumulate indole alkaloids by least one order of magnitude more than do suspension cultures (Ciau-Uitz *et al.*, 1994).

An excellent model to study the role of differentiation in the biosynthesis of secondary metabolites is the use of undifferentiated-redifferentiated hairy root cultures. Repunte *et al.*, (1993) reported that cell aggregates derived from hairy roots of horseradish were capable of regenerating hairy roots. Peroxidase activity in regenerated lines was comparable to those of the original hairy roots. Also, *Hyoscyamus muticus* hairy root cultures produced calli upon transfer to medium containing growth regulators. These unorganised calli produced only trace amounts of alkaloids, but upon return to hormone-free medium they recovered a stable hairy root phenotype with the full content of alkaloids (Flores, 1987). Likewise, in the presence of hormones, hairy root cultures of *C. roseus* have been found to form suspension cultures, which partially lose the ability to produce catharanthine. The ability to produce catharanthine is recovered upon transfer such cells to the initial medium and in step with the recovery of the hairy root phenotype (Jung *et al.*, 1995).

Here, experiments are focused on the activities of enzymes involved in the biosynthesis and accumulation of monoterpene indole alkaloids as regulated by the grade of differentiation in *C. roseus* hairy root cultures.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. Transformed roots were obtained through genetic transformation of seedling roots of *Catharanthus roseus* (L. G. Don) with *Agrobacterium rhizogenes* strain 1855, bearing plasmid pBI 121.1 (Ciau-Uitz *et al.*, 1994). Hairy roots were maintained through subculturing every 21 days using half-strength Gamborg's B₅ medium (B₅/2; Gamborg *et al.*, 1968), supplemented with 3% of sucrose. The root cultures were kept on orbital shakers at 100 rpm and 25°C in the dark (Ciau-Uitz *et al.*, 1994).

Root differentiation-dedifferentiation. Dedifferentiated cell suspension cultures were obtained from transformed roots when using Phillips and Collins (1979) liquid medium without phytohormones and with five times the concentration of micronutrients. 26 days of culture led to formation of a cell suspension. This cell suspension was subcultured in the same medium. To redifferentiate cells to roots, the cell suspension was transferred to solid B₅ medium at half the ionic strength. The new roots were isolated and subcultured under the same conditions as the original roots (control).

Alkaloid determination. Total alkaloids were extracted as described in Monforte-González *et al.*, (1992) and their total content was determined spectrophotometrically at 280 nm. Ajmalicine was identified by thin-layer chromatography in a solvent system of chloroform:acetone (8:2), and was scanned

afterwards in a Shimadzu scanner for their quantification (Monforte-González *et al.*, 1992).

HPLC alkaloid analysis. HPLC analyses were carried out at room temperature at a flow rate of 1.5 ml/min on a 4.6 mm (d) x 250 mm Ultrasphere ODS, 4 µm particle size column (Beckman). The mobile phase consisted of acetonitrile: 0.01M (NH₄)₂HPO₄ 0.01 M (43:57). The solution was filtered through a 22 µm nylon filter. and degassed under vacuum.

Enzyme activity assays. Tryptophan decarboxylase (TDC) assay was performed as described in Islas *et al.*, (1994). Strictosidine synthase (SS) activity assay activity was assayed as described in Pennings *et al.*, (1989).

3-Hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase (HMGR) activity was measured according to Chappell and Nable (1987) with the following modifications: the extract was prepared by homogenising transformed roots in 2 volumes of 100 mM K-phosphate buffer (pH 7.5), 250 mM sucrose, 50 mM KCl, 20 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoethanol, filtered through cheesecloth. The filtrate was centrifuged at 1,000 x g for 15 min; the supernatant was subsequently centrifuged for 45 min at 100,000 g. The pellet was resuspended in a buffer containing 100 mM phosphate, pH 7.5, 50 mM DTT, 5 mM EDTA, 20% glycerol, 1 mM PMSF and 7.5 µg/ml of leupeptine. The entire extraction was carried out at 4°C.

The HMGR activity assay measures the conversion of ¹⁴C-HMG-CoA to ¹⁴C-mevalonate (MVA). The assay, was performed in a final volume of 26 µl and was initiated with the addition of 0.66 nmol of ¹⁴C-HMG-CoA (0.33mol/ml; 59.9 mCi/ml) to the reaction mixture containing 5 - 50 µg protein, 5 mM DTT, 3 mM β-NADPH and 100 mM K-phosphate buffer, pH 7.5. After incubation at 30°C for 5 min, the reaction was terminated with 5 µl of 6N HCl and 100 mg/ml mevalonate lactone. The ¹⁴C-MVA was allowed to lactonize for 15 min at 18°C. 125 µl of K-phosphate buffer and 300 µl of ethyl acetate were added to lactonized ¹⁴C-MVA, the mixture vortexed for 3 min and centrifuged for 2 min in a microfuge at full velocity. An aliquot of 150 µl of the upper phase was taken and added to a scintillation vial containing 5 ml of scintillation liquid and the radioactivity was determined.

The protein content of the enzyme extract was determined as described by Peterson (1977), using albumin as a standard.

RESULTS AND DISCUSSION

The strategy used to dedifferentiate hairy roots of *C. roseus* was a modification of the micronutrients levels of the Phillips and Collins (1975) medium. 26 days after the transfer to PC medium, roots dedifferentiated to cells and formed a suspension culture. After five subcultures, the cells were filtered and transferred to solid B₅ medium and the suspension cells regenerated root tissue. A single root from a Petri dish was transferred to a flask and after several transfers, a new hairy root line was established. The redifferentiated (R2) line showed a growth similar to the original line with a doubling time of 1.84 days, as compared to the 1.74 days of the control and exhibited active growth with extensive lateral branching like the control. The Southern blot analysis showed that the R2 line is also transformed (data not shown).

Transformed roots of *C. roseus* line J1 cultured *in vitro* have a similar morphology to the roots of normal plants, both possess a terminal protective root cap composed of several layers of parenchymatous cells. The apical meristem of the root is adjacent to the root cap, and the junction between the cap region and the meristem are composed by cells in a "closed" structure (Fig. 1A). The root can be divide in three regions, the meristematic region, the differentiating region and the mature region (Fig. 1A). When the transformed roots were cultivated in the dedifferentiation medium for 24 days of culture, they lost their structure, the epidermis of the root and the meristematic region disappeared and at the same time, a meristematic zone appeared near to the central cylinder (Fig. 1B and 1C). This meristematic zone grew and formed a lateral root from which gave origin to dedifferentiated cells. Finally, all the root cells disgregated to conform a cell suspension culture. Regenerated roots have a similar morphology and structure to the original root, being the only difference that the regenerated line has only a few layers of cells in the root cap and this is not-well defined (Fig 1D).

Pasquali *et al.*, (1992) showed that the addition of auxins to the medium of *C. roseus* suspension cultures inhibit the transcription of TDC and SS genes. They proposed that auxins function as a switch for active cell division or secondary metabolite synthesis, two process that have repeatedly and quite consistently been report

Indole alkaloid accumulation. In *C. roseus* seedlings, the indole alkaloid biosynthesis is under developmental control (Balsevich *et al.*, 1986; De Luca *et al.*, 1986). When hairy roots were transferred to PC modified medium, the roots gradually lost their capability to synthesise alkaloids. The loss reached 50% (data not show) before the root cultures had developed into a single cell state. The cell suspension generated via dedifferentiation contained 5 times less alkaloids than the previous hairy root culture (Fig. 2A). After transfer of the cell suspension onto B₅ solid medium, roots were regenerated, and subsequently the alkaloid content almost returned to that of the control (Fig. 2A).

Ajmalicine was found to be one the major alkaloids in *C. roseus* hairy roots, line J1 (Ciau-Uitz *et al.*, 1994). However, the ajmalicine content in the cell suspension culture was only 7% when compared to the original root line. When roots had been regenerated, the ajmalicine content represented only 20% of the control (Fig. 2B).

Since alkaloid accumulation had been restored, the next question was if the qualitative pattern had been conserved. The individual alkaloid pattern changed dramatically during the dedifferentiation-differentiation process. In control hairy roots, ajmalicine and yohimbine were two of the major alkaloids; however, in the regenerated lines these two alkaloids had decreased considerably, and ajmalicine was present only in trace amounts. On the other hand, some unidentified alkaloids had increased in the regenerated line as well as ajmaline (Fig. 3).

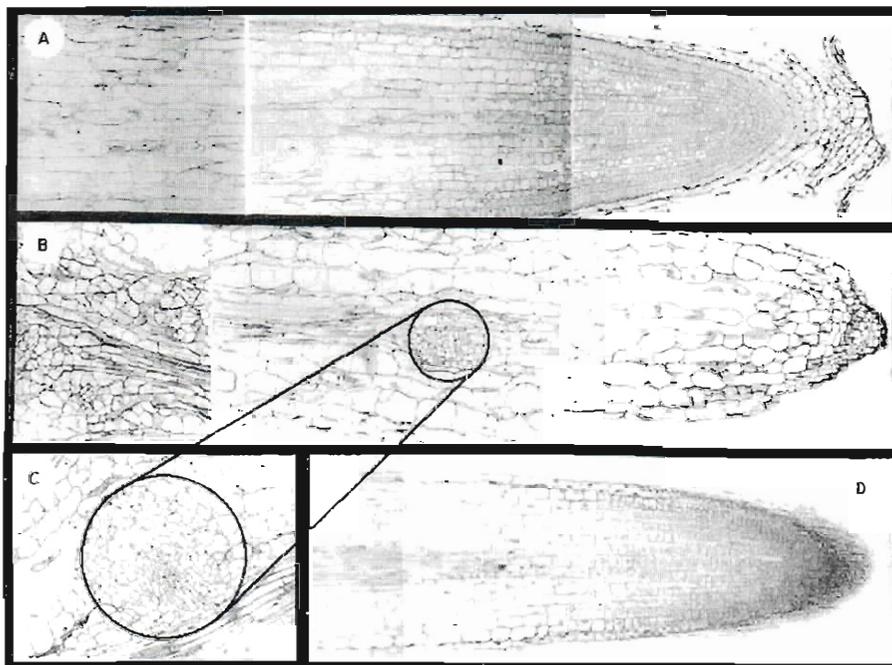


Fig. 1. Morphological changes present in the roots through the process of dedifferentiation. (A) Control line J2. (B) Hairy roots after 24 days in the dedifferentiation medium. (C) Close-up of the meristematic zone, where a lateral root is being formed, which originated all dedifferentiated cells. (D) Regenerated line R2.

TDC activity. Alkaloids are affected both quantitatively and qualitatively, during differentiation-dedifferentiation, and possibly as a result of the change of some key enzymes. The activity of TDC, the enzyme that converts tryptophan into tryptamine, is highly regulated by the development of *C. roseus* seedlings (De Luca *et al.*, 1988). Here TDC activity decreased, at least one order of magnitude, when the hairy roots dedifferentiated into suspension cells (Fig. 4). However, while the alkaloids level was recovering, when on B_5 medium the roots regenerated from cells, the TDC activity remained low and reached only 5% of the control (Fig. 4).

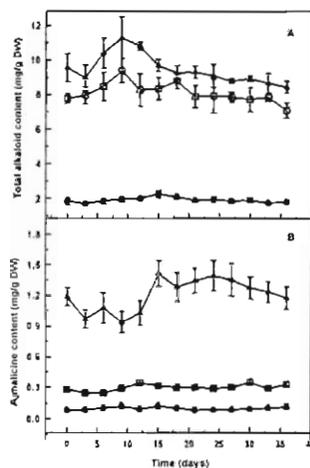


Fig. 2. Effect of level of differentiation on total indole alkaloid and ajmalicine accumulation. Three flasks were harvested every three days along a culture period of 36 days and the alkaloids were extracted and quantified as described in Materials and Methods. Data presented are the result of two independent experiments. (A) Total alkaloids. (B) Ajmalicine. (▲) control hairy roots; (●) cell suspension; (□) regenerated roots (R2).

SS activity. Strictosidine synthase activity decreased when the roots dedifferentiated to cells (Fig. 5) and only recovered to 30% of the initial activity when the cells were regenerated into roots (Fig. 5).

HMGR activity. Evidence suggest that HMGR is one of the key regulatory mechanisms that control carbon flow in indole alkaloid biosynthesis (Stermer and Bostock, 1987; Chappell and Nable, 1987). Here, HMGR activity was low in the cell suspension stage, however unlike TDC and SS enzyme activities, the HMGR enzyme activity completely recovered to control levels when the roots were regenerated (Fig. 6).

The regulation of some enzyme activities in the indole alkaloid pathway depends on the degree of development of the plants. In *C. roseus* and *Cinchona ledgeriana* enzyme activity of the TDC and the SS are under strict developmental control (Balsevich *et al.*, 1986; De Luca *et al.*, 1988; Aerts *et al.*, 1990; Aerts *et al.*, 1991). Here, indole alkaloid accumulation and TDC and SS activities were strongly related to the degree of differentiation. Remarkably the results of Figs. 4 and 5 show that 5% of TDC activity was enough to produce a total indole alkaloid level of 8 - 9 mg/g DW. This result and the results obtained by Knobloch and Berlin (1983) suggest that TDC is not

the rate-limiting step in alkaloid biosynthesis and that the regulation may reside in the terpenic pathway

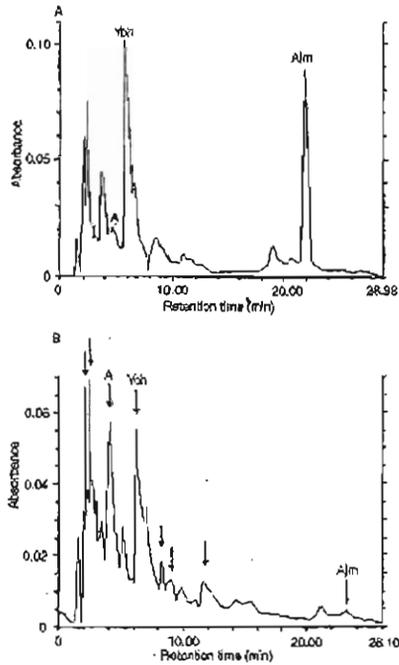


Fig. 3. Effect of differentiation on the alkaloid pattern. Roots were harvested on day 21 of culture and samples were analysed by HPLC. A. J1 line; (B) R2 line. Ajm.: ajmalicine; A.: ajmaline; Yoh.: yohimbine. The arrows show differences in the pattern of the individual alkaloids between the two lines.

The SS enzyme activity showed the same pattern as that of the TDC activity. Roewer *et al.*, (1992) demonstrated a transient and very similar induction pattern between TDC and SS transcripts in *C. roseus* cell culture, after elicitor treatment, and that this pathway is co-ordinately regulated.

Recently we found that the pattern of SS isoenzymes changes over the period of a hairy root culture (Galaz-Avalos and Loyola-Vargas, unpublished data). If 30% SS enzyme activity remaining in hairy roots regenerated from cell compared to initial hairy roots, reflects the activity of some isoenzymes rather than the total enzymes, such observation might point to specific individual metabolic channels. Furthermore, every such channel might lead to the formation of one specific alkaloid. Studies are underway to look into these possibilities.

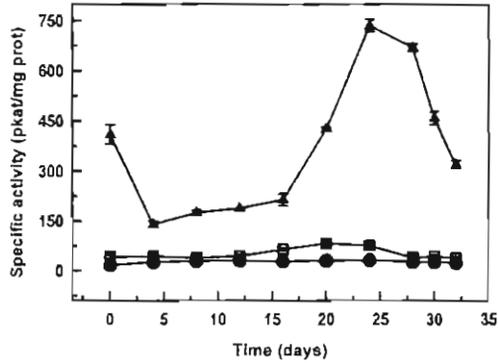


Fig. 4. Effect of differentiation on tryptophan decarboxylase activity. Three flasks were harvested every three days along a culture and the enzyme activity was quantified as described in Materials and Methods. Data presented are the results of two independent experiments. (▲) control hairy roots; (●) cell suspension; (□) regenerated roots, R2.

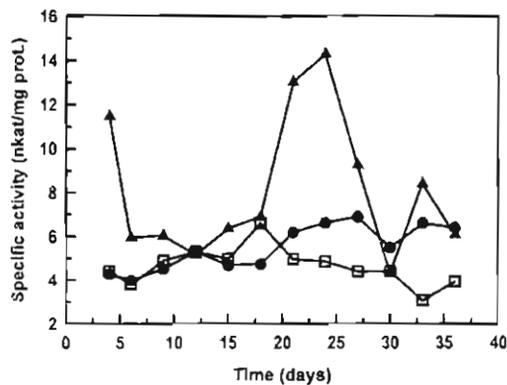


Fig. 5. Effect of differentiation on the strictosidine synthase activity. Three flasks were harvested every three days along a culture and the enzyme activity was quantified as described in Materials and Methods. Data presented are the results of two independent experiments. (▲) control hairy roots; (●) cell suspension cultures; (□) regenerated roots, R2.

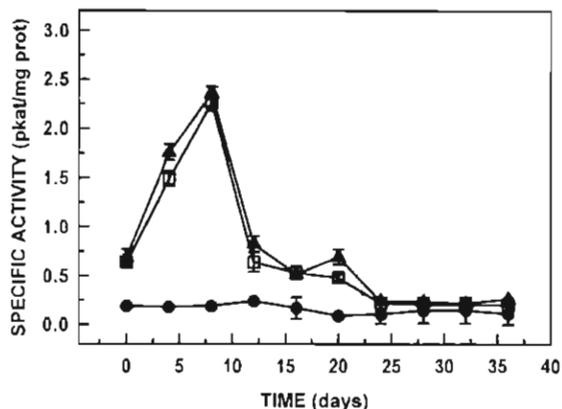


Fig. 6. Effect of differentiation on the 3-hydroxy-3-methyl glutaryl Coenzyme A reductase activity. Three flasks were harvested every three days along a culture and the enzyme activity was quantified as described in Materials and Methods. Data presented are the results of two independent experiments. (▲) control hairy roots; (●) cell suspension; (□) regenerated roots. R2.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Council for Science and Technology, (CONACYT), México, Grant No. 225135-5-4023N. O. M-V. was a recipient of CONACYT scholarship (88208).

REFERENCES

- Aerts R.J., T. Van der Leer, Van der Heijden R., R. Verpoorte. Developmental regulation of alkaloid production in *Cinchona* seedlings. *J. Plant Physiol.* **136**: 86-91 (1990).
- Aerts R.J., W. Snoeijer, O. Aerts-Teerlink, E. Van der Meijden, R. Verpoorte. Control and biological implications of alkaloid synthesis in *Cinchona* seedlings. *Phytochem.* **30**: 3571-3577 (1991).
- Balsevich J., V. De Luca, W.G.W. Kurz. Altered alkaloid pattern in dark grown seedlings of *Catharanthus roseus*. The isolation and characterization of

- 4-desacetoxyvindoline*: a novel indole alkaloid and proposed precursor of vindoline. *Heterocycles* **24**: 2415-2421 (1986).
- Chappell J., R. Nable.** Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol.* **85**: 469-473 (1987).
- Ciau-Uitz R., M.L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, B. Chí, L.M. Pacheco, V.M. Loyola-Vargas.** Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **30P**: 84-88 (1994)
- Collinge M.A., M.M. Yeoman.** The relationship between tropane alkaloid production and structural differentiation in plant cell cultures of *Atropa belladonna* and *Hyoscyamus muticus*. In: Morris P, Scragg AH, Stafford A, Fowler MW (eds.) Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge University Press, Cambridge, pp 82-88 (1986).
- De Luca V., J. Balsevich, R.T. Tyler, U. Eilert, B.D. Panchuk, W.G.W. Kurz.** Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* **125**: 147-156 (1986).
- De Luca V., A.J. Fernández, D. Campbell, W.G.W. Kurz.** Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **86**: 447-450 (1988).
- Endo T., A.E. Goodbody, M. Misawa.** Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.* **53**: 479-482 (1987).
- Flores H.E.** Use of plant cells and organ culture in the production of biological chemicals. In: LeBaron HM, Mumma RO, Honeycutt RC, Duesing JH, Phillips JF, Haas MJ (eds.) Biotechnology in Agricultural Chemistry. Symposium Series 334. American Chemical Society, Washington, D. C. pp 66-86 (1987).
- Galewsky S., C.L. Nessler.** Synthesis of morphinane alkaloids during opium poppy somatic embryogenesis. *Plant Sci.* **45**: 215-222 (1986).
- Gamborg O.L., R.A. Miller, K. Ojima.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151-158 (1968).
- Greidziak N., B. Dietrich, M. Luckner.** Batch cultures of somatic embryos of *Digitalis lanata* in gaslift fermenters. Development and cardenolide accumulation. *Planta Med.* **56**: 175-178 (1990).
- Islas-Flores I.R., V.M. Loyola-Vargas V.M., M.L. Miranda-Ham.** Tryptophan decarboxylase activity in transformed roots from *Catharanthus roseus* and its relationship to tryptamine, ajmalicine, and catharanthine accumulation during the culture cycle. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **30P**: 81-83 (1994).
- Jung K.H., S.S. Kwak, C.Y. Choi, J.R. Liu.** An interchangeable system of hairy root and cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* for indole alkaloid production. *Plant Cell Rep.* **15**: 51-54 (1995).

- Knobloch K.-H., J. Berlin.** Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. I. Comparison of enzyme activities and product accumulation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **2**: 333-340 (1983).
- Lindsey K., Yeoman M.M.** The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.* **34**: 1055-1065 (1983).
- Monforte-González M., T. Ayora-Talavera, I.E. Maldonado-Mendoza, V.M. Loyola-Vargas.** Quantitative analysis of serpentine and ajmalicine in plant tissues of *Catharanthus roseus* and hyoscyamine and scopolamine in root tissues of *Datura stramonium* by densitometry in thin layer chromatography. *Phytochem. Analysis* **3**: 117-121 (1992).
- Pasquali G., O.J.M. Goddijn, A. De Waal, R. Verpoorte, R.A. Schilperoort, J.H.C. Hoge, J. Memelink.** Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol. Biol.* **18**: 1121-1131 (1992).
- Pennings E.J.M., R.A. Van den Bosch, R. Van der Heijden, L.H. Stevens, J.A. Duine, R. Verpoorte.** Assay of strictosidine synthase from plant cell cultures by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **176**: 412-415 (1989).
- Peterson G.L.** A simplification of protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356 (1977).
- Phillips G.C., G.B. Collins.** *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop. Sci.* **19**: 59-64 (1979).
- Repunte V.P., M. Kino-Oka, M. Taya, S.Tone.** Reversible morphology change of horseradish hairy roots cultivated in phytohormone-containing media. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 271-275 (1993).
- Roewer I.A., N. Cloutier, C.L. Nessler, V. De Luca.** Transient induction of tryptophan decarboxylase (TDC) and strictosidine synthase (SS) genes in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **11**: 86-89 (1992).
- Scott A.I., S.-L. Lee.** Biosynthesis of the indole alkaloids. A cell-free system from *Catharanthus roseus*. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 6906-6908 (1975).
- Stermer B.A., R.M. Bostock.** Involvement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in the regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. *Plant Physiol.* **84**: 404-408 (1987).

Capítulo III

Role of Phospholipase C in the regulation of secondary metabolism in response to elicitors in *Catharanthus roseus* hairy roots

Oscar A. Moreno-Valenzuela, Miriam Monforte-González*, J. Armando Muñoz-Sánchez*, Marcela Méndez-Zeef, Victor M. Loyola-Vargas and S. M. Teresa Hernández-Sotomayor

This chapter was accepted for publication in Journal of Plant Physiology

SUMMARY

The effect of macerozyme on indole alkaloid, on coumarin accumulation and on the induction of tryptophan decarboxylase (TDC, E.C. 4.1.1.28) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL, E.C. 4.3.1.5) activities was investigated in relation with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phospholipase C (PLC, E.C. 3.1.4.3) activation on *Catharanthus roseus* hairy roots. Increasing concentrations of macerozyme induced an increase in indole alkaloid and in coumarin accumulation. There was a 10-fold increase in TDC and a 4-fold increase in PAL activities in hairy roots treated with 1 % macerozyme. The effect of macerozyme on PLC activity depended on the concentration used. In a dose-response experiment, PLC activity decreased 38 % when 0.5 % macerozyme was added, whereas it increased 40 % with 1 % of macerozyme when compared to control. This effect depended on the exposure time to macerozyme. After 30 min of treatment with 1% macerozyme, PLC activity increased up to two fold. The addition of neomycin, a PLC inhibitor, reduced markedly the increment in alkaloid production induced by macerozyme.

* M.M.-G. and J.A.M.-S. contributed equally to this work

Key words: *Catharanthus roseus*, macerozyme, phenyl alanine ammonia-lyase, phospholipase C, tryptophan decarboxylase.

Abbreviations: cAMP, cyclic adenosine monophosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLC, phospholipase C; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; TDC, tryptophane decarboxylase.

INTRODUCTION

Plant cells have a sensitive perception system as a result of a variety of external stress signals, such as UV-light, ethylene and endogenous or exogenous elicitors (Darvill and Albersheim, 1984). After recognition of the stimuli, a multitude of defense responses are initiated: ion fluxes across the plasma membrane, generation of highly reactive oxygen species (the oxidative burst), phosphorylation of specific proteins, activation of enzymes involved in cell wall reinforcement, transcriptional activation of numerous defence genes, induction of phytoalexins synthesis, localised cell death at the infection sites, and the induction of systemic acquired resistance in distal plant organs (Bent, 1996; Crute and Pink, 1996; Dangl *et al.*, 1996; Hammond-Kosack and

Jones, 1996; Ryals *et al.*, 1996). Among these are the molecules that stimulate a plant defence mechanism called elicitors. How elicitors are recognised by the plant, is one of the major questions in modern Plant Biology. It has been shown that elicitors bind to high affinity receptors which reside in the plasma membrane (Cosio *et al.*, 1996; Nürberger *et al.*, 1994; Schmidt and Ebel, 1987). If the elicitor binding to the receptor in the plasma membrane is essential to induce plant defense response, so it is the generation of a second messenger that transmits the signal from the plasma membrane receptor to the nucleus. It has been proposed that Ca^{2+} ions and cAMP play crucial roles for signal transduction in the elicitation response (Kurosaki *et al.*, 1987; Stab and Ebel, 1987). There is evidence suggesting that the products of the phosphoinositide metabolism may be involved as second messengers during elicitation of the defense response in cell suspension cultures of soybean and carrot (Kurosaki *et al.*, 1987; Stab and Ebel, 1987). However, contradictory results have been reported in cell suspension culture of parsley and soybean. In these systems, phosphoinositides metabolism was not involved in the defense response induced by elicitors (Strasser *et al.*, 1986). Toyoda *et al.*, (1992) demonstrated that the pathogenic fungus of pea, *Mycosphaerella pinodes*, secretes both, a polysaccharide elicitor and a glycopeptide suppressor, for the production of the phytoalexin pisatin. In this case the elicitor rapidly activated phosphatidylinositol and phosphatidylinositol-4-monophosphate kinases in plasma membrane, although the suppressor markedly inhibited these enzymes. These authors also showed that the *M. pinodes* elicitor induced a rapid and biphasic increase in levels of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) few minutes after of the treatment (Toyoda *et al.*, 1993), which was blocked simultaneously with pisatin increase in presence of neomycin, a phospholipase C inhibitor (Toyoda *et al.*, 1993). Kamada and Muto (1994) demonstrated that an elicitor prepared from the cell wall of the pathogenic fungus *Phytophthora nicotinae*, stimulated turnover of inositol phospholipid in tobacco suspension cells followed by the induction of phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity. These results suggest that a rapid changes in phosphoinositide metabolism is important in the signal transduction involved in plant defense response.

It has been shown that plant tissue cultures are able to accumulate secondary metabolites in response to elicitors (DiCosmo *et al.*, 1987; Godoy-Hernández and Loyola-Vargas, 1991; Vázquez-Flota *et al.*, 1994). The activity of some enzymes involved in secondary metabolism also were induced when cultures were elicited (Kombrick and Halhbrock, 1986; Chappell and Nable, 1987; Seitz *et al.*, 1989). In the past few years, the culture of transformed roots has emerged as an alternative to obtain different natural products (Signs and Flores, 1990). Hairy root cultures present several important characteristics such as fast growth, high degree of genetic and biochemical stability (Rhodes *et al.*, 1990), which can be used to study signal transduction and secondary metabolism pathways in plants. In our laboratory several pieces of these two topics have been extensively studied using *C. roseus* hairy roots as a model (Sáenz-Carbonell *et al.*, 1993; Ciau-Uitz *et al.*, 1994; Vázquez-Flota *et al.*, 1994; De Los Santos-Briones *et al.*, 1997). This fact prompted us to investigate the role of PLC in the regulation of secondary metabolism in response to macerozyme as an elicitor in transformed roots of *C. roseus*.

MATERIALS AND METHODS

Tissue culture. *C. roseus* hairy root line J1 was obtained by infection of roots with *Agrobacterium rhizogenes* strain 1855 pBI 121.1 (Ciau-Uitz *et al.*, 1994), and maintained in half strength B₅ medium supplemented with 3 % sucrose (Gamborg *et al.*, 1968) and subcultured in 250 ml Erlenmeyer flasks with 100 ml of media every 21 d. The initial inoculum was 0.5 g. Flasks were incubated in the dark on a rotary shaker at 100 rpm at 25 °C.

Alkaloid content. Total alkaloids were extracted as described (Monforte-González *et al.*, 1992) and their total content was determined spectrophotometrically at 280 nm. Ajmalicine was separated using thin layer chromatography (TLC) plates using chloroform:acetone (8:2) as solvent system and quantified in a Shimadzu densitometer (Monforte-González *et al.*, 1992).

Coumarin content. Total coumarins were extracted and quantified as described (Kombrick and Hahlbrock, 1986).

TDC assay. TDC activity was measured as described in Islas *et al.*, 1994. Frozen transformed roots (1 g) were ground in a cold mortar to fine powder and homogenised with 1.25 ml of 0.1 mol/l HEPES (pH 7.5), containing 3 mmol/l DTT, 5 mmol/l EDTA, 10.5 µmol/l leupeptine and 1 mmol/l PMSF. The brei was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged for 30 min at 18,000 g_n. The resulting supernatant was immediately used as a source of enzyme for the TDC activity assay. The assay mixture (total volume: 100 µL) contained enzyme extract (10-25 µg of protein), L-[¹⁴C methyle]-tryptophan (2.1 X 10⁻³ Mbq, 50 nmol), pyridoxal phosphate 41.4 µmol/l, and HEPES 5 µmol/l (pH 7.5) and was incubated at 30 °C. After 1 h the reaction was stopped by the addition of 100 µl of 1 M KOH. Tryptamine was extracted with 500 µl of ethyl acetate and an aliquot of 300 µl was added to a scintillation vial containing 5 ml of scintillation liquid Aquasol.

Protein quantification. Protein concentration in samples was measured according to Smith *et al.*, (1985) using the BCA protein assay reagent. Bovine serum albumin was used as a standard.

PLC assay. Hairy roots (1 g) were ground in a cold mortar to fine powder and homogenised with 2.5 ml of 50 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris-HCl pH 7.4, 250 mmol/l sucrose, 10 % glycerol, 1 mmol/l PMSF, 10 mmol/l sodium pyrophosphate and 0.2 mmol/l orthovanadate. The tissue debris was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged at 12,000 g_n for 30 min at 4 °C, the supernatant was further centrifuged at 100,000 g_n for 45 min. The supernatants (protein: 3.5-5 mg/ml) were recovered as soluble fraction. The pellet was resuspended in the extraction buffer (protein: 0.5-1.2 mg/ml), and used as the membrane fraction. The hydrolysis of [³H] PIP₂ was measured as described (Hernández-Sotomayor and Carpenter, 1993) in a reaction mixture (50µl) that contained 35 mmol/l NaH₂PO₄ (pH 6.8), 70 mmol/l KCl, 0.8 mmol/l CaCl₂ (final Ca²⁺ concentration 25 µmol/l), 200 µmol/l [³H]-PIP₂ (20,000 cpm), 0.08 % deoxycholate. The reaction mixture was stopped with 100 µl of 1 % (w/v) bovine serum albumin and 250 µL of 10 % (w/v) TCA. Precipitates were removed by centrifugation (13,000g_n for 10

min) and the supernatant collected for quantification of the release of [^3H] IP_3 in liquid scintillation counting Aquasol.

PAL assay. PAL activity was measured as described (Zimmerman and Halbrock, 1975) with slight modifications. Frozen transformed roots (1 g) were ground in a cold mortar to fine powder and homogenised with 2 ml of 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.8), containing 15 mmol/L β -mercaptoethanol, 1 mmol/L EDTA, 10.5 $\mu\text{mol/l}$ leupeptine and 1 mmol/l PMSF. The brei was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged for 15 min at 10,000 g_n . The resulting supernatant was immediately used as a source of enzyme for the PAL activity assay. The assay mixture (total volume: 2 ml), which contained enzyme extract (protein: 2-20 mg), 10 mmol/l phenylalanine, and Tris-HCl 50 mmol/l, pH 8.8, was incubated at 37 °C. After 1 h the reaction was stopped by the addition of 500 μl of 6 N HCl. The mixture was centrifuged at 10,000 g_n for 10 min and the supernatant was used for the reaction product in a spectrophotometer at 290 nm.

Materials. [^3H]PIP $_2$, [^{14}C -methyl]tryptophan, Aquasol scintillation cocktail were purchased from Dupont NEN Research. Unlabelled PIP $_2$ was purified from Folch extracts of brain lipids (Sigma) by a neomycin affinity column as previously described (Waldo *et al.*, 1994). BCA protein assay reagent was supplied by Pierce Chemical Company. B $_5$ medium, neomycin, leupeptine and PMSF were obtained from Sigma Chemical Company. Macerozyme was obtained from Yakult Honsha Company.

Data presentation. All experiments were done at least three times with three replicates each one and data were analysed with a t-student test. Results are the mean (\pm S.E.).

RESULTS

Induction of secondary metabolites accumulation by macerozyme addition.

It has been demonstrated that different hydrolytic enzymes induced an alkaloid production by hairy roots of *C. roseus* (Vázquez-Flota *et al.*, 1994). In this work, the effects of macerozyme (an enzyme that hydrolyses cell wall pectin) on the accumulation of secondary metabolites, such as total indole alkaloids, ajmalicine and coumarins, in *C. roseus* hairy roots were studied. Increasing concentrations of macerozyme were added at 30 day old hairy roots which were harvested 72 h afterwards. Addition of macerozyme increased total alkaloid content and ajmalicine accumulation, as shown in Fig. 1 panel A and B. In the case of the total alkaloid content, only a slight increase was observed with both 0.05 % and 1 % macerozyme (Fig. 1 panel A). However, ajmalicine content increased 90 % with respect to the control in roots treated with 0.05 % of macerozyme (Fig. 1 panel B).

After 72 h of macerozyme treatment, roots turned slightly brown, probably due to accumulation of coumarins, which are phenylpropanoid derivatives. These compounds were extracted with chloroform from spent media and their content was estimated spectrophotometrically, as reported by Kombrick and Halbrock (1986). In spent medium from untreated roots the amount of coumarins was practically undetectable, but their accumulation increased with the addition of macerozyme and they were

dependent on the concentration of the elicitor used, showing a maximum increase with 0.5 % macerozyme (Fig. 1 panel C).

Effect of macerozyme on TDC and PAL activities. Tryptophan decarboxylase (TDC) catalyses the conversion of tryptophan to tryptamine and it has been suggested that it may have a role as a possible site of regulation in indole alkaloid biosynthesis (Eilert *et al.*, 1987; De Luca *et al.*, 1988; Seitz *et al.*, 1989). When hairy roots were treated with increasing concentrations of macerozyme, TDC activity increased in a dose-dependent manner. At the highest macerozyme concentration, TDC activity increased 10-fold when compared to untreated roots (Fig. 2).

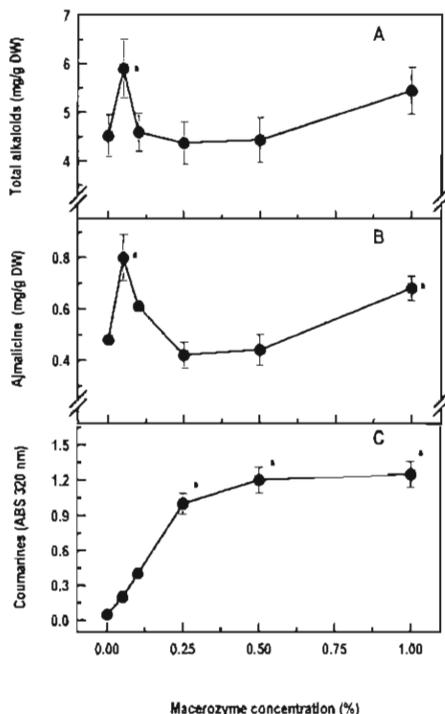


Fig. 1: Effect of increasing concentrations of macerozyme on secondary metabolites accumulation. Different concentrations of macerozyme were added to the culture media in the 30 day of culture and roots were harvested 72 h after macerozyme addition. (A) Total alkaloids; (B) Ajmalicine; (C) Total coumarins. The results were the media of three different experiments with three replicates each one. a, statistically differences from control at $p < 0.001$

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) catalyses the first committed step in the phenylpropanoid pathway and this enzyme is highly regulated by elicitors. PAL showed a marked increased in its activity after treatment with macerozyme. The activity of this enzyme increased four-fold at 0.5 % macerozyme when compared to control (Fig. 2).

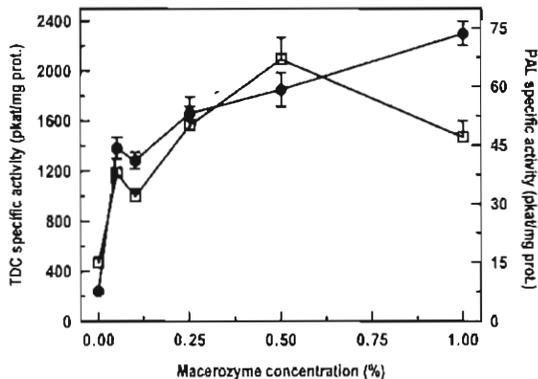


Fig. 2: Macerozyme dose-response effect on TDC and PAL activities. Different concentrations of macerozyme were added to the culture media at day 30th of culture and roots were harvested 72 h later. (●) TDC specific activity; (□) PAL specific activity. The results were the media of three different experiments with three replicates each one. All the points have $p < 0.001$ when compared to control without macerozyme.

A time course for TDC and PAL induction by macerozyme was carried out exposing 30 days old root cultures to 0.5% macerozyme. TDC and PAL activities from roots without treatment showed no significant changes during the time of the experiment. However, both enzyme activities increased in elicitor-treated hairy roots (Fig. 3 panel A and B). In both cases was reached the maximum after 72 h of macerozyme addition; however, the activities of the two enzymes declined slightly in longer treatment.

Regulation of PLC activity by macerozyme. There is some evidence that correlates elicitor action and phosphoinositides as the signal transduction mechanism. In order to elucidate if PLC, a key enzyme in phosphoinositides metabolism, is involved in the signal transduction mechanism of *C. roseus* hairy roots response to macerozyme and if there is any relationship between alkaloid and phenylpropanoid metabolism, we analysed the effect of the addition of this elicitor on PLC activity. As shown for TDC and PAL activities, PLC is affected by the elicitor in a dose-dependent manner. At a low concentration of macerozyme, such as 0.1 %, PLC activity decreased slightly when compared to untreated roots; however, the activity increased at higher macerozyme concentrations, up to 135 % of the basal activity at 1 % macerozyme (Fig. 4).

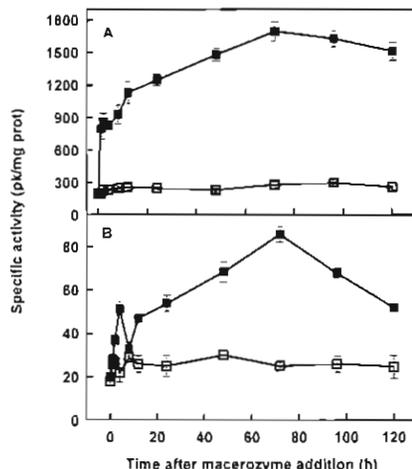


Fig. 3: Time course for TDC and PAL elicitation in *C. roseus* hairy roots. 0.05 % of macerozyme was added on the 30 day of culture and the roots were harvested at different periods of time. (A) TDC activity, in the presence (■) or absence of 0.05 % macerozyme (□). (B) PAL activity, in the presence (■) or absence of 0.05 % macerozyme (□). The results were the media of three different experiments with three replicates each one

The possibility of PLC response being related to elicitor exposure time was also explored. At the 30th day of culture, 0.1 % or 1 % macerozyme was added to the culture media. Hairy roots were harvested at different times and PLC activity was measured. Results are shown in figure 5. Non-treated roots showed a constant PLC activity throughout the incubation period. Elicitor treatment led to an increase in PLC activity, which reached its maximum after 1 h, at both macerozyme concentrations. With 0.05 % macerozyme, PLC activity increased 1 fold after 1 h of the induction and one h later rapidly declined to the same level of untreated roots. After 72 h, PLC activity was inhibited by approximately 30 % in relation to untreated roots (Fig. 5). With 1 % macerozyme, PLC activity increased 4-fold 1h after elicitor addition followed by a decrease (Fig. 5).

Effect of neomycin on indole alkaloid accumulation. Since PLC activity and secondary metabolite accumulation can be regulated by the addition of macerozyme, the possible relationship between these two events was further investigated. It has been shown that neomycin is a potential PLC inhibitor due to its binding to phosphoinositides, particularly to PIP_2 (Toyoda *et al.*, 1992), the substrate of the enzyme. We analysed the effect of increasing concentrations of neomycin on indole alkaloid accumulation in *C. roseus* hairy roots. In the 30th day of culture, four different concentrations of neomycin were added to the culture media and roots were harvested 72 h later. The results in Fig. 6 panel A showed that total alkaloid content decreased in a dose dependent manner up to 40 % less than untreated roots at 500 $\mu\text{mol/l}$

neomycin. However, the effect of neomycin was very dramatic when ajmalicine was measured. At 500 $\mu\text{mol/l}$, ajmalicine content was only 3 % of the content found in untreated roots (Fig. 6 panel B).

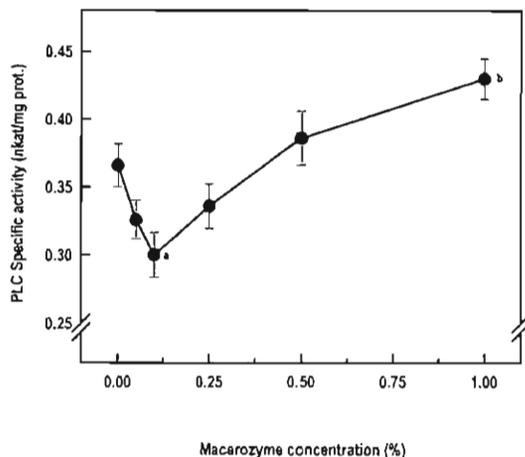


Fig. 4: Macerozyme dose-response effect on PLC activity. Different concentrations of macerozyme were added to the culture media in the 30 day of culture and roots were harvested 72 h after macerozyme addition. PLC activity was measured in the membrane fraction. The results were the media of three different experiments with three replicates each one, a ($p < 0.001$); b ($p < 0.005$).

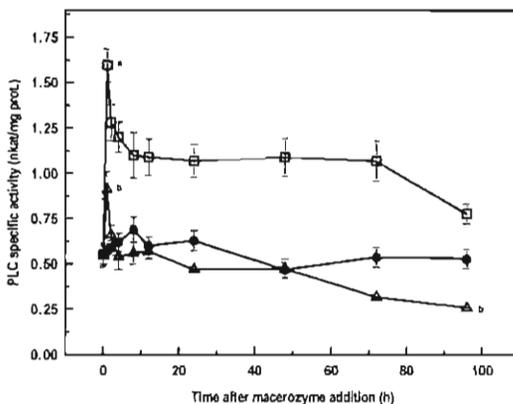


Fig. 5: Time course for PLC elicitation in *C. roseus* hairy roots. Macerozyme was added at day 30th of culture and the roots were harvested at different periods of time. (●) Control; (Δ) 0.1 % of macerozyme; (◻) 1 % of macerozyme. The results were the media of three different experiments with three replicates each one.

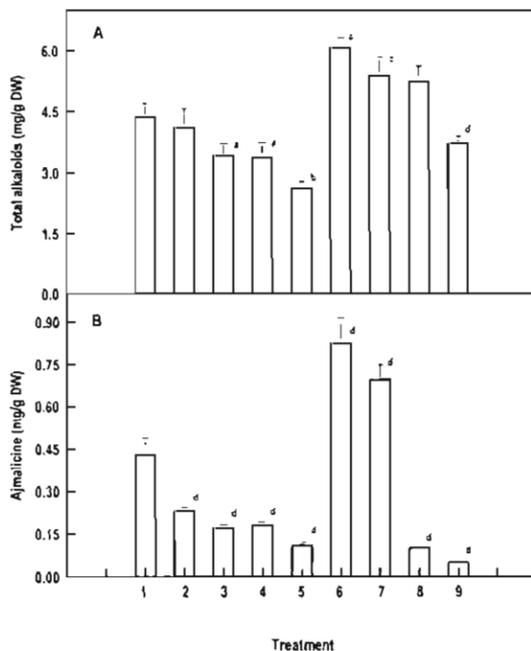


Fig. 6: Effect of neomycin in the elicitor action of macerozyme on the indol alkaloid accumulation. Macerozyme, neomycin and macerozyme plus neomycin were added in the 30 day of culture and roots were harvested 72 h after macerozyme addition. (1) Control without macerozyme or neomycin; (2) 1 $\mu\text{mol/L}$ of neomycin; (3) 10 $\mu\text{mol/L}$ of neomycin; (4) 100 $\mu\text{mol/L}$ of neomycin; (5) 500 $\mu\text{mol/L}$ of neomycin; (6) 0.05 % of macerozyme; (7) 1 % of macerozyme; (8) 0.05 % of macerozyme plus 500 $\mu\text{mol/L}$ of neomycin; (9) 1 % of macerozyme plus 500 $\mu\text{mol/L}$ of neomycin. The results were the media of three different experiments with three replicates each one, a ($p < 0.05$); b ($p < 0.02$); c ($p < 0.005$); d ($p < 0.001$).

As previously shown in Fig. 1 macerozyme treatment did result in an increase in indole alkaloids content. When macerozyme and 500 $\mu\text{mol/l}$ neomycin were added simultaneously on day 30 to the cultures, no effect in total alkaloid and ajmalicine accumulation was observed 72 hafter (Fig. 6 panel A and panel B).

DISCUSSION

Elicitor treatment has proved to be a powerful tool for increasing the accumulation and excretion of secondary metabolites in cell cultures that produce only trace amounts and to study the mechanisms that regulate their biosynthesis (Kombrink and Hahlbrock, 1986; Eilert *et al.*, 1987; Funk *et al.*, 1987; Seitz *et al.*, 1989; Nef *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1993; Vázquez-Flota *et al.*, 1994; Garnier *et al.*, 1996). Hydrolytic enzymes such as chitinase, macerozyme and cellulase increased the excretion of alkaloids by *C. roseus* hairy roots into the culture media (Vázquez-Flota *et al.*, 1994). In the present work it was demonstrated that macerozyme, a commercial preparation of

pectinase that hydrolyses the cell wall generating endogenous elicitors, induced an increase in the total indole alkaloid as well as of ajmalicine (Fig. 1). These results contrast with those obtained by Garnier *et al.*, (1996), whom found that the addition of macerozyme to the culture medium induced an ajmalicine decrease, but induced a tryptamine increase in *C. roseus* cell suspension culture. The cell wall of hairy roots and cell suspension culture of *C. roseus* could be different and thus, the endogenous elicitors liberated by macerozyme could induce different responses.

Elicitors, by definition, induce the synthesis of phytoalexins, such as coumarins, phenylpropanoid derivatives. Increasing concentrations of macerozyme induced an accumulation of coumarins, which depended on the amount of elicitor used (Fig. 1), as reported by Kombrink and Hahlbrock (1986) and Conrath *et al.*, (1989). As can be seen in Fig. 1 panels A, B and C, macerozyme can induce the accumulation of secondary metabolites derived from different, but related pathways, indole alkaloids and phenylpropanoids in *C. roseus* hairy roots.

It is also demonstrated that macerozyme can regulate two key enzymes of secondary metabolism, TDC and PAL (Figs. 2 and 3). Seitz *et al.*, (1989), using *C. roseus* cell line 615, observed transient increases in PAL and TDC enzyme activities after elicitor treatment. The elicitor induced a direct increase in TDC enzyme activity, while PAL activity and phenolics accumulation lagged behind and only occurred after indole alkaloid accumulation had peaked. In the present work (Fig 1 and 3), PAL and TDC activities peaked after 72 h of the elicitor addition.

The next step in the study was to try to elucidate if the phosphoinositides transduction mechanism was involved in these increases in metabolites contents and in related enzymatic activities. As shown in figures 4 and 5, macerozyme increased PLC activity as well. When macerozyme was added, PLC activity after 72 h showed a biphasic behaviour. This type of behaviour has previously been observed in response to other elicitors in pea epicotyls (Toyoda *et al.*, 1993).

Although in other reports it has been shown the effect of elicitors on phosphatidylinositol turnover or PIP₂ or IP₃ accumulation, a detailed study regarding the effect of an elicitor on PLC activity was missing. After a 72 h treatment with macerozyme, the effect on PLC activity was not very pronounced, although it was statistically significant (at $p < 0.005$). When roots were treated with macerozyme, and the effect on PLC activity was monitored for shorter periods of time (Fig. 5), a very pronounced increase on PLC activity was detected at two different concentrations. The decrease in the effect when the roots were harvested after a longer period of treatment, could be due to feedback regulation or to the presence of different PLC isoforms, which could be regulated by different mechanisms and whose sensibility to elicitors may also be different.

Another piece of information that supports the hypothesis that PLC may be involved in the signal transduction mechanism through which macerozyme modulates secondary metabolism is the fact that neomycin blocked the effect of this elicitor on the increase of ajmalicine accumulation (Fig. 6). Neomycin is widely used in cell biology for

the generation of second messengers. It binds with high affinity to PIP₂ and forms an electroneutral (1:1) complex with it (Gabev *et al.*, 1989). It has been previously established that in *C. roseus* transformed roots, neomycin inhibited PLC activity *in vitro* (Piña-Chable *et al.*, 1998). Neomycin has been used to upset the turnover of polyphosphoinositides in both animal and plant cells. Chen and Boss (1991) showed that neomycin inhibited the PIP and PIP₂ stimulation of plasma membrane ATPase activity in carrot cells. It also has been used to demonstrate that PLC may be involved in the fungal elicitor response in pea (Toyoda *et al.*, 1993).

In summary, our results demonstrate that macerozyme treatment can affect two branches of secondary metabolism and suggests a possible role of PLC in regulating the response to elicitation in *C. roseus* hairy roots.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Suveena Sharma for the revision of the English version of the manuscript. Supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (3016-N9306 to S.M.T.H.-S. and 4023-N to V.M.L.-V.), International Foundation for Science (C/2236-2) and a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología fellowship to O.A. M.-V. (88208).

REFERENCES

- Asada, M. and M. L. Shuler. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: Effect of adsorption *in situ*, elicitors and alginate immobilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 475-481 (1989).
- Bent, A. F. Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* **8**: 1757-1771 (1996).
- Chappell J. and R. Nable. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol.* **85**: 469-473 (1987).
- Chen Q. and W. F. Boss. Neomycin inhibits the phosphatidylinositol monophosphate and phosphatidylinositol bisphosphate stimulation of plasma membrane ATPase activity. *Plant Physiol.* **96**: 340-343 (1991).
- Ciau-Uitz R., M. L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello, L. M. Pacheco, B. Chi, and V. M. Loyola-Vargas. Indole alkaloid production by transformed and non transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **30P**: 84-88 (1994).
- Conrath U., A. Domard and H. Kauss. Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **8**: 152-155 (1989).
- Cosio E., M. Feger, C. Miller, L. Antelo and J. Ebel. High-affinity binding of fungal β -glucan elicitors to cell membranes of species of the plant family fabacea. *Planta* **200**: 92-99 (1996).

- Crute I. R. and D. A. C. Pink.** Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *Plant Cell* **8**: 1747-1755 (1996).
- Dangl J. L., R. A. Dietrich and M. H. Richberg.** Death don't have no mercy: cell death in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807 (1996).
- Darvill A. G. and P. Albersheim.** Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 243-275 (1984).
- De Los Santos-Briones C., J. A. Muñoz-Sánchez, J. Chín-Vera, V. M. Loyola-Vargas and S. M. T. Hernández-Sotomayor.** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-phospholipase C activity during the growing phase of *Catharanthus roseus* transformed roots. *J. Plant Physiol.* **150**, 707-713 (1997).
- De Luca V., J. Alvarez, D. Campbell and W. G. W. Kurz.** Developmental regulation of enzymes of indol alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **86**: 447-450 (1988).
- DiCosmo F., A. Quesnel, M. Misawa and S. G. Tallevi.** Increased synthesis of ajmalicine and catharanthine by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* in response to fungal culture-filtrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **14**: 101-106 (1987).
- Dixon R. A. and C. J. Lamb.** Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogen. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 339-367 (1990).
- Eilert U., V. De Luca, F. Constabel and W. G. W. Kurz.** Elicitor-mediated induction of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **254**: 491-497 (1987).
- Gabev E., J. Kasianowicz, T. Abbott and S. McLaughlin.** Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). *Biochim. Biophys. Acta* **979**: 105-112 (1989).
- Gamborg O. L., R. A. Miller and K. Ojima.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. *Exp. Cell. Res.* **50**: 151-158 (1968).
- Garniert F., C. Depierreux, G. Petit-Paly, S. Hamdi, J. Chénieux and M. Rideau.** Induction of the accumulation of tryptamine and phenols by endogenous elicitors in cell suspension cultures of periwinkle. *J. Plant Physiol.* **148**: 701-706 (1996).
- Godoy-Hernández G. and V. M. Loyola-Vargas.** Effect of fungal homogenate enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **10**: 537-540 (1991).
- Funk C., K. Gügler and P. Brodelius.** Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry* **26**: 401-405 (1987).
- Hahlbrock K., C. J. Lamb, C. Purwin, J. Ebel, E. Fautz and R. Schafer:** Rapid Response of suspension-cultured parsley cells to the elicitor from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Induction of enzymes of general phenylpropanoid metabolism. *Plant Physiol.* **67**: 668-673 (1981).
- Hammond-Kosack K. E. and J. D. G. Jones.** Resistance gene-dependent plant defense response. *Plant Cell* **8**: 1773-1791 (1996).

- Hernández-Sotomayor S. M. T. and G. Carpenter.** Non-catalytic activation of phospholipase C- γ 1 *in vitro* by epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* **293**: 507-511 (1993).
- Islas I., V. M. Loyola-Vargas and M. L. Miranda-Ham.** Tryptophan decarboxylase activity in transformed roots from *Catharanthus roseus* and its relationship to triptamine, ajmalicine and catharantine accumulation during the culture cycle. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **30P**: 81-83 (1994).
- Kamada Y. and S. Muto.** Protein kinase inhibitors inhibit stimulation of inositol phospholipid turnover and induction of phenylalanine ammonia-lyase in fungal elicitor-treated tobacco suspension culture cells. *Plant Cell Physiol.* **35**: 405-409 (1994).
- Kombrink E. and K. Hahlbrock.** Response of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol.* **81**., 216-221 (1986).
- Kurosaki F., Y. Tsurusawa and A. Nishi.** Breakdown of phosphatidylinositol during the elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cell. *Plant Physiol.* **85**: 601-604 (1987).
- Monforte-González M., T. Ayora-Talavera, I. E. Maldonado-Mendoza and V. M. Loyola-Vargas.** Quantitative analysis of serpentine and ajmalicine in plant tissues of *Catharanthus roseus* and hyosciamine and scopolamine in root tissues of *Datura stramonium* by densitometry in thin layer chromatography. *Phytochem. Analysis* **3**: 117-121 (1992).
- Moreno P. R. H., van der Heijden and R. Verpoorte.** Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloid in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **12**: 702-705 (1993).
- Nef C., B. Rio and H. Chrestin.** Induction of catharantine synthesis and stimulation of major indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant Cell Rep.* **10**: 26-29 (1991).
- Nürberger T., D. Nennstiel, T. Jabs, W. Sacks, K. Hahlbrock and D. Scheel.** High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes trigger multiple defense response. *Cell* **78**: 449-460 (1994).
- Rhodes M. J. C., R. J. Robins, J. D. Hamill, A. J. Parr, M. G. Hilton and N. J. Walton.** Properties of transformed root cultures. In: Secondary products from plant tissue culture. Charlwood B. V. and Rhodes M. J. C. (eds.) Oxford University Press, Oxford, pp. 201-225 (1990).
- Ryals J. A., H. U. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H. Y. Steiner and M. D. Hunt.** Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819 (1996).
- Saéñz-Carbonell L., I. Maldonado-Mendoza, O. Moreno-Valenzuela, R. Ciau-Uitz, M. López-Meyer, C. Oropeza and V. M. Loyola-Vargas.** Effect of the medium pH on the release of secondary metabolites from root of *Datura stramonium*, *Catharanthus roseus* and *tagetes patula* cultured *in vitro*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **38**: 257-267 (1993).
- Schmidt W. E. and J. Ebel.** Specific binding of a fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 4117-4121 (1987).
- Seitz H. U., U. Eilert, V. De Luca and W. G. W. Kurz.** Elicitor-mediated induction of phenyl alanine ammonia-lyase and tryptophan decarboxylase: accumulation of

- phenols and indol alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **18**: 71-78 (1989).
- Signs M. W. and H. E. Flores.** The biosynthetic potential of plant roots. *BioEssays* **12**: 7-13 (1990).
- Smith P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **15**: 76-85 (1985).
- Stab M. R. and J. Ebel.** Effect of Ca²⁺ on phytoalexin induction by fungal elicitor in Soybean cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**: 416-423 (1987).
- Strasser H., C. Hoffmann, H. Grisebach and U. Matern.** Are phosphoinositides involved in signal transduction of elicitor-induced phytoalexin synthesis in cultured plant cells. *Z. Naturforsch* **41c**: 717-724 (1986).
- Toyoda K., T. Shiraishi, H. Yoshioka, T. Yamada, Y. Ichinose and H. Oku.** Regulation of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* **33**: 445-452 (1992).
- Toyoda K., T. Shiraishi, T. Yamada, Y. Ichinose and H. Oku.** Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol.* **34**:729-735 (1993).
- Vázquez-Flota F., O. A. Moreno-Valenzuela, M. L. Miranda-Ham, J. Coello-Coello and V. M. Loyola-Vargas.** Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures in an induction medium and during elicitation. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **38**: 273-279 (1994).
- Waldo G. L., A. Morris, J. and T. K. Harden.** Purification of G-protein-regulated phospholipase C from turkey erythrocytes. *Methods in Enzymology* **238**: 195-201 (1994).
- Zimmerman A. and K. Hahlbrock.** Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. Purification and some properties of phenylalanine ammonia lyase (E.C. 4.3.1.5). *Arch. Biochem. Biophys.* **166**: 54-62 (1975).

Capítulo IV Discusión

1. Diferenciación-rediferenciación. La estrategia que se utilizó para desdiferenciar a las raíces fue la modificación de la concentración de los micronutrientes del medio PC (5 veces más que el control, cuadro 3). Otros autores han reportado la obtención de cultivos desdiferenciados utilizando reguladores del crecimiento (Flores y Filner, 1985; Jung *et al.*, 1995; Medina-Bolivar *et al.*, 1995; Navarrete-Loeza, 1995; Repunte *et al.*, 1993); sin embargo, el uso de reguladores del crecimiento puede influir en la expresión del metabolismo secundario en *Catharanthus roseus* (Pasquali *et al.*, 1992), lo que sugiere que el uso de auxinas en el medio de cultivo podría inhibir la transcripción de los genes *tdc* y *sss*. Ellos propusieron que las auxinas funcionan como un interruptor entre la división celular y la síntesis de los metabolitos secundarios, dos procesos que han sido considerados como inversos.

Cuadro 2. Composición del stock A del medio de Phillips y Collins normal y modificado (5X).

Micronutriente	μM (medio normal)	μM (medio modificado 5X)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,750	8,750
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	88.8	444
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	17.4	87
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.4	2

Además, los reguladores del crecimiento pueden provocar un cambio en el número cromosómico de una especie. En *Nicotiana rustica*, diez clones de raíces regeneradas a partir de cultivos desdiferenciados, a su vez provenientes de raíces transformadas, presentaron alteraciones en su número cromosómico y se encontró un gran número de aneuploidías (60% del total de las clonas regeneradas). En las clonas que presentaron aneuploidías, la acumulación de la nicotina disminuyó considerablemente (Aird *et al.*, 1988). En otro trabajo, en 100 clonas de raíces regeneradas de *Nicotiana rustica* se encontró que el contenido de la nicotina varió entre 42-653 $\mu\text{g/g}$, comparado con los 160 $\mu\text{g/g}$ de la línea original de raíces. Los cultivos desdiferenciados se obtuvieron mediante el uso de reguladores del crecimiento (Rhodes *et al.*, 1988). En el CICY se demostró que las raíces normales de *C. roseus*, las cuales se cultivan en un medio con fitoreguladores, tuvieron un alto grado de aneuploidías y variaciones en el número cromosómico, mientras que las raíces transformadas tuvieron una alta estabilidad a nivel cromosómico durante varios ciclos de cultivo (Baiza, datos no publicados). Esto sugiere que los fitoreguladores podrían provocar alteraciones cromosómicas en los cultivos *in vitro*. En el modelo de desdiferenciación-diferenciación no se realizaron estudios a nivel cromosómico.

Desde hace aproximadamente dos décadas se han ido acumulando evidencias de que el aumento en la síntesis de los metabolitos secundarios es máxima cuando los

cultivos presentan diferenciación estructural, tales como citodiferenciación o bien organización de las células en raíces, brotes o embriones (Lindsey y Yeoman, 1983). Además, en estudios realizados con plántulas de *C. roseus* (Balsevich *et al.*, 1986; De Luca *et al.*, 1988) y *Cinchona ledgeriana* (Aerts *et al.*, 1990, Aerts *et al.*, 1991) se demostró que la actividad de algunas enzimas involucradas en la síntesis de los alcaloides indólicos como la TDC y la SSS se encuentran bajo estricto control de las condiciones ambientales y del grado de desarrollo. Nuestros datos apoyan esta hipótesis, ya que la actividad de la TDC, y la de la SSS, así como la acumulación de los alcaloides, dependieron fuertemente del grado de diferenciación de los cultivos. En las células en suspensión obtenidas a partir de las raíces, los alcaloides (Fig. 2, Capítulo II) y la actividad de la TDC (Fig. 4, Capítulo II) disminuyeron hasta en dos órdenes de magnitud. La actividad de la SSS disminuyó aproximadamente en un 70% en relación a las raíces originales (Fig. 5, Capítulo II). Sin embargo, al rediferenciar las células en suspensión nuevamente a raíces (línea R2), éstas recuperaron su capacidad de acumular alcaloides, en la misma cantidad que el control (Fig. 2, Capítulo II), pero no recuperaron el 100% de las actividades de la TDC o la SSS (Fig. 4, Capítulo II; Fig. 5, Capítulo II). Las raíces podrían estar utilizando la pequeña poza de triptamina disponible debido a la baja actividad de la TDC en la línea R2, para canalizarla hacia la síntesis de los alcaloides indólicos y no hacia otras rutas, como por ejemplo, hacia la síntesis de auxinas. Aparentemente, otros factores diferentes a la participación de la TDC, tales como la disponibilidad de la triptamina, la actividad de otras enzimas que utilizan a este precursor como sustrato y su transporte a través del tonoplasto, regulan más fuertemente la síntesis de los alcaloides indólicos (Whitmer *et al.*, 1998).

La regulación de la actividad de la TDC y su participación en la síntesis de los alcaloides indólicos está relacionada con el nivel de diferenciación de los sistemas experimentales utilizados. En células en suspensión, esta enzima aparentemente no es el punto clave en la regulación con la síntesis de los alcaloides indólicos (Mérillon *et al.*, 1986; Sasse *et al.*, 1983; Whitmer *et al.*, 1998); mientras que, por el contrario, en plántulas, su actividad correlaciona positivamente con la síntesis de estos compuestos (Aerts *et al.*, 1990). En las raíces regeneradas R2, su baja actividad, comparada con la de la línea original, sugieren que no es el paso limitante en la síntesis de los alcaloides.

En cultivos de células en suspensión, hojas y raíces de plantas y en raíces transformadas y plántulas de *C. roseus* se han encontrado 6 isoformas de la SSS, todas ellas presentes en cada una de las fuentes estudiadas, pero algunas isoformas fueron más abundantes en un tipo de cultivo que en los otros (de Waal *et al.*, 1995). En las raíces transformadas de *C. roseus* línea J1, se han identificado las 6 isoformas, las cuales se detectaron de manera diferencial durante el ciclo de cultivo (Galaz-Avalos, datos no publicados). Este hecho podría sugerir que existe una regulación muy fina de la síntesis de los precursores de los alcaloides indólicos y que las isoformas tengan información muy precisa acerca del o de los compuestos que se van a sintetizar a partir de su producto y que dichas isoformas formen parte de diferentes canales metabólicos. El hecho de que las raíces regeneradas sólo posean el 30% de la actividad de la SSS con relación a las raíces originales, pero sean capaces de acumular la misma cantidad de alcaloides, sugiere que sólo alguna o

algunas isoformas de la SSS estén presentes, pero que la actividad de esta o estas isoformas sea suficiente para suministrar la estrictosidina necesaria para la síntesis de estos metabolitos secundarios. Es importante resaltar que el patrón de los alcaloides individuales cambió bruscamente, ya que la ajmalicina, la cual es uno de los alcaloides mayoritarios en las raíces transformadas, prácticamente desapareció en la línea regenerada; no obstante, la acumulación de otros alcaloides aumentó, algunos de ellos se encuentran aún sin identificar. Con base a lo anterior, se propone que las células podrían modificar los flujos metabólicos que lleven a los precursores de los alcaloides indólicos hacia la síntesis de algunos compuestos específicos, y que se estén formando metabolitos o canales metabólicos para cada una de las isoformas de la SSS para que el producto de cada uno de ellos genere precursores para diferentes alcaloides. Con esta especulación se postula que las isoformas de la SSS se encuentran bajo una estricta regulación y tienen una función muy importante en la biosíntesis de estos compuestos.

Varios grupos han sugerido que la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos se encuentra en la parte terpénica. La aplicación de precursores de los alcaloides indólicos por la parte terpénica como la secologanina, la loganina o el ácido logánico estimularon un aumento en la acumulación de la ajmalicina, la estrictosidina y una disminución en los niveles de la triptamina, probablemente, porque está siendo canalizada hacia la síntesis de los alcaloides (Mérillon *et al.*, 1986; Moreno *et al.*, 1993). Los efectos de la adición de la triptamina o del triptofano son contradictorios ya que puede causar un incremento en la producción de los alcaloides (Deus-Neumann y Zenk, 1982; Zenk *et al.*, 1977), reprimirla (Döller *et al.*, 1976) o bien, no tener ningún efecto (Mérillon *et al.*, 1986).

En esta parte de la ruta metabólica de los alcaloides indólicos se encuentra la enzima HMGR, la cual se ha postulado como el punto clave en la regulación de la síntesis de los terpenos en las plantas (Chappell, 1995; Chappell, 1995a). En el presente trabajo, a diferencia de lo obtenido con las actividades enzimáticas de la TDC y de la SSS, la actividad de la HMGR alcanzó los mismos niveles de actividad en las raíces regeneradas que en las raíces originales (Fig. 6, Capítulo II). Sin embargo, la importancia de la vía del acetato-mevalonato en la síntesis de algunos compuestos terpénicos ha sido cuestionada en los últimos años, debido al descubrimiento de la vía alterna de la síntesis del IPP en las plantas (Adam y Zapp, 1998; Arigoni *et al.*, 1997; Contin *et al.*, 1998; Lichtenhaler *et al.*, 1997), y su canalización hacia la síntesis de β -carotenos, luteína, fitol (Lichtenhaler *et al.*, 1997), diterpenos (Knöss *et al.*, 1997), y monoterpenos, entre ellos la secologanina (Contin *et al.*, 1998). Lo anterior indica que en la síntesis de los isoprenoides participan dos rutas, la del acetato-mevalonato y la ruta alterna.

En *C. roseus*, el IPP utilizado para la síntesis del β -caroteno y de la luteína provino de la ruta alterna, mientras que en la síntesis del sitosterol se utilizó el que provino de la ruta del mevalonato (Arigoni *et al.*, 1997). La síntesis de la secologanina, que es un monoterpeneo y se sintetiza en los plástidos, puede ser llevada a cabo por la ruta alterna. En cultivos de células en suspensión de *C. roseus* se demostró que al adicionar [$1-^{13}\text{C}$]glucosa, la marca se incorporaba a la secologanina, lo que sugirió que la vía alterna del gliceraldehído-3-fosfato/piruvato es la principal vía de suministro del IPP para la síntesis de este precursor de los alcaloides indólicos (Contin *et al.*, 1998).

Sin embargo, dadas las evidencias de la participación de la vía del acetato-mevalonato, no se descarta la posibilidad de que en *C. roseus* estén operando las dos rutas, y que la utilización de cualquiera de ellas dependa del estado fisiológico de las células (Contin *et al.*, 1998), o de los diferentes estímulos que reciban las plantas, como ataque de patógenos, salinidad, sequía, etc.

Debido a que en el modelo de desdiferenciación-rediferenciación, los cultivos atravesaron por diferentes estados fisiológicos, es difícil determinar si la HMGR es un punto clave en la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos. Para lograr dilucidar su importancia o la participación de la vía de la triosa fosfato/piruvato, o bien, la participación de las dos rutas en las raíces transformadas de *C. roseus*, es necesario realizar experimentos de inhibición de la HMGR, y de adición de precursores marcados para ambas vías metabólicas.

Lo que sí es claro es que la HMGR en las plantas se encuentra bajo una estricta regulación a varios niveles. En *C. roseus* se han identificado al menos dos genes que codifican para la HMGR, los cuales son expresados de manera diferencial en respuesta a diferentes estímulos (Maldonado-Mendoza *et al.* 1994).

Los promotores de los genes *tdc*, *sss*, y *hmgr* pueden estar bajo estricto control por el nivel de desarrollo de los cultivos. En plántulas de *C. roseus* se demostró que la expresión de los genes *tdc* y *sss* se dió de manera transitoria durante el desarrollo de las plántulas y que sus niveles aumentaron de manera simultánea a la actividad de las enzimas (De Luca *et al.*, 1986, 1988; Rower *et al.*, 1992). Se ha demostrado también que la expresión de los genes *hmgr* son regulados de manera muy estricta por el nivel de desarrollo de los cultivos; por ejemplo, en *A. thaliana*, uno de los genes *hmgr* estuvo estrictamente regulado por el nivel de diferenciación de las plántulas (Enjoto *et al.*, 1995), al igual que en *C. acuminata* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1992). Replanteando lo anteriormente dicho, el aporte del mevalonato para la síntesis del IPP como precursor de los alcaloides indólicos no está del todo claro, y la regulación diferencial de la expresión de la HMGR a varios niveles podría estar más vinculada con la síntesis de los esteroides y de otros isoprenoides, y no con la síntesis de los alcaloides en *C. roseus*.

2. Función de la PLC en respuesta a la inducción. El cultivo *in vitro* ha sido muy utilizado para estudiar la relación existente entre plantas y patógenos, así como su modo de acción. Para ello se han utilizado un gran número de inductores de diferentes fuentes (Eilert, 1986; Eilert *et al.*, 1987; Nef *et al.*, 1991; Seitz *et al.*, 1989; Vázquez-Flota *et al.*, 1994). En trabajos previos se demostró que las enzimas hidrolíticas: quitinasa, macerozima y celulasa, provocaban un aumento en la excreción de alcaloides de las raíces transformadas de *C. roseus* al medio de cultivo (Vázquez-Flota *et al.*, 1994). En este trabajo, al adicionar macerozima al medio de cultivo de las raíces transformadas, se presentó un aumento del 90% en el contenido de la ajmalicina con respecto al control (Fig. 1, Capítulo III), mientras que en cultivos de células en suspensión de *C. roseus*, este mismo tratamiento indujo, a la vez, una disminución en la acumulación de la ajmalicina, y un aumento en la acumulación de la triptamina, uno de los precursores de los alcaloides indólicos (Garnier *et al.*, 1996). La composición de la pared celular de las raíces transformadas y de las células en suspensión podría ser diferente. De esta manera, los inductores endógenos que son

liberados por la macerozima podrían estar provocando diferentes respuestas en las células. Por ejemplo, los fragmentos de pared celular aislados del hongo fitopatógeno *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* provocaron un aumento (fragmentos con actividad de inductor) o una disminución de la actividad de la PAL (fragmentos con actividad de inhibidor) en hojas de trigo. El análisis de la composición del inductor reveló que presenta residuos de galactosa (71.1%), manosa (11.17%) y glucosa (16.4%); no obstante, la identificación del inhibidor no se realizó (Arz y Grambow, 1995). Como ambos compuestos se derivan de la pared celular del hongo, es de suma importancia identificar la composición del inhibidor para poder conocer como ambos compuestos interactúan con la célula vegetal (Arz y Grambow, 1995).

Por definición, los inductores son moléculas que promueven un aumento en la síntesis de las fitoalexinas (Eilert, 1986), como por ejemplo, las cumarinas, compuestos derivados de la vía de los fenilpropanoides (Conrath *et al.*, 1989; Kombrink y Hahlbrock, 1986). En este trabajo, se observó que el aumento en la acumulación de las cumarinas fue dependiente de la dosis de macerozima utilizada (Fig. 1, Capítulo III). Los resultados obtenidos en células en suspensión de perejil fueron similares, ya que la adición de quitosana o de homogenados de hongos produjeron un aumento en el contenido de las cumarinas dosis-dependiente (Conrath *et al.*, 1989; Kombrink y Hahlbrock, 1986). La macerozima provocó un aumento en la acumulación de metabolitos secundarios derivados de dos rutas diferentes, la vía de los alcaloides indólicos y la vía de los fenilpropanoides, pero relacionadas, dado que su precursor es el shikimato.

La vía del shikimato tiene una función crucial en la regulación del metabolismo de los fenilpropanoides y de los alcaloides indólicos, controlando el flujo de la fenilalanina y del triptofano (Yao *et al.*, 1995). La introducción del gen *tdc* en papa causó un desbalance en las vías del shikimato y de los fenilpropanoides. El aumento en la acumulación de la triptamina fue acompañado de una disminución en los niveles del triptofano, de la fenilalanina y de los fenoles y además de una reducción de la síntesis de la lignina, lo que causó que los tubérculos fueran más susceptibles al ataque de *Phytophthora* (Yao *et al.*, 1995). En *C. roseus* se demostró que los cultivos de callos y de células en suspensión que sobreexpresaban el gen *tdc* mostraban signos de estrés y características de bajo crecimiento (Canel *et al.*, 1998). Sólo cuando los cultivos fueron transferidos a un medio que contenía 2,4-D, un potente inhibidor del metabolismo secundario (Sakuta y Komamine, 1987), en los cultivos transformados se eliminaron las características descritas (Canel *et al.*, 1998). Los autores sugieren que mediante un estricto control de la actividad de la TDC, las células de *C. roseus* tratan de prevenir una sobreutilización del triptofano y sus precursores, los cuales son necesarios para la síntesis de otros aminoácidos aromáticos y de los fenilpropanoides (Canel *et al.*, 1998). En las raíces transformadas de *C. roseus* tratadas con la macerozima, un aumento de diez veces en la actividad de la TDC no evitó que la vía de los fenilpropanoides se activara, ya que la PAL también aumentó su actividad (cuatro veces en relación al control) (Fig. 2, Capítulo III), así como también la síntesis de las cumarinas. Se ha demostrado que el triptofano regula su propia síntesis por retroalimentación y que es un activador positivo de la síntesis de la fenilalanina y de la tirosina, mientras que la fenilalanina inhibe por retroalimentación su propia biosíntesis (Bentley, 1990). Estos resultados sugieren que los inductores endógenos, generados

por la macerozima, podrían estimular la síntesis de los precursores del triptofano y de la fenilalanina, provenientes de la vía del shikimato (Fig. 10). De esta manera se explicaría el por qué las dos vías son activadas al mismo tiempo por la acción de la macerozima. El punto exacto dónde actuarían los inductores se desconoce, pero se sugiere que podría ser antes de la síntesis del corismato.

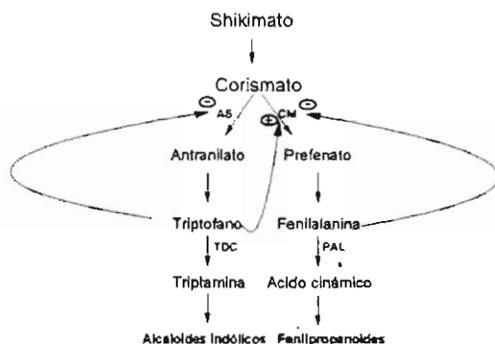


Figura 10. Diagrama simplificado que ilustra la vía del shikimato, de los alcaloides indólicos y de los fenilpropanoides. Las líneas punteadas representan la activación (+) o la inhibición (-) por retroalimentación de las enzimas de la vía del shikimato. AS: antranilato sintasa; CM: corismato mutasa; PAL: fenilalanina amonio-liasa; TDC: triptofano descarboxilasa.

Los inductores endógenos generados por la macerozima pueden estimular la actividad de dos enzimas del metabolismo secundario: la TDC y la PAL. Los homogenados de hongos pueden inducir el aumento de la actividad de la TDC, como se ha observado en células en suspensión de *C. roseus*. La adición de homogenados de *Pythium aphanidermatum* a los cultivos produjo un aumento en la actividad de esta enzima, el cual fue dependiente de la duración del tratamiento, alcanzándose el pico máximo de actividad a las 48 h después de iniciado éste (Eilert *et al.*, 1987); mientras que en las raíces transformadas, la máxima inducción se obtuvo a las 72 h (Fig. 3, Capítulo III). La actividad de la PAL también puede ser inducida por homogenados fúngicos: en células en suspensión de perejil, la adición de homogenados de *Phytophthora megasperma* dieron lugar a un aumento en la actividad de la PAL dependiendo de la dosis utilizada, y la duración del tratamiento, alcanzándose el máximo a las 30 h después de que se agregó al inductor (Kombrink y Hahlbrock, 1986). Los inductores derivados de la pared celular de *Colletotrichum lindemuthianum* provocaron un aumento transitorio de la actividad de la PAL en células en suspensión de frijol, pero a diferencia de lo observado en perejil, la máxima actividad de la enzima se alcanzó después de 10 h de iniciada la inducción (Lawton *et al.*, 1983). En las raíces transformadas, la máxima actividad de la PAL se observó a las 72 h después de añadir la macerozima al medio de cultivo (Fig. 3, Capítulo III).

La diferencia en el tiempo en que las enzimas TDC y PAL alcanzan la máxima inducción de su actividad podría deberse a varios factores. Uno de ellos es la especie vegetal con la que se realizaron los experimentos, ya que la respuesta de los cultivos celulares a experimentos con inductores es altamente dependiente de la planta con la que se trabaje (Eilert, 1986). Otro factor es la composición de los inductores, ya que en un caso se trata de fragmentos de la pared celular de hongos fitopatógenos (Lawton *et al.*, 1983), en otro se utilizan homogenados fúngicos totales, los que incluyen a las paredes celulares, lípidos, proteínas, etc. (Kombrink y Hahlbrock, 1986; Eilert *et al.*, 1987), y en nuestro caso se utilizó la macerozima, la cual libera fragmentos de pared celular de las raíces transformadas. Otra causa puede ser el nivel de diferenciación de los cultivos analizados, ya que la expresión y la actividad de las enzimas del metabolismo secundario están directamente relacionadas con el estadio de organización celular.

En células en suspensión de *C. roseus*, Seitz *et al.*, (1989) estudiaron la posible relación entre la síntesis de metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos y los alcaloides indólicos, con las actividades de la PAL y la TDC, en respuesta a la inducción con homogenados fúngicos. Por un lado, demostraron que los compuestos fenólicos aumentaron su excreción al medio de cultivo y que dicho incremento fue precedido por un aumento en la actividad de la PAL; mientras que, al parecer, la acumulación de los alcaloides indólicos no estaba regulada por la actividad de la TDC, ya que los alcaloides indólicos alcanzaron su máxima acumulación antes de que la actividad de la TDC alcanzara su pico de máxima actividad. Nuestros datos también sugieren que la TDC no es el único punto de regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos, ya que la inducción de su máxima actividad causada por la macerozima no coincidió con la máxima acumulación de los alcaloides. El tratamiento con 0.05% de macerozima estimuló la máxima acumulación de los alcaloides, mientras que la máxima inducción de la actividad de la TDC se logró con 1% de macerozima. Otra conclusión a la que se podría llegar con estos resultados es que en las células de *C. roseus* (células en suspensión o raíces transformadas) no se requiere que la actividad de la TDC sea inducida al máximo para provocar un aumento en la acumulación de los alcaloides indólicos, y que sólo basta un pequeño incremento de su actividad para que la síntesis de los alcaloides aumente. Como ya se había sugerido, otros factores diferentes a la participación de la TDC, tales como la disponibilidad de la poza interna de triptamina, la actividad de otras enzimas que utilizan a este precursor como sustrato y su transporte a través del tonoplasto, influyen más fuertemente la síntesis de los alcaloides indólicos (Whitmer *et al.*, 1998). Además, la síntesis de estos compuestos depende también de la disponibilidad de los precursores terpénicos, así que si se aumenta la síntesis de la triptamina, pero la secologanina no aumenta en los mismos niveles, la limitante podría estar dada por este otro factor.

Lograr aclarar cómo se lleva a cabo la percepción y la transducción de las señales en respuesta a los inductores es indispensable para entender qué mecanismos utiliza la planta para defenderse del ataque de patógenos; sin embargo, poco se conoce acerca de este tema. La existencia de los componentes esenciales del metabolismo de los fosfoinosítidos en células vegetales fue reportado por primera vez por Boss y Massel (1985). La detección de la actividad de la PLC en las raíces

transformadas de *C. roseus* (De los Santos-Briones *et al.*, 1997; Piña-Chable *et al.*, 1998) y la participación de los fosfoinosítidos en respuesta a homogenados fúngicos (Kamada y Muto, 1994; Kurosaki *et al.*, 1987; Toyoda *et al.*, 1992) sugieren la posible participación de la PLC en la cascada de señales como respuesta de las plantas al ataque de patógenos.

En membranas aisladas de epicótilos de chícharo, la adición de un oligosacárido aislado del hongo *Mycosphaerella pinodes* a la mezcla de reacción, provocó un aumento en las actividades de la fosfatidilinositol cinasa, la fosfatidilinositol fosfato cinasa y de la PLC, tres enzimas involucradas en el recambio de fosfoinosítidos (Toyoda *et al.*, 1992). La inducción de las actividades de las tres enzimas se redujo cuando se añadió un glucopéptido (inhibidor) aislado del mismo hongo. En las raíces transformadas, los inductores endógenos producidos por la macerozima provocaron un comportamiento bifásico en la actividad de la PLC, dependiendo de la dosis utilizada. A bajas concentraciones (0.05%), se dió una disminución en la actividad de la enzima, mientras que a altas concentraciones (1%) se estimuló su actividad (Fig. 4, Capítulo III). Estos datos sugieren que, al igual que en el hongo *Mycosphaerella pinodes*, probablemente la macerozima esté liberando de la pared celular oligosacáridos que puedan ser inductores e inhibidores de la actividad de la PLC, y que el inhibidor sea el primero en ser reconocido por la célula, para ser desplazado posteriormente por el inductor.

La respuesta de las células vegetales a la inducción es altamente dependiente de la duración del tratamiento, y dicha respuesta puede darse desde minutos hasta horas después de iniciada la inducción (Eilert, 1986; Toyoda *et al.*, 1993). En epicótilos de chícharo, el inductor aislado de *Mycosphaerella pinodes* provocó un aumento bifásico de los niveles del PIP_2 y del IP_3 . En la primera fase, el PIP_2 aumentó rápidamente, durante los primeros dos segundos, y después disminuyó hasta los 5 s después de iniciada la inducción. En la segunda fase (5 s a 6 min), el PIP_2 aumentó ligeramente para luego disminuir gradualmente hasta alcanzar los niveles del control (Toyoda *et al.*, 1993). Se ha descrito que los niveles del IP_3 aumentaron inmediatamente después de que las células en suspensión de zanahoria fueron tratadas con un inductor derivado de la pared celular de las mismas células hidrolizadas con pectinasa (Kurosaki *et al.*, 1987). En las raíces transformadas se encontró que la inducción de la actividad de la PLC fue transitoria, alcanzándose el pico de mayor actividad a los 30 min después de iniciado el tratamiento. Al utilizar 0.05% de macerozima, la actividad de la enzima disminuyó gradualmente con el tiempo hasta ser incluso menor que el control, mientras que con 1% de macerozima, la actividad de la PLC también disminuyó con el tiempo; sin embargo, durante el curso del experimento, la actividad de la enzima siempre fue mayor que el control (Fig. 5, Capítulo III). Este comportamiento era de esperarse, ya que las señales son percibidas por las células y transmitidas inmediatamente al interior para iniciar la cascada de señales en respuesta al estímulo específico. Además, la disminución de la actividad de la PLC con el tiempo puede deberse a la presencia de varias isoenzimas en las raíces transformadas de *C. roseus* (De Los Santos Briones *et al.*, 1997), las cuales pueden estar reguladas de manera diferencial, y por lo tanto, mostrar sensibilidad diferencial por el inductor.

Otra estrategia para demostrar la posible función de la PLC en respuesta a la inducción en raíces transformadas es el uso de inhibidores de la enzima. La neomicina

es un conocido inhibidor de la PLC, que forma un complejo con el PIP_2 (Gabev *et al.*, 1989), secuestrando así a su sustrato. En cultivos de raíces transformadas de *C. roseus* se demostró que la neomicina inhibió la actividad de la PLC *in vitro* (Piña-Chable *et al.*, 1998). Al añadir simultáneamente la neomicina y la macerozima al medio de cultivo, se eliminó el efecto del inductor sobre el aumento en el contenido de ajmalicina (Fig. 6, Capítulo III). De manera similar ocurrió en epicótilos de chicharo tratados con neomicina más un inductor, donde se observó una disminución en la acumulación de la pisatina (una fitoalexina), comparada con los tejidos tratados solo con el inductor (Toyoda *et al.*, 1992). Estos datos sugieren que la PLC podría estar involucrada en la cascada de señales en respuesta a la inducción en células vegetales.

A diferencia de lo que sucede en las células animales, en donde se requieren de altas concentraciones de neomicina para que se dé una respuesta (1 a 5 mM), en nuestro modelo se requieren concentraciones micromolares para lograr una disminución en el contenido de los alcaloides (Fig. 6, Capítulo III), al igual que lo reportado por Legendre *et al.* (1993), donde encontraron que concentraciones micromolares de neomicina (100-300 μ M) provocaban una inhibición en la acumulación de IP_3 , y por Franklin-Tong *et al.*, (1996), en donde con 150 μ M de neomicina se evitó el aumento del calcio inducido por la adición de mastosparán (un agonista de las proteínas G) y se inhibió el crecimiento del tubo polínico en *Papaver rhoeas*.

Los datos obtenidos hacen posible agregar una pieza más al rompecabezas acerca de la posible función de la PLC en la cascada de transducción de señales como respuesta a la inducción (Fig. 11). La macerozima es una mezcla de enzimas que hidrolizan la pared vegetal de las células de la raíz. Los fragmentos de oligosacáridos generados se podrían unir a un receptor localizado en la membrana plasmática. En células en suspensión de soya se demostró que en la membrana plasmática existe una proteína de 70 kDa, a la cual se unen con una alta especificidad oligosacáridos del tipo de los glucanos (Cosio *et al.*, 1990). También en células vegetales se ha encontrado a un receptor para un oligourónido derivado de la pared vegetal, al cual se une este con una alta afinidad (Farmer *et al.*, 1991). La unión del oligosacárido al receptor desencadena la cascada de señales en respuesta a la inducción. Este receptor podría activar a una proteína G heterotrimérica, la cual al disociarse activaría a la PLC, que hidrolizaría al PIP_2 , generando IP_3 y DAG (Fig. 11). El IP_3 se uniría a un receptor en la vacuola y de esta manera, se activaría la salida de calcio hacia el citosol. El aumento en los niveles del calcio citosólico induce la fosforilación de algunas proteínas. Luego de varios pasos de fosforilación, que en este caso no se conocen, la señal llegaría hasta el núcleo, en donde activaría la transcripción de los genes de la TDC, SSS, HMGR y PAL. La HMGR es codificada por varios genes y se podría estar activando sólo uno o incluso varios de ellos. La expresión de estos genes provocaría la síntesis de estas proteínas, con un consecuente aumento en su actividad, lo que se refleja en un aumento en la síntesis de los alcaloides indólicos. Dicho aumento ocurre únicamente en algunos de los alcaloides que sintetizan las raíces de *C. roseus*, como por ejemplo, la ajmalicina y la catarantina. En este trabajo se propone la existencia de canales metabólicos que dirigen los precursores hacia la síntesis de alcaloides específicos.

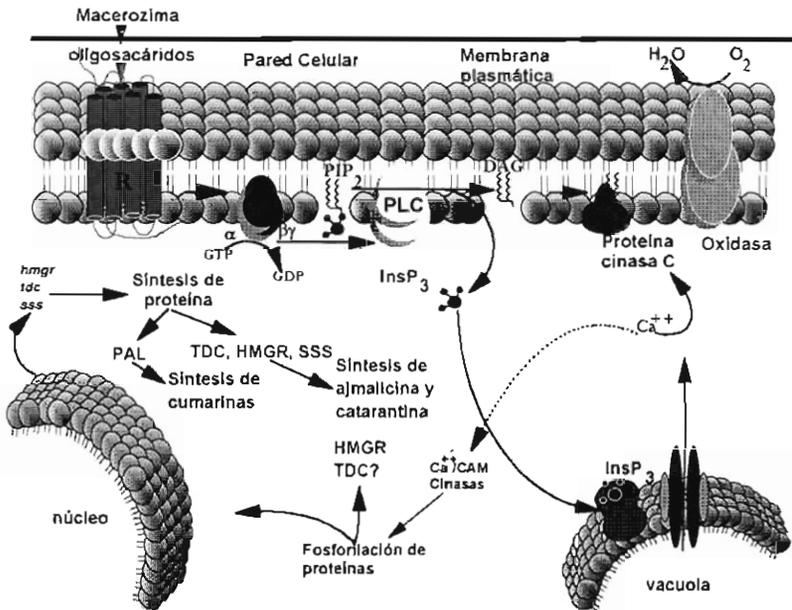


Figura 11. Modelo hipotético de la cascada de transducción de señales en respuesta a la inducción con la macerozima en las raíces transformadas de *C. roseus*. PLC: fosfolipasa C; TDC: triptofano descarboxilasa; HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa; SSS: estrictosidina sintasa; CAM: calmodulina; PIP₂: fosfatidil inositol trifosfato; IP₃: inositol trifosfato; G: proteína G heterotrómicas.

También se ha propuesto una función para las proteínas cinasas como mediadoras de la respuesta a un ataque de patógenos y se ha identificado una cinasa en células en suspensión de tabaco que aumentó su actividad en respuesta a inductores (Suzuki y Shinshi, 1995). En nuestro modelo se propone que las cinasas que se activan en respuesta a los inductores podrían fosforilar directamente a las enzimas de la vía de los alcaloides indólicos como la HMGR. En papa se ha identificado una proteína cinasa con propiedades muy similares a la familia de proteínas cinasas C de mamíferos, y se propone que esta cinasa participe en la respuesta de defensa provocada por los inductores en ese sistema experimental (Subramaniam *et al.*, 1997).

Los datos obtenidos plantean una serie de interrogantes acerca de la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos, las cuales son una interesante área de estudio. En el apartado de las perspectivas se plantean algunas alternativas que nos pueden ayudar en un futuro a entender con mayor claridad cómo se regula dicha vía.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden plantear las siguientes conclusiones:

a). Diferenciación-rediferenciación.

1) El nivel de diferenciación celular influyó la acumulación de los alcaloides indólicos, tanto en la cantidad como en el patrón de los alcaloides individuales producidos por los diferentes cultivos. Las células en suspensión acumularon 10 veces menos alcaloides que las raíces originales, mientras que estas y las raíces regeneradas acumularon cantidades similares entre sí.

2) El patrón de los alcaloides individuales cambió de manera drástica en la línea R2 con relación al control. La ajmalicina, de ser uno de los alcaloides mayoritarios en la línea J1, prácticamente desapareció en la línea R2. Lo anterior sugiere que la ajmalicina se podría estar convirtiendo con rapidez en otro compuesto, o bien, que los precursores se estén canalizando a otros alcaloides, como lo muestran los resultados obtenidos.

3) En este trabajo, se demostró que la actividad de la TDC y de la SSS se encuentran altamente reguladas por el grado de diferenciación de los cultivos. Esta regulación podría ser a nivel de los promotores de los genes u otro mecanismo que se desconoce. Su papel en la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos no está del todo clara, ya que con menos actividad de ambas enzimas en la línea R2 que en la J1, se acumuló la misma cantidad de estos compuestos. Se propone la existencia de metabolones o canales metabólicos que dirijan eficazmente a los precursores hacia la síntesis de los alcaloides.

4) La HMGR es regulada por el nivel de diferenciación de los cultivos; sin embargo, el descubrimiento de la vía alterna del IPP sugiere que el control de los precursores para los compuestos terpénicos no se encuentra en la vía del acetato-mevalonato, pero su para la síntesis de los alcaloides indólicos no se descarta, ya que ambas vías podrían estar participando a la vez.

b) Función de la PLC en respuesta a la inducción.

5) La macerozima provocó un aumento en la acumulación de los alcaloides totales, de la ajmalicina y de las cumarinas en las raíces transformadas de *C. roseus*, así como en las actividades de la TDC y de la PAL. Este aumento dependió de la dosis de macerozima utilizada. La actividad de la TDC aumentó en aproximadamente un orden de magnitud en relación al control con 1% de macerozima, y la actividad de la PAL aumentó aproximadamente 4 veces comparada con el control con 0.5% de macerozima. Ambas enzimas tuvieron la máxima inducción de su actividad a las 72 h después de realizada la inducción.

5) La macerozima provocó un comportamiento bifásico en la actividad de la PLC. A bajas concentraciones (0.05%) la macerozima provocó una disminución de la actividad de la enzima, mientras que con 1% de macerozima la actividad aumentó en aproximadamente un 35%. La máxima actividad de la PLC se observó a los 30 min después de iniciada la inducción con dos concentraciones de macerozima.

6) La neomicina, (un inhibidor de la actividad de la PLC) adicionada junto con la macerozima a las raíces transformadas, inhibió el aumento en la acumulación de los alcaloides indólicos causado por la macerozima. Los resultados obtenidos sugieren una posible participación de la PLC en la regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos en respuesta a la inducción en las raíces transformadas de *C. roseus*.

Perspectivas

La regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos sigue siendo una gran interrogante, y cada trabajo aporta una pieza pequeña al rompecabezas que ayudan aclararla. Después de contestar a una pregunta, surgen más que quedan pendientes por responder, lo que induce a profundizar sobre detalles más específicos. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo y las evidencias de la literatura, nos permiten plantear las siguientes perspectivas:

1) Analizar la posible participación de canales metabólicos que dirijan el flujo de los precursores de los alcaloides indólicos y hagan más eficiente su biosíntesis. En la discusión se propuso que la SSS podría estar participando en un metabolón; para comprobar esta hipótesis se podría purificar a la enzima y durante las diferentes etapas del proceso, monitorear la actividad de algunas de las enzimas que participan en la biosíntesis de ciertos alcaloides en particular. El resultado esperado sería una relación constante de las actividades enzimáticas. Se podría dar el caso que la relación no permaneciera constante, pero esto no implicaría que no exista el canal metabólico, ya que las proporciones de las enzimas libres y en el metabolón dentro de la célula puede variar para cada proteína del complejo. Existen otros criterios para determinar la existencia de los canales metabólicos que pudieran ser empleados en este caso, por ejemplo, estudiar el comportamiento cinético de las enzimas involucradas. Una de las ventajas para la célula de la canalización de los precursores de determinados compuestos es que se aumenta la eficiencia de la vía involucrada, la cual se da, principalmente debido a la proximidad de los sitios catalíticos de las diferentes enzimas participantes en el metabolón.

Otros experimentos a realizar para demostrar la presencia de un metabolón en el que estén involucradas las diferentes isoformas de la SSS es realizar cristalografía de rayos X, lo cual nos serviría para determinar la presencia de canales físicos entre las enzimas que podrían conformar este canal metabólico. La microscopía electrónica nos podría ayudar a determinar si existe una unión de varias enzimas que participan en la síntesis de un alcaloide en particular a elementos estructurales como las membranas o el citoesqueleto.

2) Dilucidar el posible origen del IPP para la síntesis de la secologanina. El modelo de desdiferenciación-diferenciación nos podría servir para analizar si el nivel de organización celular regula el suministro del IPP, ya sea por la vía del mevalonato o la vía alterna. Los experimentos a realizar serían la adición de precursores marcados de ambas vías a los diferentes estadios de diferenciación y determinar cuál de las vías tiene el aporte mayoritario de este precursor, si no es que sólo proviene de una de ellas. El uso de inhibidores de la actividad de la HMGR, como la mevinolina, aportaría evidencia sobre la participación de esta enzima en la síntesis de los precursores de la vía de los alcaloides indólicos. Alternativamente, se podrían utilizar inhibidores de alguna o algunas de las enzimas clave de la vía alterna (triosa fosfato/piruvato).

3) La cascada de señales en respuesta a la inducción es muy compleja y muy pocas piezas del rompecabezas han sido comprobadas. Aislar al inductor que se genera por la macerozima podría servir como herramienta para identificar al receptor que interacciona con éste. Una vez caracterizado el inductor, se le podría marcar, ya sea con compuestos fluorescentes o con compuestos radiactivos. Posteriormente se

realizarían experimentos de unión a los receptores y de competencia con el inductor no marcado. Estos experimentos podrían sugerirnos la presencia de un receptor en las raíces de *C. roseus*. El siguiente paso sería caracterizar al receptor.

Otros componentes de la cascada de transducción de señales son las proteínas G heterotriméricas. Para dilucidar la posible participación de estas proteínas en la respuesta al ataque de patógenos, se pueden utilizar agonistas de las proteínas G heterotriméricas como el mastosparán y evaluar su efecto sobre la síntesis de los alcaloides indólicos y sobre la expresión de algunas de las enzimas involucradas en su producción. El uso de antagonistas como la toxina pertussis, es otra estrategia para demostrar presencia de las proteínas G y su posible participación en este proceso.

Si las proteínas G heterotriméricas activan a la PLC durante la inducción, otra perspectiva que se plantea es el estudio y la caracterización de las proteínas cinasas que posiblemente participen en el proceso, así como las proteínas blanco de estas cinasas.

Bibliografia

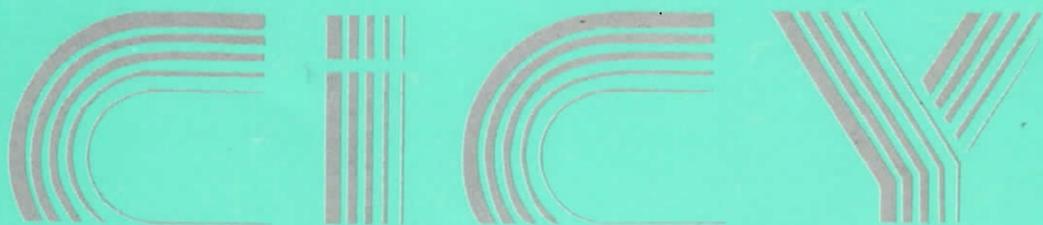
- Adam K.P. and J. Zapp. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry* **48**: 953-959 (1998).
- Aerts R.J., T. Van der Leer, R. Van der Heijden and R. Verpoorte. Developmental regulation of alkaloid production in *Cinchona* seedling. *J. Plant Physiol.*, **136**:86-91 (1990).
- Aerts R.J., W. Snoeijer, O. Aerts-Teerlink, E. Van der Meijen and R. Verpoorte. The distribution of strictosidine synthase activity and alkaloids in *Cinchona* plants. *Phytochemistry* **30**: 3571-3577 (1991).
- Aird E.L.H., J.D. Hamill, R.J. Robins and M.J.C. Rhodes. Chromosome stability in transformed hairy root cultures and the properties of variant lines of *Nicotiana rustica* hairy roots. In: Manipulating secondary metabolism in culture. Robins R.J. and M.J.C Rhodes (eds.). Cambridge University Press, London. pp. 137-144 (1988).
- Arigoni D., S. Sagner, C. Latzel, W. Einsenrech, A. Bacher and M.H. Zenk. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10600-10605 (1997).
- Arz M.C. and H.J. Grambow. Elicitor and suppressor effects on phospholipase C in isolated plasma membrane correlate with alterations in phenylalanine ammonia-lyase activity of wheat leaves. *J. Plant Physiol.* **146**: 64-70 (1995).
- Balsevich J., V. De Luca and W.G.W. Kurz. Altered alkaloid pattern in dark grown seedlings of *Catharanthus roseus*. The isolation and characterization of 4-deacetoxyvindoline^b: a novel indole alkaloid and proposed precursor of vindoline. *Heterocycles* **24**: 2415-2421 (1986).
- Bentley R. The shikimate pathway-A metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**: 307-384 (1990).
- Boss W. and M.O. Massel. Polyphosphoinositides are present in plant tissue culture cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**: 1018-1023 (1985).
- Canel C., M. I. Lopes-Cardoso, S. Whitmer, L. Van der Fits, G. Pasqualli, R. Van der Heijden, J.H. Hoge and R. Verpoorte. Effect of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta* **205**: 4141-419 (1998).
- Conrath U., A. Domard and H. Kauss. Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **8**: 152-155 (1989).
- Contin A., R. Van der Heijden, A.W.M. Lefeber and R. Verpoorte. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/piruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett.* **434**: 413-416 (1998).
- Cosio E.G., T. Frey, R. Verduyn, J. Van Boom and J. Ebel. High-affinity binding of a synthetic heptaglycoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Lett.* **271**: 223-226 (1990).
- Chappell J. Biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 521-547 (1995).

- Chappell J.** The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* **107**: 1-6 (1995a).
- De Luca V., J. Balsevich, R.T. Tyler, U. Eilert, B.D. Panchuk and W.G.W. Kurz.** Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* **125**: 147-156 (1986).
- De Luca V., J.A. Fernández, D. Cambell and W.G.W. Kurz.** Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **86**: 447-450, (1988).
- De Los Santos-Briones C., J.A. Muñoz-Sánchez, J. Chín-Vera, V.M. Loyola-Vargas and S.M.T. Hernández-Sotomayor.** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phospholipase C activity during the growing phase of *Catharanthus roseus* transformed roots. *J. Plant Physiol.* **150**: 707-713 (1997).
- Deus-Neumann B. and M.H. Zenk.** Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 1965-1974 (1982).
- De Waal A., A.H. Meijer and R. Verpoorte.** Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: purification and characterization of multiple forms. *Biochem. J.* **306**: 571-580 (1995).
- Döllner G., A.W. Alfermann and E. Reinhard.** Produktion von indolalkaloiden in calluskulturen von *Catharanthus roseus*. *Planta Med.* **30**: 14-20 (1976).
- Eilert U.** Elicitation: methodology and aspects of applications. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol.4. Cell Culture in Phytochemistry. Constabel F. and I.K. Vasil (eds.). Academic Press, Co., San Diego, Cal. U.S.A. pp. 153-196 (1986).
- Eilert U., De Luca V., F. Constabel and W.G.W. Kurz.** Elicitor-mediated induction of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **254**: 491-497 (1987).
- Enjuto M., V. Lumbreras, C. Marín and A. Boronat.** Expression of the *Arabidopsis HMG2* gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell* **7**: 517-527 (1995).
- Farmer E.E., T.D. Moloshok, M.J. Saxton and C.A. Ryan.** Oligosaccharine signalling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**: 3140-3145 (1991).
- Flores H.E. and P. Filner.** Hairy roots of Solanaceae as a source of alkaloids. *Plant Physiol.* **77**: 12s, (1985).
- Franklin-Tong V., B. Drobak, A. Allan P. Watkins and A. Trewavas.** Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-triphosphate. *Plant Cell* **8**: 1305-1321, (1996).
- Garnier F., C. Depierreux, G. Petit-Paly, S. Hamdi, J.-C. Chénieux and M. Rideau.** Induction of the accumulation of tryptamine and phenols by endogenous elicitors in cell suspension cultures of periwinkle. *J. Plant Physiol.* **148**: 701-706 (1996).

- Gabev E., J. Kasianowicz, T. Abbot and S. McLaughlin.** Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). *Biochem. Biophys Acta* **979**:105-112 (1989).
- Jung K.H., S.S. Kwak, C.Y. Choi and J.R. Liu.** An interchangeable system of hairy root and cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* for indole alkaloid production. *Plant Cell Rep.* **15**: 51-54 (1995).
- Kamada Y. and S. Muto.** Stimulation by fungal elicitor of inositol phospholipid turnover in tobacco suspension culture cells. *Plant Cell Physiol.* **35**: 397-404 (1994).
- Kombrink E. and K. Hahlbrock.** Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi: timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. *Plant Physiol.* **81**: 216-221 (1986).
- Knöss W., B. Reuter and J. Zapp.** Biosynthesis of the labdane marrubin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. *Biochem. J.* **326**: 449-454 (1997).
- Kurosaki F., Y. Tsurusawa and A. Nishi.** Breakdown of phosphatidylinositol during the elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Plant Physiol.* **85**: 601-604 (1987).
- Lawton M.A., R.A. Dixon, K. Hahlbrock and C.J. Lamb.** Rapid induction of the synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in elicitor-treated plant cells. *Eur. J. Biochem.* **129**: 593-601 (1983).
- Legendre L., Y.G. Yueh, R. Crain, N. Haddock, P.F. Heinsten and P.S. Low.** Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 24559-24563 (1993).
- Lichtenhaler H.L., J. Schwender, A. Disch and M. Rohmer.** Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplast proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**: 271-274 (1997).
- Lindsey K. and M.M. Yeoman.** The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell culture. *J. Exp. Bot.* **34**: 1055-1065 (1983).
- Maldonado-Mendoza I.E., R.J. Burnett and C. Nessler.** Nucleotide sequence of cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **100**: 1613-1614 (1992).
- Maldonado-Mendoza I.E., R.J. Burnett, M. López-Meyer and C. Nessler.** Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase by wounding and methyl jasmonate. Implications for the production of anti-cancer alkaloids. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **38**: 351-356 (1994).
- Medina-Bolivar F. and H. E. Flores.** Selection for hyoscyamine and cinnamoyl putrescine overproduction in cell and root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Physiol.* **108**: 1553-1560 (1995).
- Mérillon M., P. Doireau, A. Guillot, J.C. Chénieux and M. Rideau.** Indole alkaloid accumulation and tryptophan decarboxylase activity in *Catharanthus roseus* cells cultured in three different media. *Plant Cell Rep.* **5**: 23-26 (1986).
- Moreno P.R.H., R. Van der Heijden and R. Verpoorte.** Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **12**: 702-705 (1993).
- Navarrete-Loeza M.** Diseño de estrategias para la selección de variantes de interés a partir de una línea de raíces transformadas de *Catharanthus roseus*. Tesis de

- Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yuc. Mex. (1995).
- Nef C., B. Rio and H. Chrestin.** Induction of catharanthine synthesis and stimulation of major indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant Cell Rep.* **10**: 26-29 (1991).
- Pasquali G., O.J.M. Goddijn, A. De Waal, R. Verpoorte, R.A. Schilperoort, J.H.C. Hoge and J. Memelink.** Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol. Biol.* **18**: 1121-1131 (1992).
- Piña-Chable M.L., C. De Los Santos-Briones, J.A. Muñoz-Sánchez, I. Echevarría-Machado and S.M.T. Henández-Sotomayor.** Effect of different inhibitors on phospholipase C activity in *Catharanthus roseus* transformed roots. *Prostaglan. & Other Lip. Med.* **56**: 19-31 (1998).
- Repunte V.P., M. Kino-Oka, M. Taya and S. Tone.** Reversible morphology change of horseradish hairy roots cultivated in phytohormone-containing media. *J. Ferment. Bioeng.* **75**:271-275, (1993)
- Rhodes M.J.C., J. Hamill, A.J. Parr, R.J. Robins and N.J. Walton.** Strain improvement by screening and selection techniques. In: Manipulating Secondary Metabolism in Culture. Robins R.J. and M.J.C Rhodes (eds.). Cambridge University Press, London. pp. 83-93 (1988).
- Roewer I., C. Nessler and V. De Luca.** Transient induction of tryptophan decarboxylase (TDC) and strictosidine synthase (SSS) genes in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* **11**: 86-89 (1992).
- Sakuta M. and A. Komamine.** Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Constabel F. and I.K. Vasil (eds.) San Diego Academic Press Co., pp. 97-114 (1987).
- Sasse F., M. Buchholtz and J. Berlin.** Selection of cell lines of *Catharanthus roseus* with increased tryptophan decarboxylase activity. *Z Naturforsch.* **38c**: 916-922 (1983).
- Seitz H.U., V. De Luca and W.G.W. Kurz.** Elicitor-mediated induction of phenylalanine ammonia-lyase and tryptophan decarboxylase: accumulation of phenols and indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **18**: 71-78 (1989).
- Subramaniam R., C. Després and N. Brisson.** A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *Plant Cell* **9**: 653-664 (1997).
- Suzuki K. and H. Shinshi.** Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* **7**: 639-647 (1995).
- Toyoda K., T. Shiraiishi, H. Yoshioka, T. Yamada, Y. Ichinose and H. Oku.** Regulation of polyphosphoinositides metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* **33**: 445-452 (1992).

- Toyoda K., T. Shiraishi, T. Yamada, Y. Ichinose and H. Oku.** Rapid changes in polyphosphoinositides metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol.* **34**: 729-735 (1993).
- Vázquez-Flota F., O.A. Moreno-Valenzuela, M.L. Miranda Ham, J. Coello-Coello and V.M. Loyola-Vargas.** Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy roots cultures. Medium optimization and elicitation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **38**: 273-279 (1994).
- Whitmer S., C. Canel, D. Hallard, C. Goncalves and R. Verpoorte.** Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* **116**: 853-857 (1998).
- Yao K., V. De Luca and N. Brisson.** Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **7**: 1787-1799 (1995).
- Zenk M. H., H. El-Shagi, H. Arens, J. Stöckigt, E. W. Weiler and B. Deus.** Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension culture of *Catharanthus roseus*. IN: Plant tissue culture and its bio-technological application. Barz W., E. Reinhard and M. H. Zenk (eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 27-43 (1977).



CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN, A.C.

Ex-hacienda Xcumpich
Antigua carretera a Progreso Km. 7
Apartado Postal 87 C.P. 97310
Cordemex, Yucatán