



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DE LA SEÑALIZACIÓN FOSFOLIPÍDICA
EN LA REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
VAINILLINA ESTIMULADA POR EL ÁCIDO
SALICÍLICO EN SUSPENSIONES CELULARES DE
C. chinense JACQ.**

Tesis que presenta

BEATRIZ ADRIANA RODAS JUNCO

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2014



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “**Estudio de la señalización fosfolipídica en la regulación de la producción de vainillina estimulada por el ácido salicílico en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq.**” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Febrero 2014.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: M. en C. Beatriz A. Rodas Junco

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "El sistema de transducción de señales a través de fosfolípidos y las posibles repercusiones biotecnológicas en dos cultivos de interés comercial" con el apoyo del proyecto CONACYT No. 98352, bajo la dirección de la Dra. Teresa Hernández Sotomayor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 126769 otorgada en apoyo a mis estudios de Doctorado.

Agradezco a la Dra. Teresa Hernández Sotomayor el apoyo académico otorgado durante mi estancia en su laboratorio. Gracias por haber inculcado en mí un sentido de responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa como investigador.

Gracias a los Doctores Felipe Vázquez Flota, Lourdes Miranda Ham y Manuel Martínez Estévez por sus oportunas aportaciones y comentarios para llegar a cumplir el objetivo de este trabajo.

Hago un agradecimiento especial a mi comité tutorial integrado por la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, Dr. Manuel Martínez Estevez, Dr. Neftalí Ochoa Alejo y el Dr. Felipe Vázquez Flota, por las aportaciones y sugerencias vertidas durante cada evaluación de éste trabajo de tesis.

A mi comité revisor integrado por los Doctores, Teresa Hernández Sotomayor, Lourdes Miranda Ham, Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, Manuel Martínez Estévez, Neftalí Ochoa Alejo, Ignacio Islas Flores y Felipe Vázquez Flota, gracias por sus oportunas observaciones, correcciones y comentarios en la elaboración del documento de tesis.

De manera especial al M. en C. Armando Muñoz Sánchez por tu incondicional apoyo durante la parte experimental de este trabajo y por tu valiosa amistad.

Quiero agradecer a la M. en C. Miriam Monforte González por siempre brindarme su apoyo técnico durante la realización de la tesis.

Finalmente quiero agradecer a: Fernando, Eduardo, Will, Arely, Joel, Roberto, Julieta por compartir momentos agradables y tristes pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero y nunca los olvidaré.

DEDICATORIAS

A tí Dios que me diste la oportunidad de vivir esta etapa y de regalarme una familia maravillosa

A mi pequeña hija Angélica quien me prestó el tiempo que le pertenecía para poder alcanzar esta meta y me motivó siempre con un abrazo y un "te quiero mami".

A mi esposo Arturo, quien me brindo su amor, su estímulo y apoyo constante. Su comprensión y paciente espera para que pudiera terminar mis estudios son evidencia de su gran amor. Gracias!

Con todo mi cariño y mi amor para tí mamá y papá que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A los que nunca dudaron que alcanzaría esta meta: mis hermanos Jorge y Lupita.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....1

CAPÍTULO I.....3

ANTECEDENTES3

1.1 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.3

1.2 SEÑALIZACIÓN FOSFOLIPÍDICA4

1.2.1 FOSFOLIPASAŞ.5

1.2 FOSFOLIPASA C.6

1.2.3 PLC EN PLANTAS.8

1.2.4 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PLC.9

1.2.5 INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA PLC.10

1.2.6 FOSFOLIPASA D.13

1.2.7 PLD EN PLANTAS.14

1.2.8 TRANSFOSFATIDILACIÓN.....15

1.2.9 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PLD.16

1.2.10 INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA PLD.17

1.3 METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS.18

1.3.1 INDUCTORES18

1.3.2 ÁCIDO SALICÍLICO19

1.3.3 BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO SALICÍLICO20

1.3.4 FUNCIÓN DEL AS EN PLANTAS21

ÍNDICE

1.3.5 PROTEÍNAS DE UNIÓN AL AS.....	22
1.3.6 AS Y LA SEÑALIZACIÓN FOSFOLIPÍDICA	24
1.4 GÉNERO <i>CAPSICUM</i>	25
1.4.1 IMPORTANCIA DEL CHILE EN MÉXICO.....	25
1.4.2 BIOSÍNTESIS DE LOS CAPSAICINOIDES.....	26
1.4.3 INDUCCIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN <i>CAPSICUM</i>	29
1.5 FENILALANINA AMONIA LIASA.....	29
1.5.1 REGULACIÓN DE LA PAL.....	31
1.5.2 EL ÁCIDO SALICÍLICO Y LA PAL.....	31
1.5.3 SEÑALIZACIÓN FOSFOLIPÍDICA Y EL METABOLISMO SECUNDARIO.....	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
JUSTIFICACIÓN.....	34
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	36
CAPÍTULO II	51
SALICYLIC ACID INDUCES VANILLIN SYNTHESIS TROUGH THE PHOSPHOLIPID SIGNALING PATHWAY IN <i>CAPSICUM CHINENSE</i> ÇELL CULTURES.....	51
2.1 INTRODUCTION.....	51
2.2 MATERIALS AND METHODS.....	53

2.2.1 MATERIALS.....	53
2.2.2 CELL CULTURE AND SA TREATMENT.	53
2.2.3 PHOSPHOLIPASE INHIBITOR TREATMENT.....	53
2.2.4 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY.....	54
2.2.5 PROTEIN EXTRACT PREPARATION.....	54
2.2.6 PAL ACTIVITY.	55
2.2.7 VANILLIN DETERMINATION.....	55
2.2.8 TOTAL SA MEASUREMENT.	56
2.2.9 DATA PRESENTATION.	56
2.3 RESULTS.	56
2.3.1 EFFECT OF SA ON PAL ENZYMATIC ACTIVITY AND VANILLIN LEVELS.	56
2.3.2 EFFECT OF PHOSPHOLIPASE INHIBITORS ON CELL STRUCTURE.....	57
2.3.3 U73122 AND NEOMYCIN REDUCE PAL ACTIVITY AND SA STIMULATED VANILLIN LEVELS.	59
2.3.4 PLD REGULATES PAL ACTIVITY AND ACCUMULATION OF VANILLIN IN <i>C. CHINENSE</i>	59
2.3.5 TOTAL ENDOGENOUS SA PRODUCTION.	62
2.4 DISCUSSION.	63
REFERENCES.....	67
CAPÍTULO III	73
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA FOSFOLIPASA D Y EL ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE MARCAJE <i>IN VIVO</i> DE LOS FOSFOLÍPIDOS EN SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. CHINENSE</i>	73
3.1 INTRODUCCIÓN.....	73

ÍNDICE

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
3.2.1 CULTIVO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. CHINENSE</i>	74
3.2.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> DE LA PLC Y LA PLD.	74
3.2.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.	75
3.2.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> DE LA PLC.	75
3.2.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> DE LA PLD.	75
3.2.7 MARCAJE <i>IN VIVO</i> DE LOS FOSFOLÍPIDOS EN CÉLULAS DE <i>C. CHINENSE</i>	76
3.2.8 EXTRACCIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS.....	76
3.2.9 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC).	76
3.3 RESULTADOS	77
3.3.1 EFECTO DE LA NEOMICINA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> DE LA PLC EN SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. CHINENSE</i>	77
3.3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA FOSFOLIPASA D EN CÉLULAS INCUBADAS CON LA NEOMICINA.	77
3.3.3 ESTABLECIMIENTO DEL MARCAJE <i>IN VIVO</i> DE LOS FOSFOLÍPIDOS EN CÉLULAS DE <i>C. CHINENSE</i>	79
3.4 DISCUSIÓN.....	82
BIBLIOGRAFÍA.....	84
CAPÍTULO IV.....	87
EFFECTO DEL AS EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE LA FENILALANINA AMONIA LIASA EN LAS SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. CHINENSE</i>.....	87
4.1 INTRODUCCIÓN.....	87

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	88
4.2.1 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL POR EL MÉTODO DEL TRIZOL.....	88
4.2.2 SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNC).....	88
4.2.3 CONDICIONES DE REACCIÓN DE LA PCR.....	89
4.2.4 ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	89
4.2.5 DISEÑO DE LOS INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PAL.....	89
4.2.6 GEN DE REFERENCIA: FACTOR DE ELONGACIÓN-1 α	90
4.3 RESULTADOS.....	90
4.3.1 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL.....	90
4.3.2 DISEÑO DE LOS INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PAL.....	92
4.3.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA A LA PAL.....	94
4.3.4 AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE REFERENCIA <i>EF1α</i>	97
4.3.5 SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS EN LA PCR.....	98
4.3.6 EFECTO DEL AS EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DEL GEN DE LA PAL.....	99
4.4 DISCUSIÓN.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	102
CAPÍTULO V.....	105
DISCUSIÓN GENERAL.....	105
BIBLIOGRAFÍA.....	109

CAPÍTULO VI.....113

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....113

6.1 CONCLUSIONES GENERALES.....113

6.2 PERSPECTIVAS.....114

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Reconocimiento del receptor hacia la hormona o al estímulo ambiental.....	3
Figura 1.2 Señalización fosfolipídica en plantas.....	5
Figura 1.3 Sitio de hidrólisis en un fosfolípido por las enzimas fosfolipasas.....	6
Figura 1.4 Estructura de los dominios y organización de las PI-PLC.....	10
Figura 1.5 Inhibidores de la señalización mediada por la PLC.....	13
Figura 1.6 Estructura de los dominios de la PLD en <i>Arabidopsis</i>	14
Figura 1.7 Reacciones catalizadas por la PLD.....	15
Figura 1.8 Marcaje diferencial para distinguir la vía de formación del PA.....	16
Figura 1.9 Estructura química del ácido salicílico.....	19
Figura 1.10 Ruta de biosíntesis del ácido salicílico.....	21
Figura 1.11 Frutos del género <i>Capsicum</i>	25
Figura 1.12 Ruta de biosíntesis de los capsaicinoides.....	28
Figura 1.13 Reacción catalizada por la fenilalanina amonía liasa.....	30
Figura 1.14 Estrategia Experimental.....	35
Figura 2.1 Salicylic acid increases PAL activity and vanillin content in <i>C. chinense</i> cells.....	57
Figura 2.2 Effect of PLC-inhibitors on cellular morphology of <i>C. chinense</i> suspension cells.....	58
Figura 2.3 Effect of 1-butanol on <i>C. chinense</i> cellular morphology.....	58

Figura 2.4 PLC-inhibitor suppress vanillin accumulation and PAL activity in <i>C. chinense</i> suspensions cells.....	61
Figura 2.5 Reduction of vanillin accumulation and PAL activity in <i>C. chinense</i> cells in the presence of 1-butanol.....	62
Figura 2.6 Effect of phospholipase inhibitors on total endogenous SA levels in <i>C. chinense</i> suspension cells	63
Figura 3.1 Efecto de la neomicina en la actividad <i>in vitro</i> de la PLC en suspensiones celulares de <i>C. chinense</i>	78
Figura 3.2 Efecto de la neomicina en la actividad enzimatica <i>in vitro</i> de la PLC y la PLD en células de <i>C. chinense</i>	78
Figura 3.3 Curso temporal de incorporación de ³² P-ortofosfato en los fosfolípidos de las células de <i>C. chinense</i>	81
Figura 4.1 Extracción del ARN total.....	91
Figura 4.2 Secuencia del gen que codifica a la PAL.....	93
Figura 4.3 Amplificación por PCR del gen que codifica a la PAL a partir del ADNc obtenido en las células de <i>C. chinense</i> utilizando los iniciadores PALF883/PALR1083.....	95
Figura 4.4 Amplificación por PCR del gen que codifica a la PAL a partir del ADNc obtenido en las células de <i>C. chinense</i> utilizando los iniciadores FPAL2/RPAL2.....	96
Figura 4.5 Amplificación del gen que codifica a PAL y del gen <i>EF1α</i> a partir del ADNc obtenido en las células de <i>C. chinense</i> utilizando los iniciadores FPAL2/RPAL2.....	97

Figura 4.6 Efecto del AS sobre la acumulacion de los transcritos de PAL en las células de <i>C. chinense</i>	100
Figura 5.1 Modelo conceptual del papel del AS en la síntesis de vainillina involucrando a la vía de señalización fosfolípida.....	107

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 4.1 Iniciadores utilizados para la amplificación del gen de la PAL y el gen del factor de elongación 1 α por la PCR en este estudio.....89

Cuadro 4.2 Condiciones de la PCR para la amplificación del gen que codifica a la PAL utilizando los iniciadores FPAL2/RPAL2.....94

Cuadro 4.3 Análisis del fragmento de ADNc de 305 pb del gen de PAL obtenido por PCR y secuenciado. Comparación con el Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) del fragmento obtenido de 305 pb97

ABREVIATURAS

pAMT	p-amino transferasa
ABA	Ácido abscísico
ACL	Proteína acarreadora de grupos acilos
AMPc	Adenosin-monofosfato cíclico
AOS	Aleno óxido sintasa
AS	Ácido salicílico
ASGT	Glucosiltransferasa ácido salicílico
ATP	Adenosin-trisfosfato
BA	Ácido benzóico
BCA	Ácido bicinconfínico
BCAT	Aminotransferasa de aminoácidos ramificados
BCAT	Aminotransferasa de aminoácidos ramificados
BSA	Albúmina sérica bovina
C2	Dominio de unión a calcio
CA	Ácido <i>trans</i> -cinámico
Ca3H	Ácido cumárico 3-hidroxilasa
Ca4H	Ácido cinámico 4 hidroxilasa
CDPK	Proteína cinasa dependiente de calcio
COMT	Ácido cafeico σ -metiltransferasa

CS	Capsaicina sintasa
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGGP	Diacilglicerol pirofosfato
DGK	Diacilglicerol cinasa
DOC	Desoxicolato de sodio
DRY	Dominio de interacción con proteína G
DST	Desaturasa
EGTA	Etileno glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N,N- ácido tetraacético
FAT	Ácido graso tioesterasa
FFA	Ácidos grasos libres
GDP	Guanosín difosfato
GMPc	Guanosín-monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
GTP	Guanosín trifosfato
H ³ -PC	Fosfatidil colina tritiada
HKD	Dominio catalítico de la fosfolipasa D
HR	Respuesta hipersensible
InsP ₆	Inositol hexafosfato
IP ₃	Inositol (1,4,5-trifosfato)

IP ₄	Inositol tetrafosfato
IP ₅	Inositol pentafofato
JA	Ácido jasmónico
KAS	β-cetoacil sintasa
LPL	Lisofosfolípidos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MeJa	Jasmonato de metilo
MS	Murashike y Skoog
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PA	Ácido fosfatídico
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PBut	Fosfatidilbutanol
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PH	Dominio de homología a pleckstrina
PI	Fosfatidilinositol
Pi	Fósforo inorgánico
PI3K	Fosfatidilinosítido-3-cinasa

PI4K	Fosfatidilinosítido-4-cinasa
PI5K	Fosfatidilinosítido-5-cinasa
PIP	Fosfatidilinositol-4-fosfato
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol-trifosfato
PI-PLC	Fosfoinosítidos-PLC
pKa	Constante de disociación ácida
PKC	Proteína cinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLB	Fosfolipasa B
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PR	Proteína relacionada a la patogénesis
PX	Dominio homólogo a Phox
RH	Respuesta hipersensible
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SABP	Proteína de unión a ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio

SEM	Scanning electron microscopy
SH	Dominio homólogo a Src
TCA	Ácido tricloroacético
Tert	Tertbutanol

RESUMEN

La respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés se puede dar a través del reconocimiento del estímulo y la posterior transducción de la señal a través de segundos mensajeros que envían la información para la regulación del metabolismo y la expresión de genes de defensa. La transducción de señales a través de los fosfolípidos es mediada por las fosfolipasas que catalizan la hidrólisis de fosfolípidos estructurales de la membrana plasmática para generar segundos mensajeros; como el fosfatidilinositol 4-5 bisfosfato (PIP₂) cuya ruptura por la fosfolipasa C (PLC) genera dos productos: el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). Por su parte, la fosfolipasa D (PLD) hidroliza a la fosfatidilcolina para generar ácido fosfatídico (PA), cada uno con actividad de segundo mensajero.

La señalización fosfolípídica también está involucrada en la respuesta de la planta a la señal por fitorreguladores como el ácido salicílico (AS). La relación entre la señalización fosfolípídica, el AS y el metabolismo secundario aun no ha sido completamente entendida. En nuestro modelo de estudio con suspensiones celulares de *C. chinense*, se evaluó si la señalización fosfolípídica modula la producción estimulada por el AS a través de la regulación de la fenilalanina amonía liasa (PAL), una enzima importante en la vía biosintética de los fenilpropanoides. Nuestros resultados mostraron que el AS regula la actividad de la PAL y en consecuencia la producción de vainillina, la cual fue disminuida o revertida cuando las células se expusieron a los inhibidores de la señalización de los fosfoinosítidos-PLC (PI-PLC), la neomicina y el U73122. La exposición de las células con el inhibidor de la producción de PA, el 1-butanol, modificó la actividad de la PAL y redujo la producción de vainillina estimulada por el AS. Los resultados sugieren que los segundos mensajeros generados a través de la PLC y la PLD podrían estar modulando la producción de vainillina estimulada por el AS a través de la regulación de enzimas claves en la ruta biosintética de los capsaicinoides. Por otro lado, se observó que la inhibición de la señalización por la neomicina es compensado con un incremento en la actividad *in vitro* de la PLD. Los niveles endógenos del AS se evaluaron en todas las células tratadas con los inhibidores encontrando que los niveles basales del mismo no fueron alterados en las células tratadas solo con los inhibidores. Finalmente, se evaluó el efecto del AS en los niveles de expresión de los transcritos de la PAL. Los resultados muestran que la

regulación de la enzima PAL podría estar ocurriendo a nivel transcripcional en respuesta al AS causando un incremento en la actividad de ésta enzima y en los niveles de vanillina en las suspensiones celulares de *C. chinense*.

ABSTRACT

The response of plants to different types of stress can occur through recognition of the stimulus and the subsequent signal transduction through second messengers that send information to the regulation of metabolism and the expression of defense genes. Signal transduction through the phospholipids is mediated by phospholipases, which catalyze the hydrolysis of structural phospholipids of the plasma membrane to produce second messengers, such as phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) whose cleavage by phospholipase C (PLC) generates two products, the inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG), meanwhile phospholipase D hydrolyzes phosphatidylcholine to produce phosphatidic acid (PA), each second messenger activity. Phospholipid signaling is also involved in plant responses to phytohormones such as salicylic acid (SA).

The relationship between phospholipid signaling, SA and secondary metabolism is not fully understood. Using a *Capsicum chinense* cell suspension as a model, we evaluated whether phospholipid signaling modulates SA-induced vanillin production through the regulation of phenylalanine ammonia lyase (PAL), a key enzyme in the biosynthetic pathway of phenylpropanoids. Salicylic acid was found to elicit PAL activity, and consequently, vanillin production, which was diminished upon exposure to the phosphoinositide-phospholipase C (PI-PLC) signaling inhibitors: neomycin and U73122. Exposure to phosphatidic acid inhibitor, 1-butanol, altered PLD activity and prevented SA-induced vanillin production. Our results suggest that PLC- and PLD-generated secondary messengers may be modulating SA-induced vanillin production through the activation of key biosynthetic pathway enzymes of capsaicinoids. On the other hand, inhibition of PLC signaling by neomycin is compensated by an increase in the *in vitro* activity of the PLD. Endogenous SA levels were evaluated in cells treated with the inhibitors and it was found that basal SA levels remained unchanged in cells treated with the inhibitor alone. Finally, the effect of SA in the expression levels of PAL was evaluated. Our results showed that regulation could be occurring at the transcriptional level in response to SA, and therefore, causing an increase in PAL's enzymatic activity and thus an increase in vanillin levels.

INTRODUCCIÓN

Las plantas y los animales comparten algunos mecanismos de respuesta a las condiciones adversas que se presentan en su medio ambiente. En el caso de las plantas, han desarrollado estrategias eficientes para poder adaptarse a los diferentes tipos de estrés. El estrés en plantas, puede definirse como un cambio en las condiciones de crecimiento dentro de su hábitat, que altera o interrumpe su homeostasis metabólica (Shulaev *et al.*, 2008). La respuesta de las plantas al estrés se da a través del reconocimiento del estímulo y la posterior transducción de la señal mediante segundos mensajeros, que envían la información para la regulación del metabolismo y la expresión de los genes necesarios (Hong *et al.*, 2010).

Los fosfolípidos son componentes estructurales de la membrana plasmática, además de ser reconocidos como importantes mensajeros que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como también en la respuesta celular a los cambios ambientales o de estrés (Xue y Chen, 2009). En la transducción de señales que se generan a través de los fosfolípidos participan las fosfolipasas que catalizan la hidrólisis de estos compuestos de la membrana plasmática para generar segundos mensajeros. La fosfolipasa C hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂), generando el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG), mientras que, la fosfolipasa D hidroliza fosfolípidos estructurales de la membrana dando lugar al ácido fosfatídico (PA) y liberando la cabeza polar del fosfolípido (Munnik y Nielsen, 2011)

La señalización fosfolipídica está involucrada en la respuesta de la planta a los fitorreguladores. Las fitohormonas son utilizadas también como inductores que promueven la producción de algunos metabolitos secundarios en algunas especies (Angebra *et al.*, 2006; Babar-Ali *et al.*, 2007; Canche-Chay, 2006; Chen *et al.*, 2006). Los inductores son percibidos por los receptores proteicos que generalmente están presentes en las membranas de las células y esto genera que se transduzca la señal y permita la regulación de las enzimas que están implicadas en la biosíntesis de esos compuestos (Ramani y Chellilah, 2007). Se ha demostrado que el ácido salicílico (AS) es un regulador de varios procesos fisiológicos en las plantas y es esencial en la expresión de algunos genes de defensa (Raskin *et al.*, 1990).

INTRODUCCIÓN

En nuestro grupo de trabajo, se evaluó el efecto del AS en la vía de transducción de señales a través de fosfolípidos en suspensiones celulares de chile encontrándose que la inducción con AS regula las actividades de la PLC y la PLD (Altúzar-Molina, 2008). En este sentido, también, se analizó el efecto del AS sobre la producción de vainillina (un intermediario de la ruta de biosíntesis de capsaicinoides) determinando que se incrementaba su producción (Altúzar-Molina *et al.*, 2011). Por lo anterior, en la presente investigación se propuso entender cómo el AS regula la producción de vainillina, así como su participación en este proceso de la transducción de señales vía fosfolípidos en las suspensiones celulares de chile habanero.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. 1 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Las plantas están sujetas a diferentes tipos de estrés, ya sea de tipo biótico o abiótico, que en consecuencia afectan su crecimiento y desarrollo. Las plantas poseen múltiples mecanismos para protegerse de cualquier situación adversa, y así ajustarse a las condiciones ambientales externas. Para ello han desarrollado mecanismos de comunicación con el objetivo final de producir cambios en su metabolismo acorde con el estímulo que desencadenó tal respuesta. Estos mecanismos de producción, reconocimiento y procesamiento de una señal extracelular son llamados sistemas de transducción de señales (Figura 1.1) (Ramani y Chellilah, 2007).

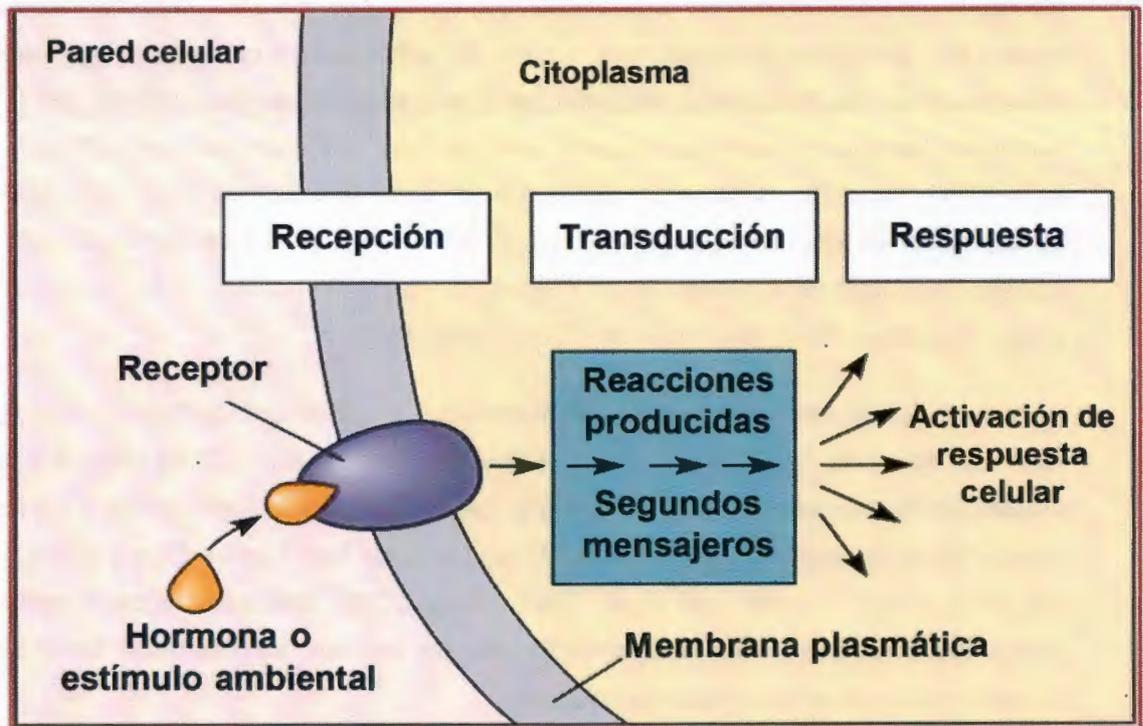


Figura 1.1 Reconocimiento del receptor hacia la hormona o al estímulo ambiental (Tomado de Ramani y Chellilah, 2007).

En las plantas, las vías de señalización reguladas (a menudo de manera concertada) en respuesta a diversos tipos de estrés, son diversas incluyendo el flujo de Ca^{2+} , la actividad de proteínas fosfatasas y de proteínas cinasas, así como la cascada de señalización de lípidos (Wang, 2002). En estos sistemas de transducción de señales participan enzimas que generan directa o indirectamente segundos mensajeros. Los segundos mensajeros más estudiados son los iones Ca^{2+} , el AMP cíclico (AMPC), el GMP cíclico (GMPc) y los derivados de fosfolípidos, como el IP_3 , el DAG, el PA y el fosfatidilinositol-trifosfato (PIP_3) (Wang, 2001; Munnik y Nielsen, 2011).

1.2 SEÑALIZACIÓN FOSFOLÍPIDICA

Los fosfolípidos proporcionan no sólo la base estructural de las membranas en las células, sino que también son reguladores celulares (Xue y Chen, 2009). La hidrólisis de los fosfolípidos por las fosfolipasas es a menudo el primer paso en la generación de lípidos y mensajeros derivados de ellos. La transducción de señales vía fosfolípidos consiste en la generación de segundos mensajeros, a partir de la hidrólisis o cambios en el estado de fosforilación de los fosfolípidos presentes en la membrana plasmática (Wang, 2004). Los segundos mensajeros generados a partir de ellos son importantes en la respuesta celular de la planta hacia los cambios ambientales o condiciones extremas (Xue y Chen, 2009). La activación de las fosfolipasas D (PLD), C (PLC) y A_2 (PLA_2) se ha relacionado con diversos procesos de señalización en plantas, como los hormonales y las respuestas al estrés (Chapman, 1998; Munnik *et al.*, 1998; Wang, 2001).

A menudo, estas fosfolipasas están involucradas en una respuesta celular (Fan *et al.*, 1997; Jacob *et al.*, 1999; Staxén *et al.*, 1999; Den Hartog *et al.*, 2001) (Figura 1.2). La producción de mensajeros lipídicos, como el PA, el DAG, los lisofosfolípidos, y los ácidos grasos libres, se puede atribuir a la acción de múltiples fosfolipasas (Ryu y Wang 1996; Lee *et al.*, 1997; Van der Luit *et al.*, 2000, Wang, 2000). Estos hallazgos aumentan la posibilidad de un posible entrecruzamiento entre las fosfolipasas para poder llevar a cabo la mediación de diversas funciones celulares.

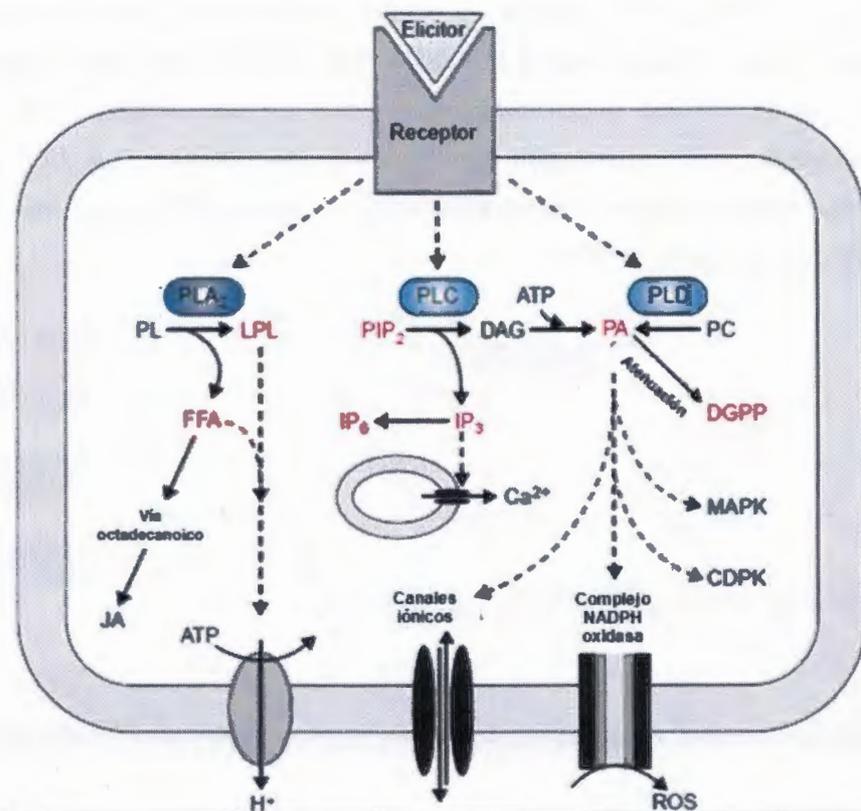


Figura 1.2 Señalización fosfolípídica en plantas. LPL: (lisofosfolípidos); FFA (ácidos grasos libres), JA (ácido jasmónico), PLA₂ (fosfolipasa A); PLC (fosfolipasa C); PLD (fosfolipasa D); PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato), DAG (diacilglicerol); IP₃ (inositol 4,5 trifosfato); InsP₆ (inositol hexafosfato); PA (ácido fosfatídico); DGPP (diacilglicerol pirofosfato); ROS (especies reactivas de oxígeno) (Tomado de Laxalt y Munnik, 2002).

1.2.1 Fosfolipasas

La degradación de los fosfoinosítidos requiere la hidrólisis enzimática de los diversos enlaces éster para liberar sus correspondientes productos (Laxalt y Munnik, 2002). Las enzimas encargadas de dicho proceso se llaman fosfolipasas, las cuales en su mayoría son reguladas por señales extracelulares. Los sustratos comunes para este tipo de enzimas son los fosfolípidos. De acuerdo a los sitios de hidrólisis de las fosfolipasas, éstas se agrupan en las siguientes familias: A₁, A₂, B, C y D (Figura 1.3) (Wang, 2001; Meijer y Munnik, 2003). Cada una de esas familias se encuentra dividida en subfamilias, basándose en sus secuencias, propiedades bioquímicas o una combinación de ambas

(Wang, 2002). La fosfolipasa A₁ hidroliza el enlace acil-éster sn-1 de los fosfolípidos para generar ácidos grasos libres y 2-acil-1 lisofosfolípidos. La PLB remueve secuencialmente dos ácidos grasos de los glicerofosfolípidos para generar ácidos grasos libres y glicerofosfodiésteres solubles en agua. Los genes de las enzimas PLA, PLB y PLC han sido clonados e identificados en animales y levaduras (Wang, 2001), mientras que la PLD lo ha sido principalmente en plantas.

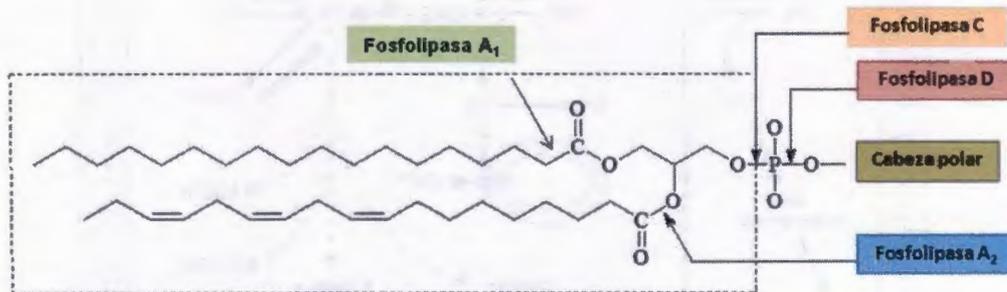


Figura 1.3 Sitio de hidrólisis en un fosfolípido por las enzimas fosfolipasas (Modificado de Wang, 2002).

1.2.2 Fosfolipasa C

La fosfolipasa C (PLC) es una fosfodiesterasa que remueve la cabeza polar unida a un fosfato de los fosfolípidos (Figura 1.3). La PLC hidroliza a los lípidos presentes en la membrana, los cuales constituyen menos del 0.1% del total de los lípidos. Esta enzima participa con varias fosfoinosítido-cinasas que incluyen a la fosfatidilinosítido-3-cinasa (PI3K), la fosfatidilinosítido-4-cinasa (PI4K) y la fosfatidilinosítido-5-cinasa (PI5K), así como fosfatasas, en un ciclo importante para la síntesis e hidrólisis de los fosfoinosítidos. La formación del PIP₂ está catalizada por las PIP-cinasas que sucesivamente convierten el fosfatidilinositol (PI) a fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP), y luego, a PIP₂. Los polifosfatos de inosoles pueden ser fosforilados para generar IP₆ por la polifosfato-inositol cinasa. El sustrato para la PLC es el PIP₂, el cual es hidrolizado y genera dos importantes segundos mensajeros: el IP₃ citosólico y el DAG que permanece asociado a la membrana plasmática (Xue y Chen, 2009).

El IP₃ es soluble en agua, y se difunde rápidamente a través del citosol. La principal función de IP₃ es movilizar el Ca²⁺ de los almacenes internos no mitocondriales, por lo que existe un incremento transitorio en el contenido de Ca²⁺ citosólico. La liberación de Ca²⁺ se encuentra bien documentada en animales y en numerosas especies de plantas (Krinke *et al.*, 2007); sin embargo, el gen correspondiente al receptor de IP₃ en plantas aún no ha sido identificado o aislado.

En muchas especies de plantas superiores se han evaluado los cambios en los niveles de IP₃ en respuesta a diversos estímulos, como la luz, el frío, el estrés oxidativo, el estrés hiperosmótico, las hormonas vegetales y los patógenos inductores (Krinke *et al.*, 2009). Se señala que la localización del receptor putativo del IP₃ en plantas podría estar en el tonoplasto; ya que su presencia ha sido evaluada en las membranas de varios organelos utilizando diversas técnicas (radiactividad, flujo de Ca²⁺, anticuerpos, minielectrodos del IP₃); sin embargo, se sugiere que el receptor putativo se localice en la membrana de la vacuola, ya que es el organelo donde se da la mayor acumulación de Ca²⁺ intracelular, además de que su volumen representa más del 90% del citoplasma (Krinke *et al.*, 2007; Munnik y Testerink, 2008).

El hecho de no poder identificar de manera precisa los receptores de IP₃ en plantas ha permitido suponer que, al igual que en las levaduras, el IP₃ generado es rápidamente fosforilado a IP₆, y que éste puede funcionar como una molécula de señalización en la regulación de la transcripción de genes o en la exportación del ARNm (Munnik y Nielsen, 2011). En plantas, el IP₆, mejor conocido como fitato es un compuesto que sirve de reserva de fosfatos en la semilla y otros tejidos de almacenamiento. No obstante, se ha demostrado que el IP₆ estimula la liberación de Ca²⁺ de sus almacenes intracelulares en las células guardas, apuntando así a su función como molécula de señalización en plantas (Munnik y Verneer, 2010). El DAG, por su parte, es un lípido insoluble que permanece en la membrana (Gross *et al.*, 1992) y puede activar una clase de proteínas cinasas denominadas proteínas cinasas C (PKC) (Legendre *et al.*, 1993). En plantas aún no se ha identificado algún miembro de esta familia de cinasas, sino por el contrario, hay evidencias de que el DAG rápidamente se convierte en PA por la actividad de la DAG cinasa (DGK) (Munnik y Testerink, 2008). De ésta manera, dos cascadas de señalización son iniciadas por la PLC, involucrando un aumento en el Ca²⁺ citosólico, lo que resulta en

la modulación de elementos de respuesta sensibles a Ca^{2+} , o bien, del efecto del PA o de otros lípidos sobre la actividad de diferentes proteínas (Munnik y Testerink, 2008; Xue y Chen, 2009).

1.2.3 PLC en plantas

Se han identificado dos clases de PLC en las plantas y categorizados de acuerdo al sustrato sobre el que actúan. La PC-PLC puede usar a la fosfatidilcolina como sustrato; sin embargo, no tiene una preferencia específica por éste. En contraste, la segunda clase, las PI-PLC prefieren al fosfatidilinositol y sus derivados. A pesar de que ambas clases se agrupan como PLC, los genes identificados que codifican a proteínas como miembros de estos dos grupos no tienen dominios estructurales en común y se piensa que han evolucionado de forma independiente (Dowd y Gilroy, 2010).

En *Arabidopsis* existen nueve genes activos que codifican las PI-PLC. Los genes de las PI-PLC también se han identificado en varias especies de plantas como arroz, maíz, avena, tabaco y canola (Chen *et al.*, 2011). En el caso de las PC-PLC, existen 6 genes putativos que se han identificado únicamente en *Arabidopsis*. Los estudios realizados con las PC-PLC sugieren que pueden estar involucradas en la respuesta al estrés; además de en la señalización celular en plantas (Wimalasekera *et al.*, 2010)

La actividad de la PLC en mamíferos esta constituida por una diversa familia de enzimas que difieren en su estructura y distribución en los tejidos. Son proteínas monoméricas y se dividen en 6 subfamilias: β , γ , δ , ζ , ϵ y η (Figura 1.4). Todas las PLC de animales presentan cinco dominios conservados: un dominio de homología a pleckstrina (PH) en la región N-terminal que permite establecer la interacción de la proteína con los fosfolípidos de la membrana; un dominio manos EF que es útil en la unión a Ca^{2+} ; un dominio X y otro Y que constituyen el dominio catalítico de la enzima y un dominio C2 de unión a Ca^{2+} en la región C-terminal (Figura 1.4) (Munnik y Testerink, 2008).

La isoenzima PLC ζ representa la más simple de las PI-PLC, ya que no posee el dominio PH; por lo que se le considera similar a la de plantas, las cuales no poseen este dominio, así como la carencia de la región amino N-terminal en el dominio EF-hand (Wang, 2002; Munnik y Testerink, 2008). Las otras subfamilias poseen un dominio PH y otras regiones

de secuencia conservados.

1.2.4 Mecanismos de regulación de la PLC

La formación del IP_3 puede ser activada mediante dos vías; una iniciada por una familia de receptores acoplados a proteínas G, y la otra, activada por receptores con actividad de cinasas de tirosina o receptores que pueden activar a otro tipo de cinasas. Las proteínas G están compuestas de tres subunidades: α , β y γ . Cuando las subunidades de las proteínas G heterotriméricas se encuentran asociadas, una molécula de GDP se une a la subunidad. Después de que la célula percibe el estímulo, se da un intercambio de GDP por el GTP, lo que provoca que la subunidad α -GTP se disocie del complejo $\beta\gamma$. La subunidad α de las proteínas G posee actividad de GTPasa; por lo que cuando el estímulo finaliza, se hidroliza GTP y las subunidades se reasocian (Legendré *et al.*, 1993).

Se ha determinado que la familia de las PLC γ está regulada por fosforilación en residuos de tirosina a través de esta última clase de receptores (Munnik y Testerink, 2008). Las PLC β s pueden ser reguladas por proteínas G triméricas, y las PLC ϵ , por proteínas G heterotriméricas y monoméricas (Munnik y Testerink, 2008). En el caso de las enzimas PLC $-\delta$, $-\eta$, y $-\zeta$ aún no ha quedado claro cómo se regulan, pero quizá involucren al Ca^{2+} , especialmente en el caso de la PLC η (Cockcroft, 2006).

El Ca^{2+} es también un importante regulador de las PLC en plantas, pues esta enzima contiene un dominio de unión a éste ión. En concentraciones micromolares de Ca^{2+} , el PIP y PIP $_2$ son hidrolizados, mientras que en concentraciones milimolares, la PLC puede además usar al PI como sustrato (Helsper *et al.*, 1987; Drobak, 1992; Munnik y Musgrave, 1998; Munnik *et al.*, 1998). Echevarría-Machado *et al.* (2007) reportaron la purificación parcial de una PLC asociada a membrana. Se encontró que había, al menos, dos proteínas putativas con masas moleculares diferentes (57 y 67 kDa) de la PLC asociadas a membrana en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, las cuales eran diferencialmente reguladas durante su crecimiento.

La actividad de la PLC también puede estar regulada diferencialmente a nivel de la expresión génica. En avena, entre cuatro, y seis PLCs se han discernido

bioquímicamente, y cuatro diferentes ADNc han sido clonados en *Arabidopsis*. El nivel de ARNm de AtPLC1S se vió afectado drásticamente ante todo tipo de condiciones de estrés, tales como las bajas temperaturas y el estrés osmótico (Hirayama *et al.*, 1995). Esto podría reflejar un mecanismo de adaptación de la planta a condiciones adversas, ya que al ser organismos sésiles, éstas no pueden evitar las condiciones a las que están expuestas, pero sí pueden optimizar su respuesta.

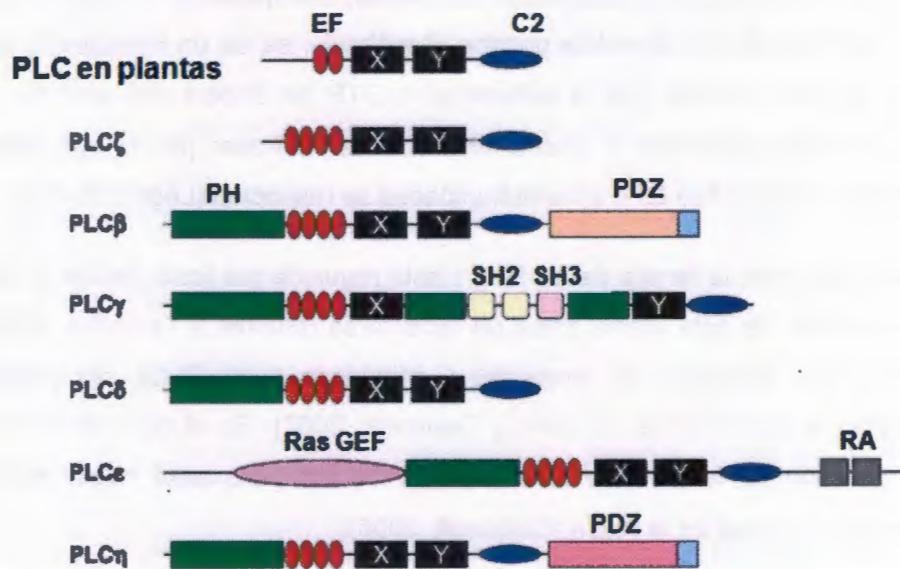


Figura 1.4 Estructura de los dominios y organización de las PI/PLC. Se indican los dominios catalíticos X y Y, EF, dominio manos EF; C2, dominio de unión a calcio; PH, dominio homólogo a pleckstrina; SH, dominio Src; Ras, dominio de unión a Ras; RasGEF, dominio similar al factor intercambiador de nucleóticos de guanina de Ras; PDZ, dominio de anclaje al citoesqueleto (Modificado de Munnik y Testerink, 2008).

1.2.5 Inhibidores de la señalización de la PLC

El descubrimiento de la función del segundo mensajero IP_3 hace más de tres décadas, generó una serie de investigaciones en células de animales para tratar de entender una variedad de procesos de señalización celular en los cuales los productos de la PI-PLC eran importantes, no sólo en la fisiología de una célula normal, sino también en los procesos patológicos (Bleasdale y Fisher, 1993). La utilización de sustancias

farmacológicas ha permitido establecer la contribución de las enzimas fosfolípicas en la respuesta celular (Toyoda *et al.*, 2000). En plantas también se ha evaluado la respuesta a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, así como la posible participación de la PLC en dicha respuesta. El estudio farmacológico con inhibidores, como la neomicina y el U73122, en plantas como alfalfa, suspensiones celulares de arroz, semillas de chícharos y suspensiones celulares de zanahoria (Legendre *et al.*, 1993; Staxen *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2005) han permitido establecer que la PLC se encuentra involucrada en la respuesta celular analizada.

En 1976, Schacht demostró que la neomicina se une con una alta afinidad a los PI y al PIP₂ y en consecuencia, este compuesto es usado como un inhibidor del metabolismo de los PI. La neomicina (Figura 1.5A) es un aminoglucósido cargado positivamente que puede formar complejos electroneutros con el PIP y el PIP₂ (Chen y Boss, 1991), bloqueando la unión de éstos a la PLC, lo que impide su hidrólisis y la liberación del segundo mensajero IP₃ (Bastiaan *et al.*, 2009).

La neomicina es un inhibidor de la producción del IP₃ en protoplastos en respuesta a la luz e inductores (Coté, 1995), en cultivos celulares de soya (Legendre *et al.*, 1993), en hojas e hipocotilos de chícharo en respuesta a inductores (Toyoda *et al.*, 1993). La neomicina tuvo un efecto inhibitorio sobre la velocidad de germinación y el crecimiento de las semillas en arroz; por lo que se sugiere que la señalización fosfolipídica dependiente de Ca²⁺ tiene un papel importante en éstos procesos (Kashem *et al.*, 2000).

En nuestro grupo de trabajo se ha evaluado el efecto de la neomicina en dos modelos: *C. roseus* y *C. chinense*. En el primer modelo, raíces transformadas de *C. roseus* se evaluó la actividad de dos PLC, soluble y membranal, en presencia de la neomicina, observándose la inhibición dosis-dependiente de la actividad de la PIP₂-PLC (Piña-Chable *et al.*, 1998).

También se ha utilizado a la neomicina para evaluar su efecto sobre la producción de vainillina inducida por el AS un intermediario en la ruta de los capsaicinoides en suspensiones celulares de *C. chinense* (Altúzar-Molina *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos señalaron que la presencia de éste inhibidor provocó una disminución en la producción de vainillina estimulada por el AS.

Por otro lado, el aminoesteroide U73122 (1-[6-({17beta-3-metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il}amino)hexil]-1H-pirrol-2,5-diona), (Figura 1.5B), que atraviesa la membrana, es ampliamente utilizado para investigar los procesos dependientes de la actividad de la PLC, tanto en sistemas animales (Stauffer *et al.*, 1998) como en plantas (MacRobbie, 1998; Staxen *et al.*, 1999; Perera *et al.*, 2001). El mecanismo inhibitorio del U73122 sobre la actividad de la PLC aun no ha sido establecido; sin embargo, los estudios de cristalografía de la PLC δ en animales han permitido sugerir que el posible modo de acción del U73122 ocurre a través de la interacción de los residuos de aminoácidos importantes en el sitio catalítico de la enzima con el grupo maleimida del inhibidor (Bleasdale y Fisher, 1993). El análogo inactivo del U73122, el U73343, en el cual el grupo maleimida está sustituido por el grupo succinimida no reactivo, es utilizado como un control cuando se evalúa la participación de la PLC en un proceso celular.

El uso de este inhibidor en plantas ha permitido generar evidencia de la participación de la PLC en diversos procesos de señalización asociados al factor Nod (Pingret *et al.*, 1998), a la señalización inducida por ABA (Staxen *et al.*, 1999), a la respuesta gravitrópica en avena (Perera *et al.*, 2001), y también, en relación a la acumulación de metabolitos primarios como la prolina (Ghars *et al.*, 2012), entre otros.

La presencia de U73122 y neomicina provocaron la pérdida de la termotolerancia en los tejidos de hojas de chícharo, por lo que existe una participación directa de la PIP_2 -PLC en el desarrollo de éste proceso (Liu *et al.*, 2006a). La formación del PA fue reprimida a través de la inhibición del U73122 de la actividad de la PLC en células de *Coffea arabica*, lo cual es una evidencia importante de la toxicidad del AI en la formación del PA (Ramos-Díaz *et al.*, 2007).

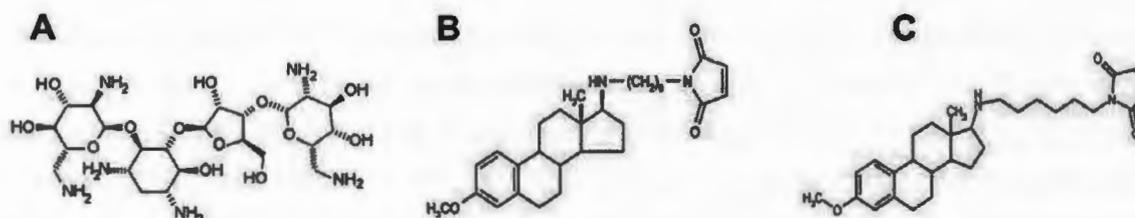


Figura 1.5 Inhibidores de la señalización mediada por la PLC. Neomicina (A); el U73122 (B) y el U73343, análogo no inhibitorio del U73122 (C).

1.2.6 Fosfolipasa D

La fosfolipasa D (PLD) se ha encontrado en varias especies de plantas, animales y microorganismos. La PLD hidroliza lípidos de membrana, principalmente la fosfatidilcolina (PC), para generar PA y un grupo polar libre, la colina (Figura 1.3) (Chen *et al.*, 2011). La PLD pertenece a una familia de enzimas con propiedades estructurales, regulatorias y bioquímicas distinguibles. Se conocen 12 y 17 genes que codifican para la PLD en *Arabidopsis thaliana* y en *Oryza sativa*, respectivamente (Munnik y Testerink, 2008).

La asignación de las funciones fisiológicas que involucran a la PLD se basa en la demostración de una activación rápida de ésta. Los estímulos que regulan a la PLD incluyen hormonas, factores de crecimiento, citocininas, componentes de la matriz extracelular, antígenos y estímulos como la congelación, las heridas, la interacción planta-patógeno, la deshidratación y el estrés salino (Wang 2002; Bargmann y Munnik, 2006).

La regulación de la PLD está mediada por proteínas G y proteínas-quinasas (Chapman, 1998; Munnik *et al.*, 1998; Laxalt *et al.*, 2001). Bajo condiciones fisiológicas, la activación de la PLD resulta en la formación de PA. Se han reportado varios procesos fisiológicos que pueden ser regulados por la PLD; incluyendo a la germinación de semillas, la senescencia, la maduración de frutos o flores, la respuesta a estrés por temperatura o por heridas, la acción de las hormonas como el ácido abscísico (ABA), el etileno, y la respuesta a patógenos (Mansfeld y Ulbrich-Hofmann, 2009).

Se ha propuesto el PA generado por la PLD como un segundo mensajero lipídico membranaral, el cual constituye menos del 1% del total de los fosfolípidos en la mayoría de los tejidos de la planta. El modo de acción de ésta molécula en la transducción de señales está basado en el reclutamiento de proteínas hacia la membrana, o un destino en particular, e influyendo en la regulación de la actividad enzimática de algunas proteínas específicas (Wang, 2005; Bargmann y Munnik, 2006). El PA tiene un papel importante en el cierre de estomas, el crecimiento de la raíz y en la tolerancia de la planta a la salinidad y la deshidratación (Hong *et al.*, 2010).

1.2.7 PLD en plantas

En el genoma de *Arabidopsis* se han encontrado 12 genes para las PLDs, y las proteínas se dividen en seis clases en función de su secuencia y propiedades bioquímicas: α , β , γ , δ , ε y ζ . Las PLDs pueden ser divididas en dos subfamilias de acuerdo a la estructura de la enzima: las C2-PLD, dependiendo si la enzima posee el dominio C2 y de unión a fosfolípidos y las PX/PH-PLD si presentan los dominios PX y PH que son sitios de interacción con fosfoinosítidos. Las PLD α , β , γ , δ y ε poseen el dominio C2, mientras que la PLD ζ contiene los dominios PX y PH (Figura 1.6). Todas las PLDs contienen dominios con secuencias conservadas, incluyendo el dominio HKD, el cual corresponde al sitio catalítico (Mansfeld y Ulbrich-Hofmann, 2009; Chen *et al.*, 2011).

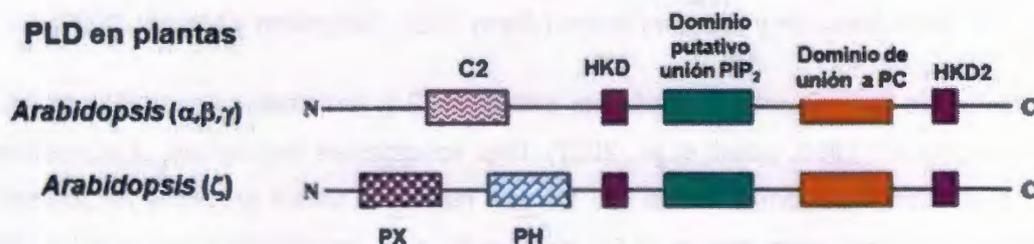


Figura 1.6 Estructura de los dominios de las PLD en *Arabidopsis* (α, β, γ y ζ): C2, dominio de unión a Ca^{2+} ; HKD, dominio catalítico; PX, dominio homólogo a Phox; PH, dominio homólogo a pleckstrina; PIP_2 , dominio de unión a polifosfoinosítidos (Tomado de Tuteja y Sopory, 2008).

1.2.8 Transfosfatidilación

La identificación de que la actividad *in vivo* de la PLD se encuentra involucrada en diversas respuestas celulares que puede evaluarse mediante la capacidad que tiene para usar alcoholes primarios como el n-butanol, en lugar del agua, en una reacción denominada transfosfatidilación (Figura 1.7) (Chen *et al.*, 2011). La reacción catalizada por la PLD en condiciones normales consiste en la hidrólisis de la cabeza de la fosfatidilcolina o etanolamina y la transferencia del fosfatidilo a un aceptor nucleofílico, que es el agua, lo que resulta en la formación de PA (Munnik *et al.*, 1995).

Sin embargo, la PLD también puede transferir la fracción fosfatidilo a los alcoholes primarios, lo que resulta en la formación de fosfatidilbutanol (PBut). Este lípido no está normalmente presente en las células, pero es fácil de sintetizar *in vivo* cuando las células son preincubadas con bajas concentraciones (0.1-0.5%) de 1-butanol (Chen *et al.*, 2011). Así cuando las células están premarcadas con ortofosfato (^{32}P), la formación de ^{32}P -PBut es una medida relativa de la actividad *in vivo* de la PLD. El PBut posee propiedades cromatográficas diferentes respecto a las del PA, lo cual permite que pueda separarse fácilmente y pueda ser cuantificado para proporcionar información acerca de la contribución de la PLD en la formación del PA (Ariz *et al.*, 2000).

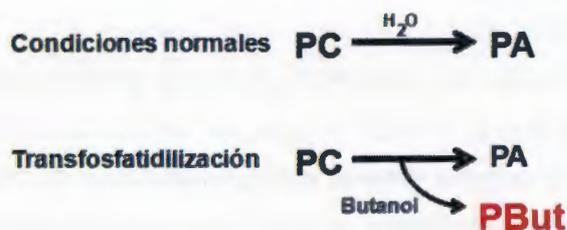


Figura 1.7 Reacciones catalizadas por la PLD (Modificado de Liscovitch *et al.*, 1999).

El PA generado por la PLD puede distinguirse del producido a través de la señalización PLC/DGK utilizando el marcaje de las células con ^{32}P -ortofosfato. Esta estrategia ha sido utilizada en *Chlamydomonas*, una cianobacteria que toma la marca radiactiva e incorpora el fosfato marcado en sus fosfolípidos (Munnik *et al.*, 1998). Primero lo hacen los lípidos menores de señalización como el PIP, PIP₂ y PA, ya que se forman a través de la fosforilación directa utilizando ATP. Estos fosfolípidos son los primeros compuestos que

llegan a formarse durante la incubación con ^{32}P -ortofosfato a diferencia de los fosfolípidos estructurales (fosfatidil-etanolamina; fosfatidil-glicol), y en consecuencia el marcaje es mucho más lento en ellos (Figura 1.8).

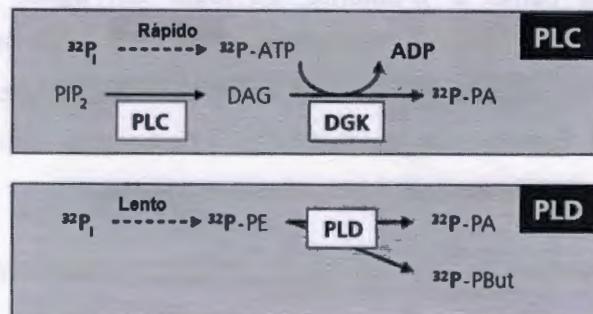


Figura 1.8 Marcaje diferencial para distinguir la vía de la formación del PA (Tomado de Arisz *et al.*, 2000).

1.2.9 Mecanismos de regulación de la PLD

Las distintas propiedades bioquímicas en las PLDs permiten obtener información sobre su regulación y las funciones que llevan a cabo en los procesos celulares en plantas. El Ca^{2+} es un importante elemento en la activación de algunas PLDs en plantas. Este ión se une a los dominios C2 de la $\text{PLD}\alpha$ y la $\text{PLD}\beta$ provocando un cambio conformacional que genera un incremento en la afinidad del dominio C2 por la PC (Wang, 2000). Esta aseveración ha permitido explicar que la activación de la $\text{PLD}\alpha$ involucra la traslocación entre el citosol y las membranas, mientras que en la $\text{PLD}\beta$ pudiera ser activada sinérgicamente por el Ca^{2+} y el PIP_2 permitiéndole traslocarse a través de las membranas. El PIP_2 se une a la $\text{PLD}\beta$ en el dominio C2 y la región catalítica, mientras que el Ca^{2+} lleva a cabo una tipo de regulación diferente. En la ausencia o en bajos niveles de Ca^{2+} , la $\text{PLD}\beta$ se une al PIP_2 en el dominio C2; pero si la concentración de Ca^{2+} aumenta, esta unión es inhibida provocando un incremento en la afinidad de PIP_2 por la región catalítica. Esta unión de PIP_2 con la región catalítica provoca la unión a PC y su posterior hidrólisis (Wang, 2002).

Basados en varios estudios realizados utilizando el mastoparan, la toxina del cólera y la toxina pertussis, se ha sugerido que la PLD está regulada por proteínas G. La expresión de la $\text{PLD}\alpha$ de tabaco y la subunidad α de la proteína G heterotriméricas en *Escherichia*

coli se usaron para estudiar cómo la PLD es regulada por éstas proteínas (Lein y Saalbach, 2001). La co-incubación de la PLD α y la proteína G α provocó la inhibición en la actividad de la PLD α ; sin embargo, cuando se incluía la molécula análoga no hidrolizable de guanosina trifosfato (GTP γ S), la inhibición se veía reducida. Esto permite suponer que la proteína G α interactúa con la PLD α y que la activación de la proteína G α tiene un efecto directo en la actividad de ésta enzima.

1.2.10 Inhibidores de la señalización de la PLD

Los alcoholes primarios pueden inhibir la producción de PA mediada por la PLD mediante la competencia con el agua por el grupo fosfatiditilo para generar el fosfatidilbutanol (PBut). Por ello, el n-butanol es considerado como un inhibidor competitivo en la formación de PA mediado por la PLD. Los alcoholes secundarios y terciarios no pueden inhibir la formación de PA, puesto que no son sustratos para la transfosfatidilación (Munnik *et al.*, 1995). La participación de la PLD en diversos procesos celulares de la planta se ha evaluado a través de esta estrategia; por ejemplo en la deformación de los pelos de la raíz de leguminosas utilizando diferentes alcoholes en la respuesta inducida por el factor Nod (Den Hartog *et al.*, 2001); cuando se adicionaron los alcoholes primarios junto con el factor Nod se inhibió la deformación de los pelos de la raíz, mientras que con alcoholes secundarios y terciarios esto no ocurrió.

Por otro lado, cuando se incubaron células de *Coffea arabica* con diferentes concentraciones de AlCl₃ en presencia del 1-butanol, no se observó un efecto significativo en la formación de Pbut, sugiriendo que la actividad de la PLD se veía alterada por el tratamiento de las células con el Al³⁺ (Ramos-Díaz *et al.*, 2007). Adicionalmente, la actividad de la PLD en presencia del 1-butanol se ha evaluado en la respuesta a inductores del metabolismo secundario en diversos modelos como suspensiones celulares de *Rubia tinctorum* L. (Vasconsuelo *et al.*, 2003), suspensiones celulares de arroz (Yamaguchi *et al.*, 2005) y suspensiones celulares de *Silybum marianum* (Madrid y Corchete, 2010), entre otros.

1.3 METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Una de ellas es la producción de metabolitos secundarios. Existen cuatro grupos principales de metabolitos secundarios (compuestos que no están directamente involucradas en el crecimiento y reproducción) en plantas: los terpenoides, los alcaloides, los complejos sulfónicos y los fenilpropanoides (DiCosmo y Misawa, 1985; Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

Estos metabolitos tienen una gran importancia ecológica, ya que participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). Sin embargo, se acumulan en muy bajas concentraciones cuando las plantas están en condiciones ambientales favorables, aumentando únicamente cuando éstas están sujetas a una condición de estrés ambiental (Nieto-Pelayo, 2006).

1.3.1 Inductores

El término inductor se refiere a un agente biótico o abiótico que puede disparar una respuesta fisiológica y morfológica en la planta (Zhao *et al.*, 2005). El uso de inductores puede facilitar el estudio de las rutas de síntesis de los metabolitos secundarios en suspensiones celulares, ya que las líneas celulares que sólo producen cantidades trazas de estos compuestos pueden ser estimuladas a sintetizar mayores cantidades, y concomitantemente, se estimulará un aumento en la actividad de las enzimas involucradas en su síntesis (DiCosmo y Misawa, 1985; Nieto-Pelayo, 2006; Ramani y Chellilah, 2007; Babar-Ali *et al.*, 2007). El efecto de los inductores es altamente dependiente de la edad de los cultivos, ya que mientras más edad tiene la línea celular, menor podría ser el efecto en la acumulación del metabolito secundario. Esta respuesta podría ser un reflejo de los diferentes estados fisiológicos de las células cultivadas *in vitro* (Angelova *et al.*, 2006)

El modo de acción de los inductores se basa en la interacción de éstos 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. Estos compuestos señalizadores ocasionarán que finalmente se lleguen a activar los genes que codifican a las enzimas implicadas en la biosíntesis del metabolito secundario (Ramani y

Chellilah, 2007).

Algunos inductores como el ácido salicílico (AS) y el jasmonato de metilo (MeJa) son comúnmente utilizados para incrementar la producción de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos en plantas de *Matricaria chamomilla* (Kovacik *et al.*, 2007), siringina en suspensiones celulares de *Saussurea medusa* (Zhen *et al.*, 2006), taxoides en suspensiones celulares de *Taxus chinensi* (Zhou y Zhong, 2011), así como también la capsaicina en suspensiones celulares de *Capsicum frutescens* (Sudha y Ravishankar, 2003) y *C. chinense* (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2011). Sin embargo, aún se desconoce completamente la cascada de señalización generada por el inductor para el incremento del metabolito secundario en la célula vegetal (Ramani y Chellilah, 2007).

1.3.2 Ácido salicílico

El ácido salicílico (AS) o ácido 2-hidroxibenzoico es un derivado del ácido benzoico (Figura 1.9). Pertenece al grupo de los compuestos fenólicos que son definidos como compuestos que poseen un anillo aromático que tienen un grupo hidroxilo o un derivado funcional. Dentro de sus propiedades físicas, el AS tiene un pka de 2.98 y un pH en soluciones acuosas de 2.4. El AS fluoresce a una longitud de onda de 412 nm cuando es excitado a 301 nm; lo que permite su detección en diversos sistemas vegetales (Raskin, 1992). El AS puede ser transportado, metabolizado o conjugado, y puede traslocarse rápidamente desde un sitio en particular hasta diferentes tejidos en la planta. En muchas plantas, como arroz, perejil y soya, los niveles de AS que se han encontrado equivalen aproximadamente a 1 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. El análisis del AS en hojas y estructuras reproductivas en angiospermas no termogénicas confirma la distribución ubicua de este compuesto en la planta (Raskin *et al.*, 1990).

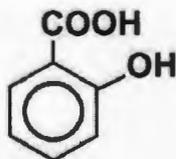
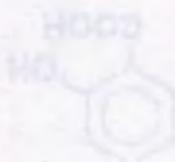


Figura 1.9 Estructura química del ácido salicílico.

1.3.3 Biosíntesis del AS en plantas

El AS puede ser generado por dos distintas vías enzimáticas que requieren el metabolito primario corismato (Chen *et al.*, 2009). El aminoácido L-fenilalanina puede ser convertido en AS por dos vías: una mediante el intermediario benzoato, y la otra, a través del ácido cumárico, por una serie de reacciones enzimáticas inicialmente catalizadas por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). El corismato puede también ser convertido en AS vía el isocorismato en un proceso de dos pasos que implica la participación de las enzimas isocorismato sintasa e isocorismato piruvato liasa (Fig. 1.10) (Verbeme *et al.*, 2000; Wildermuth *et al.*, 2001).

La mayor parte del AS producido como respuesta al ataque por patógenos es sintetizado por la segunda vía en *Arabidopsis*, *Nicotiana benthamiana* y *Solanum lycopersicum* (Wildermuth *et al.*, 2001; Uppalapati *et al.*, 2007; Catinot *et al.*, 2008). La mayoría del AS en la planta es convertido a AS O- β -glucósido (ASG) por medio de una enzima llamada AS glucosil transferasa (ASGT) inducible por patógenos (Dean *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, el AS es sintetizado probablemente en cloroplastos (Strawn *et al.*, 2007), mientras que en tabaco la enzima ASGT parece estar localizada en el citosol. El ASG, en tabaco, es activamente transportado del citosol hacia la vacuola, donde puede funcionar como una forma almacenada inactiva que puede ser convertida a AS en caso de ser necesario (Chen *et al.*, 1995; Dean *et al.*, 2005).



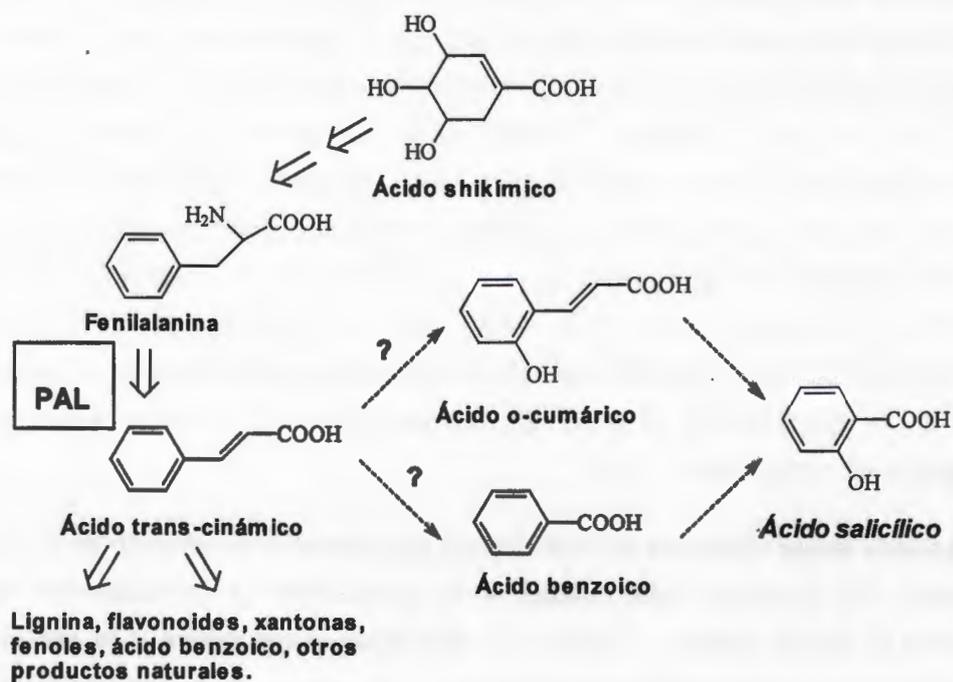


Figura 1.10 Ruta resumida de la biosíntesis del ácido salicílico. PAL (fenilalanina amonio liasa) (Tomado de Raskin, 1992).

1.3.4 Función del AS en las plantas

El AS forma parte de un grupo de compuestos llamados fenólicos, los cuales están relacionados con el metabolismo secundario de las plantas y participan en una serie de mecanismos de regulación e interacción planta-patógeno (Raskin, 1992). El AS se encuentra normalmente en cantidades basales y que varían entre 1 y 50 μM y su concentración aumenta cuando las células, órganos o plantas se encuentran en condiciones de estrés (Chen *et al.*, 1997; Vlot *et al.*, 2009).

Uno de los primeros efectos fisiológicos del AS es la inducción de la floración y la formación de brotes en cultivos celulares de tabaco (Eberhard *et al.*, 1989). El efecto de la estimulación del AS sobre la floración no es específico, ya que promueve la floración en combinación con otros reguladores de crecimiento como las giberelinas. Sin embargo,

algunos de los mecanismos por los cuales el AS incrementa la floración se basan en la inhibición de la ruta de biosíntesis del etileno por el AS en suspensiones celulares de pera bloqueando la conversión del ácido carboxílico 1-aminociclopropano a etileno. Otra hipótesis sugiere que el AS induce la floración actuando como un agente quelante de hierro, el cual es un cofactor esencial en la conversión del ácido carboxílico 1-aminociclopropano-1 hacia etileno (Raskin, 1992). Algunas plantas como las *Arum lilies* generan calor en las inflorescencias durante la floración (termogénesis), lo que puede estar asociado con un incremento en la vía de transporte de electrones no fosforilada insensible al cianuro (Popová *et al.*, 1997). Algunos otros efectos del AS en plantas incluyen la inhibición de la germinación de las semillas, la interferencia en el transporte de iones en la membrana y la absorción del potencial electroquímico transmembranal (Malamy *et al.*, 1990; Raskin, 1992).

El AS puede actuar como una señal endógena que involucra la inducción de la síntesis de proteínas PR (proteínas relacionadas a la patogénesis) y la resistencia sistémica adquirida (SAR) en tabaco y pepino. La resistencia a patógenos y la producción de proteínas PR en plantas puede ser inducida por AS y por el ácido acetil salicílico aún en ausencia de organismos patógenos (Popová *et al.*, 2003). El AS está asociado al mecanismo de respuesta hipersensible (HR), el cual evita la diseminación del patógeno con la producción de lesiones alrededor del sitio de infección, de tal manera que el organismo queda aislado en un anillo de células muertas. En el caso de la SAR, el AS promueve la resistencia a un segundo ataque del patógeno que se desarrolla después de la primera infección. Ambos procesos, HR y SAR, involucran la activación de genes que expresan las proteínas PR (Raskin, 1992; Borsani *et al.*, 2001).

1.3.5 Proteínas de unión al AS

Se han llevado a cabo investigaciones acerca de los componentes involucrados en la respuesta al AS, revelando la aparición de proteínas de unión a AS (SABP). Se han aislado tres tipos de SABP. La primera SABP se aisló a partir de tabaco (Chen *et al.*, 1993), la cual presentó actividad de catalasa (enzima que degrada el H₂O₂). Esta proteína es un complejo de 240-280 kDa, consistente con la estructura de las catalasas, enzimas tetraméricas compuestas de cuatro subunidades idénticas de 55-60 kDa en la que existen dos características que sugieren su función como receptor del AS. La primera es su

afinidad, ya que el AS se une a ésta proteína con una afinidad ($K_d = 12 \mu\text{M}$) que es consistente con las concentraciones fisiológicas (1-50 μM) del AS observadas durante la inducción de una respuesta de defensa. La segunda característica es su unión específica, puesto que el AS y sus análogos sólo pueden unirse a SABP para inducir los genes PR. Desde que se demostró que el SABP tiene actividad de catalasa, Chen *et al.*, (1993) propusieron que el aumento de H_2O_2 y las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden ser generados a partir de la señalización por AS.

Por otro lado, Tenhakken y Rubel (1997) presentaron resultados opuestos de la participación de SABP pues al monitorear la actividad de la catalasa no hubo disminución de la concentración del H_2O_2 en una mezcla de reacción que contenía extractos crudos de la enzima aislados partir de soya. Sin embargo, se ha señalado que esta estrategia no es la apropiada, ya que en extractos enzimáticos crudos posiblemente existan otras actividades peroxidativas.

La segunda SABP aislada a partir de tabaco fue una proteína de 25 KDa, denominada SABP2, que mostró una afinidad mayor por el AS comparada con la catalasa (Du y Klessig, 1997). Basándose en el análisis de las secuencias, se propuso que la SABP2 presenta actividad de lipasa, perteneciente a la superfamilia de las hidroxilasas. Por ejemplo, la SABP2 recombinante expresada en *E. coli* presentó actividad de lipasa (Kumar y Klessig, 2003), la cual se vió incrementada 3.8 veces cuando se añadió el AS a la proteína.

Por otra parte, el silenciamiento basado en ARNi de SABP2 en tabaco resultó en la supresión de la resistencia local hacia el virus de mosaico de tabaco así como en el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida, indicando que la SABP2 tenía un papel importante como receptor del AS.

La SAPB3 de tabaco tiene identidad con una anhidrasa carbónica del cloroplasto que posee actividad antioxidante (Slaymaker *et al.*, 2002). Dada la importancia de los cloroplastos como sitio de síntesis del AS sería obvio que una proteína vinculada al AS estuviera presente en estos organelos. Por lo anterior, la búsqueda de proteínas que regulan la señalización del AS podría proporcionar información clave de la participación de ROS en la transducción de señales del AS.

1.3.6 AS y la señalización fosfolipídica

La señalización por el AS se ha relacionado con los fosfolípidos y las enzimas que los metabolizan; sin embargo, a pesar de que se ha estudiado la participación de esta señalización en la respuesta de las plantas a los fitorreguladores, aún existe escasa información acerca de la relación del AS con la señalización a través de fosfolípidos.

La participación de la PLC y la PLD en la respuesta al AS se evaluó en plantas de *Brassica napus*, encontrándose que el AS provocaba una rápida activación de la PI-PLC y de tres formas diferentes de la PLD (α , β y δ); además, estas enzimas llevan a cabo una regulación diferencial en sus actividades enzimáticas, generando una respuesta celular rápida al AS (Profotová *et al.*, 2006).

El tratamiento con AS en suspensiones celulares de *A. thaliana* marcadas con ortofosfato (^{32}P) estuvo acompañada por un incremento en los niveles del PIP y el PIP₂ (Krinke *et al.*, 2007). La evaluación de la ruta de señalización del AS a través de la activación de la PLD, mediante la formación de Pbut, en suspensiones celulares de *A. thaliana*, señala que la activación de la PLD fue dependiente de la dosis del AS empleado, pero que ninguna de las isoenzimas de la PLD existentes en ésta planta estuvo inducida significativamente por el AS (Krinke *et al.*, 2009). Esto sugiere que la isoenzima de la PLD involucrada en la respuesta al AS puede ser activada a nivel de proteína, ya sea por un incremento en la traducción o por la activación de la proteína ya existente.

En respuesta al estrés por calor en hojas de chícharo, se ha determinado la participación del AS en la estimulación de la PIP₂-PLC (Liu *et al.*, 2006), dado que el AS generó un incremento en la actividad de la PLC a nivel de proteína, lo cual podría explicarse por su modificación postraduccional

La actividad de la PLC y la PLD esta regulada por el AS en suspensiones celulares de *C. chinense*, incrementándose la producción de vainillina, intermediario necesario para la formación de vanillilamina (Altúzar-Molina *et al.*, 2011). En este mismo estudio se observó que cuando se utilizaba un inhibidor como el sulfato de neomicina, había una disminución en la producción de vainillina estimulada por el AS, lo que podría sugerir que los segundos mensajeros fosfolipídicos podrían estar participando en la producción de

vainillina.

1.4 GÉNERO *Capsicum*

Se conocen como chiles a los frutos de las plantas del género *Capsicum* (Figura 1.11). El género *Capsicum* tiene su centro de origen en las regiones tropicales y subtropicales de América, probablemente en el área Bolivia-Perú, donde se han encontrado semillas de formas ancestrales de más de 7000 años, y desde donde se habría diseminado por toda América. Este género comprende cerca de 27 especies, cinco de las cuales han sido domesticadas: *C. annuum* (L.), *C. baccatum* (L.), *C. chinense* (Jacq), *C. frutescens* (L.) y *C. pubescens* (Vázquez-Flota *et al.*, 2007).



Figura 1.11 Frutos del género *Capsicum*.

1.4.1 Importancia del chile en México

El cultivo de chile en México tiene una trascendencia social, económica y cultural desde la época prehispánica, donde se cultiva desde el nivel del mar del Golfo de México y Pacífico hasta 2500 msnm cubriendo diferentes condiciones ecológicas. El chile habanero es un cultivo de gran importancia económica para los productores de hortalizas de la Península de Yucatán, ocupando el segundo lugar después del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) (López y Castro, 2005).

La mayor superficie del cultivo se encuentra en la parte norte del estado, lo que contribuye en más del 90 % al volumen de la producción estatal, que en su mayor parte se comercializa y se consume en fresco mientras que sólo una pequeña parte se utiliza en la industria como materia prima para la elaboración de salsa picante. Existen diferentes

tipos de chile habanero, los cuales se diferencian por el color del fruto maduro. A nivel local, para el consumo en fresco se emplea el de color naranja, preferido por los consumidores; sin embargo, en el extranjero se prefieren los frutos de color rojo por su mayor tamaño y pungencia (López y Castro, 2005).

1.4.2 Biosíntesis de los capsaicinoides

Cuando las plantas del género *Capsicum* se someten a una condición de estrés, como la sequía (Ruiz-Lau *et al.*, 2011), el ataque por herbívoros o la infestación por microorganismos patógenos, se eleva la producción de sustancias conocidas como capsaicinoides, responsables de la pungencia en el fruto de chile (Nieto-Pelayo *et al.*, 2006). Todos los capsaicinoides son amidas de C₉- C₁₁ de longitud, provenientes de los ácidos grasos y de la vainillilamina. Estos compuestos se producen únicamente producidos en el fruto de los miembros de éste género. La ruta bioquímica que conduce a la formación de los capsaicinoides tiene dos orígenes distintos: uno de ellos es a partir del componente aromático, la vainillilamina, a través de la ruta fenilpropanoide, y la otra que es la fuente de una cadena acil-graso probablemente derivado de la valina o la leucina (Kothari *et al.*, 2010).

La ruta de biosíntesis de los capsaicinoides (Figura 1.12) ha sido parcialmente establecida y se conocen algunos factores ambientales que pueden afectar su acumulación en las diferentes especies de chile. La biosíntesis, acumulación y almacenamiento de los capsaicinoides se han estudiado por un gran número de investigadores, usando principalmente precursores putativos de esos compuestos marcados radioactivamente. Se ha demostrado que la fenilalanina es uno de los precursores de los capsaicinoides (Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001); la conversión de este aminoácido ocurre mediante la ruta de los fenilpropanoides.

La fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la primera reacción, convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico. Posteriormente, éste se transforma en el ácido cumárico, cafeico y ferúlico por la acción ordenada de las enzimas: ácido cinámico 4-hidroxilasa (Ca4H), ácido cumárico 3-hidroxilasa (Ca3H) y la ácido cafeico O-metiltransferasa (COMT), respectivamente (Figura 1.12) (Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993). Finalmente, la condensación enzimática de la vainillilamina y el ácido 8-metil-6-nonenico

es llevado a cabo por la capsaicinoide sintasa (Ochoa-Alejo y Gómez Peralta, 1993).

La formación de cada uno de los capsaicinoideos está determinada por el aminoácido que da origen al ácido graso de cadena corta, y que se unirá a la vainillilamina. Si el primer aminoácido de la ruta de los ácidos grasos es la L-valina, se formará capsaicina y dihidrocapsaicina; y si es L-leucina, los capsaicinoideos serán nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina y homocapsaicina (Ruiz-Lau *et al.*, 2011).

Esta vía no se ha dilucidado completamente, pero se considera que las enzimas de las primeras etapas encargadas de la conversión, de la fenilalanina al ácido ferúlico, y la valina a la acil-graso-CoA, para la capsaicina y la dihidrocapsaicina, son las mismas que conducen a la síntesis de fenilpropanoides, lignina y ácidos grasos en otros organismos. Sin embargo, la parte posterior a las reacciones a partir del ácido ferúlico hacia vainillina y vainillilamina hacia capsaicina solamente se lleva a cabo en los frutos de chiles (Kothari *et al.*, 2010).

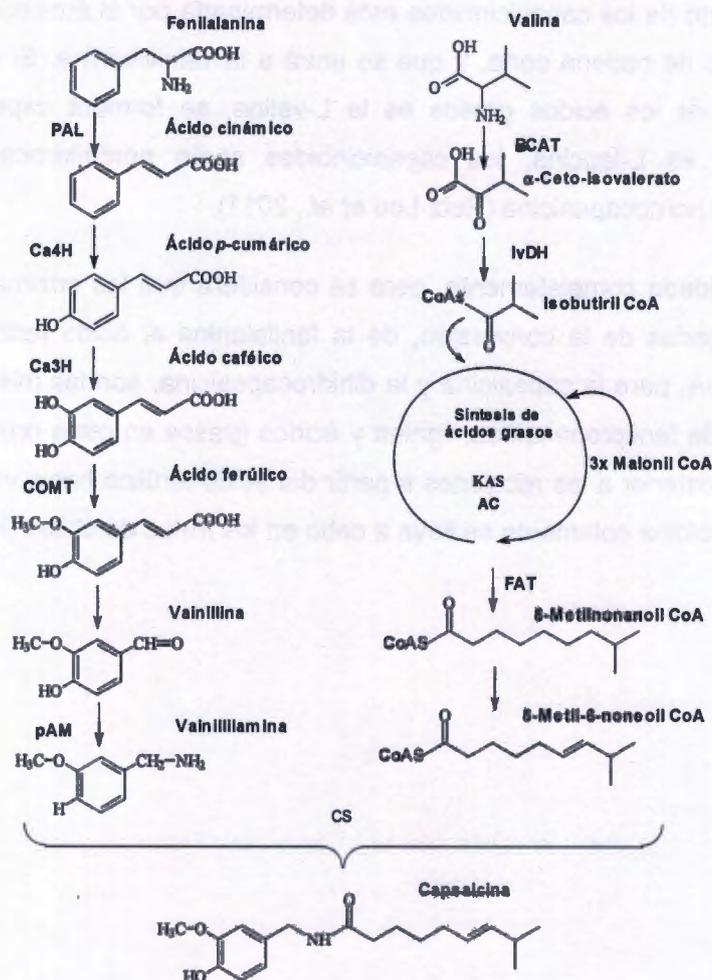


Figura 1.12 Ruta de biosíntesis de los capsaicinoides. PAL (fenilalanina amonio liasa); Ca4H (ácido cinámico 4-hidroxilasa); Ca3H (ácido cumárico 3-hidroxilasa), COMT (ácido caféico O-metiltransferasa), pAMT (presunta aminotransferasa de la vainillina), BCAT (aminotransferasa de los aminoácidos ramificados), KAS (β -cetoacil sintasa), ACL (proteína acarreadora de grupos acilos), FAT (ácido graso tioesterasa), DST (desaturasa), CS (capsaicina sintasa) (Tomado de Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

1.4.3 Inducción del metabolismo secundario en *Capsicum*

La acumulación de los capsaicinoides en cultivos de suspensiones celulares se ha estudiado en especies como *C. frutescens* y *C. annum*; encontrándose una baja producción de éstos en comparación con los frutos (Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993). Se ha intentado aumentar la producción de los capsaicinoides en cultivos *in vitro* manipulando la composición del medio (Leslie y Romani, 1986; Ochoa-Alejo y Salgado-Garciglia, 1992), por la adición de agentes osmóticos como la sacarosa y el NaCl (Kehie *et al.*, 2012), la adición de precursores o inductores del metabolismo secundario en plantas, como el AS y/o el MeJa (Sudha y Ravishankar, 2003; Nieto-Pelayo *et al.*, 2006; Canché-Chay, 2006; Gutiérrez-Carbajal, 2006; Altúzar-Molina, 2008).

Existen estudios que tratan de entender la biosíntesis de los capsaicinoides en respuesta a fitorreguladores como el AS y el MeJa en suspensiones celulares de *Capsicum*. En ese sentido, Sudha y Ravishankar (2003) estudiaron la inducción con MeJa y AS en la producción de capsaicina, así como su efecto sobre la actividad de la capsaicina sintasa (CS) en suspensiones celulares de *C. frutescens*, detectándose un incremento en la producción de la capsaicina en el día 12 del ciclo de cultivo que se correlacionaba con un incremento en la actividad de la enzima CS.

Gutiérrez-Carbajal *et al.*, (2011) cuando se analizó el efecto del AS y el MeJa en la biosíntesis de los capsaicinoides en suspensiones celulares de *C. chinense* se observó que la adición del AS a las suspensiones celulares incrementó su contenido a las 24 h, mientras que la adición del MeJa esto ocurrió a las 48 h. Además se presentó un incremento en la actividad de la COMT (enzima que forma el ácido ferúlico, precursor de la vainillina) en respuesta a ambos inductores. Estos trabajos indican que las diferencias en la producción de los capsaicinoides por efecto de los inductores dependen no solamente de la disponibilidad de los precursores sino de la actividad de las enzimas participantes en la formación del metabolito.

1.5 FENILALANINA AMONIO LIASA

La fenilalanina amonio liasa (PAL), es la primera enzima de la vía que conduce a la producción de los capsaicinoides, fenilpropanoides y ligninas (Chen *et al.*, 2001). Esta enzima cataliza el primer paso que convierte a la L-fenilalanina, por desaminación en

ácido trans-cinámico (Figura 1.13), que es el primer intermediario verdadero en la biosíntesis de compuestos fenólicos (Jones, 1984; Levine *et al.*, 1994). La PAL es una enzima tetramérica, con un masa molecular de aproximadamente 330 kDa y una estructura cuaternaria homo y heterogénea (Maldonado *et al.*, 2007).

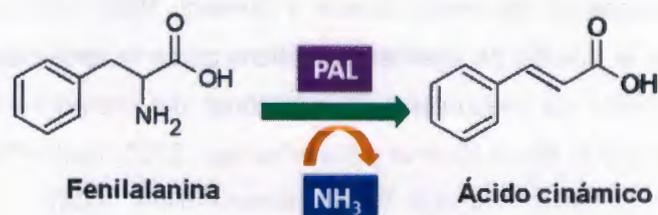


Figura 1.13 Reacción catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL).

La actividad de la PAL se incrementa por varios tipos de condiciones extremas, tales como el congelamiento (Sánchez-Ballesta *et al.*, 2000; Lafuente *et al.*, 2004), las heridas (Campos-Vargas *et al.*, 2005), la luz UV (Teklemariam y Blake, 2004), el ozono (Sgarbi *et al.*, 2003), la invasión por patógenos (Jones, 2000) y aplicación de hormonas como el ácido jasmónico, el etileno y el AS. Se han identificado varias isoenzimas de la PAL que representan los productos de diferentes miembros de la familia génica que codifica a PAL (Maldonado *et al.*, 2007). En este sentido, en la mayoría de las plantas se han reportado que PAL está codificada por una familia multigénica de dos a seis miembros (Allwood *et al.*, 2002).

Por otro lado, la actividad de la PAL es considerada como un indicador del estrés ambiental en diferentes tejidos de plantas (Leyva *et al.*, 1995, Sánchez-Ballesta *et al.*, 2000). Por ello, se ha estudiado la actividad de la PAL en relación con la acumulación de compuestos fenólicos en respuesta a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. De tal manera que el incremento de la actividad de la PAL está asociado a la acumulación de metabolitos secundarios como las antocianinas, los flavonoides y otros compuestos fenólicos en los tejidos de diversas especies como pera (Billot *et al.*, 1978), uva (Kataoka *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 2006), jitomate (Fleuriet y Macheix, 1984), manzana (Arakawa *et al.*, 1986), fresa (Given, 1988), y mandarina (Oufedkijh *et al.*, 2000). Sin embargo, esta relación no se ha observado en otras especies expuestas a estrés abiótico como en

semillas de trigo (Horbowicz *et al.*, 2008), en los pelos de la raíz de la salvia (Yan *et al.*, 2006) y en semillas de limón (Dunn *et al.*, 1998), entre otros. En estos modelos se sugiere que la biosíntesis de los compuestos fenólicos no es independiente de la actividad de la PAL sino más bien que la actividad de esta enzima es lo bastante activa para catalizar la reacción metabólica para incrementar el compuesto fenólico (Dunn *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2006; Horbowicz *et al.*, 2008).

1.5.1 Regulación de la PAL

La regulación de ésta enzima es compleja e incluye la activación transcripcional de miembros de la familia génica, la estabilidad de los ARNm y el control post-traducciona, que involucra a la fosforilación (Chen *et al.*, 2001; Allwood *et al.*, 2002). PAL es un blanco para la fosforilación mediada por una cinasa dependiente de calcio (CDPK) en suspensiones celulares de frijol francés en presencia de un inductor (Bolwell, 1992).

Cheng y colaboradores (2001) utilizaron la expresión transitoria en protoplasto de una CDPK de *A. thaliana*. La AtCDPK, fosforila a PAL en residuos de treonina. La identificación de ésta CDPK como la cinasa de PAL ha permitido colocar a esta enzima dentro el mecanismo regulatorio que involucra al Ca^{2+} en el posible control de la biosíntesis del AS (Figura 1.10), a través de los cambios en el Ca^{2+} citosólico (Chen *et al.*, 2006).

1.5.2 El ácido salicílico y la PAL

El AS provoca un incremento en la actividad de la PAL, la cual está estrechamente relacionada con el estado fisiológico o de desarrollo de la planta (Chen *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2008). Mediante la infiltración del AS en frutos de uva se observó que la activación de la PAL se debe a un aumento en la acumulación tanto del ARNm de PAL, así como un incremento en su actividad enzimática y en la síntesis de una nueva proteína repercutiendo todo esto en un incremento en la acumulación de los fenilpropanoides tales como los ácidos fenólicos (Chen *et al.*, 2006).

En suspensiones celulares de *C. chinense* se determinó un incremento en los capsaicinoides después de 24 h de la inducción con el AS; no obstante, la actividad de PAL permaneció sin cambios, concluyéndose que el efecto del AS sobre la actividad de

PAL era el mantenimiento de la actividad y no en la acumulación de capsaicinoides. Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2011).

1.5.3 Señalización fosfolipídica y el metabolismo secundario

La secuencia de los procesos de señalización que siguen a la percepción del inductor por las células vegetales, y finalmente, la síntesis y al transporte de metabolitos secundarios ha sido de interés en la última década. En la mayoría de los estudios, el flujo de Ca^{2+} y los cambios transitorios de éste ión en el citosol son eventos necesarios para la activación de genes de defensa (Zhao *et al.*, 2005).

Moléculas como el H_2O_2 generadas como resultado del estallido oxidativo, están también involucrados en la síntesis de metabolitos estimulada por el inductor (Zhao *et al.*, 2001). Sin embargo, pocos reportes conectan a la señalización fosfolipídica con la inducción de la acumulación de los metabolitos secundarios. La acumulación de fitoalexinas generadas por el inductor en suspensiones celulares de arroz se relaciona con la participación de la enzima PLD puesto que la inhibición de ésta por el n-butanol suprimió parcialmente la acumulación de momilactona A estimulada por el inductor (Yamaguchi *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha propuesto que la activación de la PLD y la producción de PA pueden actuar como reguladores positivos en la biosíntesis de taxol en células de *Taxus chinensis* var. *mairei* (Yang *et al.*, 2007).

Por todo lo anterior, en nuestro grupo de trabajo se ha estudiado el efecto del AS sobre la producción de vainillina en suspensiones celulares de *C. chinense*. Los resultados obtenidos hasta ahora, han demostrado que existe un incremento en los niveles de vainillina cuando las células son tratadas con 100 y 200 μM de AS pero esto, resultó afectado en la presencia de la neomicina, un inhibidor de la señalización de la PLC (Altúzar-Molina *et al.*, 2011). En este sentido, la presente investigación quiere entender cómo el AS regula la producción de vainillina, así como la participación en este proceso de la transducción de señales vía fosfolípidos en las suspensiones celulares de chile habanero.

HIPÓTESIS

Si la señalización fosfolipídica está involucrada en la respuesta a inductores del metabolismo secundario, entonces es de esperar que el incremento en la producción de vainillina estimulada por el AS en suspensiones celulares de *C. chinense* sea modulada por la PLC y/o la PLD.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de la vía de transducción de señales fosfolipídica en el incremento en la producción de vainillina estimulada por el ácido salicílico en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de los inhibidores (neomicina y U73122) en la señalización de la PLC, en la actividad enzimática de la PAL y en el contenido de vainillina
2. Determinar el efecto del 1-butanol en la señalización mediada por la PLD sobre la actividad enzimática de la PAL y el contenido de vainillina
3. Evaluar el efecto del AS en los niveles de transcritos de la PAL en las suspensiones celulares de *C. chinense*

JUSTIFICACIÓN

Aún cuando hay algunos trabajos de investigación de la ruta de biosíntesis de los capsaicinoides y de las enzimas participantes; aquellos sobre los procesos de señalización en relación con la inducción en el metabolismo secundario son aún menos. La identificación de la conexión entre el metabolismo secundario y las vías de señalización que participan después de la percepción del inductor no sólo permitirá entender las rutas complejas de biosíntesis de los metabolitos en las células de las plantas, sino que además podría abrir nuevas perspectivas en el mejoramiento en modelos de plantas que producen metabolitos de alto valor en el mercado. De este modo, el presente proyecto tiene el objetivo de entender el papel de la señalización fosfolipídica en la producción de vainillina estimulada por el AS en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos, se realizó el diseño experimental con el fin de esquematizar de forma sencilla las etapas más importantes a cubrir dentro del proyecto de investigación (Figura 1.14).

1. Para evaluar la participación de la PLC en la producción de vainillina estimulada por el AS, se utilizó a la neomicina y el U73122 como inhibidores de la señalización de la PLC. Las células de 14 días de *C. chinense* fueron tratadas durante 15 min con los inhibidores antes de la adición de 200 μ M de AS. Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la actividad enzimática de PAL, la PLC, la PLD así como también la cuantificación de vainillina y el análisis de la morfología celular.
2. En la segunda parte, se utilizó al 1-butanol como una estrategia para inhibir la producción de PA generado por la acción de la PLD. Las células de 14 días de *C. chinense* fueron tratadas durante 15 min con el 1-butanol antes de la adición de 200 μ M de AS. Se realizó el marcaje radiactivo de las células con ^{32}P -ortofosfato, la medición de la actividad enzimática de PAL, el análisis de expresión del ARNm de esta enzima, el análisis celular y la cuantificación de vainillina.

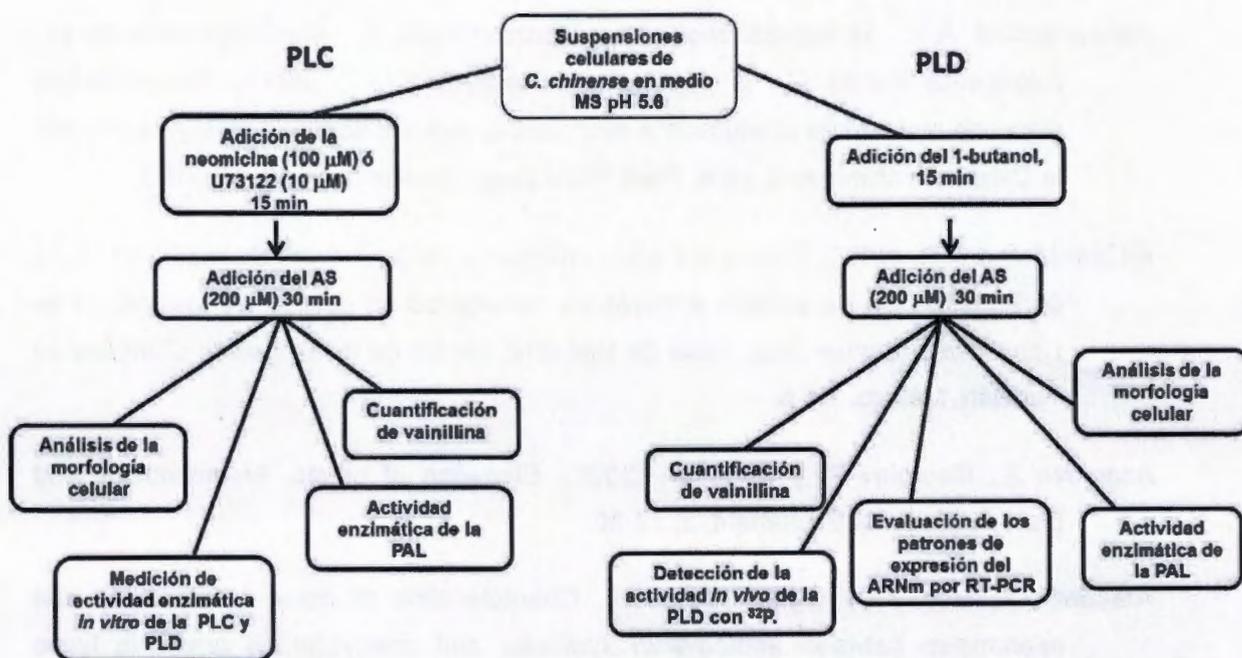


Figura 1.14 Estrategia experimental

BIBLIOGRAFÍA

- Allwood E.G., Davies D.R., Gerrish C. y Bolwell G.P. (2002). Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase in biotically stressed cells on French bean. *Plant Molecular Biology*, 49, 533-544.
- Altúzar-Molina A.R., Muñoz-Sánchez J.A., Vázquez-Flota F., Monforte-González M., Racagni-Di Palma G., y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2011). Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* J. cells. *Plant Physiology Biochemistry*, 49, 151-158.
- Altúzar-Molina A.R. (2008). Efecto del ácido salicílico y del jasmonato de metilo en la vía de transducción de señales a través de fosfolípidos en células en suspensión de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 55 p.
- Angelova Z., Georgiev S. y Roos W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2, 72-80.
- Arakawa O., Hori Y. y Ogata R. (1986). Characteristics of color development and relationship between anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia lyase activity in "starking delicious" "Fuji" and Mustu apple fruits. *J. Japan Soc. Horticultural. Science*, 54, 424-430.
- Arisz S.A., Van Himbergen J.A., Musgrave A., Van den E.H., y Munnik T. (2000). Polar glycerolipids of *Chlamydomonas moewusii*. *Phytochemistry*, 53, 265-270.
- Babar-Ali M., Hanh E.J. y Paek K.Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 12, 607-621
- Bargmann B.O. y Munnik T. (2006). The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 515-522
- Bastiaan O.R., Bargmann, Laxalt A.M., Bas T.R., Schooten B., Merquiol E., Testerink C., Haring M., Bartels D. y Munnik T. (2009). Multiple PLDs required for high salinity

and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell*, 50, 78-89.

Billot J., Hartmann C., Macheix J., y Rateau J. (1978). Les composés phénoliques au cours de la croissance de la poire Passe-Crassane. *Physiology Vegetal*, 16, 693-714.

Bleasdale J. y Fisher S.K. (1993). Use of U73122 as an inhibitor of phospholipase C-dependent processes. *Neuroprotocols: A Companion to Methods in Neurosciences* 3, 125-133.

Bolwell G.P. (1992). A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension-cultured cells of french bean. *Phytochemistry*, 31, 4081-4086.

Borsani O., Valpuesta V. y Botella M.A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 126, 1024-1030.

Campos-Vargas R., Nonogaki H., Suslow T. y Saltveit M.E. (2005). Heat shock treatments delay the increase in wounding-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not induction in romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiology Plant*, 132, 82-91.

Canché-Chay C.I. (2006). Efecto de inductores en la síntesis de capsaicina y las vías de transducción de señales a través de fosfoinosítidos en suspensiones celulares de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Química. Mérida, Yucatán, 62 p.

Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E., y Métraux J.P. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochlorogenic acid in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters*, 582, 473-478.

Chapman K.D. (1998). Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Science*, 3, 419-426.

-
- Chen G., Snyder C., Greer M.S. y Randall J. (2011). Biology and Biochemistry of Plant Phospholipases. *Critical Reviews in Plant Science*, 30, 239-258.
- Chen H., Jones A.D., y Howe G.A. (2006). Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Letters*, 580, 2540-2546.
- Chen J.Y., Wen P.F., Kong W.F., Pan Q.H., Zhan J.C., Li J.M., Wan S.B., y Huang W.D. (2006). Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology Technology*, 40, 64-72.
- Chen Q., Brglez I. y Boss, W.F. (1991). Inositol phospholipids as plant second messengers. In G Jenkins, W Schuch, eds. *Molecular Biology of Plant Development*. Company of Biologist Cambridge, 175 p.
- Chen Z., Iyer S., Caplan A., Klessig D.F. y Fan B. (1997). Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiology*, 114, 193-201.
- Chen Z., Malamy J., Henning J., Conrath U., Sánchez-Casas P., Silva H., Ricigliano J. y Klessig D.K. (1995). Induction, modification and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4134-4137.
- Chen Z., Ricigliano J.R. y Klessig D.F. (1993). Purification and characterization of soluble salicylic acid binding protein from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9533-9537.
- Chen Z., Zheng Z., Huang, J. Lai Z. y Fan B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4, 493-496.
- Cheng S.H., Sheen J., Gerrish C., y Bolwell G.P. (2001) Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Letters*, 503, 185-188.
- Cockcroft S. (2006). The latest phospholipase C, PLC γ , is implicated in neuronal function. *Trends in Biochemical Science*, 31, 4-7.

- Coté G.G. (1995). Signal transduction in leaf movement. *Plant Physiology*, 109, 729-734.
- Dean J.V., Mohammed L.A. y Fitzpatrick T. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, 221, 287-296.
- Den Hartog M., Verhoef N. y Munnik T. (2001). Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells. *Plant Physiology*, 132, 311-317.
- DiCosmo F. y Misawa M. (1985). Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends Biotechnology*, 3, 318-322.
- Dowd P. y Gilroy S. (2010). The emerging roles of phospholipase C in plant growth and development. *Lipid Signalling in Plants*, Munnik T. (ed). Springer, 330 p.
- Drobak B.K. (1992). The plant phosphoinositide system. *Biochemical Journal*, 288, 697-712.
- Du H. y Klessig D.F. (1997). Identification of a soluble, high-affinity salicylic acid-binding protein in tobacco. *Plant Physiology*, 113, 1319-1327
- Dunn D.C, Duncan L.W. y Romeo J.T. (1998). Changes in arginine, PAL activity, and nematode behavior in salinity-stressed citrus. *Phytochemistry*, 49, 413-7.
- Eberhard S., Doubrava N., Marta V., Mohnen D., Southwick A., Darviel A.I. y Albersheim P. (1989). Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell layer explant morphogenesis. *Plant Cell*, 1, 747-755.
- Echevarría-Machado I., Martínez-Estévez M., Muñoz-Sánchez J.A., Loyola-Vargas V.M., y Hernández-Sotomayor S.M.T. y De los Santos Briones C. (2007). Membrane associated phosphoinositide-specific phospholipase C forms from *Catharanthus roseus* transformed roots. *Molecular Biotechnology*, 35, 297-309.
- Fan L., Zheng S. y Wang X. (1997). Antisense suppression of phospholipase D α retards abscisic acid and ethylene-promoted senescence of postharvest *Arabidopsis*

- leaves. *Plant Cell*, 9, 2916-2919.
- Fleuriet A. y Macheix J.J. (1984). Orientation nouvelle du métabolisme des acides hydroxycinnamiques dans les fruits de tomates blessés (*Lycopersicon esculentum*). *Physiology Plantarum*, 61, 64-68.
- Ghars M.A., Richard L., Lefebvre-De Vos D., Leprince A.S., Parre E., Bordenave M., Abdelly C. y Savouré A. (2012). Phospholipases C and D modulate proline accumulation in *Thellungiella halophila/salsuginea* differently according to the severity of salt or hyperosmotic stress. *Plant Cell Physiology*, 53, 183-192.
- Given N.K. (1988). Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *Journal of Plant Physiology*, 133, 25-30.
- Gross W., Yang W., y Boss W.F. (1992). Release of carrot plasma membrane-associated phosphatidylinositol kinase by phospholipase A₂ and activation by a 70 kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1134, 73-80.
- Gutiérrez-Carbajal M.G. (2006). Estudios de la síntesis de capsaicina en cultivos *in vitro* de *C. chinense* Jacq. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. 55 p.
- Gutiérrez-Carbajal M.G., Monforte-González M., Miranda-Ham M.L., Godoy-Hernández G. y Vázquez-Flota F. (2011). Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biologia Plantarum*, 54, 430-434.
- Helsper J.P., Heemskerk J.W., y Veerkamp J.H. (1987). Cytosolic and particulate phosphatidylinositol phospholipase C activities in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Physiology Plantarum*, 71, 120-126.
- Hirayama T., Chikara O., Mizoguchi T. y Shinozaki K. (1995). 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.

- Hong Y., Zhang W. y Wang X. (2010). Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, Cell and Environment*, 33, 627-635.
- Horbowicz M., Grzesiuk A., Debsik H., Koczdojaj D. y Saniewski M. (2008). Methyl jasmonate inhibits anthocyanin synthesis in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* moench). *Acta Biológica Cracoviensia Series Botánica* 2, 71-78.
- Jacob T., Ritchie S., Assmann S.M. y Gilroy S. (1999). Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 12192-12197.
- Jones D.H. (1984). Phenylalanine ammonia lyase: regulation of its induction, and role in plant development. *Phytochemistry*, 23, 1349-1359.
- Jones G.A. y Wu Y. (2000). Effect of limited proteolysis on phospholipase C- γ 1 kinetics. *Biochemical Biophysics*, 375, 229-239.
- Kamada Y. y Muto S. (1994). 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 Physiology*, 35, 405-409.
- Kashem M.A., Itoh K., Iwabuchi S., Hori H., y Mitsui T. (2000). Possible involvement of phosphoinositide-Ca²⁺ signaling in the regulation of alpha-amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology*, 41, 399-407.
- Kataoka I., Kubo Y., Sugiura A. y Tomana T. (1983). Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocianin synthesis during berry ripening of three grape cultivars. *J. Japan Soc. Horticultural Science*, 52, 273-279.
- Kothari S.L., Joshi A., Kachhwaha S. y Ochoa-Alejo N. (2010). Chilli peppers-A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28, 35-48.
- Kováčik J., Klejdus B., Bačkor M. y Repčák M. (2007). Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria*

-
- chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science*, 172, 393-403.
- Krinke O., Flemer M., Vergnolle S.C., Renou J.P., Taconnat L., Yu A., Burketová L., Valentová O., Zachowski A. y Ruelland E. (2009). Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiology*, 150, 424-436.
- Krinke O., Novotná Z., Valentová O. y Martinec J. (2007). Inositol trisphosphate receptor in higher plants: is it real?. *Journal of Experimental Botany*, 58, 361-376.
- Kumar D. y Klessig D.F. (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 16101-16106.
- Lafuente M.T., Sala J.M. y Zacarías L. (2004). Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Journal Agricultural Food Chemical*, 52, 3606-3611.
- Laxalt A.M. y Munnik T. (2002). Phospholipid signaling in plant defense. *Current Opinion Plant Biology*, 5, 1-7.
- Laxalt A.M., Ter R.B., Veerdonk J.C., Parigi L., Tameling W.I., Vossen T., Haring M., Musgrave A. y Munnik T. (2001). Characterization of five tomato phospholipase D cDNAs: rapid and specific expression of LePLD 1 on elicitation with xylanase. *Plant Journal*, 26, 237-247.
- Lee S., Suh S., Kim S., Crain R.C., Kwak J.M., Nam H.G., y Lee Y. (1997). Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. *Plant Journal*, 12, 547-556.
- Legendre L., Yueh Y.G., Crain R., Handdock N., Heinstejn P.F. y Low P.S. (1993). Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 24559-24563.
- Lein W. y Saalbach G. (2001). Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco. *Biochemical Biophysics Acta*, 1530, 172-183.

CAPÍTULO I

- Leslie C.A., y Romani R.J. (1986). Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Reports*, 5, 144-146.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., y Lamb C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79, 583-593.
- Leyva A., Jarillo J A., Salinas J. y Martínez-Zapater J.M. (1995). Low temperatura induces the accumulation of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase mRNA of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology*, 108, 39-46.
- Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G., Lavie Y. y Tang X. (1999). Localization and possible functions of phospholipase D isozymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1439, 245-263.
- Liu H.T., Huang W.D., Pan Q.H., Weng F.H., Zhan J.C., Liu Y., Wan S.B. y Lui Y.Y. (2006). Contributions of PIP₂-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *Journal Plant Physiology*, 163, 405-416.
- López L. y Castro G. (2005). Al rescate de la diversidad genética del chile (*Capsicum spp.*) en Oaxaca, México. Memoria de la Segunda Convención Mundial del Chile. Zacatecas, Zac. pp: 253-257.
- MacRobbie E.A. (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. *Phil. Trans. R. Soc. London, B. Biol. Sci.*, 353, 1475-1488.
- Madrid E. y Corchete P. (2010). Silymarin secretion and its elicitation by methyl jasmonate in cell cultures of *Silybum marianum* is mediated by phospholipase D-phosphatidic acid. *Journal of Experimental Botany*, 61, 747-754.
- Malamy J., Carr J.P. Klessing D.F. y Raskin I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to tobacco mosaic virus. *Science*, 250, 1002-1004.

- Maldonado R., Goñi O., ESCRIBANO M.I. y Merodio C. (2007). Regulation of phenylalanine ammonia-lyase enzyme in *annona* fruit: kinetic characteristics and inhibitory effect of ammonia. *Journal of Food Biochemistry*, 31, 161-178.
- Mansfeld J., y Ulbrich-Hofmann R. (2009). Modulation of phospholipase D activity *in vitro*. *Biochemical Biophysics Acta*, 1791, 913-926.
- Meijer H.J.G. y Munnik T. (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Rev. Plant Biology*, 54, 265-306
- Munnik T. y Nielsen E. (2011). Green light for polyphosphoinositide signals in plants. *Current Opinion in Biology*, 14, 489-497.
- Munnik T. y Testerink C. (2008). Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *Journal of Lipid Research*, 260-265.
- Munnik T., y Vermeer J.E.M. (2010) Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositolphosphate signaling in plants. *Plant Cell Environmental*, 33, 655-669.
- Munnik T. Van Himbergen J.A.J., Ter R.B., Braun F.J., Irvine R.F., Vanden Ende H. y Musgrave A. (1998). Detailed analysis of the turnover of phosphoinositides and phosphatidic acid upon activation of phospholipases C and D in *Chlamydomonas* cells treated with non-permeabilizing concentrations of mastoporan. *Planta*, 207, 133-145.
- Munnik T., Arisz S.A, de Vrije T., y Musgrave A. (1995) G-protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants. *Plant Cell*, 7, 2197-2210.
- Munnik T., Irvine R.F. y Musgrave A.P. (1998). Phospholipid signaling in plants. *Biochemical Biophysics Acta*, 1389, 222-272.
- Nieto-Pelayo Y. (2006). Inducción de la síntesis de capsaicinoides en cultivos de células en suspensión de *Capsicum chinense*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán. 95 p.
- Ochoa-Alejo N. y Gómez-Peralta J.E. (1993). Activity of enzymes involved in capsaicin

- biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal Agricultural Food Chemical*, 46, 1695-1697.
- Ochoa-Alejo N. y Salgado-Garciglia R. (1992). Phenylalanine ammonia-lyase activity and capsaicin-precursor compounds in *p*-fluorophenylalanine-resistant and -sensitive variant cells of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum*, 85, 173-179.
- Ochoa-Alejo N., y Ramírez-Malagón R. (2001). *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular Development Biology Plant*, 37, 701-729.
- Oufedkijh H., Mahrouz M., Amiot M.J., y Lacroix M. (2000). Effect of γ -irradiation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. Ex Tanaka. *Journal Agricultural Food Chemical*, 48, 559-565.
- Perera I.Y., Heilmann I., Chang S.C., Boss W.F., y Kaufman P.B. (2001). A role for inositol 1,4,5-trisphosphate in gravitropic signaling and the retention of cold-perceived gravistimulation of oat shoot pulvini. *Plant Physiology*, 125, 1499-1507.
- Piña-Chablé M.L., De los Santos Briones C., Muñoz-Sánchez J.A., Echevarría-Machado I., y Hernández-Sotomayor S.M.T. (1998). Effect of different inhibitors on phospholipase C activity in *Catharanthus roseus* transformed roots. *Prostaglandins and other Lipids Mediators*, 56, 19-31.
- Pingret J.L., Journet E.P. y Barke D.G. (1998). *Rhizobium* Nod factor signaling: evidence for a G protein-mediated mechanism. *Plant Cell*, 10, 659-671.
- Popova L., Ananieva E., Hristova V., Christov K., Georgieva K., Alexieva V. y Stoinova Z.H. (2003). Salicylic acid and methyl jasmonate-induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. *Journal of Plant Physiology*, 133-152.
- Popova L., Pancheva T., y Uzunova A. (1997) Review: Salicylic acid: Properties, biosynthesis and physiological role. *Bulgarian Journal Plant Physiology*, 23, 85-93.

-
- Profotová B., Burketová L., Novotná Z., Martinec J., y Valentová O. (2006). Involvement of phospholipase C and D in early response to SAR and ISR inducers in *Brassica napus* plants. *Plant Physiology Biochemical*, 44, 143-151.
- Ramani S. y Chellilah J. (2007). UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *BMC Plant Biology*, 7, 1-17.
- Ramos-Díaz A., Brito-Argáez I., Munnik T. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2007). Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta*, 225, 393-401.
- Raskin I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review. Plant Physiology*, 43, 439-463.
- Raskin I., Skubatz H., Tang W, y Meeuse B.J.D. (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Annals Botany*, 66, 369-373.
- Ruiz-Lau N., Medina-Lara F., Minero-García Y., Zamudio-Moreno E., Guzmán-Antonio A., Echevarría-Machado I. y Martínez-Estévez M. (2011). Water deficit affects the accumulation of capsaicinoids in fruits of *Capsicum chinense* Jacq. *HortScience* 46, 487-492.
- Ryu S.B. y Wang X.M. (1996). Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation of wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves. *Biochimical. Biophysics. Acta*, 1303, 243-250.
- Sánchez-Ballesta M.T., Zacarías L., Granell A., y Lafuente M.T. (2000). Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits. *Journal Agricultural Food Chemical*, 48, 2726-2731.
- Schacht J. (1976). Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex *in vitro*. *Journal of Neurochemistry*, 27, 1119-1124.

- Shulaev V., Colt es D., Miller G. y Mittler R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132, 199-208.
- Sepúlveda-Jiménez G., Porta-Ducoing H. y Rocha-Sosa M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de la planta. *Revista Mexicana de Fitopatolog a*, 21, 351-363.
- Sgarbi E., Fornasiero R.B., Lins A.P., y Bonatti P.M. (2003). Phenol metabolism is differentially affect by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera L.*) leaf. *Plant Science*, 165, 951-957.
- Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., Del Pozo O., Martin G.B. y Klessig D.F. (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 11640-11645.
- Stauffer T.P., Ahn S. y Meyer T. (1998). Receptor induced transient reduction in plasma membrane PtdIns (4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Current. Biology*, 8, 343-346.
- Stax n I., Pical C., Montgomery L.T., Gray J.E., Hetherington A.M. y Mcainsh M.R. (1999). Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1779-1784.
- Strawn, M.A. Marr, S.K., Inoue K., Inada, N., Zubieta, C. y Wildemuth M.C. (2007). *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 5919-5933.
- Sudha G. y Ravishankar G.A. (2003). Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens*. Mill. *Current Science*, 85, 1212-1217.
- Teklemariam T.A. y Blake T.J. (2004). Phenylalanine ammonia lyase-induced freezing tolerance in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with low ambient levels

-
- of ultraviolet-B-radiation. *Physiol. Plant*, 122, 244-253.
- Tenhaken R. y Rubel C. (1997). Salicylic acid is needed in hypersensitive cell death in soybean but does not act as a catalase inhibitor. *Plant Physiology*, 115, 291-298.
- Toyoda K., Kawahara T., Ichinose Y., Yamada T. y Shiraishi T. (2000). Potentiation of phytoalexin accumulation in elicitor-treated epicotyls of pea (*Pisum sativum*) by a diacylglycerol kinase inhibitor. *Journal of Phytopathology*, 148, 633-636.
- Toyoda K., Shiraishi T., Yamada T., Ichinose Y. y Oku H. (1993). Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant and Cell Physiology*, 34, 729-735.
- Tuteja N. y Sopory S. K. (2008). Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 3: 525-536.
- Uppalapati, S.R. Ishiga Wangdi Y., Kunkel T., Anand B.N., Mysore A.K. y Bender C.L. (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 955-965.
- Van der Luit A.H., Piatti T., Van Doorn A., Musgrave A., Felix G., Boller T. y Munnik T. (2000). Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiology*, 123, 1507-1515.
- Vasconsuelo A. A., Giuletti A.M., Picotto G., Rodriguez-Talou J., y Boland R. (2003) Involvement of the PLC/PKC pathway in chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures. *Plant Science*, 165, 429-436
- Vázquez-Flota F., Miranda-Ham M.L., González-Monforte M., Carbajal-Gutiérrez G., Velázquez-García C. y Nieto-Peláyo Y. (2007). La Biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30, 353-360.

CAPÍTULO I

- Verberne M.C., Verpoorte R., Mercado-Blanco J.F., y Linthorst H.J.M. (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*, 18, 779-783.
- Vlot A.C., Amick D.D., y Klessig D.F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review Phytopathology*, 47, 177-206.
- Wang X. (2000). Multiple forms of phospholipase D in plants: The gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Progress in Lipid Research*, 39, 109-149.
- Wang X. (2001). Plant phospholipases. *Plant Molecular Biology*, 52, 211-231.
- Wang X. (2002). Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Current Opinion Plant Biology*, 5, 408-414.
- Wang X. (2004). Lipid signaling. *Current Opininnion Plant Biology*, 7, 1-8.
- Wang X. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid and jasmonic acid on the inhibition of seed germination and the induction of freezing tolerance. *Canadian Journal Botany*, 72, 1009-1017.
- Wen P.F., Chen J.Y., Wan S.B., Kong W.F., Zhang P., Wang W., Cheng-Zhan J., Pan Q.H. y Huang W.D. (2008). Salicylic acid activates phenylalanine ammonia lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Regulation*, 55, 1-10.
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., y Ausubel F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 41, 562-571.
- Wimalasekera R., Pejchar P., Holk A., Martinec J. y Scherer G.F. (2010). Plant phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipases C NPC3 and NPC4 with roles in root development and brassinolide signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 3, 610-625.

-
- Xue H.W. y Chen M.X. (2009). Function and regulation of phospholipid signaling in plants. *Biochemical Journal*, 421, 145-156.
- Yamaguchi T., Minami E., Ueki J. y Shibuya N. (2005). Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells. *Plant and Cell Physiology*, 46, 579-587.
- Yamaguchi T., Tanabe S., Minami E. y Shibuya, N. (2004) Activation of phospholipase D induced by hydrogen peroxide in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiology*, 9, 1261-1270.
- Yan Q., Shi M., Ng J. y Wu J.Y. (2006) Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*, 170, 853-858.
- Yang S., Qiao B., Lu S.H. y Yuan Y.J. (2007). Comparative lipidomics analysis of cellular development and apoptosis in two *Taxus* cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771, 600-612.
- Zhao J., Fujita K., Yamada J. y Sakai K. (2001). Improved β -thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 301-305.
- Zhao J., Davis L.C., y Verpoorte R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23, 283-333.
- Zhou X. y Zhong J. (2011) Intracellular salicylic acid is involved in signal cascade regulating low ammonium-induced taxoid biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 90, 1027-1036.
- Zhen-Zhen Y., Chun-Xiang F., Ying-Shan H., Yong-Xing L. y De-Xiu Z. (2006). Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. *Biotechnological Letter*, 28, 1027-1031.

CAPÍTULO II

¹SALICYLIC ACID INDUCES VANILLIN SYNTHESIS THROUGH THE PHOSPHOLIPID SIGNALING PATHWAY IN *Capsicum chinense* CELL CULTURES

2.1 INTRODUCTION

Phospholipids are structural components of the cell plasma membrane and are important messengers that regulate plant growth and development and cellular response to environmental change or stress (Xue *et al.*, 2009). Phospholipid-generated signal transduction involves a family of phospholipases that catalyze the hydrolysis of plasma membrane phospholipids to generate secondary messengers. Phospholipase C (PLC) hydrolyzes phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate (PIP₂) to generate inositol 1,4,5 trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG). In plants, IP₃ may be converted instead to inositol hexaphosphate (IP₆), which has been shown to stimulate the release of Ca²⁺ from intracellular stores in guard cells (Munnik y Vermeer 2012). Phospholipase D (PLD) hydrolyzes membrane phospholipids, generating structural phosphatidic acid (PA) and releasing the polar head of the phospholipid (Munnik y Nielsen 2011). Phospholipid signaling is involved in plant response to phyto regulators such as salicylic acid (SA), an important endogenous signaling molecule in plant defense. It also regulates several plant physiological processes and is essential for the expression of some defense genes (Raskin, 1990).

Two pathways of SA biosynthesis have been proposed in plants: the shikimic acid pathway and cinnamate pathway (Dempsey *et al.*, 2010). Salicylic acid has been applied in different plants to elicit the production of some secondary metabolites. In the genus *Capsicum*, SA has been used to induce secondary metabolites and increase capsaicinoid content in *in vitro* cultures (Sudha y Ravishankar, 2003; Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2011). Capsaicinoid formation can originate from the phenylpropanoid pathway and via branched-chain amino acids such as valine or leucine (Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

¹ Rodas-Junco B.A., Cab-Guillén Y., Muñoz-Sánchez J.A., Vázquez-Flota F., Monforte-González M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2013). Salicylic acid induces vanillin synthesis through the phospholipid signaling pathway in *Capsicum chinense* cell cultures. Publicado en *Plant Signaling & Behaviour*, 8, doi:10.4161/psb.26752.

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), a key enzyme in the phenylpropanoid pathway, forms cinnamic acid by the deamination of phenylalanine. PAL activity can be induced in response to various stress-inducing factors including freezing (Sánchez-Ballesta *et al.*, 2000; Lafuente *et al.*, 2004), wounding (Campos-Vargas *et al.*, 2005), UV light (Teklemariam *et al.*, 2004) and phytohormones such as SA. Increased PAL activity is associated with the accumulation of secondary metabolites (e.g., anthocyanins, flavonoids and other phenolic compounds) in the tissues of plants such as pear (Billiot *et al.*, 1978), grape (Kataoka *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 2006), tomato (Fleuriet *et al.*, 1984), apple (Arakawa *et al.*, 1986), strawberry (Given, 1988) and tangerine (Oufedkijh *et al.*, 2000). This supports evidence suggesting that PAL is an environmental stress indicator in different plant tissues (Leyva *et al.*, 1995; Sánchez -Ballesta *et al.*, 2000). However, the relationship between phospholipid signaling, SA and PAL has not yet been established.

Several inhibitory substances have been used to elucidate the role of phospholipid enzymes in cellular responses (Toyoda *et al.*, 2000). In pharmacological studies using the inhibitors neomycin and U73122 (PI-PLC inhibitors), PLC was shown to play a role in cellular response in plant models such as alfalfa, rice, seeds, peas and carrot cell suspensions (Legendre *et al.*, 1993; Staxen *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2005). An evaluation of PLD involvement in different plant cellular processes has been conducted using a primary alcohol such as 1-butanol (1-but), which can inhibit PA-mediated PLD production by competing with water to generate the phosphatidyl-butanol group (Testerink y Munnik, 2005). This lipid is not normally present in cells but can be easily synthesized *in vivo* when cells are pre-incubated with low concentrations (0.1-0.5%) of 1-butanol (Chen, 2001). In this method, PLD-induced PA production is required to regulate increased production of secondary metabolites such as silymarin in *Silybum marianum* cell suspensions (Madrid y Corchete, 2012) or scopoletin in tobacco suspensions (Wang *et al.*, 2013). These studies suggest that the products of the phospholipid signaling cascade may function as secondary messengers during the stimulation of secondary metabolism in plants (Yamaguchi *et al.*, 2004; Munnik y Nielsen, 2011).

Our research group has observed that the treatment of *C. chinense* cell suspensions with 100 and 200 μ M SA modulates the *in vitro* enzymatic activities of PLC and PLD, resulting in increased vanillin content (Altúzar-Molina *et al.*, 2001). However, when vanillin content

was evaluated in the presence of neomycin, the SA-induced vanillin production was inhibited. Therefore, we focused on elucidating the relationship between phospholipid signaling, PAL activity and vanillin accumulation, which are all events closely related to the SA induction response. Our goal was to analyze biochemical evidence supporting PLC and PLD involvement in SA-induced signal transduction in the presence of neomycin, U73122 and 1-but and evaluate vanillin accumulation and PAL activity in *C. chinense* suspension cells.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Materials

Neomycin sulfate, U73122, U73343, 1-But, tert-butanol and sodium salicylate were purchased from Sigma-Aldrich. U73122 and U73343 were dissolved in dimethyl sulfoxide to make stock solutions. Bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent was used (Pierce Chemical Co). All other chemicals were supplied by Sigma-Aldrich.

2.2.2 Cell culture and SA treatment

Capsicum chinense suspension cells were obtained by callus desegregation followed by culture in MS medium at pH 5.6 (Murashige y Skoog, 1962). The MS medium was supplemented with 0.5 mM myo-inositol, 0.02 mM thiamine, 0.2 mM cysteine, 4 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3% sucrose. Cells were subcultured every 14 days. For the induction treatments, 1 g (fresh weight) cell suspension per flask was inoculated into 25 ml culture medium and maintained as described above for 14 days prior to SA exposure. After the culture period, 200 μ M SA was added to the cell suspension, and water was added in the control sample. Both samples were kept at 25 °C on a rotary shaker at 100 rpm for 30 min. The cells were then harvested, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until protein extraction.

2.2.3 Phospholipase inhibitor treatment

Before being added to cell suspensions, the inhibitors neomycin (100 μ M), U73122 (10 μ M) and 1-but (0.5%) were sterilized by filtration using Millipore membrane (0.45 μ m). Each inhibitor was added to a cell suspension at the end of the 14-day culture period and

15 min before SA addition.

2.2.4 Scanning electron microscopy

Upon the completion of inhibitor treatment and prior to fixation, the cells were centrifuged at 850 x g for 10 s to completely remove the culture medium. Cells were then immersed in a fixative solution [0.2 M buffer solution (pH 7.2) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 2.5% glutaraldehyde (fixative)] for 48 h (24 h at room temperature followed by 24 h at 4 °C in darkness). Following fixation, samples were washed with 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) (without fixative) to completely remove any residual fixative agent. Cells were then centrifuged at 3,000 x g for 10 s and the supernatant (i.e., fixative) discarded. The pellet was gently suspended in phosphate buffer for 30 min. This process was done a total of three times.

After washing, samples were dehydrated with a series of increasing ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) concentrations. The cells were centrifuged at 3,000 x g for 10 s and the phosphate buffer removed after the third wash. The pellet was suspended in 30% ethanol, stirred gently and left at 4 °C for 30 min. Two changes were made for each ethanol concentration used. This process was repeated after the 50% and 70% ethanol washing steps, and the samples were refrigerated at the final concentration (70%) until the following day. Cell dehydration was continued by increasing the ethanol percentage to 85%, 96% and finally to absolute ethanol. Samples were then dried with liquid CO_2 . Cells were viewed by scanning electron microscopy (SEM) (Carl Zeiss Axioplan II, Carl Zeiss MicroImaging Inc., Thornwood, NY, USA) using bright field and phase contrast optical conditions. Images were taken with a digital camera (Axiocam MRM) attached to the microscope and processed using the manufacturer's software.

2.2.5 Protein extract preparation

For protein extraction, 1 g of cells was homogenized in a mortar and pestle in 2 ml extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 15 mM β -mercaptoethanol) at 4 °C. The resulting mixture was centrifuged at 1,747 x g for 30 min and the supernatant used as the PAL enzyme source for the activity assay. Sample protein concentration was measured by the BCA assay (Hermanson *et al.*, 1985) using bovine serum albumin (BSA) as a

standard.

2.2.6 PAL activity

Enzymatic activity assay was carried out in 2 ml reaction volume containing 0.5 ml enzyme extract (5-20 μg protein), 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) and 0.5 ml 10 mM L-phenylalanine (Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993). After incubating this mixture at 37 °C for 1 h, 500 μl 6 M HCl was added to stop the reaction and then centrifuged at 10,000 x g for 10 min. The supernatant was removed to quantify PAL activity in a spectrophotometer at 290 nm. The boiled extract was white in appearance and contained other reaction mixture components. A calibration curve was generated using cinnamic acid, and one unit of enzyme activity was designated as being equivalent to the amount required to produce 1 pmol cinnamic acid / min (Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993).

2.2.7 Vanillin determination

Vanillin was acetone extracted from freeze-dried cultures and quantified by *in situ* TLC densitometry using a Shimadzu CS-930 dual wavelength chromatoscanner equipped with a DR 2 data collector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) (Monforte-González *et al.*, 2007).

2.2.8 Total SA Measurement

Endogenous total SA levels were measured in total extract by adding 800 μl buffer (50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 250 mM sucrose, 10% glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM sodium pyrophosphate, 0.2 mM sodium orthovanadate), 1.24 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM β -mercaptoethanol per gram of plant tissue, homogenizing the mixture and centrifuging it at 20,442 x g for 30 minutes at 4 °C. Organic phase extraction was performed by adding 1 ml 1M HCl to 0.5 ml protein extract, mixing for 20 seconds, adding 2 ml dichloromethane/isopropanol (9:1 v/v), stirring for 5 min and centrifuging at 3,351 x g for 5 min. The organic phase (bottom layer) was evaporated in a CentriVap (DyNA Vap) at 400 mbar for 1 hour. The concentrate was resuspended in 50 μl mobile phase [pH 3.6 acetate buffer / methanol (72:28 v/v)]. SA separation was done by high performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1100) using a 4.6 x 150 mm ion exchange column (Eclipse XDB-C18). SA was eluted with the mobile phase at a rate of 1

ml/min at room temperature and quantified SA by UV spectrometry at 280 nm.

2.2.9 Data presentation

All experiments were repeated at least three times using extracts prepared in separate occasions, and all produced similar results. Data were analyzed using a Student t test (* $p < 0.01$ vs. control). Analyses were run using the Sigma Stat ver. 3.1 program (2004).

2.3 RESULTS

2.3.1 Effect of SA on PAL enzymatic activity and vanillin levels

SA-induced response and activity of PAL was studied in *C. chinense* suspension cells after culturing them for 14 days. Cells were harvested by transferring 1 g of the samples into flasks containing 25 ml fresh Murashige and Skoog (MS) medium. After a 15 min adjustment period, one sample was exposed to 200 μM SA for 30 min, and a control sample was left unexposed for the same period of time. Cells were then harvested by vacuum filtration and immediately frozen in liquid nitrogen.

PAL activity was found to be doubled in the 200 μM SA treatment compared to the control (Figure 2.1A). Because increased PAL activity is associated with secondary metabolite accumulation, the present model was used to evaluate the effect of SA on vanillin accumulation. Addition of 200 μM SA to the cell suspensions three times markedly stimulated vanillin production (Figure 2.1B), suggesting that SA-induced vanillin biosynthesis yield is correlated to increased PAL enzyme activity.

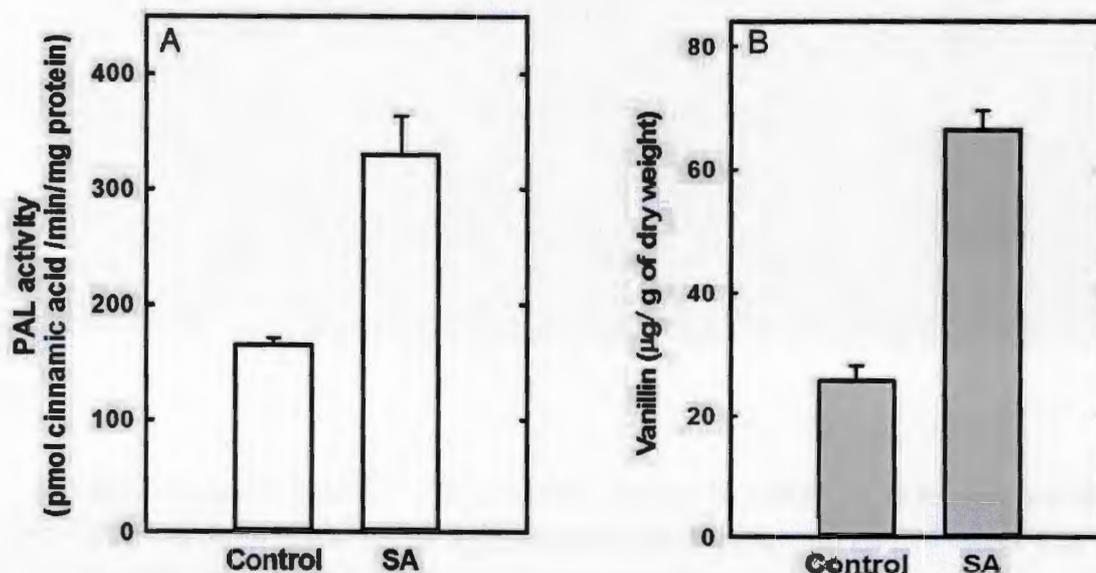


Figure 2.1 Salicylic acid increases PAL activity and vanillin content in *C. chinense* cells. After a 14-day culture cycle, cells were treated with 200 μ M SA or untreated (control) and then PAL activity (A) and vanillin production (B) assessed. Results represent the mean of three independent experiments \pm SE, * $p < 0.001$.

2.3.2 Effect of phospholipase inhibitors on cell structure

Initially, the effect of inhibitors of PI-PLC (neomycin and U73122) and PLD inhibitor (1-But) on cell suspensions was evaluated, followed by analysis of the cellular structure using scanning electron microscopy. Prior to SA treatment, the cells were pretreated for 15 min with the inhibitors neomycin, U73122 or 1-But (Figures 2.2 and 2.3). Cells treated with SA exhibited no abnormalities in structure (Figure 2.2C) and were similar in appearance to the control cells (Figure 2.2A). Cells in the neomycin + SA treatment group (Figure 2.2G) showed no visible structural changes compared to the SA only treatment group (Figure 2.2C). The U73122 + SA treatment caused no differences in cellular structure in terms of cell shape (Figure 2.2I), and the 0.5% 1-butanol treatment had no effect on cell morphology (Figure 2.3D). Therefore, the treatments with SA and inhibitors did not cause any visual morphological damage to the cell structure that might compromise metabolic

activity.

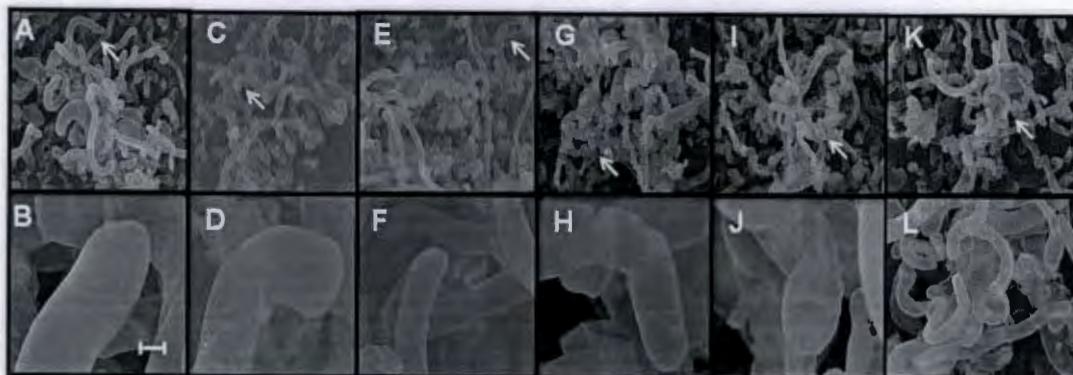


Figure 2.2 Effect of PLC-inhibitors on cellular morphology of *C. chinense* suspension cells. The cells were treated with SA (C), neomycin (E), neomycin + SA (G), U73122 + SA (I) and U73343 + SA (K) (see Material and Methods) and observed by scanning electron microscopy. The images in the upper panel represent a group of cells, while the bottom panel (bar = 10 μm) shows a closer view of a single cell, indicated by the white arrows in the upper panel.

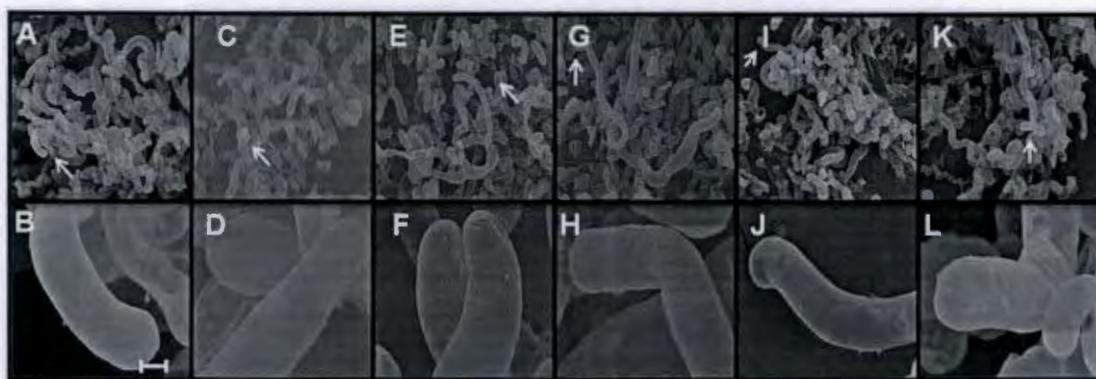


Figure 2.3 Effect of 1-butanol on *C. chinense* cellular morphology. The cells were treated with SA (C), 1-But (E), 1-But + SA (G), Tert (I) and Tert + SA (K) (see Material and Methods) and observed by scanning electron microscopy. The images in the upper panel represent a group of cells, while the bottom panel (bar = 10 μm) shows a closer view of a single cell, indicated by the white arrows in the upper panel.

2.3.3 U73122 and neomycin reduce PAL activity and SA-stimulated vanillin levels

To determine the role of PLC in the regulation of vanillin accumulation in *C. chinense* cells, the cells were first treated with the PI-PLC inhibitors neomycin and U73122 and then treated with SA. Cell suspensions were placed in 25 ml fresh MS medium containing neomycin and/or U73122 for 15 min, and a sample without inhibitor treatment was used as the control. Salicylic acid (200 μ M) was then added to some of the cell/inhibitor mixtures for 30 minutes, while the others were not treated with SA. Our results showed that upon neomycin-only treatment, PAL activity was similar to that of the control sample (Figure 2.4A) but higher than the neomycin + SA treated sample, suggesting SA-induced stimulation. Treatment with U73122 lowered PAL activity only by 26% compared to the control. The U73122-SA treatment further decreased PAL activity, especially compared to the SA only treatment (Figure 2.4B). Treatment of cells with U73343, the inactive analog of U73122, did not alter PAL activity. These results suggest that SA-induced increases in PAL activity can be regulated by PLC-mediated signaling.

The above results also imply that PLC signaling and metabolite (i.e., vanillin) accumulation are both related to the SA induction response. To further evaluate the effect of neomycin and U73122 treatment on vanillin levels, cell suspensions were placed in 25 ml fresh MS medium containing neomycin or U73122 for 15 min before the addition of SA for 30 min (Figures 2.4C and D). Neomycin-only treatment produced vanillin levels similar to control levels (Figure 2.4C), but neomycin-SA treatment reversed any SA-stimulated increases in vanillin accumulation. When treated with U73122 only, vanillin levels remained at basal levels similar to those observed in the neomycin-only treated cells (Figure 2.4D). Combined U73122-SA treatment produced lower levels of vanillin than in the SA-only treatment. The inhibitory analogue U73343 had no effect on vanillin levels (Figure 2.4D).

2.3.4 PLD regulates PAL activity and accumulation of vanillin in *C. chinense*

To assess the role of PLD signaling in PAL regulation, 1-But was used as an inhibitor of PLD-induced PA formation. Because 1-But may have a toxic effect on metabolite production, different concentrations (% v/v) were evaluated to identify the concentration that did not affect basal vanillin levels in cell suspensions. After 15 min treatment with 1-

But, cells were filtered, lyophilized and vanillin levels quantified. At the 1% concentration, 1-But reduced vanillin levels by 53% compared to the control, but concentrations <0.75% had no effect on vanillin levels (Figure 2.5A). Specifically, 1-But at 0.5% did not affect basal vanillin levels compared to the control and therefore, this concentration was used to evaluate the effect of 1-But on PAL activity and SA-stimulated vanillin accumulation. After 14 days in culture, cell suspension samples were placed in 25 ml fresh MS medium containing 0.5% 1-But for 15 min before the addition of SA. Tert-butanol, an inactive 1-But isomer, was used as a positive control (Figure 2.5B). In the 1-But treatment, vanillin levels were similar to that of the control (Figure 2.5B). In contrast, 1-But-SA treatment decreased the vanillin content by 84%, effectively reversing SA-stimulated vanillin accumulation. Tert-butanol had no effect on basal levels of vanillin content in the cell suspension.

In the 1-But-only treatment, PAL activity was similar to control (Figure 2.5C). However, PAL activity was 58% lower in the 1-But + SA treatment than in the SA-only treatment. Tert-butanol did not modify PAL activity. These results suggest that SA-stimulated increases in PAL activity are mediated by PLD signaling.

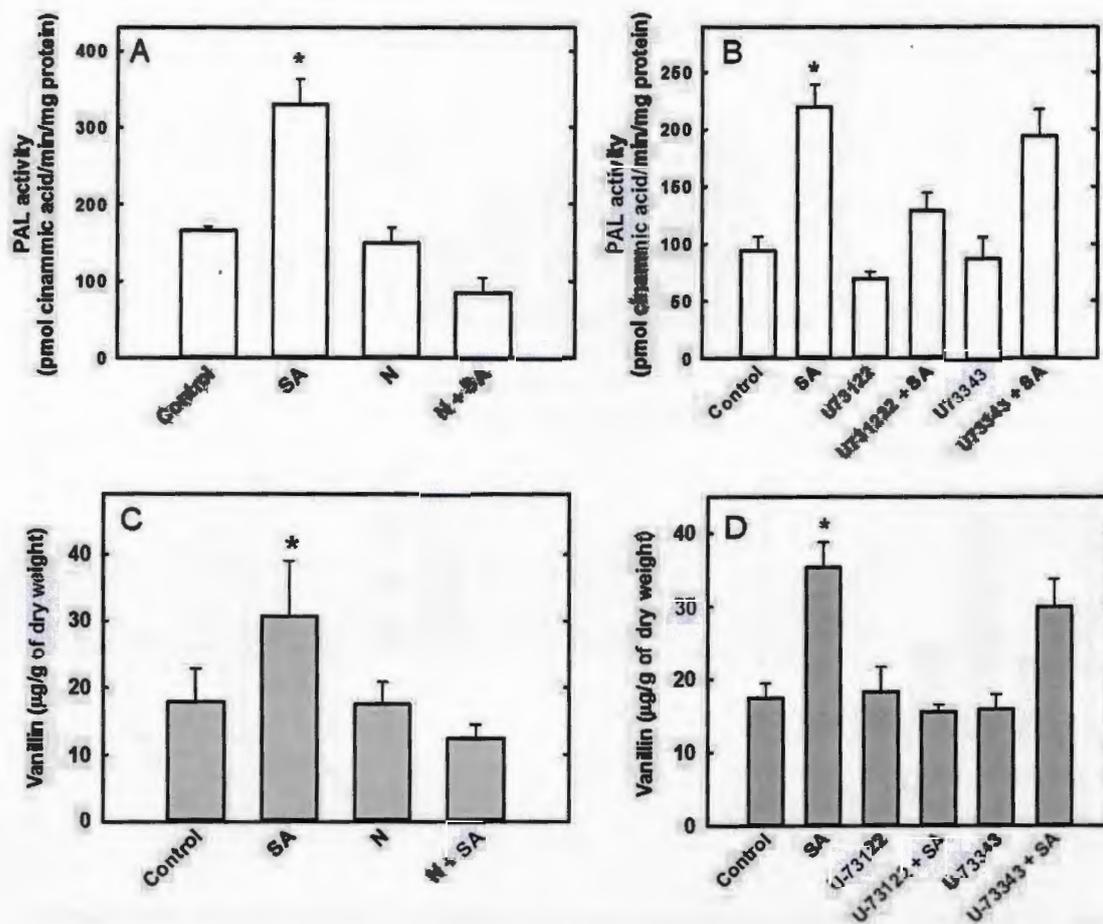


Figure 2.4 PLC-inhibitors suppress vanillin accumulation and PAL activity in *C. chinense* suspension cells. Cells were treated with 100 μM neomycin (N), 10 μM U73122 or 10 μM U73343 (inactive analogue) for 15 min before SA addition and the PAL activity (A and B) and vanillin content (C and D) were evaluated. Data represent the mean of three independent experiments \pm SE, * $p < 0.001$.

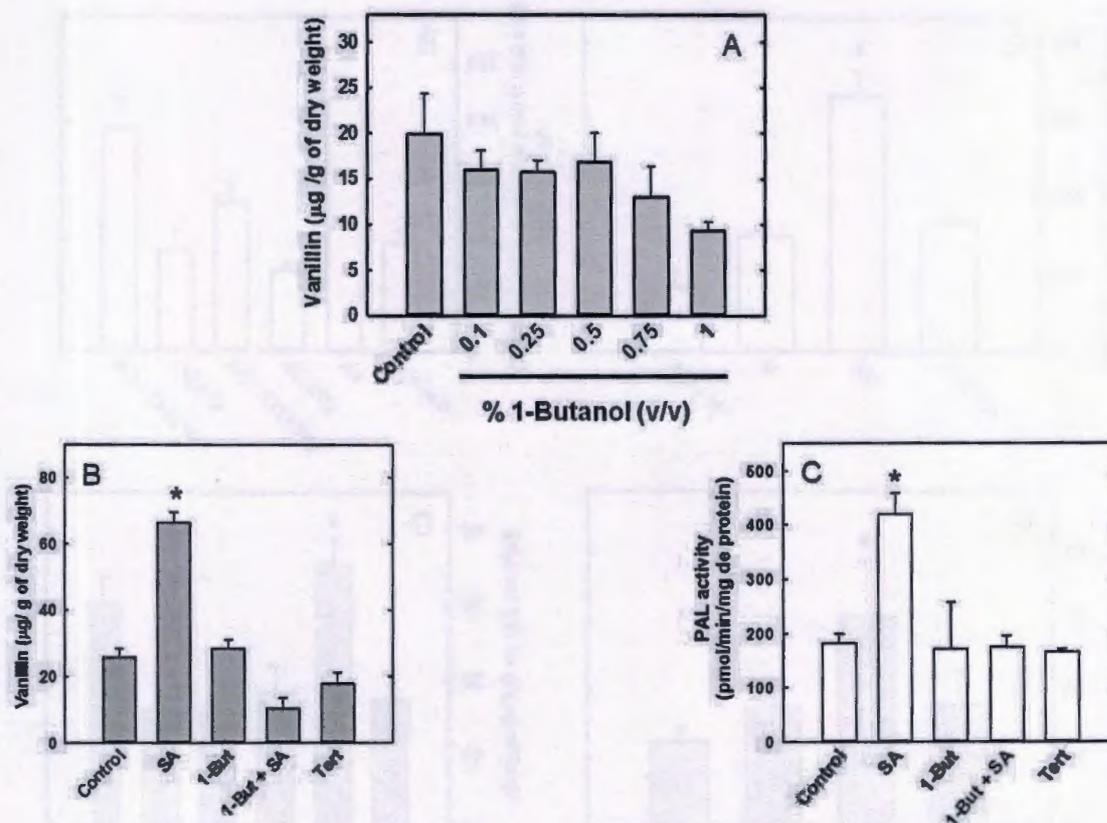


Figure 2.5 Reduction of vanillin accumulation and PAL activity in *C. chinense* cells in the presence of 1-butanol. Vanillin content was evaluated in cells treated with increasing concentrations of 1-butanol for 15 min (A). Cells were incubated in 1-butanol (1-But, 0.5%), 200 µM SA, 1-But + SA or 0.5% Tert-butanol (Tert). Vanillin content (B) and PAL activity (C) were then evaluated. Data represent the mean of three independent experiments \pm SE, * $p < 0.001$.

2.3.5 Total endogenous SA production

Total endogenous SA level in the cells was quantified in the presence of neomycin, U73122 or 1-But to determine whether these inhibitors modify intracellular SA levels. Exogenous SA application produced a three-fold increase in total endogenous SA content compared to the basal content in cells (Figure 2.6A). However, upon U73122+SA and neomycin + SA treatments SA levels decreased by 43% and 53%, respectively (Figure

2.6A) and by 43% after 1-But treatment (Figure 2.6B). When incubated with the PI-PLC inhibitors or the PLD inhibitor, total endogenous SA levels were similar to the endogenous levels in control cells. The inhibitory analogues U73343 and tert-butanol had no effect on endogenous SA levels.

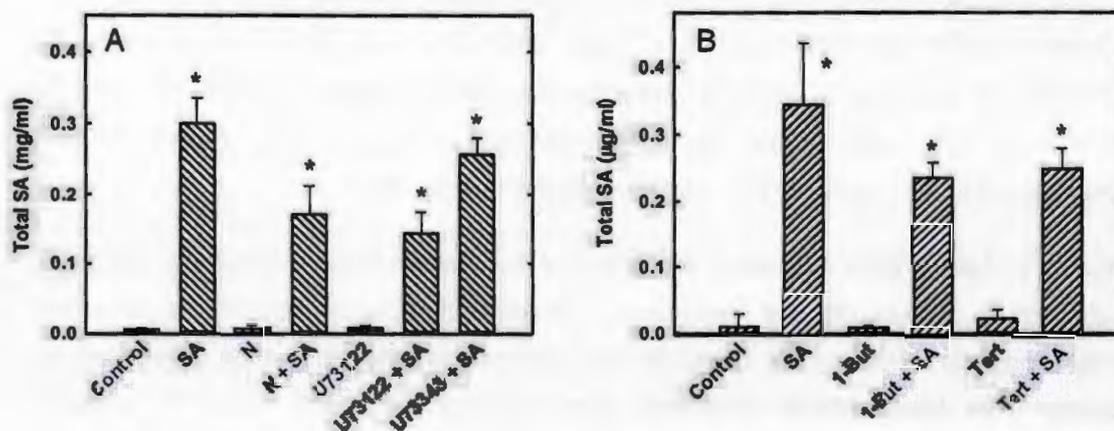


Figure 2.6 Effect of phospholipase inhibitors on total endogenous SA levels in *C. chinense* suspension cells. Cells were treated with the PLC inhibitors 100 μ M neomycin (N), 10 μ M U73122 or 10 μ M U73343 with 200 μ M SA (A), or the PLD inhibitor 0.5% 1-butanol or 0.5% Tert-butanol (Tert) with 200 μ M SA (B). In all treatment groups, cells were pre-incubated with the inhibitors for 15 min before the 30 min SA treatment. The SA level in the cells after the different treatments was evaluated by HPLC (see Materials and Methods). The data represent the mean of three independent experiments \pm SE, * $p < 0.001$

2.4 DISCUSSION

Elicitors increase secondary metabolite accumulation in cultured cells, thereby facilitating the study of metabolite biosynthesis regulation mechanisms (Moreno-Valenzuela *et al.* 1999). Phyto regulators such as SA increase the accumulation of metabolites such as capsaicinoids in cell suspensions of *C. annum*, *C. mill*, *C. frutescens* and *C. chinense* (Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993; Sudha y Ravishankar *et al.*, 2003; Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2011; Altúzar-Molina *et al.*, 2011). This study evaluated the role of the

phospholipase signaling pathway in SA-stimulated vanillin production in *C. chinense* cell suspensions. Pharmacological substances that inhibit PLC and PLD signaling were used and their effect on PAL activity and vanillin content quantified.

PAL is the first enzyme in the activated phenylpropanoid biosynthesis pathway and is responsive to elicitor stimulation. Enzymatic activity was initially evaluated on day 14 of *C. chinense* cell suspension culture, and SA application was found to increase it. The use of the PLC antagonist neomycin and U73122 showed that PLC signaling participates in SA-stimulated vanillin production and that it may occur as a result of an increase in the channeling of carbon precursors to the phenylpropanoid pathway (Figure 4A and B). Induction of PAL may occur via a PLC-modulated signal, since neomycin is a phosphoinositide turnover and PIP₂ inhibitor (Kashem *et al.*, 2000).

Kamada y Muto (1994) evaluated the effect of the protein kinase inhibitors K252 and staurosporine (kinase inhibitor dependent Ca²⁺/phosphoinositide) on PAL activity and phosphoinositide turnover in *N. tabacum* cell suspensions after stimulation with an elicitor prepared from *Phytophthora nicotianae*. The inducing agent was found to stimulate phosphoinositide turnover and increase PAL activity, while the addition of K252 and staurosporine inhibited both these responses. The results suggested that phosphoinositide turnover plays an important role in stimulating PAL activity via kinases. Neomycin has been shown to have a similar inhibitory effect on PAL elicitation when used in combination with an elicitor prepared from the cell wall of the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* that infiltrated *Pisum sativum* leaves (Toyoda *et al.*, 1993) or *Larix decidua* cell suspensions (Bach *et al.*, 1997). Neomycin treatment reduced PAL activity when used in combination with the elicitor.

Effects of neomycin and U73122 on vanillin accumulation suggest that blocking one of the processes coupled to IP₃ or IP₆ as cytosolic Ca²⁺ increases, may also lead to the failure of the Ca²⁺-calmodulin dependent kinases responsible of PAL activation. This would affect vanillin levels in the *C. chinense* cell suspensions. This covalent modification was not identified in the present study, but there are reports of PAL activity regulation via phosphorylation (Bolwell *et al.*, 1992; Allwood *et al.*, 2002), although it is not clear if these effects occur either directly on PAL or on some regulatory element mediating the response to a stimulus.

For experimental purposes, PLD activity can be manipulated by the addition of 1-But. This strategy was previously used to show that PLD-induced PA production is necessary for increased production of the metabolite silymarin in *Silybum marianum* cell suspensions (Madrid y Corchete, 2010).

In this way, the effect of inhibited PA derivative production on PLD-stimulated vanillin accumulation in *C. chinense* cell suspensions treated with SA was analyzed by adding 1-But. Both SA-stimulated PAL activity (Figure 2.5B) and vanillin accumulation (Figure 2.5C) were reduced by addition of 1-But. The same effect has been reported in *N. tabacum* cell suspensions treated with 1-But (Wang *et al.*, 2013), where it was shown to reduce riboflavin-stimulated scopoletin accumulation (activating defense response), whereas exogenous application of PA reversed the effect. This indicates that PLD and the PA products are important components in riboflavin-activated phytoalexin biosynthesis regulation. When 1-But was applied to mechanically injured plants, both PAL activity and phenolic compounds were reduced (Choi *et al.*, 2005).

That the inhibition of PLD in SA exposed *C. chinense* cells had abolished PAL and vanillin suggests that this signaling pathway participate in this response. Phosphatidic acid (PA) is a vital molecule that has been characterized as a multifunctional phospholipid with direct and indirect impacts on many cellular processes (Wang *et al.*, 2006; Testerink y Munnik, 2011). For example, in a study of how PA may activate MAPK-type protein kinases in soybean (*Glycine max* L.) under stress, inhibition of PA production by 1-But resulted in wounding, and MAPK activation was also affected (Lee *et al.*, 2001). No reports exist in the literature on the direct role of PA in PAL activity, although some studies have suggested that Ca^{2+} , calmodulin and ion channels are important components in the signal transduction pathway that stimulates PAL activity and that PA may be acting as a modulator of these signaling components (Blanco *et al.*, 2008).

Capsicum chinense cells are sensitive to exogenous SA treatment and exhibit a significant increase in total SA in response to exogenous SA. These results are consistent with those from a study of SA stimulation in *Hypericum perforatum* L. shoots, callus and cell suspensions in which growth of callus or shoots in cell suspensions was facilitated by close contact between the cells and the elicitor (Gadzovska *et al.*, 2013). In another study, treatment with SA was reported to induce *de novo* synthesis via activation of gene

expression of proteins involved in the SA biosynthetic pathway (Szalai *et al.*, 2011). Our evaluation of the endogenous SA content in *C. chinense* cell suspensions treated with 10 μ M SA showed that endogenous SA levels were twelve-fold higher compared to the control (data not shown). The results presented here suggest that PLC and PLD signaling inhibitors may be interfering at some level with SA biosynthesis, and consequently, with vanillin production.

REFERENCES

- Allwood E.G., Davies D.R., Gerrish C., y Bolwell G.P. (2002). Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase, in biotically stressed cells of French bean. *Plant Molecular Biology*, 49, 533-544.
- Altúzar-Molina A.R., Muñoz-Sánchez J.A., Vázquez-Flota F., Monforte-González M., Racagni-Di Palma G., y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2001). Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense*. *Plant Physiology Biochemical*, 49, 151-158.
- Arakawa O., Hori Y., y Ogata R. (1986). Characteristics of color development and relationship between anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia lyase activity in 'Starking Delicious' 'Fuji' and 'Mutsu' apple fruits. *Journal of the Japanese Society Horticultural Science*, 54, 424-430.
- Bach M. y Ulrich-Seitz H. (1997). Elicitor-induced defense responses of a suspension-cultured woody plant (*Larix deciduas*) and possible mechanisms of signal transduction. *Canadian Journal Botany*, 75, 1243-1251.
- Billot J., Hartmann C., Macheix J. y Rateau J. (1978). Les composés phénoliques au cours de la croissance de la poire Passe-Crassane. *Physiology Vegetal*, 16, 693-714.
- Blanco F.A., Zanetti M.E. y Daleo G.R. (2008). Calcium-dependent protein kinases are involved in potato signal transduction in response to elicitors from the oomycete *Phytophthora infestans*. *Journal Phytopathology*, 156, 53-61.
- Bolwell G.P. (1992). A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension-cultured cells of French bean. *Phytochemistry*, 31, 4081-4086.
- Campos-Vargas R., Nonogaki H., Suslow T., y Saltveit M.E. (2005). Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not induction in romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiology Plant*, 132, 82-91.

- Chen G., Snyder C., Greer M.S. y Randall J. (2011). Biology and biochemistry of plant phospholipases. *Critical Review Plant Science*, 30, 239-258.
- Chen J.Y., Wen P.F., Kong W.F., Pan Q.H., Zhan JC, Li J.M., Wan S.B. y Huang W.D. (2006). Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology Technology*, 40, 64-72.
- Choi Y.J., Tomás-Barberán F.A., y Saltveit M.E. (2005). Wound-induced phenolic accumulation and browning in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf tissue is reduced by exposure to n-alcohols. *Postharvest Biology Technology*, 37, 47-55.
- Dempsey D.A., Vlot A.C., Wildermuth M.C. y Klessig D.F. (2010). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book* 9, e0156.
- Fleuriet A. y Macheix J.J. (1984). Orientation nouvelle du métabolisme des acides hydroxycinnamiques dans les fruits de tomates blessés (*Lycopersicon esculentum*). *Physiology Plant*, 61, 64-68.
- Gadzovska S., Maury S., Delaunay A., Spasenoski M., Hagege D., Courtois D., y Joseph C. (2013). The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 113, 25-39.
- Given N.K. (1988). Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *Journal Plant Physiology*, 133, 25-30.
- Gutiérrez-Carbajal M.G., Monforte-González M., Miranda-Ham M.L., Godoy-Hernández G. y Vázquez-Flota F. (2011). Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biology Plant*, 54, 430-434.
- Kamada Y. y Muto S. (1994). 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 Physiology* 35, 405-409.

- Kashem M.A. Itoh K., Iwabuchi S., Hori H., y Mitsui T. (2000). Possible involvement of phosphoinositide-Ca²⁺ signaling in the regulation of alpha-amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiology*, 41, 399-407.
- Kataoka I., Kubo Y., Sugiura A. y Tomana T. (1983). Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis during berry ripening of three grape cultivars. *Journal of the Japanese Society Horticultural Science*, 52, 273-279.
- Lafuente M.T., Sala J.M. y Zacarías L. (2004). Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 3606-3661.
- Lee S., Hirt H. y Lee Y. (2001). Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant Journal*, 26,479-486.
- Legendre L., Yueh Y.G., Crain R., Handdock N., Heinstejn P.F. y Low P.S. (1993). Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 28, 24559-24563.
- Leyva A., Jarillo J.A., Salinas J. y Martínez-Zapater J.M. (1995). Low temperatura induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology*, 108, 39-46.
- Madrid E. y Corchete P. (2010). Silymarin secretion and its elicitation by methyl jasmonate in cell cultures of *Silybum marianum* is mediated by phospholipase D-phosphatidic acid. *Journal of Experimental Botany*, 61, 747-754.
- Monforte-González M., Medina-Lara F., Gutiérrez-Carbajal G. y Vázquez-Flota F. (2007). Capsaicinoid quantification by in situ densitometry of thin layer chromatography plates. *Journal Liquid Chromatography Related Technology*, 30, 1697-1704.

- Moreno-Valenzuela O.A., Monforte-González M., Muñoz-Sánchez J.A., Méndez-Zeel M., Loyola-Vargas M., y Hernández-Sotomayor S.M.T. (1999). Effect of macerozyme on secondary metabolism plant product production and phospholipase C activity in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Journal Plant Physiology*, 155,447-452.
- Munnik T. y Nielsen E. (2011). Green light for polyphosphoinositide signals in plants. *Current Opinion Plant Biology*, 14,489-97.
- Munnik T. y Vermeer J.E.M. (2010). Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signaling in plants. *Plant Cell Environmental*, 33, 655-669.
- Murashige T. y Skoog F. (1985). A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*, 15, 608-612.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goetze N.M., Olson B.J. y Klenk D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Annals Biochemical*, 150, 76-85.
- Ochoa-Alejo N. y Gómez-Peralta J.E. (1993). Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal Plant Physiology*, 141, 147-152.
- Oufedkijh H., Mahrouz M., Amiot M.J. y Lacroix M. (2000). Effect of γ -irradiation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. Ex Tanaka. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 559-565.
- Raskin I., Skubatz H., Tang W. y Meeuse B.J.D. (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Annals Botany*, 66, 369-373.
- Sánchez-Ballesta M.T., Zacarías L., Granell A. y Lafuente M.T. (2000). Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 2726-2731

-
- Staxen I., Pical C., Montgomery L.T., Gray J.E., Hetherington A.M, y Mcainsh M.R. (1999). Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc Natl. Acad Science USA*, 1779-1784.
- Sudha G. y Ravishankar G.A. (2003). Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens*. *Mill. Current Science*, 85, 1212-1217.
- Szalai G., Pál M. y Janda T. (2011) Abscisic acid may alter the salicylic acid-related abiotic stress response in maize. *Acta Biologica Szegediensis*, 55, 155-157.
- Teklemariam T.A. y Blake T.J. (2004). Phenylalanine ammonia lyase-induced freezing tolerance in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with low ambient levels of ultraviolet-B- radiation. *Physiology Plantarum* 122, 244-253.
- Testerink C. y Munnik T. (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1-13.
- Testerink C. y Munnik T. (2005). Phosphatidic acid: A multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Science*, 10, 368-375.
- Toyoda K., Kawahara T., Ichinose Y., Yamada T. y Shiraishi T. (2000). Potentiation of phytoalexin accumulation in elicitor-treated epicotyls of pea (*Pisum sativum*) by a diacylglycerol kinase inhibitor. *Journal of Phytopathology*, 148, 633-636
- Toyoda K., Shiraishi T., Yamada T., Ichinose Y. y Oku H. (1993). Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiology*, 34, 729-735.
- Vázquez-Flota F., Miranda-Ham M.L., Monforte-González M., Gutiérrez-Carbajal G., Velázquez-García C. y Nieto-Pelayo Y. (2007). La Biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30, 353-360.
- Wang L., Zhu X., Liu J., Chu X., Jiao J., y Liang Y. (2012). Involvement of phospholipase C and D in the defense responses of riboflavin-treated tobacco cells.

Protoplasma, 250, 441-449.

Wang X.M., Devaiah S.P., Zhang W.H. y Welti R. (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Journal of Lipids Research*, 45, 250-278.

Xue H.W., Chen X., y Mei Y. (2009). Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochemical Journal*, 421, 145-156.

Yamaguchi T., Minami E., Ueki J. y Shibuya N. (2005). Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiology*, 46, 579-587.

Yamaguchi T., Tanabe S., Minami E. y Shibuya N. (2004). Activation of phospholipase D induced by hydrogen peroxide in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiology*, 45, 1261-1270.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD *in vitro* DE LA FOSFOLIPASA D Y EL ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE MARCAJE *in vivo* DE LOS FOSFOLÍPIDOS EN SUSPENSIONES CELULARES DE *C. chinense* Jacq.

3.1 INTRODUCCIÓN

La fosfolipasa D hidroliza el enlace fosfodiéster terminal de los fosfolípidos, generando ácido fosfatídico (PA) y colina. En plantas, la PLD constituye un grupo importante de enzimas representada por varias isoformas (Singh *et al.*, 2012), las cuales están involucradas en procesos celulares como la señalización del ácido abscísico, respuesta a estrés hídrico, daño mecánico y ataque por patógenos (Meijer y Munnik, 2003). La actividad enzimática de las diferentes PLDs es dependiente de varios factores, incluyendo la concentración de iones Ca^{2+} , pH y sustratos lipídicos (Singh *et al.*, 2012). La regulación por los lípidos se debe a la presencia dentro de su estructura de un dominio de unión al PIP_2 .

Debido a que en el presente trabajo se utilizó a la neomicina como estrategia para inhibir la señalización mediada por la PLC (Ver Capítulo I) y tomando en cuenta que ésta puede bloquear otros procesos en los cuales los fosfoinosítidos están involucrados como por ejemplo la inhibición de la actividad de la PLD dependiente del PIP_2 , en este capítulo se evaluó el efecto de la neomicina en la actividad enzimática *in vitro* de la PLD para determinar la respuesta bajo condiciones de inducción con el AS.

Por otra parte, para evaluar si el PA generado a través de la señalización de la PLD tiene un papel como componente en la señalización para la regulación de la actividad de PAL, se determinó la actividad *in vivo* de la PLD por medio de la reacción de transfosfatidilación. Este análisis requiere de la extracción de los lípidos en las células previamente marcadas radiactivamente con ^{32}P -ortofosfato y el posterior análisis del perfil fosfolipídico *in vivo*. Por lo anterior, es importante establecer inicialmente las condiciones del marcaje *in vivo* de los fosfolípidos con el ortofosfato radiactivo, ya que no se contaba con un protocolo para tal efecto en las células de *C. chinense*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Cultivo de las suspensiones celulares de *C. chinense*

Las suspensiones celulares de *C. chinense* se obtuvieron por disgregación de callos y se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), pH 5.6. El medio MS fue suplementando con 0.5 mM mio-inositol, 0.02 mM tiamina, 0.2 mM cisteína, 4 μ M de ácido 2,4 diclorofenoxiacético y 3% sacarosa. Las células fueron subcultivadas cada 14 días. Para los tratamientos de inducción, 1 g (peso fresco) de suspensiones celulares por matraz se inocularon en 25 ml de medio de cultivo. Después del periodo de cultivo, 200 μ M de AS se adicionaron a las suspensiones celulares; en el caso del testigo, sólo se adicionó agua. Ambas muestras fueron mantenidas a 25°C en un orbitador a 100 rpm durante 30 min. Las células fueron cosechadas, congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su análisis.

3.2.2. Tratamientos de las suspensiones celulares con la neomicina

Antes de la adición de la neomicina (100 μ M) a las suspensiones celulares, la solución del inhibidor fue esterilizada por filtración en membranas Millipore (0.45 μ m). La neomicina fue adicionada a las células 15 min antes de la adición del AS.

3.2.3 Obtención del extracto proteico para la determinación de la actividad enzimática *in vitro* de la PLC Y LA PLD

Para la determinación de las actividades enzimáticas de la PLC y la PLD, las células de *C. chinense*, congeladas en N₂ líquido, se pulverizaron en un mortero de porcelana y se homogeneizaron en una solución amortiguadora que contenía: 50 mM NaCl, 1mM EGTA, 250 mM sacarosa, 10% glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM pirofosfato de sodio, 0.2 mM ortovanadato de sodio, 1mM fluoruro de fenil-metilsulfonilo (PMSF) y 1mM β -mercaptoetanol; se utilizó 1 g de células en 2.5 ml de solución amortiguadora. La mezcla se homogeneizó usando un politrón durante 1 min y se centrifugó a 23700 x g durante 30 min. La pastilla obtenida se desechó, y posteriormente, se llevó a cabo una segunda centrifugación a 100000 x g durante 50 min. El segundo sobrenadante obtenido es el extracto citosólico, mientras que el extracto membranal se obtuvo resuspendiendo la

pastilla en 200 μ l de solución amortiguadora (De los Santos-Briones *et al.*, 1997). Ambos extractos se almacenaron a -80°C hasta la realización de los análisis.

3.2.4 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de la concentración de proteínas en las suspensiones celulares de cada condición experimental, se utilizó el método comercial del ácido bicinconínico (Smith, 1985), usando albúmina sérica bovina (ASB) como estándar. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min y se midieron las absorbancias a 562 nm.

3.2.5 Determinación de la actividad enzimática *in vitro* de la PLC

La determinación de la actividad de la PLC mediante la hidrólisis del PIP_2 se evaluó según Martínez-Estévez *et al.* (2003) en una mezcla de reacción (50 μ l) que contenía 35 mM NaH_2PO_4 (pH 6.8), 70 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.8 mM CaCl_2 , 200 μ M $\text{PIP}_2/{}^3\text{H-PIP}_2$ (≈ 333 Bq), 0.08% desoxicolato de sodio y el extracto membranal (10-20 μ g proteína). La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 10 min y la reacción se detuvo con ASB al 1% y TCA al 10%. Finalmente, se centrifugó a 13500 x g durante 10 min, el sobrenadante se depositó en viales con 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la formación de ${}^3\text{H-IP}_3$ en un contador.

3.2.6 Determinación de la actividad enzimática *in vitro* de la PLD

Para la determinación de la actividad de la PLD, la hidrólisis de la ${}^3\text{H-PC}$ se evaluó según el protocolo de Ramos-Díaz (2005) en una mezcla de reacción (100 μ l) que tenía el extracto proteico (10 μ g proteína), 100 mM de acetato de sodio (pH 5), 10 mM de CaCl_2 , 2 mM de MgCl_2 , 80 mM de KCl, 1 mM EGTA, 414 μ M de $\text{PC}/{}^3\text{H-PC}$ (≈ 436.8 Bq) y 0.1% deoxicolato de sodio. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 10 min y la reacción se detuvo con BSA al 1% y TCA al 10%. Finalmente, se centrifugó a 13,500 x g durante 10 min, el sobrenadante se depositó en viales con 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la formación de ${}^3\text{H-PC}$ en un contador.

3.2.7 Marcaje *in vivo* de los fosfolípidos en células de *C. chinense*

Las células fueron obtenidas por sedimentación y se resuspendieron nuevamente en el medio de cultivo MS. El material fue transferido a una caja de Petri donde se les añadió el (³²P)-ortofosfato (³²Pi; actividad: 74 MBq/ml), 185 mBq por cada 100 µl de células. Una vez realizado el biomarcaje durante el tiempo establecido (0, 6, 12, 15 y 19 h), la reacción se detuvo con ácido perclórico (PCA) y nitrógeno líquido.

3.2.8 Extracción de los fosfolípidos

Para la extracción de los lípidos, a las células marcadas con ³²Pi-ortofosfato se les adicionaron 720 µl de CHCl₃/MeOH/HCl (50:100:1, v/v), y las muestras se sometieron a agitación constante durante 15 min. El sistema de fases se originó con la adición de 0.9% NaCl y CHCl₃. Posteriormente, se agitó y centrifugó, la fase inferior fue transferida a un tubo Eppendorf limpio, donde se le añadió la mezcla CHCl₃/MeOH/HCl 1N (3:48:47 v/v) para evitar la presencia de compuestos solubles en las muestras. La fase superior se desechó, y a la fase inferior, se le añadió isopropanol. Las muestras se secaron y fueron resuspendidas en 40 µl CHCl₃ (Munnik *et al.*, 1998).

3.2.9 Cromatografía en capa fina (TLC)

La mezcla de los lípidos extraídos se aplicó en una placa de sílica gel, previamente activada en una solución de oxalato de potasio al 1%, que contenía: 200 mM EDTA, 40 ml metanol y 60 ml agua. Los lípidos fueron separados con un sistema alcalino (CHCl₃/MeOH/25% NH₄NO₃/H₂O [45/35/2/8]), donde los fosfolípidos se identificaron a partir de estándares comerciales. Las autoradiografías se obtuvieron por medio de la exposición de las placas a películas de rayos X a temperatura ambiente.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efecto de la neomicina en la actividad *in vitro* de la PLC en suspensiones celulares de *C. chinense*

Para comprobar que en el modelo de estudio la neomicina inhibe la actividad de la PLC, se realizó un experimento de dosis respuesta en el cual las suspensiones celulares fueron tratadas con diferentes concentraciones de neomicina durante 15 min. A continuación la actividad de la PLC se determinó en los extractos proteicos como se describe en la sección 3.3.6.

En la Figura 3.1 se observa que el tratamiento de las células con la neomicina inhibió la actividad de la PLC *in vitro* de forma dependiente de la dosis, presentando el mayor efecto inhibitorio con la concentración de 100 μM ; este comportamiento es consistente con el hecho de que la neomicina es un inhibidor que no afecta el sitio catalítico de la PLC, sino que se une a los sustratos de la misma (ver Sección 1.2.4).

3.3.2 Evaluación de la actividad de la fosfolipasa D *in vitro* en células incubadas con la neomicina

La neomicina puede unirse a PIP_2 , pero también puede bloquear otros procesos en los cuales los fosfoinosítidos están involucrados, por ejemplo inhibiendo la actividad de las PLD dependientes de PIP_2 . Es por esto, que se evaluó el efecto de la neomicina en la actividad *in vitro* de la PLC y la PLD en células tratadas con el AS.

Las suspensiones celulares a los 14 días de ciclo de cultivo fueron preincubadas con la neomicina durante 15 minutos antes de la adición del AS (200 μM). En la Figura 3.2A se observó que el tratamiento de las células con neomicina reduce la actividad de la PLC en un 57%. También se detectó que no hay un efecto en la actividad de la PLC cuando las células fueron incubadas con el AS. En el tratamiento de las células con la neomicina mas el AS, hubo un incremento en la actividad de la PLC del 15%, comparado con la actividad obtenida en las células tratadas con el AS.

En el caso de la actividad *in vitro* de la PLD, la adición del AS a las células no ocasionó cambios en su actividad comparado con las células testigo (Figura 3.2B). Además, se observó que la actividad de esta enzima no fue modificada por la presencia de la neomicina. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con la neomicina mas el AS se detectó un incremento en la actividad de la PLD de 1.5 veces más comparada con el tratamiento realizado sólo con el AS.

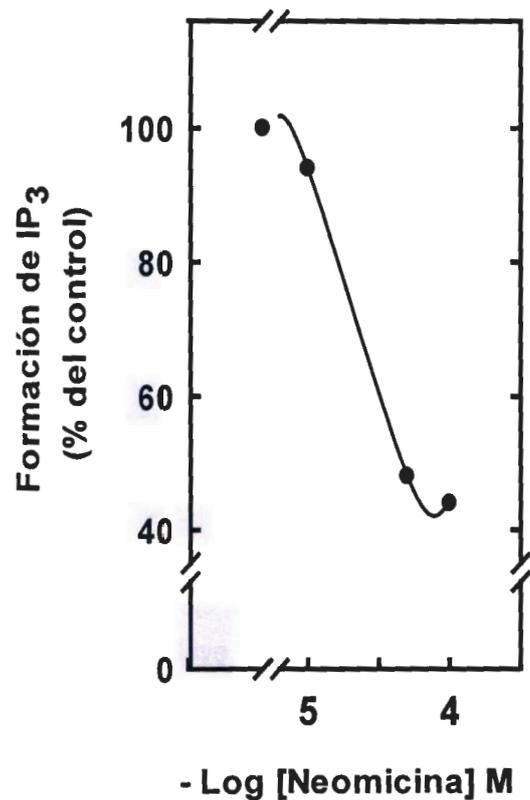


Figura 3.1 Efecto de la neomicina en la actividad *in vitro* de la PLC. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de la neomicina (1, 10 y 100 μ M) y después de un periodo de incubación de 15 min se determinó la actividad *in vitro* de la PLC. Los resultados son expresados como el porcentaje de la actividad basal, la cual fue de 1,325 pmol/min/mg de proteína.

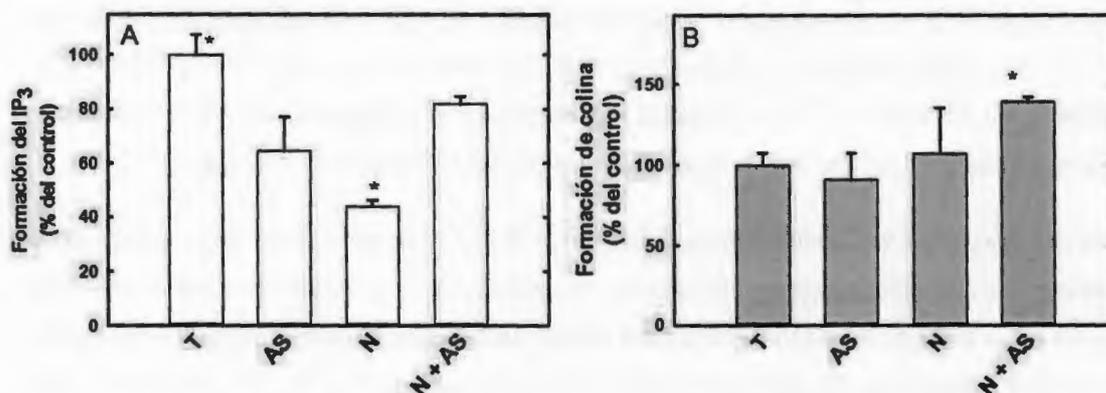


Figura 3.2 Efecto de la neomicina en la actividad enzimática *in vitro* de la PLC (A) y la PLD (B) en células de *C. chinense*. Las células fueron pre-incubadas con la neomicina (100 μM) durante 15 minutos antes de la adición del AS (200 μM). Las células fueron cosechadas después de 30 min realizándose extractos proteicos para determinar la actividad enzimática de la PLC y la PLD respectivamente. El 100% representa la actividad de la PLC (2,417 pmol/min/mg de proteína) y de la PLD (767.14 pmol/min/mg de proteína) en células tratadas sin el AS. Los resultados se presentan como el promedio de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno ± error estándar. Los datos representan la media de tres experimentos diferentes ±ES, *p<0.001.

3.3.3 Establecimiento del marcaje *in vivo* de fosfolípidos en suspensiones celulares de *C. chinense*

Para analizar si el PA pudiera ser un componente en la regulación de la actividad de la PAL, se planteó evaluar la actividad *in vivo* de la PLD utilizando como estrategia la reacción de transfosfatidilación (Ver Capítulo I, sección 1.2.7). Esta reacción inhibe la formación del PA producido directamente por la PLD. Para evaluar esto, los fosfolípidos deben ser marcados con ³²Pi-ortofosfato, por lo que era necesario establecer las condiciones de marcaje *in vivo* de los fosfolípidos en las células de *C. chinense*.

Hasta ahora, en nuestro grupo, los estudios de marcaje *in vivo* se desarrollaron en suspensiones celulares de *Coffea arabica* (Ramos-Díaz *et al.*, 2005) y no existen reportes en la literatura del marcaje *in vivo* en suspensiones celulares de *C. chinense*. El primer

paso fue decidir si las células se cultivarían en un medio preparado con y sin fosfato a pH 5.6, para determinar la facilidad de incorporación del ^{32}P i-ortofosfato en los lípidos de las células durante 19 h de incubación según Ramos-Díaz (2005) en suspensiones celulares de *C. arabica*. Sin embargo, se detectó que en las células incubadas con el medio MS preparado sin fosfatos, el ^{32}P i-ortofosfato fue incorporado lentamente en los fosfolípidos, en comparación con las células incubadas en un medio preparado con fosfatos.

Posteriormente, con la finalidad de determinar si el volumen del medio podría afectar la incorporación del radioisótopo a los lípidos, se evaluaron dos volúmenes del medio MS (25 y 50 ml) a pH 5.6, en donde las células serían adaptadas para su posterior incubación con el ^{32}P i-ortofosfato. El resultado indicó que las células en 50 ml de medio MS incorporaban en todos sus lípidos el ortofosfato radiactivo.

Finalmente, bajo las condiciones de incubación con medio MS preparado con fosfatos a pH 5.6 en un volumen de medio de 50 ml, se evaluó la cinética de marcaje *in vivo* en las suspensiones celulares de *C. chinense*. Las células a los 14 días del ciclo de cultivo fueron transferidas a un medio de cultivo MS pH 5.6 recién preparado y se incubaron con ^{32}P -ortofosfato durante diferentes periodos de tiempo: 0, 6, 12, 15 y 19 h. Luego, los lípidos fueron extraídos en los tiempos indicados y separados en una TLC, utilizando el sistema alcalino de disolventes. Los fosfolípidos marcados radiactivamente fueron identificados por comigración con estándares.

En la Figura 3.3, se observó que los fosfolípidos estructurales como la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) fueron detectados a partir de las seis horas de incubación manteniendo los mismos niveles hasta las 19 h. En el caso del PA, se observó un incremento gradual en el marcaje entre las 6 y 12 h de incubación, mientras que los lípidos que normalmente se encuentran en menor proporción, como el fosfatidilinositol monofosfato (PIP) y el PIP_2 , se detectaron a partir de las 6 horas, pero sus niveles se incrementaron cuando las células se incubaron con el ortofosfato radiactivo durante 19 h. Estos resultados indican que a partir de 15 horas de incubación con el ^{32}P i-ortofosfato, todas las clases de los fosfolípidos incorporaron el ortofosfato radiactivo alcanzando un equilibrio isotópico.

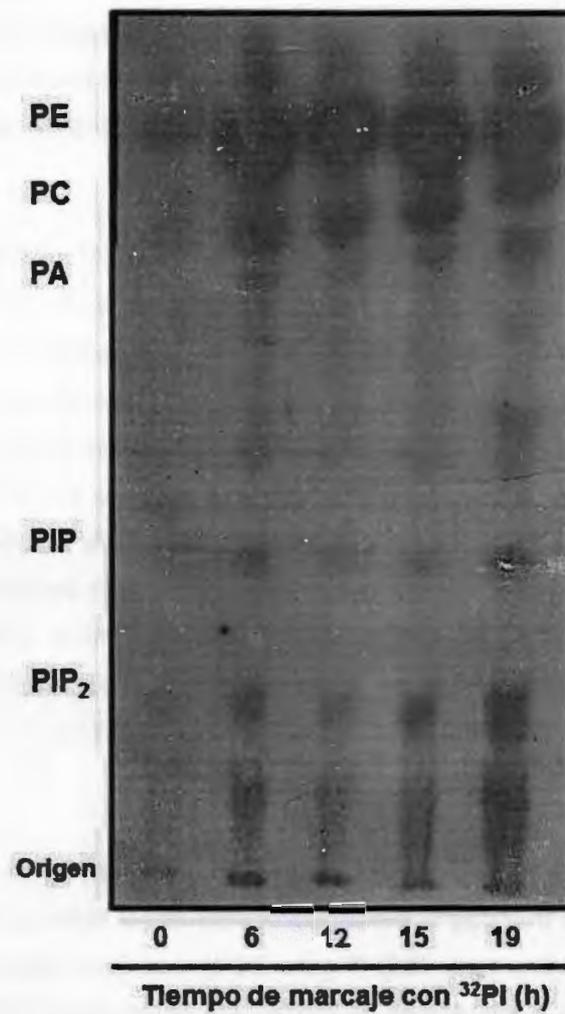


Figura 3.3 Curso temporal de incorporación del ³²Pi-ortofosfato en los fosfolípidos de las células de *C. chinense*. Las células fueron marcadas con ³²Pi-ortofosfato en los tiempos indicados, después los lípidos se extrajeron y separaron por TLC alcalina. La radiactividad fue detectada por autoradiografía. PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato; PIP: fosfatidilinositol monofosfato; PA: ácido fosfatídico; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina

3.4 DISCUSIÓN

Existen reportes que han demostrado que las vías de señalización de las enzimas PLC y PLD interactúan para regular la respuesta celular bajo condiciones de estrés. Es por ello, que se evaluó el efecto de la neomicina en la actividad *in vitro* de la PLC y la PLD bajo condiciones de inducción con el AS.

Se demostró que la neomicina a una concentración de 100 μM inhibió la actividad *in vitro* de la PLC en nuestro modelo (Figura 3.1). Por otro lado, en los tratamientos realizados en las células, con la neomicina mas el AS, se observó un incremento en la actividad de la PLC (Figura 3.2A). Una posible explicación a este resultado es que el AS podría estar provocando una disminución en la afinidad entre la neomicina y el PIP_2 , y por consiguiente, afectando positivamente la reacción catalizada por la PLC. Por otro lado, podrían estar actuando otras PLC, por ejemplo, como la familia de las PLCs no específicas que no utilizan al PIP_2 como sustrato. Esta familia de enzimas genera DAG a través de la hidrólisis de los glicerofosfolípidos. Nakamura *et al.*, (2005) identificaron en *Arabidopsis thaliana* a un miembro de esta familia de la PLC, la NPC4, la cual tiene un papel importante en la respuesta de la planta al ácido abscísico y a la sequía (Peters *et al.*, 2010).

La actividad de la PLD en las células tratadas con la neomicina no se modificó; sin embargo, en las células tratadas con neomicina mas el AS hubo un efecto positivo en la actividad enzimática *in vitro* de la PLD (Figura 3.2B). Los fosfoinosítidos, particularmente el PIP_2 , son reguladores y activadores de ciertas isoformas de las PLDs (Qin, 1997; Qin y Wang 2002). Por lo tanto, este incremento en la actividad de la enzima podría sugerir una activación por la acumulación del PIP_2 debido a la inhibición de la PI-PLC.

La presencia de la neomicina estimuló la actividad enzimática de la $\text{PLD}\alpha$, pero no de las $\text{PLD}\gamma$ y β (Qin *et al.*, 1997). Estos resultados son congruentes con lo observado sobre el efecto de la neomicina en la producción de PA en suspensiones celulares de *Arabidopsis* sometidas a condición de estrés por frío, ya que la actividad de la $\text{PLD}\alpha$ fue la menos afectada en la producción de PA en presencia del inhibidor (Ruelland *et al.*, 2002). Los resultados indican que la señalización mediada por la PLD responde regulando su

actividad en presencia de la neomicina, así como que el AS podría estar regulando la actividad de PLDs que no son afectadas por ésta.

Se logró el marcaje *in vivo* de los fosfolípidos con el ^{32}P i-ortofosfato. La cinética de marcaje demostró que las células incorporaron el ortofosfato dentro de sus lípidos de forma sincronizada. Por lo tanto, se consiguieron las condiciones para detectar los cambios en los niveles de los fosfolípidos. Con este resultado se podrán realizar experimentos con el AS y los inhibidores de la señalización lípídica y así evaluar su efecto en los fosfolípidos en las células de *C. chinense*.

BIBLIOGRAFÍA

- De los Santos Briones C., Muñoz-Sánchez J.A., Chín-Vera J., Loyola-Vargas V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (1997). Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate-phospholipase C activity during the growing phase of *Catharanthus roseus* transformed roots. *Journal Plant Physiology*, 50, 707-713.
- Martínez-Estévez M., Ku-González A., Muñoz-Sánchez J.A., Loyola-Vargas V.M., Pérez-Brito D., Tapia-Rusell R., Escamilla-Bencomo J.A. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2003). Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *Journal Inorganic Biochemical*, 97, 69-74.
- Murashige T. y Skoog F. (1985). A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*, 15, 608-612.
- Nakamura Y., Awai K., Masuda T., Yoshioka Y., Takamiya K. y Ohta H. (2005). A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemical*, 28, 7469-7476.
- Qin C. y Wang X. (2002). The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiology*, 128, 1057-1068.
- Qin W., Pappan S.K. y Wang X. (1997). Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): cloning of PLD γ and regulation of plant PLD γ , - β and - α by poliphosphoinositides and calcium. *Journal of Biological Chemical*, 272, 28767-28873.
- Ramos-Díaz A. (2005). Efecto de la adición de cloruro de aluminio sobre la transducción de señales fosfolípídicas en células en suspensión de *Coffea arabica* L. Tesis de Doctorado en Ciencias en Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 96 p.
- Ruelland E., Cantrel C.M., Gawer M., Kader J.C. y Zachowski A. (2002). Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis*

suspensions cells. *Plant Physiology*, 130, 999-1007.

Peters C., Li M., Narasimhan R., Roth M., Welti R., *et al.* (2010). Nonspecific phospholipase C NPC4 promotes responses to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22, 2642-2659

Singh A., Pandey A. y Pandey G.K. (2012). Phospholipase D in stress activated lipid signaling in plants. *Plant Stress*, 6, 10-17.

Smith P.K. Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. y Klenk C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Annals Biochemical*, 150, 76-85.

CAPÍTULO IV

EFECTO DEL AS EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE LA FENILALANINA AMONIA LIASA EN LAS SUSPENSIONES CELULARES DE *C. chinense*

4.1 INTRODUCCIÓN

La fenilalanina amonía liasa (PAL) es una enzima clave que convierte la fenilalanina en ácido cinámico, un precursor de varios fenilpropanoides, como los capsaicinoides. Como se mencionó en el Capítulo I, los niveles de actividad de la PAL están influenciados por una gran variedad de estímulos. La regulación de esta enzima incluye la activación transcripcional, la estabilidad de los ARNm y el control postraduccional. Existen reportes de la regulación de la actividad de la PAL a nivel de proteína que involucra la síntesis *de novo* de la PAL (Lois *et al.*, 1989; Wen *et al.*, 2008). La síntesis *de novo* de la proteína se ha demostrado en experimentos donde se ha observado un incremento en la actividad enzimática de la PAL cuando los frutos de uva son incubados con el AS (Wen *et al.*, 2005). Estudios con inhibidores como la actinomicina D y cicloheximida indican que la transcripción también es un proceso necesario para el incremento en la actividad de la PAL en respuesta a diversos estímulos como las heridas, el daño mecánico y las fitohormonas (Wen *et al.*, 2008; Kolahi *et al.*, 2013).

En los resultados obtenidos en este trabajo se observó una estimulación en la actividad enzimática de la PAL cuando las células fueron tratadas con el AS (Capítulo II, Figura 2.1). Por otro lado, la actividad de la PAL estimulada con el AS fue modificada en presencia de los inhibidores de la señalización fosfolipídica (Capítulo II, Figuras 2.4 y Figura 2.5). De esta manera, es posible que la aplicación exógena de ésta fitohormona, así como de los inhibidores de la señalización fosfolipídica, pudieran estar afectando los niveles de expresión del gen que codifica a la PAL, bajo condiciones de estimulación con AS en suspensiones celulares de *C. chinense*. En este capítulo, se presentan los resultados obtenidos respecto a los niveles de expresión de PAL en presencia del AS y el 1-butanol para determinar si el incremento en la actividad de PAL en condiciones de estimulación está relacionado con un incremento en los niveles de expresión del gen de PAL.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Extracción del ARN total por el método de Trizol

Para la extracción del ARN total de suspensiones celulares se siguieron las recomendaciones del proveedor (TRIZOL Reagent, Invitrogen). La extracción del ARN se realizó adicionando 1 ml del reactivo TRIZOL a 0.1 g (peso fresco) células de *C. chinense*. A esta mezcla se le agregaron 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 seg, y luego se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 min a 12,000 x g a una temperatura de 4°C y se colectó la fase acuosa, en donde el ARN permanece soluble, transfiriéndola a un tubo eppendorf para precipitar el ARN adicionando 500 μ l de alcohol isopropílico (Sigma, USA). Las muestras se incubaron a 4°C durante 30 min. Finalmente, se centrifugó a 12000 x g durante 15 min y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol (Sigma, USA) al 70% en agua/dietilpirocarbonato (DEPC), y se resuspendió en 30 μ l de agua tratada con DEPC. La integridad del ARN se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 V durante 1 h y la visualización se realizó con Gel-Red 3X (Bioline). El gel se observó en un fotodocumentador de luz UV (Quantity One. V.4.2.BIO-RAD). La cuantificación del ARN se llevó a cabo mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000). El ARN obtenido se incubó con desoxirribonucleasa (TURBO Dnase, Ambiot), como lo indica el proveedor, para eliminar el ADN contaminante.

4.2.2 Síntesis del ADN complementario (ADNc)

La transcripción reversa es una reacción que consiste en la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN catalizado por la enzima transcriptasa reversa. Para llevar a cabo esta reacción, se utilizó 1 μ g de ARN purificado de cada tratamiento en un volumen de 20 μ l. La reacción se describe brevemente: 1 μ l 50 μ M oligo dT, 1 μ l 2 μ M mix dNTP y 5 μ l de agua tratada con DEPC. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 min y se colocó en hielo durante 2 min. Inmediatamente se le agregó 2 μ l de amortiguador RT 10X, 4 μ l 25 mM MgCl₂, 2 μ l 0.1 mM DTT, 1 μ l RNasaOUT™ (40U/ μ l) y 1 μ l de Superscript™ III RT (200 U/ μ l) (Invitrogen). La mezcla se sometió a un ciclo de síntesis de ADN de cadena simple a 50°C durante 50 min con un paso final de inactivación y desnaturalización de la enzima a 85°C por 5 min. Posteriormente, se adicionó 1 μ l de RNasa H y se incubó a 37°C durante 20 min.

4.2.3 Condiciones de reacción de PCR

Se optimizaron los parámetros necesarios para lograr las condiciones de reacción del PCR. Brevemente, la mezcla de reacción contenía: 2 µg ADNc como molde; 2.5 µl amortiguador PCR 10X; 0.8 µl 50 mM MgCl₂; 2 µl iniciador directo; 2 µl iniciador reverso; 0.5 µl 200 mM dNTP; 0.5 µl Taq DNA polimerasa y H₂O bidestilada estéril hasta un volumen final de 25 µl. El ciclo de amplificación para el par de iniciadores PALF-883/PALR-1083 fue el siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, 38 ciclos de 95°C durante 1 min, 60°C durante 1 min, 72°C durante 2 min y una extensión final de 72°C durante 5 min.

4.2.4 Electroforesis y visualización de los productos de PCR

La visualización de los productos de amplificación se realizó en geles de agarosa al 2% (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen) en 1X Tris-acetato-EDTA (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). El volumen de carga utilizado fue de 10 µl, previamente mezclados con 2 µl de amortiguador de carga (Sigma-Aldrich Co.). La electroforesis se realizó a 80 V durante 45 minutos. Los geles fueron teñidos con una solución 3X de Gel-Red (Biotium) durante 30 min en agitación constante, y su visualización se realizó en un transiluminador de luz UV (Ultralum, Claremont, CA, USA). El marcador de peso molecular utilizado fue de 1 Kb (Bioline).

4.2.5 Diseño de los iniciadores para la amplificación del gen que codifica a la PAL

Para el diseño de los iniciadores, se tomó como base la secuencia parcial del gen que codifica a la PAL de *C. chinense* (GenBank, AF081215.1). Se diseñaron dos pares de iniciadores PALF-883/PALR-1083 y FPAL2/RPAL 2 (Cuadro 4.1), utilizando el software OLIGO versión 3.0 para verificar la factibilidad de los iniciadores. Los oligonucleótidos diseñados fueron sintetizados químicamente por Integrated DNA Technologies. Los iniciadores liofilizados fueron resuspendidos en H₂O-DEPC a una concentración de 1nmol/µl y almacenados a -20°C hasta su uso.

4.2.6 Gen de referencia: Factor de elongación 1 α

Para la evaluación de cambios en los niveles de expresión de PAL en células tratadas con el inhibidor, 1-butanol, era necesario elegir un gen que tuviera un perfil de expresión constante para realizar la normalización de los datos. El gen de referencia utilizado en este estudio fue el del factor de elongación 1 α (*EF1 α*). El *EF1 α* es uno de los tres factores que son los responsables de la exactitud durante la traducción del ARNm a un código de secuencia de aminoácidos (Andersen, 2003). Este gen se expresa constitutivamente en todas las células y es utilizado comúnmente como control en estudios de amplificación a través de la PCR en tiempo real (RT-PCR) (Kumar y Klessig, 2003).

Cuadro 4.1 Iniciadores utilizados para la amplificación del gen de la PAL y el gen del factor de elongación por la PCR en este estudio.

Iniciadores	Secuencia	Longitud (nt)	Tm (°C)	Tamaño esperado (pb)
PALF-881	ACCATGTCCAAAGTGCCGAG	20	63	220
PALR-1083	GAGAAC TTTGACAATGGG	18	51	
FPAL2	TAATCTCACAGCAGGAAGGA	20	52.9	305
RPAL2	CAAGAACACAGTCAGCCAAG	20	53.9	
EF1α F	AGACCACCAAGTACTACTGCAC	22	56	525
EF1α R	CCACCAATCTTGTACACATCC	21	58	

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Extracción del ARN total

La extracción del ARN total fue el procedimiento más importante para el estudio de la expresión del gen de PAL, debido que a partir de éste se sintetizó el ADNc, que se utilizó para la amplificación por PCR del gen que codifica para PAL. Algunos de los problemas en este proceso eran la posible contaminación con ADN o la degradación del ARN y la

obtención de un ARN de baja calidad.

La extracción del ARN total se llevó a cabo en suspensiones celulares a los 14 días de ciclo de cultivo, según la metodología descrita en la sección 4.2.2 en Materiales y Métodos. La pureza promedio del ARN que se obtuvo fue de 1.6, la cual fue aceptable para realizar el estudio, tomando como valores de referencia 1.6-2.5. La concentración del ARN se situó entre 2,000-8,000 ng/ μ l. Su integridad se verificó en un gel de agarosa al 1% y las bandas obtenidas de una de las muestras se observan en la Figura 4.1. Se detectaron las subunidades 28,18 y 5 del ARN ribosomal. El ARN extraído se sometió a tratamiento con ADNasa para eliminar cualquier contaminación de ADN genómico (Figura 4.1B). El ARN libre de ADN se utilizó para la síntesis del ADNc (Figura 4.1C).

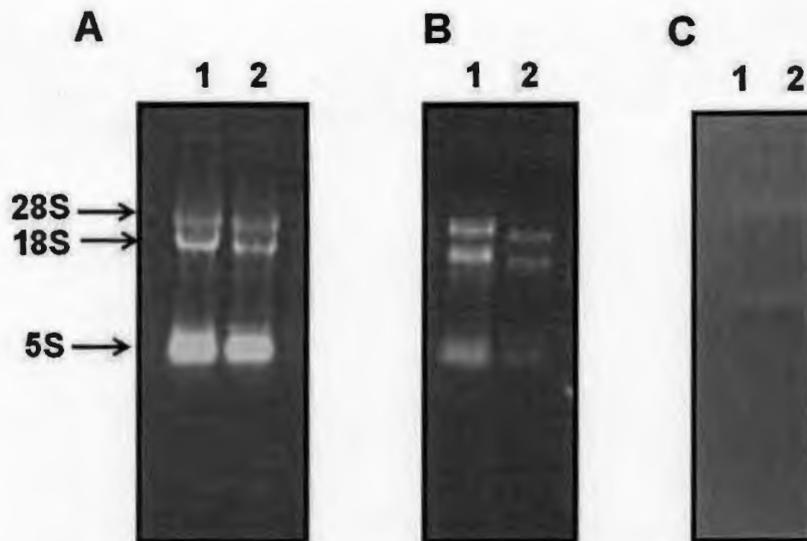


Figura 4.1 Extracción del ARN total. Separación electroforética de las unidades 28, 18 y 5S ribosomales del ARN obtenido de suspensiones celulares de *C. chinense*. A) Extracción de ARN. 1-2 muestras de RNA (duplicados). B) Muestras de ARN sometidas a tratamiento con ADNasa I. C) Síntesis de ADN complementario (ADNc). Geles de agarosa al 1% teñidos con solución Gel Red 3X (Biotium).

4.3.2 Diseño de los iniciadores para la amplificación del gen que codifica a la PAL

Con el fin de realizar la evaluación de los niveles de transcripción del gen que codifica a la PAL en *C. chinense* se realizó la revisión correspondiente en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se encontró solamente una secuencia parcial (AF081215.1). Tomando en cuenta dicha secuencia, se realizó el diseño de los iniciadores con una longitud de 18-20 nucleótidos y una composición de 60%+40% (G/C). En la Figura 4.2 se observa la ubicación de los iniciadores diseñados que corresponde al dominio conservado del sitio catalítico de la enzima. Como primer paso, se analizaron los iniciadores con el ADNc obtenido de las células de *C. chinense* a los 14 días de ciclo de cultivo para determinar las condiciones óptimas de amplificación.

1 ttgatcaaca gcaacatcac cccatgtttg ccctcogtg gcacaatcac tgcctcgggt
 61 gatcttgtcc cgttgtccta cattgctggt ttgcttactg gcagacctaa tgccaaggct
 121 gttgggtccca atgggtgagaa acttaatgca gaggaagcgt tccgcgtggc tgggtgtagt
 181 ggtggatttt tcgagttgca gccaaaggaa ggacttgccc ttgtgaatgg tacagcagtt
 241 ggttctggta tggcgtogat ggtcctgttt gagtccaaca ttcttgctgt catgtctgaa
 301 gttttgtcag tgattttcgc tgaagtgatg aatggaaagc ccgagttcac ggaccatctg
 361 acacacaagt tgaagcacca tcctggtcag attgaggctg ctgctattat ggaacacatt
 421 ttggatggca gctcttatgt aaaggcagct cagaagctcc atggaaatga tcctctccag
 481 aaaccaaagc aagatcgta tgctctccga acatctccac aatggcttgg ccctcaaatt
 541 gaagtcattc gcgctgcaac taagatgatc gagagggaga tcaactcggg gaacgacaat
 601 ccattgatcg atgtttcaag aaacaaggcc ttacacggtg ggaatttcca aggcacccct
 661 attggtgtct ccatggataa cacaagattg gccttgcac caattgggaa attgatgttt
 721 gctcagttct cagaacttgt caacgactat tacaacaatg gtttgccatc taatctcaca
 781 gcaggaagga atccaagctt ggactatggt ttcaaggag ctgaaatcgc gatggcttct
FPAL2
 841 tactgctcgg aacttcaatt cttggcaaat ccagtgacta accatgtcca aagtgccgag
PALF-881
 901 caacacaacc aagatgtaa ctcttgggc ttaatctcat caaggaaaac agccgaggcg
 961 gttgacatct tgaagctgat gtcacacacc tatctcgtgg cgctttgcca agctatagac
 1021 ttgaggcact tggaagaaaa cttgaagaat gcagtcaaga acacagtcag ccaagtagct
RPAL2
 1081 aagagaactt tgacaatggg cgctaacggt gaacttcac cagcaagatt ctgcgaaaag
PALR-1083
 1141 gagttgcttc gagtcgtgga caggaatac ttgtttgct atgctgatga tcctgcagc
 1201 tcaacctacc ctttgatgca gaagctgaga caagtcctcg ttgatcatgc actgaacaac
 1261 ggtgaaagcg agaagaatgt gaacagctca atcttccaaa agattgcagc tttcgaggac
 1321 gaattgaagg ccgtattgcc taaagaagtt gagagtgcaa gaattactct tgaaagtggc
 1381 aacccttcaa ttcccaacag gatcacagaa tgcagatcat atcccttata cagacttgtg
 1441 aggaaggaac ttggaactga actggtgaca ggtgaaagag tccgatcgcc cggtagaggag
 1501 attgacaaag tgttcacagc aatgtgcaat ggacaagtca ttgatccatt gttggagtgt
 1561 ctcaagagct ggaatggtgc tcctcttcca atctgttagg tgtttgcttg caaaaaaga
 1621 tcttttgta ctcttgtga aatgctattt ttcaaattgt ttattttatc ccatggtgaa
 1681 ttactagaat catcataata tatatgttgt caatttagga gccagtctgc tcctatatgt
 1741 ggatcagacc atgtaacta gaatatctag gtatgtatgt ttgttagatt gtcttttctc
 1801 atggagttag catactgcat gacataaaag aaacaatoca aagatttcaa gattt

Figura 4.2 Secuencia del gen que codifica a la PAL. Ubicación de los iniciadores diseñados en la secuencia parcial del gen de PAL en *Capsicum chinense*. Se diseñaron dos pares de iniciadores denominados como PALF-881/PALR-1083, FPAL2/RPAL2, los cuales amplifican fragmentos de 220 y 305 pb, respectivamente.

4.3.3 Amplificación del gen que codifica a la PAL

Con el objetivo de evaluar la utilidad de los pares de los iniciadores diseñados para la PAL, se desarrollaron reacciones de PCR con el ADNc sintetizado a partir de las células de *C. chinense*. Se utilizó el primer par de iniciadores PALF-883/PALR-1083 y la amplificación se hizo a 55°C durante 40 ciclos. El producto amplificado fue separado en una electroforesis en gel de agarosa (2%) y visualizado en una solución de Gel-Red. Como se muestra en la Figura 4.3, se detectaron varias bandas además de la esperada (220 pb), lo cual indica la inespecificidad de los iniciadores utilizados.

Este resultado parecía indicar que las condiciones establecidas no eran las adecuadas, por lo que se realizaron ensayos modificando las temperaturas de alineamiento (55, 59.2, 65.2, 66.9 y 68 °C), así como y la concentración final de MgCl₂ (1.5, 3 y 4 mM). Sin embargo, no se tuvo éxito en la amplificación de una sola banda que correspondiera al tamaño esperado. En la Figura 4.3 se muestra uno de los resultados de la amplificación utilizando las siguientes condiciones: T_m 59.2°C, 1.5 mM MgCl₂, un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 1 min, 40 ciclos de 94°C durante 30 seg, 59.2°C durante 30 seg, 72°C por 30 seg y una extensión final de 72°C durante 10 min.

En función del resultado, se diseñó otro par de iniciadores denominados FPAL2/RPAL2. Para la amplificación del fragmento, se utilizó ADNc sintetizado a partir de las células, y como control positivo ADNc de hojas de *C. chinense*. En vista de que las condiciones anteriormente planteadas no funcionaron para lograr la amplificación, para los nuevos iniciadores se modificaron las condiciones de la PCR como se muestra en el Cuadro 4.2.

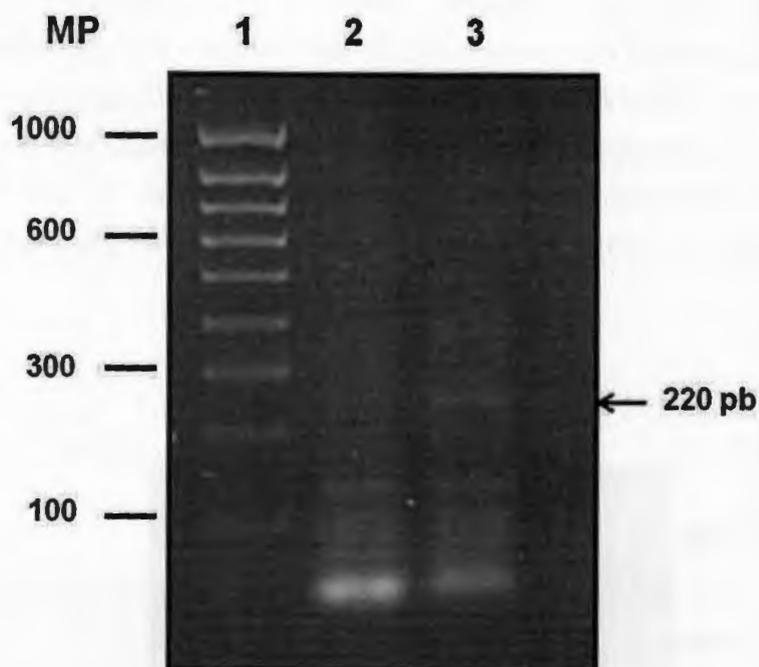


Figura 4.3 Amplificación por PCR del gen de PAL a partir de ADNc (2 μ g) obtenido de suspensiones celulares de *Capsicum chinense* utilizando los iniciadores PALF-883/PALR-1083. Carril 1: marcador de 1 Kb (Invitrogen); carril 2: amplificación de un fragmento de 220 pb con ADNc de células y carril 3: amplificación de ADNc de hoja como testigo.

Cuadro 4.2 Condiciones de la PCR para la amplificación del gen que codifica a la PAL utilizando los iniciadores FPAL2/RPAL2

	Temperatura	Tiempo
38 ciclos	95 °C	1 min
	94 °C	30 s
	56 °C	30 s
	72 °C	30 s
	72 °C	5 min
	4 °C	4 min

El nuevo par de iniciadores sintetizados, denominados FPAL/RPAL2, presentaban temperaturas de alineamiento cercanas (Cuadro 4.1), lo cual permitiría lograr la amplificación del fragmento esperado de 305 pb. Se llevaron a cabo las reacciones de la PCR utilizando como molde ADNc a partir de células y hojas de *C. chinense*. En la Figura 4.4 se muestra el resultado obtenido. Se logró amplificar el fragmento con el tamaño esperado de 305 pb a una temperatura de alineamiento de 56 °C, tanto en el ADNc obtenido de las células como en aquel obtenido a partir de hojas de *C. chinense*

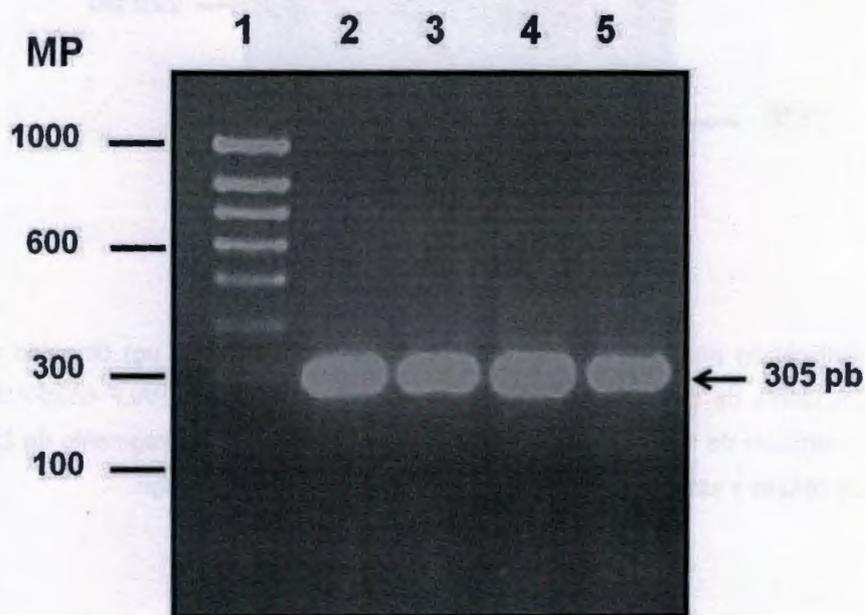


Figura 4.4 Amplificación por PCR del gen de PAL a partir de ADNc (2 µg) obtenido de suspensiones celulares de *C. chinense* utilizando los iniciadores FPAL2/RPAL2. Carril 1: marcador de 1 Kb (Bioline); carril 2-3: amplificación de un fragmento de 305 pb con ADNc obtenido a partir de células de *C. chinense* y carril 4-5: amplificación de ADNc de hojas de *C. chinense* como testigo.

4.3.4 Amplificación del gen de referencia *EF1 α*

Para poder evaluar los niveles de expresión del ARNm de PAL, éstos se deben comparar con la expresión de un gen de referencia. En este estudio se eligió al gen del factor de elongación 1 α (*EF1 α*). La amplificación de los fragmentos del gen de la PAL y del *EF1 α* se realizó con las condiciones para la amplificación de la PCR descritas en Cuadro 4.2. En la Figura 4.5, se puede observar que los iniciadores utilizados para el gen de PAL y *EF1 α* permitieron la amplificación de ambos fragmentos con los tamaños esperados de 305 y 525 pb, respectivamente con la misma temperatura de alineación de 56°C.

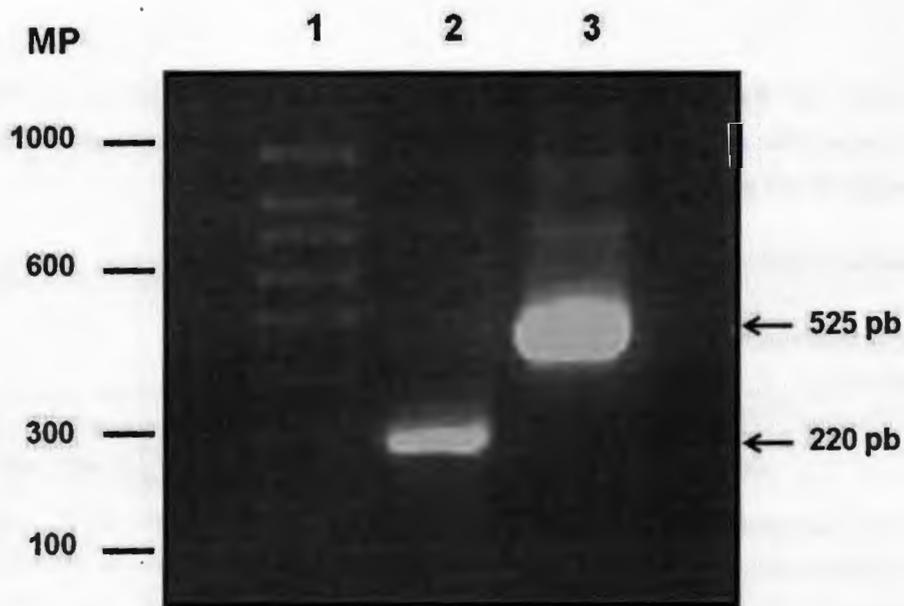


Figura 4.5 Amplificación del gen de PAL y del *EF1 α* a partir de ADNc (2 μ g) obtenido de células de *C. chinense* con los iniciadores FPAL2/RPAL2. Carril 1: marcador de 1 Kb (Bioline); carril 2: amplificación de PAL con los iniciadores FPAL2/RPAL2 y carril 3: amplificación del gen de *EF1 α* de 525 pb con los iniciadores *EF1 α F*/*EF1 α R*.

4.3.5 Secuenciación de los fragmentos amplificados en la PCR

El fragmento de 305 pb amplificado a partir del ADNc obtenido de las células de *C. chinense* utilizando los iniciadores específicos FPAL2/RPAL2. Este fragmento fue purificado y enviado a secuenciar (Instituto de Biotecnología, UNAM). Con la secuencia de nucleótidos, se realizó un análisis bioinformático utilizando el algoritmo BLASTX en la base de datos del NCBI que permitió comparar la secuencia de nucleótidos obtenida con las existentes en el banco de datos para conocer su porcentaje de identidad. El análisis BLAST indicó que el fragmento amplificado fue idéntico en un 98% al del gen de la PAL de *C. chinense*, 97% con el de la PAL de *C. annuum* y 91% con el de la PAL de *Solanum tuberosum* (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3 Análisis del fragmento ADNc de 305 pb del gen de la PAL obtenido por PCR y secuenciado. Comparación con el Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) del fragmento obtenido de 305 pb.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Capsicum chinense phenylalanine ammonia-lyase (Pal1) mRNA, partial cds	448	448	95%	2e-123	98%	AF081215.1
<input type="checkbox"/> Capsicum annuum putative phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds	442	442	95%	8e-122	97%	EU616575.1
<input type="checkbox"/> S. tuberosum PAL-1 gene for phenylalanine ammonia-lyase	353	353	95%	4e-95	91%	X63103.1
<input type="checkbox"/> Solanum tuberosum phenylalanine ammonia-lyase (PAL1) mRNA, complete cds	350	350	91%	5e-94	92%	KC631948.1
<input type="checkbox"/> Lycium barbarum phenylalanine ammonia-lyase 3 mRNA, partial cds	348	348	95%	2e-93	91%	KC759155.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Solanum lycopersicum phenylalanine ammonia-lyase-like (LOC101928221)	348	348	95%	2e-93	91%	XM_004253470.1
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 10 clone s1b-63b3 map 1	348	696	95%	2e-93	91%	AC245812.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Solanum lycopersicum phenylalanine ammonia-lyase-like (LOC101928220)	346	346	92%	7e-93	92%	XM_004246604.1
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum phenylalanine ammonia-lyase (PAL5) gene, complete cds	344	344	91%	2e-92	92%	M90692.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Solanum lycopersicum phenylalanine ammonia-lyase-like (LOC101928222)	342	342	95%	9e-92	90%	XM_004234564.1

4.3.6 Efecto del AS en los niveles de transcritos de PAL

Para determinar si los cambios en los niveles de expresión de PAL y su actividad enzimática detectada en las células de *C. chinense* están relacionados directamente en respuesta al AS, se evaluaron los niveles de expresión del gen de la PAL en presencia de ésta fitohormona.

Una vez que se establecieron las condiciones para la amplificación del gen de PAL fue posible iniciar la evaluación del efecto del 1-butanol (1-but) en los niveles de expresión del gen de PAL con y sin la adición del AS. Para su evaluación, se utilizó la misma concentración de ARN total (1 µg) en los tratamientos y se analizó la expresión diferencial por PCR punto final.

Las suspensiones celulares a los 14 días de cultivo se incubaron en 25 ml de medio MS conteniendo 0.5% 1-butanol durante 15 min antes de la adición de 200 µM AS. El terbutanol, un isómero inactivo del 1-but, se utilizó como testigo positivo. Los productos amplificados fueron separados en un gel de agarosa al 2%, como se indica en la sección de Materiales y Métodos. El gen *EF1α* que posee un patrón de expresión constitutivo, fue utilizado como testigo para estandarizar la expresión del gen de PAL.

Inicialmente se llevó a cabo la extracción del ARN total de las células tratadas con el 1-butanol o terbutanol en presencia y ausencia de AS (Figura 4.6A). Posteriormente, a partir de 1 µg del ARN total se realizó la síntesis del ADNc en cada uno de los tratamientos. La amplificación del fragmento de PAL se llevó a cabo en las condiciones descritas en el Cuadro 4.3.

Los resultados mostraron un incremento en los niveles de expresión del gen de PAL en las células tratadas con el AS, comparado con los niveles basales en las células no tratadas (Figura 4.6B). En el tratamiento de las células con el 1-butanol, se detectó un ligero incremento en los niveles de expresión comparado con el testigo. Por otra parte, la expresión en el tratamiento realizado a las células con el 1-butanol más el AS fue similar al testigo (Figura 4.6, carril 4). El terbutanol no tuvo efecto en los niveles de expresión del gen de PAL. Estos resultados demuestran que el tratamiento con AS tiene un claro efecto en la acumulación de los transcritos en las células de *C. chinense*.

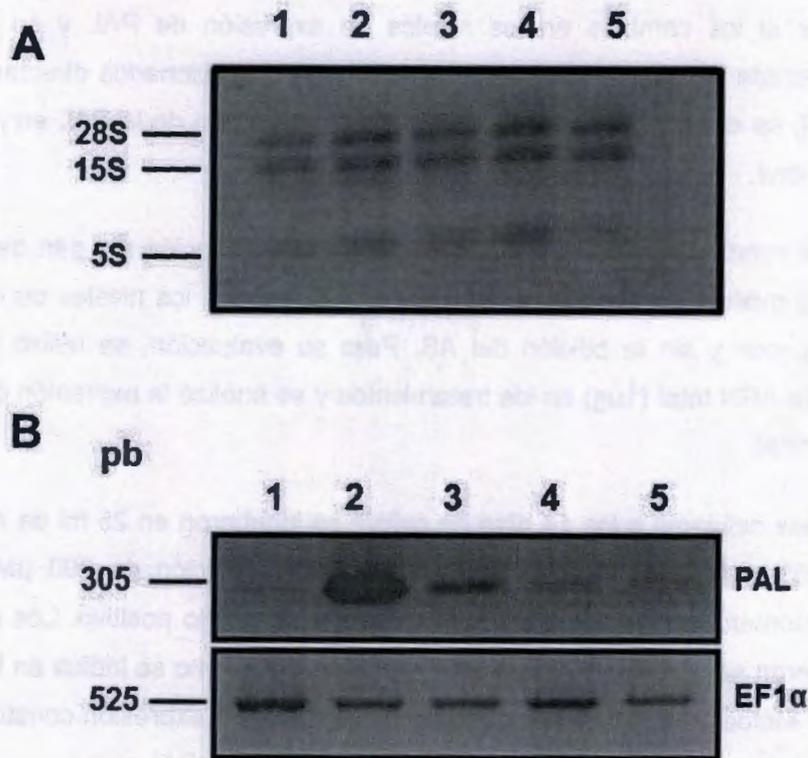


Figura 4.6 Efecto del AS sobre la acumulación de los transcritos de PAL en suspensiones celulares de *C. chinense*. Después de 14 días de ciclo de cultivo, las células fueron tratadas con el 0.5% 1-butanol o 0.5% terbutanol (isómero inactivo) durante 15 min antes de la adición de 200 μ M AS durante 30 min. El ARN total fue extraído de las células después de los diferentes tratamientos y se realizó una transcripción reversa con la presencia de un iniciador de Oligo dT (A). La amplificación por la PCR fue desarrollado con los iniciadores específicos FPAL2/RPAL2 (B). Carril 1: testigo (células sin tratamiento); carril 2: células tratadas con el AS; carril 3: células tratadas con 1-but; carril 4: células tratadas con 1-but más el AS y carril 5: células tratadas con el terbutanol. Como control interno, el gen *EF1 α* fue amplificado con la adición de los iniciadores específicos *EF1 α F/EF1 α R*.

4.4 DISCUSIÓN

El primer paso para poder evaluar los niveles de expresión del gen de PAL en presencia de los inhibidores de la señalización fosfolipídica fue la búsqueda de la secuencia total o parcial de genes que codifican a la PAL en *C. chinense*. Se encontró una secuencia parcial del gen correspondiente a PAL de *C. chinense* registrada en el GenBank. Esto permitió el diseño de dos pares de iniciadores. Los resultados presentados en esta sección mostraron que los iniciadores FPAL2/RPAL2 permiten amplificar el fragmento esperado de 305 pb con una temperatura de alineamiento de 56°C (Figura 4.4). El gen de referencia *EF1α* amplificó bajo las mismas condiciones que el gen de PAL (Figura 4.5).

Existen reportes que indican que los genes de la PAL se inducen por diversos tipos de estrés como biótico o abiótico en plantas o en suspensiones celulares (Dixon y Paive, 1995). Las heridas (Campos-Vargas *et al.*, 2005), la concentración de ozono (Olson y Bidlack, 1997), la radiación UV (Teklemariam y Blake, 2004) y el AS (Wen *et al.*, 2008) son algunos ejemplos de estímulos que pueden activar la expresión de genes de PAL. La adición exógena del AS induce un incremento en el ARNm de PAL (Thulke y Conrath 1998; Wen *et al.*, 2008). La expresión del gen de PAL está altamente influenciada por los factores de estrés debido a que este tipo de regulación es una respuesta de defensa de la planta (Zhao *et al.*, 2005)

El patrón del nivel de expresión de PAL mostró que los niveles basales en las células sin tratamiento fueron casi indetectables, mientras que en las células tratadas con el AS hubo un incremento significativo en la expresión de PAL (Figura 4.6B). Estos altos niveles de expresión podrían explicarse en términos de una respuesta adaptativa rápida de la célula al estímulo generado por el AS. Cabe destacar que el incremento observado en los transcritos es concomitante con el aumento en la actividad de PAL detectada en las células tratadas con el AS (Figura 2.5A). Sin embargo el patrón en los niveles de los transcritos no justifica totalmente el incremento en su actividad enzimática. Esto podría explicarse por la cantidad de proteína ya existente que podría modificarse postraduccionalmente y en consecuencia generar un incremento en la actividad enzimática. Existen estudios que apoyan la existencia de cambios en la actividad enzimática y en los niveles de expresión en diferentes plantas sometidas a estrés por heridas (Diallinas y Kanellis 1994; Campos-Vargas *et al.*, 2005) y por toxicidad por

metales (Sprada-Pawlak *et al.*, 2011).

Por otra parte, también se pudo detectar un ligero incremento en la expresión del gen de PAL en células tratadas con el 1-butanol. Este resultado podría explicarse como una respuesta inducida inherente a la presencia del alcohol en las células.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen G. R., Nissen P. y Nyborg J. (2003). Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 434-441.
- Campos-Vargas R., Nonogaki H., Suslow T. y Saltveit M.E. (2005). Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not induction in romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiology Plant*, 132, 82-91.
- Diallinas G. y Kanellis A. (1994) A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Molecular Biology*, 26, 473-479.
- Dixon R.A. y Paiva N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Given N.K. (1988). Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *Journal of Plant Physiology*, 133, 25-30.
- Kumar D. y Klessing D. F. (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 16101-16106.
- Kolahi M., Jonoubi P, Majd A., Tabandeh-Reza M. y Hashemitabar M. (2013). Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase in different tissues of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) during development. *Bioresources*, 8, 4912-4922.
- Lois R., Dietrich A., Hahlbrock K. y Schulz W. (1989). A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO Journal*, 8, 1641-1648.
- Olson P.E. y Bidlack J.E. (1997). Yield and enzyme activity of sweet basil (*Ocimum basilicum*) subjected to alternative pest control. *Journal Herbs Spices Medicinal Plants*, 3-16.

- Sprada-Pawlak S., Arasimowicz-Jelonek M., Podgórska M. y Deckert J. (2011). Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part I. Effects of cadmium and lead on phenylalanine ammonia lyase gene expression, enzyme activity and lignin content. *Acta Biochimica Polonica*, 58, 211-216.
- Teklemariam T. y Blake T.J. (2004). Phenylalanine ammonia-lyase-induced freezing tolerance in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with low, ambient levels of ultraviolet-B radiation. *Physiology Plant*, 122, 244-253.
- Thulke O. y Conrath U. (1998). Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *Plant Journal*, 14, 35-42.
- Wen P.F., Chen J.Y., Kong W.F., Pan Q.H., Wan S.B. y Huang W.D. (2005). Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia lyase gene in grape berry. *Plant Science*, 169, 928-934.
- Wen P.F., Chen J.Y., Wan S.B., Kong W.F., Zhang P., Wang W., Zhan J.C., Pan Q.H. y Huang W.D. (2008). Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Regulation*, 55, 1-10.
- Zhao, J., Davis L.T. y Verpoort, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23, 283-333.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

El uso de inductores es una herramienta que permite incrementar la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos celulares que producen cantidades muy pequeñas de éstas sustancias; este hecho favorece su uso para el estudio de aquellos mecanismos que regulan su biosíntesis (Moreno-Valenzuela *et al.*, 1999). Como se muestra en trabajos previos, algunos fitorreguladores como el AS y el MeJa incrementan la acumulación de metabolitos como los capsaicinoides en suspensiones celulares de *C. annuum*, *C. frutescens* Mill y *C. chinense* (Ochoa-Alejo y Gomez-Peralta 1993; Sudha y Ravishankar 2003; Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2011). Sin embargo, poco se conoce acerca de la interacción de los inductores del metabolismo secundario en las plantas con la señalización fosfolipídica. Por ello, en este proyecto, se estudió la participación de esta vía de señalización en la producción de la vainillina estimulada por el AS en suspensiones celulares de *C. chinense* a través de la utilización del uso de sustancias farmacológicas.

La activación del metabolismo fenilpropanoide ante diferentes condiciones de estrés permite que la respuesta inicial sea la síntesis de compuestos que le permitan sobrevivir a la planta en estas condiciones. Debido a que PAL es la primera enzima activada en la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides y es sensible a la estimulación por inductores, inicialmente se evaluó su actividad enzimática en las suspensiones celulares después de cultivarlas durante 14 días. Los resultados indicaron que había una estimulación de la actividad enzimática en respuesta a la adición del AS. Este incremento en su actividad se correlacionaba positivamente con el incremento en la acumulación de la vainillina bajo las mismas condiciones (Figura 2.1).

Para evaluar si en la estimulación de la actividad de PAL y en el contenido de vainillina en respuesta al AS participa la señalización mediada por la PLC, las células fueron tratadas con neomicina y U73122 bajo condiciones de estimulación con el AS. Los resultados obtenidos muestran que ambos inhibidores disminuyeron la actividad de PAL, y en consecuencia, el contenido de vainillina (Figura 2.4). Los resultados sugieren que la respuesta en la inducción con el AS en el incremento en la actividad de PAL y en la acumulación de la vainillina en respuesta al AS podría estar involucrada la señalización mediada por la PLC.

Esto se podría explicar basados en que la neomicina es un inhibidor del recambio de los fosfoinosítidos y del PIP₂ (Kashem *et al.*, 2000), y al ser modificado este sistema por la presencia del inhibidor, podría estar generando cambios en la actividad de PAL, lo cual indicaría a su vez que la presencia de los fosfoinosítidos es importante para la regulación de su actividad. Existen reportes que señalan la importancia de los fosfoinosítidos en la interacción y modulación de las proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto y la polimerización de actina (Laxalt y Munnik, 2002), así como también en el reclutamiento de varias proteínas solubles regulando su actividad. El recambio de los fosfoinosítidos tiene un papel importante en la estimulación en la actividad de la PAL a través de las cinasas en suspensiones celulares de tabaco tratadas con un inductor preparado a partir de la pared celular de *Phytophthora nicotiae* (Kamada y Moto, 1994).

La actividad de la PLD se manipuló mediante la adición del 1-butanol para evitar la formación PA, su producto. Esta estrategia se ha empleado para demostrar que la producción de PA formado por la PLD es necesaria para el incremento en la producción de silimarina en suspensiones celulares de *Silybum marianum* (Madrid y Corchete, 2010). De la misma manera, la actividad de la PAL fue estimulada por el AS y el aumento en los niveles de vainillina se redujo por la adición del 1-butanol en células de *C. chinense* (Figura 2.5).

Este efecto también ha sido reportado en modelos como suspensiones celulares de tabaco donde la acumulación de riboflavina se vio afectada por la adición del 1-butanol (Wang *et al.*, 2013), mientras que la adición exógena de PA revirtió este efecto. Esto indica la importancia del PA como molécula señal y su participación en la regulación de sistemas de señalización, ya sea a través de cinasas, como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺ (CDPK) (Lee *et al.*, 2001), ó bien, a través de la modulación de componentes de señalización, como los iones Ca²⁺, la calmodulina (CaM) y los canales iónicos (Blanco *et al.*, 2008). A pesar de que en la literatura no existen reportes de un papel directo del PA en la actividad de la PAL, sí se ha identificado que las cinasas, los iones Ca²⁺ y la calmodulina participan como componentes en la transducción de señales para regular la actividad de PAL (Allwood *et al.*, 2002).

Por otra parte, se evaluó el contenido del AS total endógeno en las células en la presencia del AS, la neomicina, el U73122 y el 1-butanol con el fin de determinar si éstos compuestos modificaban los niveles del AS intracelular. Se detectó un incremento de tres veces en el contenido del AS endógeno en las células tratadas con 200 μM de AS. Este resultado sugiere que la biosíntesis del AS es activada en respuesta al AS exógeno. Respecto a la utilización de la neomicina como un inhibidor para bloquear la unión del PIP y el PIP₂ con la PLC, se ha reportado que este antibiótico actúa también como un inhibidor de la síntesis de proteínas en bacterias y cloroplastos (Conte *et al.*, 2009). Los cloroplastos/plastidios son importantes para el metabolismo lipídico y en la generación de señales derivados de los lípidos (Shah, 2003); debido a que la neomicina puede afectar a ese organelo, no se puede descartar la posibilidad de que se pudiera tener un efecto en la síntesis de proteína, afectando la vía del AS localizada en los cloroplastos. Sin embargo, la concentración de neomicina empleada (100 μM) no afectó los niveles endógenos del AS total sugiriendo que este compuesto solo afectó a la señalización de la PLC y no la síntesis de proteínas localizada en este organelo.

El nivel de expresión del gen que codifica a PAL presentó un incremento en la expresión cuando las células son tratadas con el AS. Este resultado, y el incremento en la actividad enzimática de la PAL en las mismas condiciones del experimento, no están completamente coordinadas. Esto podría explicarse debido a que los niveles de expresión del gen que codifica a PAL son inicialmente activados en respuesta al incremento en el contenido del AS endógeno. Sin embargo, hay que considerar que los factores a nivel transcripcional y postranscripcional tienen un papel importante para la síntesis de una proteína biológicamente activa.

Los resultados obtenidos se integraron en un modelo (Figura 5.1) que sugiere que el AS puede ser reconocido por receptores localizados en la vecindad de la membrana plasmática y activar la cascada de señalización a través de la PLC o la PLD para la generación de los segundos mensajeros. En consecuencia, se observa un incremento en la actividad de la PAL y en el contenido de vainillina. La presencia de la neomicina y el U73122, estaría generando que los niveles del IP₃ y DAG disminuyeran lo cual en consecuencia, generaría cambios en los niveles del Ca²⁺ citosólico afectando cinasas dependientes de calcio (CDPK) que pudieran estar regulando la actividad de la PAL.

Por otro lado, la función inhibitoria del 1-butanol en la formación del PA podría estar afectando procesos regulados por las cinasas como la activación de factores de transcripción para la expresión de genes que codifican a PAL. De éste modo, la señalización mediada por la PLC y la PLD estaría involucrada en el proceso estimulado por el AS en la regulación de PAL y en el contenido de vainillina en las suspensiones celulares de *C. chinense*.

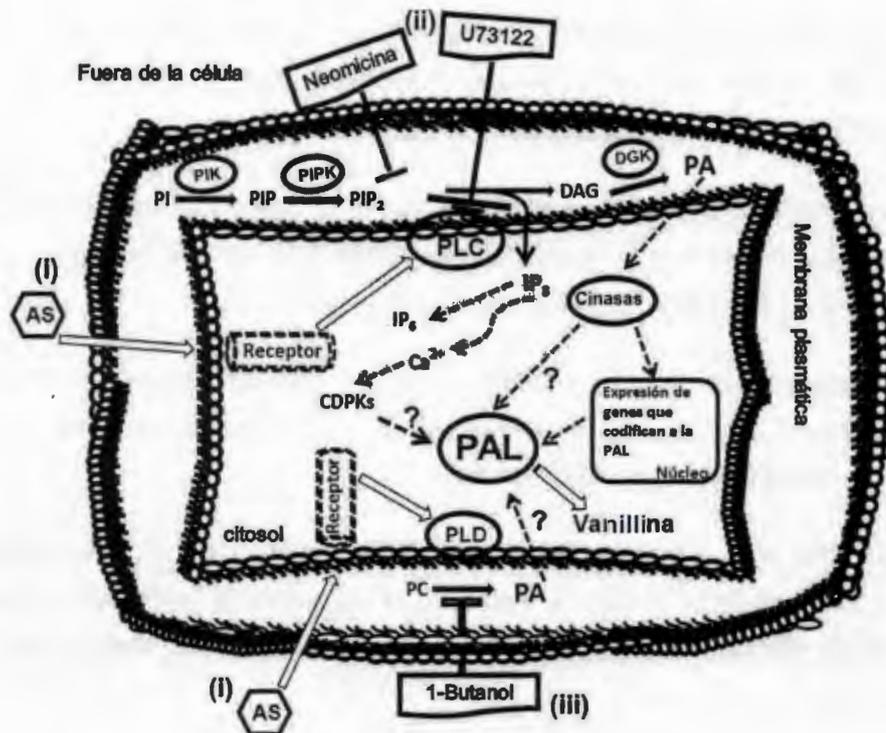


Figura 5.1 Modelo conceptual del papel del AS en la síntesis de vainillina involucrando a la vía de señalización fosfolípídica. (i) El AS puede ser sentido por un receptor cercano a la membrana plasmática y activando una cascada de señalización a través de la función de las fosfolipasas (PLC y/o PLD) y en consecuencia estimular la actividad enzimática de PAL e incrementar el contenido de vainilla. (ii) En la presencia de U73122 o la neomicina (inhibidores de la señalización de la PLC), los niveles de DAG e IP_3 (segundos mensajeros) se reducen, generando modificaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular que podrían estar afectando la actividad de PAL y podrían promover una reducción en el contenido de vainillina. (iii) La función inhibitoria del 1-butanol para la formación del PA podría estar afectando procesos de fosforilación a través de la regulación de cinasas que responden a los niveles de lípidos así como también a factores de transcripción que regulan la expresión de genes que codifican a PAL, por lo que este evento podría estar afectando la actividad de PAL y la producción de vainillina. Por lo tanto, la respuesta de las células al AS resulta en la producción de segundos mensajeros, tales como el DAG, el IP_3 y el PA, generados en la vía de señalización fosfolípídica que podrían estar involucrados en la regulación de la actividad de PAL y en la producción de vainillina.

BIBLIOGRAFÍA

- Allwood E.G., Davies D.R., Gerrish C., y Bolwell G.P. (2002). Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase, in biotically stressed cells of French bean. *Plant Molecular Biology*, 49, 533-544.
- Blanco F.A., Zanetti M.E. y Daleo G.R. (2008). Calcium-dependent protein kinases are involved in potato signal transduction in response to elicitors from the oomycete *Phytophthora infestans*. *Journal Phytopathology*, 156, 53-61.
- Conte S., Stevenson D., Ferrer I. y Lloyd A. (2009). Multiple Antibiotic Resistance in *Arabidopsis* Is Conferred by Mutations in a Chloroplast-Localized Transport Protein. *Plant Physiology*, 151, 559-73.
- Gutiérrez-Carbajal M.G., Monforte-González M., Miranda-Ham M.L., Godoy-Hernández G. y Vázquez-Flota F. (2011). Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biology Plantarum*, 54, 430-434.
- Kamada Y. y Muto S. (1994). 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 Physiology*, 35, 405-409.
- Kashem M.A. Itoh K., Iwabuchi S., Hori H. y Mitsui T. (2000). Possible involvement of phosphoinositide-Ca²⁺ signaling in the regulation of alpha-amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiology*, 41, 399-407.
- Laxalt A.M. y Munnik T. (2002). Phospholipid signaling in plant defense. *Current Opinion Plant Biology*, 5, 1-7.
- Lee S., Hirt H. y Lee Y. (2001). Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant Journal*, 26, 479-486.

- Madrid E. y Corchete P. (2010). Silymarin secretion and its elicitation by methyl jasmonate in cell cultures of *Silybum marianum* is mediated by phospholipase D-phosphatidic acid. *Journal of Experimental Botany*, 61, 747-754.
- Moreno-Valenzuela O.A., Monforte-González M., Muñoz-Sánchez J.A., Méndez-Zeel M., Loyola-Vargas M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (1999). Effect of macerozyme on secondary metabolism plant product production and phospholipase C activity in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Journal of Plant Physiology*, 155, 447-452.
- Ochoa-Alejo N. y Gómez-Peralta J.E. (1993). Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Plant Physiology*, 141, 147-152.
- Shah J. The salicylic acid loop in plant defense. (2003). *Current Opininn of Plant Biology*, 6, 365-71.
- Sudha G., y Ravishankar G.A. (2003). Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens*. Mill. *Current Science*, 85, 1212- 1217.
- Wang L., Zhu X., Liu J., Chu X., Jiao J. y Liang Y. (2013). Involvement of phospholipase C and D in the defense responses of riboflavin-treated tobacco cells. *Protoplasma*, 250, 441-449.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos acerca de la participación de la señalización fosfolipídica en la regulación de la actividad de PAL sugieren que la activación de ésta enzima y el incremento en el contenido de vainillina inducido por el AS estarían ocurriendo a través de los segundos mensajeros generados por la PLC y la PLD. La utilización de estrategias farmacológicas, bioquímicas y herramientas de biología molecular permitió profundizar en los posibles mecanismos involucrados en la regulación de una enzima clave del metabolismo secundario y el sistema de transducción de señales a través de los fosfolípidos en cultivos *in vitro*.

A partir de los resultados obtenidos se derivan las siguientes conclusiones:

- La incubación de las células con la neomicina no afectó la actividad de la PLD; sin embargo, cuando las células fueron tratadas con la neomicina mas el AS se dió un incremento en su actividad enzimática sugiriendo la posible participación de otras PLD no dependientes de PIP₂.
- La incubación de las células con ³²Pi-ortofosfato durante 15 h fue suficiente para que éstas incorporaran este elemento en sus fosfolípidos.
- La inhibición de la señalización de la PLC por la neomicina fue compensada por el incremento en la actividad *in vitro* de la PLD.
- El AS estimuló la actividad enzimática de PAL, así como del contenido de vainillina, en las suspensiones celulares de *C. chinense* a los 14 días de ciclo de cultivo.
- La inhibición en la señalización de la PLC por la neomicina y el U73122 indujo la disminución de la actividad de PAL estimulada por el AS, y en consecuencia, afectó los niveles de vainillina. Esto sugirió la posible participación de los

fosfoinosítidos (PIP y el PIP₂) y los procesos acoplados al IP₃ (ejemplo, incremento en los iones Ca²⁺) como componentes importantes en la regulación de la actividad de PAL.

- El tratamiento de las células con 1-butanol en presencia del AS también causó que la actividad de PAL disminuyera, lo cual implicaría que el PA podría estar participando como un componente regulatorio en la transducción de señales para regular la actividad de PAL.
- La utilización de la neomicina no afectó los niveles endógenos del AS total, lo cual apoya la hipótesis de que este compuesto afecta la señalización de la PLC y no la biosíntesis del AS localizada en cloroplastos.
- El tratamiento de las células con el AS permitió determinar que hubo un incremento en la expresión del gen que codifica a la PAL, y que la regulación de esta enzima también podría estar ocurriendo a nivel transcripcional provocando un aumento en la actividad de PAL, y en consecuencia, un incremento en los niveles de vainillina.

6.2 PERSPECTIVAS

En el grupo de trabajo se ha avanzado en el estudio del metabolismo secundario del género *Capsicum* que involucra a la señalización de los fosfolípidos. En el presente trabajo se demostró que el AS indujo un incremento en la actividad enzimática de PAL y el contenido de vainillina a través de la participación de la señalización fosfolípídica. Los segundos mensajeros generados en esta vía podrían estar involucrados como componentes en la cascada de señalización que es activada por el AS para la regulación de la actividad de PAL. Sin embargo, aún no se ha podido determinar el mecanismo exacto para la regulación de PAL, lo cual podría involucrar la regulación a nivel transcripcional o al postranscripcional. Por lo tanto, se proponen las siguientes actividades futuras:

- Evaluar si la adición exógena del PA puede revertir el efecto de los inhibidores de la PLC/PLD o imitar el efecto del AS en la actividad enzimática de la PAL y el contenido de vainillina.

- Determinar si la incubación de las células con activadores de la PLD (ejemplo: mastoparan) modifican los niveles de vainillina y la actividad de PAL.
- Evaluar el efecto de la inhibición de la señalización fosfolipídica en la actividad enzimática y los niveles de expresión de las otras enzimas involucradas en la ruta fenilpropanoides en el género *Capsicum*.
- Se sabe que los canales iónicos, iones Ca^{2+} y las proteínas con sitios de unión a calmodulina son componentes en la transducción de señales que estimulan la actividad de PAL en cultivos celulares de papa, por lo que sería interesante evaluar a través de agentes farmacológicos si ésto también pudiera estar ocurriendo en nuestro modelo.
- Evaluar si el proceso de fosforilación/desfosforilación está involucrado en la regulación postranscripcional de PAL en este modelo bajo condiciones de estimulación con el AS.
- Caracterizar el gen que codifica para la PAL en *C. chinense* así como también a los genes de la ruta fenilpropanoides que están localizados río abajo de la PAL para entender mejor el funcionamiento de ésta ruta en respuesta al AS.

