



LA BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL ESTUDIO DE LA FISIOLOGÍA DE LAS PLANTAS

Discurso de ingreso leído por la Académica Electa

Ilma. Sra. María Ángeles Pedreño García

en el acto de la Sesión Solemne de su Toma de Posesión como Académica de Número,
celebrado el día 30 de Mayo de 2016 y Discurso de contestación de la Académica de
Número **Ilma Sra. Dña. Francisca Sevilla Valenzuela**

Índice

Prólogo	1
1. Introducción	3
¿Qué es la Biotecnología?.....	3
Los pilares básicos de la Biotecnología Vegetal: los sistemas de cultivo <i>in vitro</i> y las técnicas de la Biología Molecular:.....	5
2. Estudios básicos: Localización e implicación de las peroxidásas en la biosíntesis y degradación de compuestos almacenados en la vacuola y en la biosíntesis de ligninas	8
3. Estudios básicos: Utilización de la planta <i>Zinnia elegans</i> y de sus cultivos celulares <i>in vitro</i> derivados de hipocotilo como fuente para la obtención de peroxidásas implicadas en la lignificación.....	15
4. Estudios básicos: Los cultivos de células del mesófilo de <i>Zinnia elegans</i> en diferenciación a traqueidas como sistema modelo para el estudio de los factores que regulan la xilogénesis.....	19
Estudio sobre los lugares de producción de óxido nítrico <i>in planta</i> , en los haces vasculares e <i>in vitro</i> , en los cultivos de células del mesófilo de <i>Zinnia elegans</i> que se diferencian a elementos traqueales.....	24
Estudio sobre los lugares de producción de H ₂ O ₂ <i>in planta</i> , en los haces vasculares e <i>in vitro</i> , en los cultivos de células del mesófilo de <i>Zinnia elegans</i> que se diferencian a elementos traqueales.....	27
5. Estudios básicos: Implicación de las peroxidásas y compuestos relacionados con la defensa vegetal.....	28
6. Estudios aplicados: Elicitación como estrategia para la producción de compuestos relacionados con la defensa vegetal.....	31
7. Estudios aplicados: El poder curativo de las plantas. Producción de principios bioactivos aprovechando las respuestas de defensa de las células vegetales mediante el uso del cultivo celular, la elicitation y la transgénesis como estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios	36
Epílogo.....	45
Bibliografía.....	47
Discurso de contestación.....	53

Prólogo

Vale más saber alguna cosa de todo, que saberlo todo de alguna cosa. Blaise Pascal

Excelentísimo Sr. Presidente de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia.

Ilustrísima Secretaría General

Ilustrísimos Académicos e Ilustrísimas Autoridades.

Queridos compañeros y amigos

Señoras y Señores.

Es un verdadero honor para mí el haber sido elegida como candidata de esta prestigiosa Academia de Ciencias de la Región de Murcia y este acto de lectura de discurso a la vez que supone una inmensa responsabilidad, lo he realizado desde lo mas profundo de mis sentimientos, teniendo en mi pensamiento a mis padres, que me permitieron realizar mis estudios universitarios y me apoyaron durante toda mi formación académica y sobretodo a mis hijos, Enrique (estés donde estés, siempre estarás en mi corazón) y Eduardo, que en tantos momentos me acompañaron al trabajo y me ayudaron a realizar algunos experimentos en el laboratorio cuando eran niños por las dificultades que en aquella época teníamos, en nuestro papel de madres, para conciliar la vida familiar con la difícil carrera universitaria, por el enorme tiempo que a ellos les he quitado para dedicarme a la docencia, a la gestión y, sobretodo a la investigación.

La trayectoria científica que he seguido a lo largo de los treinta y dos años de que llevo dedicados a la investigación no hubiera sido posible sin la ayuda de mis compañeros de grupo, por lo que deseo expresar mi gratitud a ellos, en especial a alguien que ya no está con nosotros, el Prof. Romualdo Muñoz que confió en mi cuando me inicié en la carrera investigadora y del que tanto aprendí, sobretodo a desarrollar los diseños experimentales y ese espíritu crítico necesario para realizar las discusiones científicas de los artículos de investigación; al Prof. Francisco García-Carmona por su ayuda inapreciable en el planteamiento y desarrollo de los modelos cinéticos de mi Tesis Doctoral y por sus consejos siempre certeros para mejorar tanto en mi vida personal como en la profesional, y a otra persona especial para mi, a la que siempre tengo presente, el Prof. Alfonso Ros-Barceló (en cualquier parte del mar en donde te encuentres), por sus consejos como compañero y amigo, por hacerme mantener los pies en la tierra y por ayudarme a visualizar los procesos fisiológicos que estudiábamos

manteniendo siempre esa visión global; y al resto de mis colaboradores más jóvenes del grupo de investigación, que se han formado a mi lado, siguiendo con ilusión todas las nuevas ideas y planteamientos que hemos desarrollado juntos en los últimos años.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a los Académicos numerarios que avalaron mi candidatura, la Profesora de Investigación Dra Francisca Sevilla, compañera y amiga que junto con el Profesor de Investigación Dr. Felix Romojaro hicieron posible mi formación Postdoctoral en Biotecnología Vegetal, y al Profesor Dr. Francisco García-Carmona a quien le debo una buena parte de mi formación investigadora, por su disponibilidad y por haberme brindado siempre la oportunidad de trabajar con él y con las *chicas*, ahora compañeras y amigas, del Área de Bioquímica y Biología Molecular.

Gracias a todos los que me habéis apoyado y ayudado a disfrutar de la investigación, sobretodo a los estudiantes de Grado y de Master, a los jóvenes investigadores que han pasado por nuestro laboratorio y a los que ahora lo llenan con su ilusión por la investigación, a los compañeros con los que he compartido los proyectos de investigación y aquellos con los que he desarrollado los contratos con empresas y, sobretodo a los amigos que habéis hecho posible, con vuestro apoyo incondicional y vuestra amistad, que me sienta viva todos los días.

Cuando sientes algo que te haga vibrar el corazón, no te preguntes qué es... solo vívelo al máximo, porque esa emoción, esa sensación se llama vida. Mahatma Gandhi

1. Introducción

Cuando me incorporé en 1984 como Licenciada a la línea de investigación del Grupo de *Peroxidasas Vegetales*, mi conocimiento sobre esta temática era tan vago e impreciso que me impedía averiguar cuales eran los aspectos más relevantes y los procesos en los que intervenían estas enzimas tan particulares que catalizan la oxidación de un gran número de compuestos a expensas del H₂O₂, por lo que el Prof. Romualdo Muñoz, me entregó una carpeta llena de *separatas* con las que compartí las calurosas tardes de aquel verano del 84, iniciándome, sin saberlo, en la investigación exploratoria. A la vuelta de las vacaciones, comprendí la complejidad que presentaban estas hemoproteínas puesto que estaban implicadas en multitud de procesos fisiológicos que se producen a lo largo de la vida de las plantas. Con ellas comencé mi andadura científica, explorando su implicación en los procesos de lignificación de las paredes celulares y por lo tanto, en los mecanismos de defensa de las plantas y su participación en las rutas de biosíntesis y degradación de multitud de compuestos almacenados en las vacuolas. Sin embargo, las peroxidases vegetales no constituyen el tema central de este discurso, a pesar de las numerosas publicaciones científicas que nos han proporcionado, ya que este discurso se centrará en aquellos procesos fisiológicos de las plantas en los que he utilizado herramientas biotecnológicas, fundamentalmente las técnicas de Cultivo de tejidos y células vegetales *in vitro* combinadas con técnicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Con la descripción de algunos ejemplos en los que he utilizado estas herramientas mostraré cómo hemos podido avanzar y profundizar, incluso realizar nuevos descubrimientos basados en la potencialidad que presentan las células vegetales y las plantas, estos organismos sésiles que colonizaron el paisaje terrestre durante la transición del período Silúrico al Devónico, hace más de 400 millones de años y que sobreviven en un mundo inorgánico hostil y en condiciones ambientales cambiantes.

Antes de adentrarnos en estos ejemplos es necesario definir qué se entiende por Biotecnología y cuáles son los pilares en los que se basa la Biotecnología Vegetal.

¿Qué es la Biotecnología?

La biotecnología está de moda. Hoy en día, las noticias sobre los nuevos avances y descubrimientos que se realizan en los diferentes campos de la Ciencias, se desarrollan con herramientas biotecnológicas, y no es de extrañar ya que la

biotecnología no consiste únicamente en la observación, el estudio y la comprensión de los fenómenos biológicos sino que incluye *la utilización de los seres vivos o parte de éstos para producir productos, mejorar plantas o animales o desarrollar microorganismos con propósitos industriales y comerciales* (Avalos, 1990), todo ello enfocado a mejorar el bienestar de la sociedad. Según esta definición, la biotecnología no es algo moderno o novedoso. En realidad, desde los orígenes de la especie humana, el hombre siempre ha satisfecho sus necesidades alimenticias utilizando los seres vivos que la naturaleza ha puesto a su alcance, consumiéndolos directamente o a través de un procesado, por lo que ya se realizaban procesos biotecnológicos cuando los babilonios elaboraban la cerveza, los egipcios utilizaban levadura para la fabricación del pan o el uso de leches fermentadas por los pueblos nómadas en Asia. En definitiva, durante muchos siglos, el ser humano ha utilizado las plantas, los animales y ciertos microorganismos como alimento, o como fuente de materia prima para la obtención de otros productos específicos.

Posteriormente, a finales del siglo XIX, las observaciones de Charles Darwin sobre el origen de las especies y el descubrimiento de las leyes de la genética que el monje austriaco Gregor Mendel había formulado, establecieron las bases de la herencia, y de su aplicación práctica se obtuvieron plantas y animales mejorados, mediante cruzamientos controlados y selección de la descendencia. Sin embargo, en los últimos 60 años, gracias al descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick (1953), y las posteriores aplicaciones de la tecnología del ADN recombinante que han posibilitado la manipulación del genoma de cualquier ser vivo, el avance en el desarrollo de herramientas biotecnológicas ha sido espectacular y ha supuesto una auténtica revolución, provocando un tremendo impacto en ámbitos tan diversos como la medicina, la agricultura, la ganadería, el medio ambiente, etc...

Por este motivo, la biotecnología es una disciplina transversal aplicable en los diferentes sectores de la sociedad. De hecho, en función de qué tipo de material biológico se utilice como materia prima, se distinguen cuatro variantes de la biotecnología actual, etiquetados con un color según el campo de aplicación: la biotecnología roja, aplicada a los procesos médicos y centrada en el desarrollo de terapias, productos (antibióticos, vacunas y nuevos fármacos) y servicios de diagnóstico para la mejora de la salud humana; la biotecnología azul, también conocida como

biotecnología marina, de aplicación en acuicultura (reproducción y selección con marcadores, mejora de piensos), cuidados sanitarios, cosmética y productos o aditivos alimentarios; la biotecnología blanca o biotecnología industrial, centrada en la generación de compuestos o materiales destinados a procesos industriales y la biotecnología verde o biotecnología vegetal que consiste en la aplicación de herramientas biotecnológicas fundamentalmente enfocadas hacia la mejora de las plantas.

Todas estas aplicaciones de la biotecnología han generado importantes avances sociales, medioambientales y económicos, han contribuido al desarrollo de un tejido productivo basado en tecnologías avanzadas, por lo que esta disciplina científica constituye uno de los pilares clave para el desarrollo económico y social de cualquier país, y junto con la nanotecnología y las tecnologías de la comunicación y de la información (TICs) está llamada a conformar el futuro de nuestra sociedad y a cambiar los modos de vida y los modelos de negocio actuales (Seguí Simarro, 2011).

Los pilares básicos de la Biotecnología Vegetal: los sistemas de cultivo *in vitro* y las técnicas de la Biología Molecular

Históricamente podríamos decir que el principal descubrimiento que permitió establecer los pilares básicos sobre los que se fundamenta la biotecnología vegetal moderna fue el desarrollo de técnicas que permitieron introducir en una planta genes foráneos, ajenos a su especie, y mantenerlos permanentemente de modo que se puedan trasmisir a las siguientes generaciones junto con el resto de su material genético. Como todas las cosas complicadas, este hallazgo no surgió de la noche a la mañana. Realmente, este logro fue el resultado de la conjunción de tres líneas de investigación independientes iniciadas a principios del siglo XX: (1) el desarrollo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, definido como el cultivo sobre un medio nutritivo en condiciones asépticas y controladas de trozos de plantas, órganos, tejidos y células o protoplastos (células vegetales desprovistas de la pared celular), en el laboratorio, (2) la regeneración de plantas completas a partir de trozos de tejido constituidos por células somáticas cultivadas *in vitro* (es decir, células no germinales que conforman los tejidos y órganos), y (3) las aplicaciones de la tecnología del ADN recombinante, combinadas, en nuestro caso concreto, con la tecnología de *Agrobacterium tumefaciens*,

una bacteria del suelo que provoca la aparición de agallas en corona en las plantas (Vasil, 2008).

Las bases científicas para el desarrollo de los sistemas de cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales se fundamentan en la *teoría celular* de Matthias Schleiden (1938) y Theodor Schwann (1839) en la que se postula que todos los organismos están compuestos por células y que todas las células derivan de otras precedentes, de manera que todas las funciones vitales emanan de la maquinaria celular y su contenido genético se transmite de generación en generación. De ella deriva el concepto de *totipotencia celular*, es decir, la capacidad que presentan las células para diferenciarse y especializarse en cualquier tipo celular e incluso regenerar la planta de la que derivan.

Pese a los intentos del científico austriaco Gottlieb Haberlandt realizados en 1902 por obtener cultivos de células vegetales aisladas, los estudios rigurosos y detallados no comenzaron hasta el descubrimiento de la primera sustancia reguladora del crecimiento vegetal, la auxina ácido indolacético (descrita por Went en 1928 e identificada químicamente por Kögl y Kostermans en 1934). Así fue en 1934 cuando Philip White logró el crecimiento ilimitado de un cultivo *in vitro* de raíces de tomate, demostrando que los meristemos apicales de raíz (es decir los tejidos que contienen células de raíz que se encuentran en continua actividad mitótica), aislados de la planta original y cultivados *in vitro* con nutrientes en un medio aséptico eran capaces de seguir creciendo durante 400 días. Más tarde, en 1939, el propio White en Estados Unidos y dos científicos franceses independientes, uno en París, Roger Gautheret, y otro en Grenoble, Pierre Nobécourt, publicaron simultáneamente sus famosos experimentos sobre cultivo *in vitro* de tejidos, que sirvieron de base para la regeneración de órganos vegetales *in vitro* (organogénesis). Posteriormente, el descubrimiento de otra sustancia reguladora del crecimiento, las citoquininas, concretamente la quinetina (Miller y cols, 1955) y el hallazgo de que éstas, en combinación con las auxinas, regulaban la formación de órganos (tallos y raíces) (Skoog y Miller 1957), fueron los dos factores decisivos para el desarrollo de la regeneración de plantas a partir de cultivos *in vitro* de tejidos.

Una vez conseguidas las técnicas para el cultivo *in vitro* de tejidos y órganos vegetales, quedaba por realizar un reto aún más difícil de conseguir: que un tejido o un órgano vegetal *volviera hacia atrás* en el desarrollo y se desdiferenciara y se mantuviera

en ese estado celular, en cultivo *in vitro*. A lo largo de las décadas posteriores comenzaron a publicarse artículos científicos en los que se demostraba que era posible obtener el crecimiento ilimitado de *callos*, que son masas de células mayoritariamente indiferenciadas que crecen en un medio nutritivo de forma desorganizada, sin formar estructuras anatómicas reconocibles, a partir de fragmentos de hojas, tallos, raíces, cotiledones, etc..., siendo en la actualidad posible desdiferenciar hacia *callo* cualquier tejido de una planta adulta, siempre y cuando se mantengan las condiciones de cultivo y la combinación de reguladores del crecimiento adecuadas. Es necesario destacar en este punto la aplicabilidad de los cultivos de callos ya que a partir de callos *friables*, es decir masas de células fácilmente disagregables en medio de cultivo líquido, se obtienen los cultivos de células *en suspensión* que se utilizan en la actualidad para la obtención de protoplastos, orgánulos como las vacuolas e incluso para la obtención de compuestos bioactivos y proteínas, como veremos mas adelante.

Simultáneamente al desarrollo de sistemas para la regeneración de plantas o para la obtención de cultivos de callos o células, se realizaron avances muy significativos desarrollando sistemas eficientes para la transferencia de genes a células vegetales. El éxito de uno de estos sistemas se basaba en los trabajos desarrollados por Braun (1947) sobre *las agallas en corona* causadas por la bacteria del suelo, *Agrobacterium tumefaciens*. Una *agalla* es un tumor, un “cáncer vegetal” es decir un crecimiento incontrolado de células en aquella zona de la planta que ha sido infectada por Agrobacterium. Esta bacteria del suelo infecta transmitiendo a la célula vegetal un plásmido denominado Ti, que contiene genes bacterianos empaquetados en moléculas de ADN circular, transfiriendo parte de estos plásmidos, el ADN-T, a las células vegetales que infectan. De esta manera el ADN-T queda directamente integrado en el genoma de la célula vegetal como si fuera un conjunto de genes más de la propia célula y así, se ejecutan las instrucciones que dictan los genes del ADN-T y comienza el proceso de infección, generándose el tumor, que incluso se puede crecer *in vitro*, en un medio nutritivo sin hormonas vegetales en condiciones estériles. Algunos años después de que se publicara este trabajo y gracias al descubrimiento de la arquitectura tridimensional del ADN (Watson y Crick, 1953), complementado años más tarde, por el aislamiento de las enzimas de restricción (Smith y Wilcox, 1970) que presentan la capacidad de cortar la molécula del ADN por sitios específicos, se estableció el

mecanismo por el cual *Agrobacterium*, a través de su plásmido Ti provocaba la enfermedad y se pudo conocer bien la estructura de este ADN-T. Con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante surgió la brillante idea de aislar el plásmido Ti, desarmarlo quitándole los genes que provocaban la aparición del tumor y sustituirlos por otros genes de interés e introducirlos en la célula vegetal aprovechando la facilidad con que esta bacteria infectaba a las plantas. Uno de los primeros trabajos realizados en este sentido fue publicado en 1983 por el científico mexicano Luis Herrera Estrella durante su estancia en el departamento de genética de la Universidad de Gante trabajando con los profesores Marc Van Montagu y Jozef Schell, demostrando que mediante esta técnica se podían introducir genes que conferían resistencia a antibióticos en células de tabaco cultivadas *in vitro*. De esta forma, si se aplicaban estos antibióticos a células de tabaco no transformadas, éstas morían mientras que las transformadas sobrevivían. Había comenzado una nueva etapa en la que se podía utilizar este patógeno del suelo como vector natural para la transformación genética de las células, tejidos u órganos, para la producción de cualquier compuesto de interés o incluso para la mejora genética de las plantas.

Ahora que ya conocemos las herramientas para hacer crecer *in vitro* células, tejidos u órganos a partir de un trozo de planta, en un entorno aséptico y controlado, con soluciones nutritivas y reguladores de crecimiento, y las técnicas para introducir los genes que nos interesen en estos cultivos, describiré cómo he utilizado esta caja de herramientas para resolver problemas concretos en los estudios básicos y aplicados de la fisiología de las plantas.

2. Estudios básicos: Localización e implicación de las peroxidases en la biosíntesis y degradación de compuestos almacenados en la vacuola y en la biosíntesis de ligninas

Las peroxidases son proteínas que catalizan la oxidación de numerosos compuestos a expensas del H₂O₂. En la naturaleza existen una gran diversidad de peroxidases lo que ha obligado a clasificarlas en dos grandes superfamilias, una que incluye a las peroxidases vegetales, fúngicas y bacterianas, y otra constituida por las peroxidases animales (Welinder 1992). A su vez, dentro de las peroxidases vegetales,

fúngicas y bacterianas se han definido tres clases atendiendo a las diferencias estructurales que existen entre ellas:

- La clase I está compuesta por las peroxidases bacterianas, la citocromo c peroxidasa mitocondrial de levaduras y la ascorbato peroxidasa cloroplástica y citosólica de plantas superiores (Jespersen et al., 1997). No poseen naturaleza glicoprotéica y, en general, son muy termolábiles;
- La clase II agrupa a todas las peroxidases fúngicas de secreción;
- La clase III, que engloba a todas las peroxidases vegetales de secreción, son glicoproteínas que actúan sobre una extensa variedad de compuestos y muestran una extraordinaria e inusual estabilidad térmica. El grado de glicosilación que presentan es variable y es uno de los factores principales que determinan la inusual estabilidad térmica de estas proteínas (McEldoon y Dordrick 1996). En su estructura, estas hemoproteínas contienen como grupo prostético una molécula de protohemina IX (grupo hemo). En su estado nativo, el átomo de hierro se encuentra en el estado de oxidación formal +3 [Fe(III)]. Este hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno de la estructura tetrapirrólica del grupo hemo, y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina proximal. La sexta posición de coordinación se encuentra libre determinando así el estado de alto espín para el hierro. Además contiene dos átomos de Ca²⁺ que resultan esenciales para su estabilidad (Banci 1997).

Estas peroxidases de secreción presentan diferentes formas isoenzimáticas que difieren en su carga eléctrica, por lo que pueden ser fácilmente estudiadas mediante enfoque isoeléctrico. Así, en función de su punto isoeléctrico (pI), las isoenzimas de peroxidasa se clasifican en ácidas (pI < 7.0), básicas (7.0 > pI < 8.0) y fuertemente básicas (pI > 8.0) (Ros Barceló y cols. 1997, Ros Barceló y Pomar 2001). Su localización subcelular varía aunque muestran una especificidad de sustrato similar. Las semejanzas en las características bioquímicas junto con el elevado número de formas isoenzimáticas, son los factores que más desconciertan a la mayoría de los investigadores que estudian las funciones metabólicas de estas proteínas. Este elevado número de isoenzimas es principalmente debido a los diferentes patrones de glicosilación que se originan tras las modificaciones post-transcripcionales y las alteraciones conformacionales con componentes de bajo peso molecular, fundamentalmente con los fenoles presentes en la célula vegetal (Ros Barceló y cols.

1987). Estas interacciones también modifican sus propiedades catalíticas ampliando así su funcionalidad metabólica.

Probablemente, para compensar su amplia especificidad de sustrato, las peroxidasas presentan una compartimentación tisular, celular y subcelular muy específica. Así, las peroxidasas se localizan en los tejidos meristemáticos (Crevecoeur y cols. 1997), en las células epidérmicas (Goldberg y cols. 1987, Hendriks y van Loon 1990, Ferrer y Ros Barceló 1994) y vasculares (Czaninski y Catesson 1969, Ros Barceló y cols. 2002a). En estas últimas, las peroxidasas se localizan principalmente en el xilema (Ferrer y Ros Barceló 1994) y en las células del floema. En los frutos, se encuentran fundamentalmente localizadas en las células epidérmicas y en el xilema (Calderón y cols. 1993), mientras que en las hojas se localizan en las células del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló 1997).

A nivel subcelular, las peroxidasas se localizan tanto en las paredes celulares como en las vacuolas de todas estas células. Sin embargo, en las meristemáticas (Crevecoeur y cols. 1997), vasculares (Ros Barceló y cols. 1991) y del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló 1997), se localizan principalmente en la vacuola, bien en forma soluble (Crevecoeur y cols. 1997) o firmemente ligadas a la cara interna del tonoplasto (Ros Barceló y cols. 1991, Sottomayor y Ros Barceló 1997).

Estas particularidades también conciernen a la compartimentación de las diferentes isoenzimas de peroxidasa. De hecho, mientras que las peroxidasas ácidas, básicas y fuertemente básicas se localizan en las paredes celulares, en las vacuolas sólo hay peroxidases fuertemente básicas, lo que pudimos confirmar mediante el aislamiento de vacuolas intactas a partir de protoplastos purificados de diferentes materiales vegetales, gracias a los métodos aprendidos durante mi estancia postdoctoral en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Prof. Jean-Claude Pech de Toulouse (Pedreño y cols. 1993). Así, en todas las especies vegetales analizadas, como *Vitis vinifera* (Figura 1), *Capsicum annuum*, *Lactuca sativa* y *Catharanthus roseus*, se encontró que la única isoenzima de peroxidasa de naturaleza fuertemente básica asociada a protoplastos y vacuolas, era coincidente con la que habíamos localizado en la pared celular. Esta doble localización nos llevó a plantearnos cual sería la función metabólica de estas isoenzimas fuertemente básicas en las plantas.

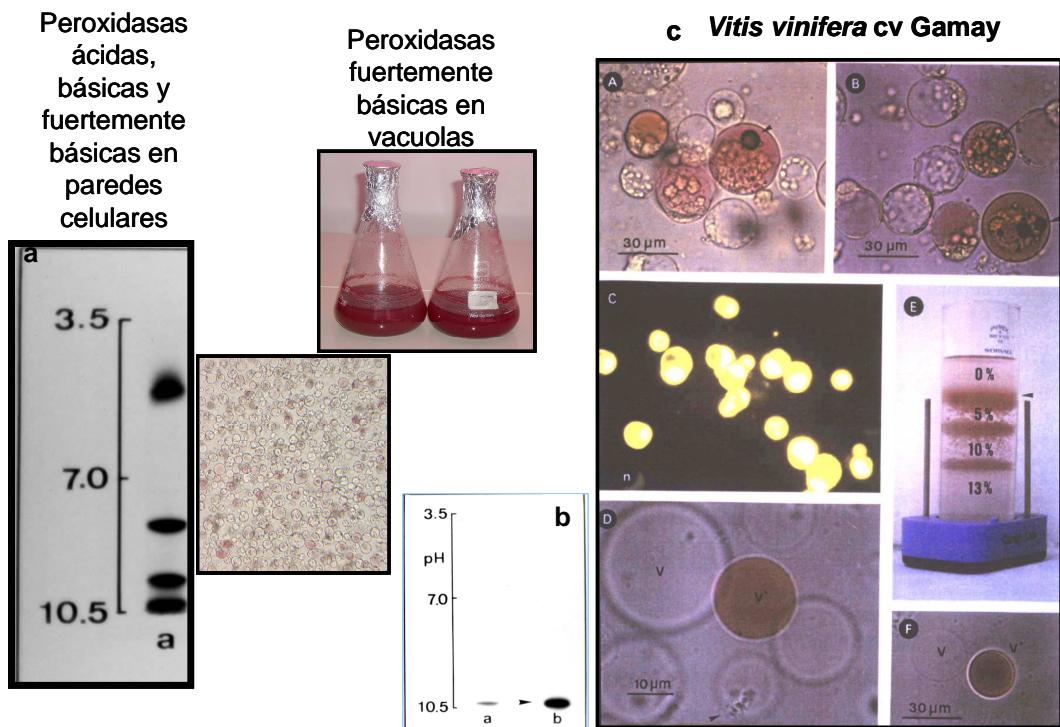


Figura 1. (a) Patrón de isoenzimas de peroxidasa en paredes celulares (b) Patrón de isoenzimas de peroxidasa en vacuolas (c) Obtención de protoplastos y vacuolas a partir de suspensiones celulares de *Vitis vinifera* cv Gamay.

Como conclusiones más sobresalientes de estos estudios cabe destacar que el papel metabólico de esta isoenzima vacuolar es la de participar en las rutas de biosíntesis y degradación de fenoles y alcaloides almacenados en la vacuola, como así lo sugiere las elevadas constantes microscópicas (K_3) que muestra por sustratos vacuolares como la quercetina, la miricetina o el *trans*-resveratrol. Además, a través del cálculo de las constantes microscópicas que indican la reactividad que muestra esta isoenzima con el H_2O_2 , (los valores de K_1), se demostró que participaba en la detoxificación de H_2O_2 en la vacuola, utilizando como donadores de electrones estos sustratos vacuolares.

Los resultados obtenidos indicaban que en la biosíntesis y degradación de los metabolitos secundarios, como los fenoles y los alcaloides, que se almacenan principalmente en las vacuolas, están implicadas sólo las peroxidases fuertemente básicas (Pedreño y cols. 1993, Ros Barceló y cols. 1997), mientras que en los procesos que conducen al endurecimiento de la pared celular están implicados los tres tipos de peroxidasas.

Confirmada la localización de las peroxidasas en los elementos vasculares de xilema y floema, nuestra atención se dirigió hacia uno de los procesos que proporcionan resistencia e impermeabilidad a las paredes celulares, la biosíntesis de ligninas.

Los elementos del xilema diferenciados (células conductoras de agua) y los tejidos de sostén, fundamentalmente las fibras del floema y del xilema, se encuentran revestidos internamente de ligninas (Figura 2), que son el resultado de la polimerización oxidativa de tres alcoholes *p*-hidroxicinámicos (Figura 3), en una reacción mediada por peroxidasas (Ros Barceló y cols. 2000; Pomar y cols. 2002), dando lugar a un heteropolímero altamente hidrofóbico (Ralph y cols. 1999). Este proceso de sellado de las paredes celulares vegetales a través de la deposición de ligninas, conocido como lignificación, proporciona la fuerza mecánica a los tallos y confiere rigidez e impermeabilidad, protegiendo a los elementos xilemáticos de las elevadas presiones hidrostáticas a las que se encuentra sometido este sistema conductor.

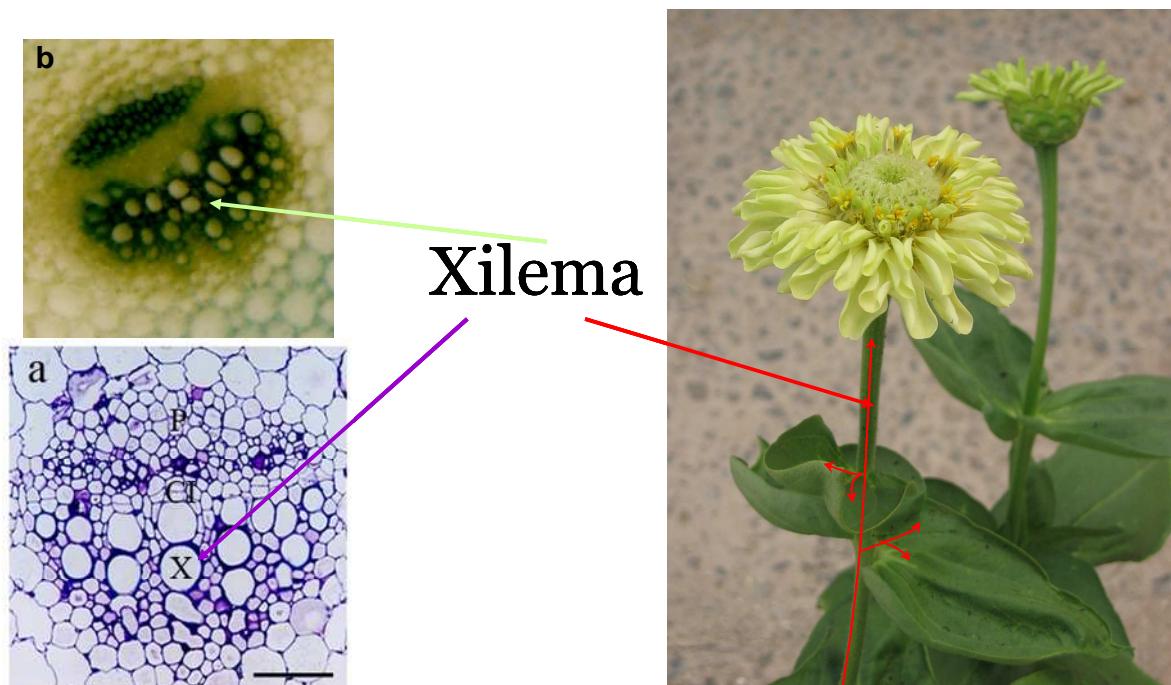
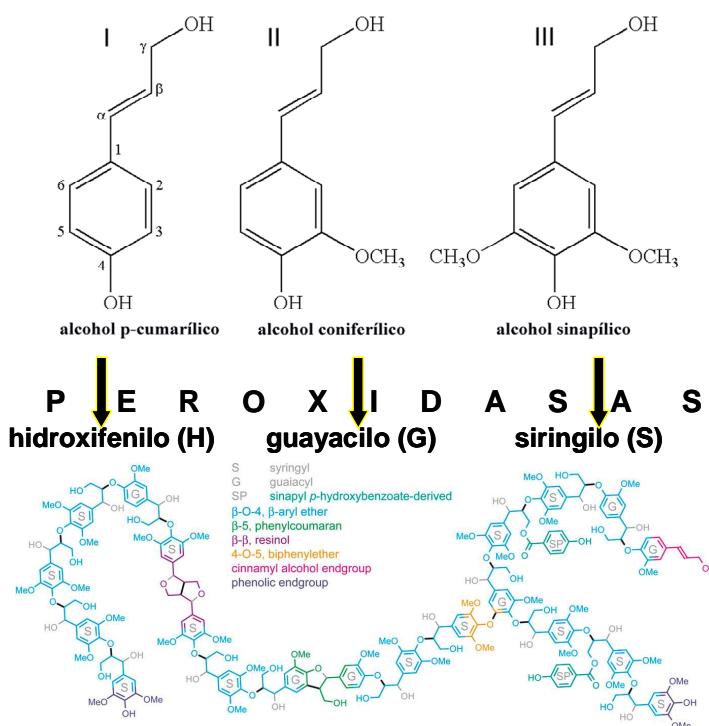


Figura 2. (a) Fotografía de microscopio óptico mostrando la deposición de ligninas y la actividad peroxidasa (b) en el xilema de *Zinnia elegans*.



LIGNIFICACIÓN

Figura 3. Polimerización oxidativa de los alcoholes p-hidroxicinamílicos catalizada por peroxidasas. Estructura extendida de las ligninas de álamo a partir de datos obtenidos mediante RMN mostrando los diferentes tipos de enlaces. Tomado de Vanholme y cols. (2010).

Sobre la importancia de este proceso es necesario destacar que la adquisición de la capacidad de lignificación, que ocurrió en las plantas a comienzos del periodo Devónico, marcó un antes y un después en la evolución vegetal, ya que fue uno de los factores que determinaron la colonización de la superficie terrestre por estos organismos originariamente acuáticos. Ello hizo posible la absorción más eficaz de la luz, y permitió el acceso directo a nuevas fuentes de nutrientes, que son más limitadas en el medio acuático. Sin embargo, al colonizar el medio terrestre las plantas quedaron directamente expuestas a diversos factores ambientales de estrés, que previamente no habían experimentado en el medio acuático. El desarrollo de respuestas apropiadas frente a estas situaciones de estrés ha sido la fuerza motriz de la evolución vegetal que, en última instancia, ha derivado en la amplia diversificación de las especies terrestres. Sin embargo, la lignificación de las plantas puede restringir su utilización y

aprovechamiento por el hombre. Así, la intensa lignificación que experimenta la madera dificulta y encarece las labores de la industria papelera, aumentando adicionalmente el nivel de los residuos tóxicos indeseables. Sobre la importancia de este fenómeno, basta decir que la industria papelera europea es la responsable del 27 % de los residuos tóxicos vertidos a los ríos y al mar. Así, estas industrias llegan a degradar 25 millones de m³ de agua, vertiendo 0.5 millones de toneladas de *organoclorados*, junto con 10.000 toneladas de partículas sólidas, 15.000 toneladas de SO₂ y 3.500 toneladas de óxidos de nitrógeno durante la producción de 1 millón de toneladas de pasta de papel, lo que también supone un gasto energético de casi 1 millón de megavatios·hora, equivalentes a 20.000 toneladas de carbón.

Es también destacable que la lignificación disminuye la calidad nutritiva de las plantas usadas como forrajes y pastos, al reducir su digestibilidad y, por lo tanto, su utilidad como alimentos. En estos aspectos, la lignificación es un factor indeseable durante el procesamiento por las industrias agroalimentarias de hortalizas como los espárragos y las alcachofas, al conferir una dureza indeseable a los productos de partida.

Desde el punto de vista metabólico, el proceso de la lignificación es una secuencia de reacciones en cadena que conducen desde un metabolito primario, la fenilalanina, hasta los precursores inmediatos de las ligninas, los ésteres de CoA de los ácidos cinámicos a través de una ruta común (fenilpropanoide) que proporciona una gran diversidad de compuestos (Figura 4). La etapa específica de la biosíntesis de ligninas conduce a estos ésteres de CoA hacia la síntesis de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos mediante dos reducciones catalizadas por las enzimas *p*-hidroxicinamilo-CoA reductasa (CCR) y la *p*-hidroxicinamilo alcohol deshidrogenasa (CAD) (Figura 4). La etapa final de este complicado proceso biosintético implica la oxidación de los alcoholes *p*-cumálico, coníferílico y sinápílico por peroxidásas (Prx) de la pared celular, dando lugar a la formación de los correspondientes radicales: las unidades hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S) que se ensamblan en la pared celular (Figura 3), fundamentalmente de las células de los tejidos conductores y de sostén; con ello generan un polímero hidrofóbico que proporciona rigidez e impermeabiliza la pared celular.

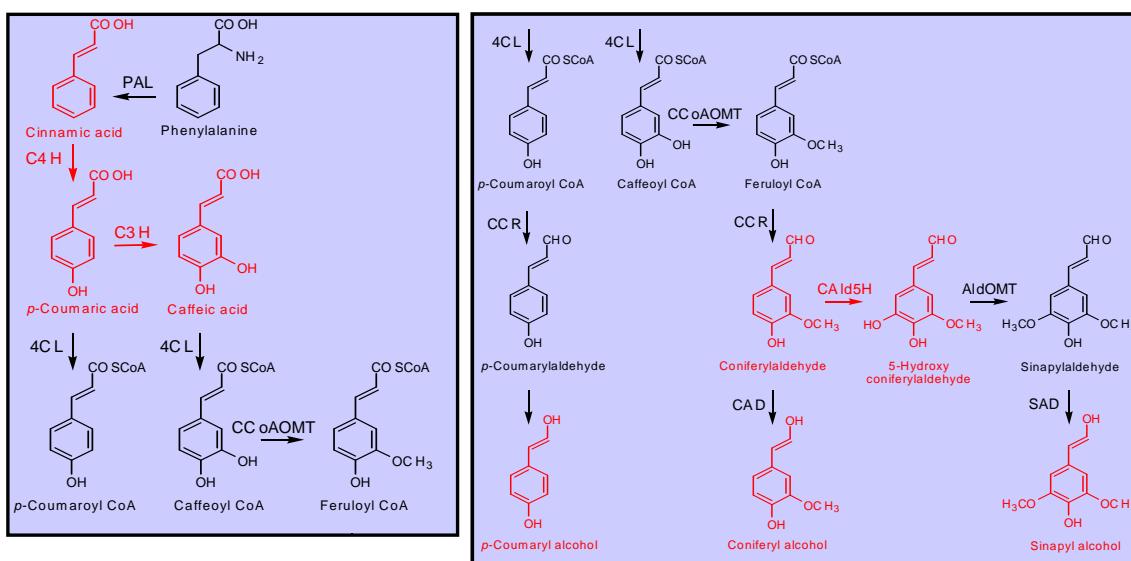


Figura 4. Ruta de biosíntesis de los monolignoles: PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato CoA ligasa; CCoAOMT: cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa; CCR: cinamil-CoA reductasa; CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; CAld5H: Coniferaldehido 5 hidroxilasa; AldOMT: aldehido *O*-metiltransferasa.

En relación a la biosíntesis de ligninas, las peroxidasas ácidas y básicas son capaces de oxidar a los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico; sin embargo, son incapaces de oxidar al alcohol sinapílico debido a las interacciones hidrofóbicas entre el sitio de unión al sustrato y los grupos metoxi del alcohol sinapílico (Ostergaard y cols., 2000). Esta situación no se produce con las peroxidasas de naturaleza fuertemente básica, cuya caracterización molecular y funcional ha sido realizada por nuestro grupo de investigación poniendo en evidencia su papel catalítico sobre este monolignol (Ros Barceló y Pomar, 2001), utilizando para ello como herramienta biotecnológica los cultivos celulares *in vitro* de la planta modelo *Zinnia elegans*.

3. Estudios básicos: Utilización de la planta *Zinnia elegans* y de sus cultivos celulares *in vitro* derivados de hipocotilo como fuente para la obtención de peroxidasas implicadas en la lignificación.

Z. elegans es una planta anual con flores que pertenece a la familia de las Asteráceas (Figura 5a). Esta especie vegetal la hemos utilizado como modelo en los estudios de lignificación y resultó ser ideal, en primer lugar debido a la simplicidad y la dualidad del patrón de lignificación que muestran sus tallos y sus hipocotilos (Figura 5b) ya que en un determinado estado de desarrollo de la planta, ofrece simultáneamente

los dos modelos de lignificación que encontramos en gimnospermas y angiospermas. Así, en plantas de *Z. elegans* de 25-30 días, el análisis de los productos de oxidación con nitrobenceno reveló que las ligninas del hipocotilo estaban formadas principalmente por unidades G/S en una relación 43/57, mientras que las ligninas del tallo contenían cantidades considerables de unidades H, en una relación H/G/S de 22/56/22. Por tanto, las unidades S predominaban en el hipocotilo, mientras que las unidades G lo hacían en el tallo. En este sentido, las ligninas del hipocotilo de *Z. elegans* resultaron ser típicas de las angiospermas mientras que las ligninas del tallo se asemejaban parcialmente a las de gimnospermas, ya que la suma (H+G) constituye el 78% de las tres unidades estructurales (Ros Barceló y cols. 2004). En segundo lugar, debido a la naturaleza del patrón isoenzimático de la peroxidasa (Figura 5c), que se encuentra completamente restringido a la presencia de una única isoenzima de naturaleza fuertemente básica (López-Serrano y cols., 2004). Indudablemente, este hecho hace de *Z. elegans* una especie vegetal idónea, y casi insustituible, para estudiar la función fisiológica de esta peroxidasa fuertemente básica y más concretamente de su participación en el proceso de lignificación.

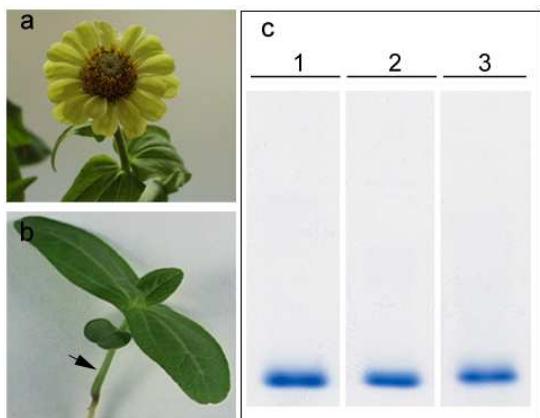


Figura 5. Planta de *Z. elegans* (a), mostrando hipocotilo (flecha) (b) e isoelectroenfoque que revela la presencia de la isoenzima fuertemente básica de peroxidasa en hipocotilos (1), tallos (2) y cultivos celulares (3) de *Z. elegans* (c).

Estas peroxidasas de secreción se encuentran localizadas en la pared y en los espacios intercelulares (*apoplasto*), y forman parte de lo que se denomina fluido intercelular o fluido apoplástico, en donde se mueven libremente. Sin embargo, la cantidad de peroxidasa que se puede extraer de este fluido es muy pequeña lo que imposibilita su extracción en grandes cantidades para su posterior purificación, además de que el proceso de extracción es destructivo. En este sentido, los cultivos celulares en suspensión de *Z. elegans* nos proporcionaron un gran cantidad de estas proteínas

apoplásticas ya que el medio de cultivo líquido (medio extracelular) en el que crecen las células vegetales *in vitro* puede considerarse como un amplio espacio intercelular que forma un continuo con la pared de las células vegetales que se encuentran en suspensión (Kärkönen y Koutaniemi, 2010). Por esta razón, las suspensiones celulares constituyeron una fuente óptima para el aislamiento, identificación y caracterización de estas proteínas localizadas en la pared celular ya que el espacio intercelular, en este caso el medio extracelular, se obtenía directamente mediante técnicas no destructivas, en un corto espacio de tiempo. Por este motivo desarrollamos, como herramienta biotecnológica, suspensiones celulares derivadas de *callus* inducidos a partir de fragmentos de hipocotilo obtenidos de plantas de *Z. elegans* germinadas *in vitro*.

De esta manera, mediante el uso de cultivos celulares sucesivos en los que se duplicaba exponencialmente el cultivo celular cada 15 días, en apenas tres meses, obtuvimos 18.5 litros de medio extracelular a partir del cual realizamos la purificación a homogeneidad de esta isoenzima de peroxidasa fuertemente básica de *Z. elegans* (Figura 5c). El proceso de purificación se realizó en cuatro etapas que incluyeron una cromatografía de interacción hidrofóbica seguida de una de exclusión molecular y, a continuación una cromatografía de intercambio iónico (Figura 6a). Dada la naturaleza glicoproteica de estas peroxidases, el último paso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad sobre Concanavalina A donde se obtuvieron dos fracciones de peroxidases que diferían en el grado de glicosilación (Figura 6b) (Gabaldón y cols. 2005) (A partir de los 18.5 litros de medio extracelular se obtuvieron 2.5mg de ZePrx 34.70 KDa y 5.2mg de ZePrx 33.44 KDa (peso calculado por MALDI-TOF MS)).

Una característica especial de esta peroxidasa fuertemente básica es que posee propiedades catalíticas que la diferencian de otras peroxidases como son: 1) la capacidad de sostener una actividad oxidasa (independiente de H₂O₂) frente a los alcoholes hidroxicinámicos (Pomar y cols. 2002), 2) la capacidad diferencial de oxidar al alcohol sinapílico (Ros Barceló y cols. 2007), y 3) los valores inusualmente bajos de Km frente a los alcoholes *p*-hidroxicinámicos y el H₂O₂, que son del mismo orden de magnitud que los que presentan, frente a sus correspondientes substratos, las dos enzimas inmediatamente antecesoras en la ruta específica de la biosíntesis de ligninas,

la *p*-hidroxicinamil-CoA reductasa (CCR) y la *p*-hidroxicinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) (Ros Barceló y Pomar 2001).

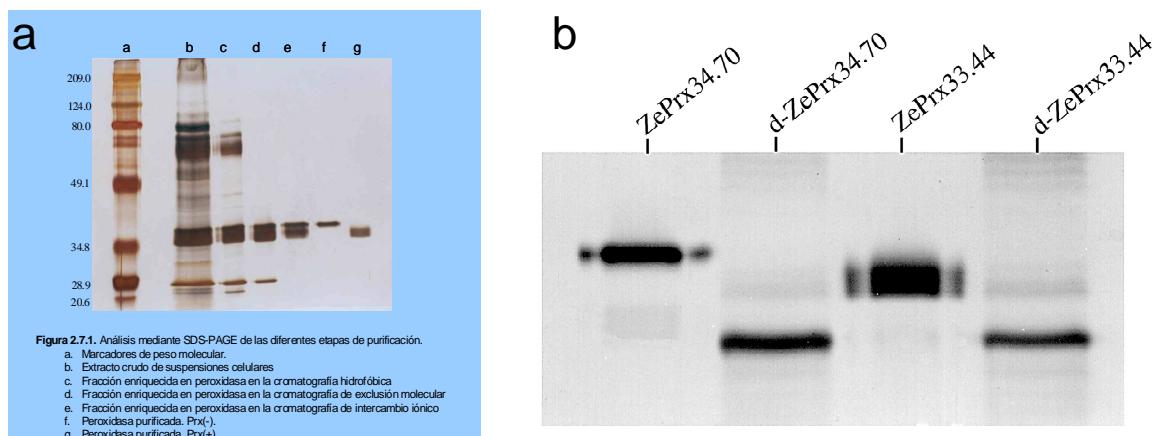


Figura 6. (a) Proceso de purificación a homogeneidad electroforética. (b) Las dos peroxidasas de *Z. elegans* desglicosiladas (d-ZePrx 34.70 y 33.44) muestran la misma movilidad en SDS-PAGE.

Una vez que conseguimos la purificación completa de esta proteína averiguamos que los determinantes estructurales que condicionan esta inusual actividad catalítica residen en sustituciones de aminoácidos en las proximidades de su centro catalítico, especialmente sobre estructuras secundarias en hélice α y hoja plegada β que condicionan la conformación de las histidinas proximales y distales en la proteína. Junto a estos determinantes característicos de la estructura secundaria, otro factor que condiciona la actividad catalítica de esta peroxidasa es su patrón de glicosilación debido principalmente a que las aspárraginas, frecuentemente N-glicosiladas en la mayor parte de las peroxidasas, se encuentran próximas a la α -hélice F en la que está incluida la histidina proximal, actuando como factores relajantes o compresoras de dicha hélice.

Un hecho destacable es que estas sustituciones de aminoácidos se encuentran también en peroxidases homólogas presentes en plantas primitivas, no sólo en gimnospermas –plantas vasculares–, sino también en plantas no vasculares como las hepáticas que no lignifican por lo que esta peroxidasa, de naturaleza fuertemente básica, es una proteína altamente conservada durante la evolución vegetal, hecho que era esperable ya que la lignificación de la pared celular es un proceso altamente conservado (Gómez-Ros y cols. 2007; Novo Uzal y cols. 2009).

Con el fin de profundizar en el conocimiento de esta proteína, se secuenció el promotor del gen de esta peroxidasa y se determinaron los elementos *cis* reguladores de su expresión génica. Estos estudios han conducido a la conclusión de que esta peroxidasa responde a las auxinas, las citoquininas y los brasinoesteroides, las tres principales hormonas que regulan el desarrollo vascular (Gutierrez y cols. 2009). De la misma forma, a partir del estudio de estos elementos *cis* se ha concluido que la expresión de la peroxidasa parece estar regulada por factores de transcripción del tipo NAC, MYB y AP2, cuya expresión está regulada por las auxinas y las citoquininas durante el desarrollo vascular. El estudio de los elementos *cis* del promotor de la peroxidasa también ha revelado la presencia de elementos “ocs”, que responden conjuntamente a las auxinas, al NO y al H₂O₂, por lo que están bajo el control del estado redox celular (Gómez-Ros y cols. 2012; Novo Uzal y cols. 2013).

4. Estudios básicos: *Los cultivos decélulas del mesófilo de Zinnia elegans en diferenciación a traqueidas como sistema modelo para el estudio de los factores que regulan la xilogénesis.*

La formación del xilema (*xilogénesis*) ha sido objeto de numerosos estudios en plantas superiores, no sólo porque su función es esencial para la existencia de las plantas vasculares, sino porque la formación del xilema supone un modelo único del proceso de diferenciación en plantas superiores. Además, la xilogénesis es importante desde una perspectiva aplicada y biotecnológica, ya que los biomateriales, como la celulosa y las ligninas, representan una gran parte de la biomasa terrestre, y además juegan un importante papel en el ciclo del carbono (Fukuda 1996).

Las traqueidas son las células más distintivas del xilema y se caracterizan por la presencia de una pared celular secundaria con engrosamientos que pueden ser espirales, anulares, reticulados o con punteaduras. En el xilema primario, las traqueidas se diferencian a partir de las células pro-cambiales mientras que en el xilema secundario, derivan de las células del cambium vascular.

Z. elegans también ofrece la posibilidad de trabajar con cultivos celulares que se asemejan a las células del xilema en diferenciación (Pesquet y cols. 2005) y de hecho, estos cultivos se han utilizado como modelo para determinar la expresión de las enzimas implicadas en la ruta biosintética de las ligninas (Demura y cols. 2002, Milioni y cols. 2002), gracias a que la diferenciación de las células de mesófilo foliar a traqueidas se induce de manera sincrónica en una población celular homogénea, haciendo posible el estudio bioquímico y fisiológico de la xilogénesis, libre de la complejidad impuesta por la heterogeneidad que presentan los tejidos vegetales (Roberts y McCann 2000, Milioni y cols. 2002). Fukuda y Komamine (1980) establecieron este sistema experimental *in vitro* en el que células aisladas de mesófilo de hojas de *Z. elegans* se diferenciaban directamente a traqueidas en un medio de cultivo que contenía auxinas y citoquininas. En la práctica, este sistema experimental depende de muchos factores, como la edad y las condiciones de la planta de *Z. elegans*, el medio de cultivo así como las condiciones específicas del mismo (Roberts y cols. 1992). El modelo de xilogénesis de *Zinnia* es también particularmente útil para visualizar todo el proceso a nivel celular, es decir toda la secuencia de eventos que se producen durante la diferenciación a traqueidas, ya que debido a sus características morfológicas, estas células se pueden identificar con facilidad a la luz del microscopio óptico. De hecho, la diferenciación es un proceso inducible, desencadenado por el establecimiento del propio cultivo, y por la adición de auxinas y citoquininas al medio en el que las células se diferencian de manera sincrónica (McCann y cols. 2000). Esta propiedad unida al hecho de que la inducción de la diferenciación de traqueidas *in vitro* es un proceso relativamente simple de reproducir, nos animó a utilizar esta herramienta biotecnológica como sistema para realizar el estudio de los factores que regulan este proceso de diferenciación celular.

El proceso de desdiferenciación de células de mesófilo foliar y su diferenciación posterior a traqueidas se divide en tres estados diferentes (Figura 7) (Pedreño et al. 2006): Estado I en el que se produce la inducción de la desdiferenciación como consecuencia del establecimiento del cultivo y de la adición de una combinación de auxinas y citoquininas, perdiendo las células del mesófilo su capacidad para realizar la fotosíntesis. Estado II en el que las células desdiferenciadas restringen su potencial de desarrollo y se diferencian en células pro-cambiales. Estado III en el que las células pro-

cambiales se diferencian en traqueidas. Este proceso de diferenciación *in vitro* implica la formación de la pared celular secundaria y la muerte celular programada, por lo que imita el desarrollo de las células del xilema *in vivo*, y permite el estudio de la xilogénesis que, *in planta*, hubiera sido mucho más difícil y más lento en cuanto a la obtención de resultados.

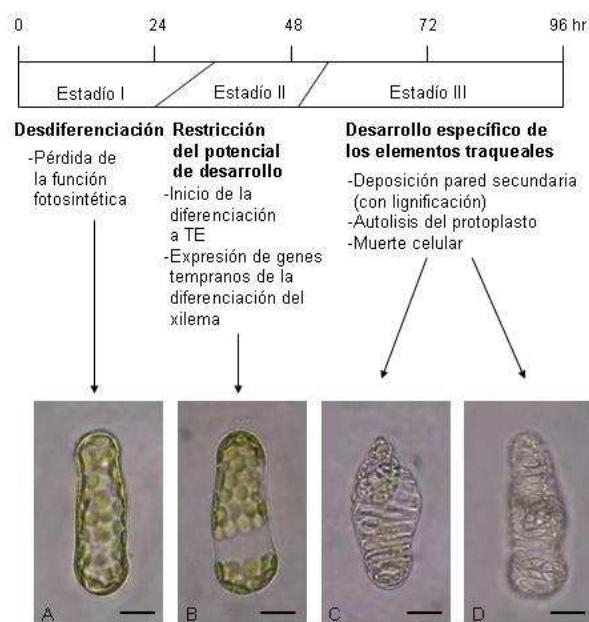
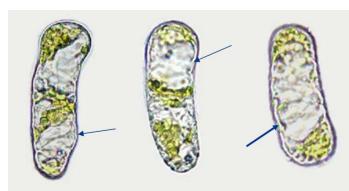


Figura 7. Estados del proceso de desdiferenciación de células de mesófilo foliar de *Z. elegans* y su diferenciación posterior a traqueidas.

La muerte celular programada es una de las características más distintivas del xilema en diferenciación y se trata de un proceso estrechamente coordinado con los procesos de formación de la pared celular secundaria y lignificación (Fukuda, 1996). Durante este proceso, las células individuales degradan de manera autónoma sus contenidos celulares (Groover y Jones, 1999). Las traqueidas alcanzan su madurez tras la pérdida del contenido celular (Fukuda y Komamine 1980, Roberts y cols. 1988). Las enzimas hidrolíticas, que catalizan la degradación del contenido celular, se acumulan en la vacuola de las células hasta la lisis de este orgánulo (Fukuda y cols. 1998; Fukuda 2004). Una entrada masiva de calcio en el citosol provoca el colapso de la vacuola y la liberación de las enzimas hidrolíticas. Tras la rotura del tonoplasto, los orgánulos con una sola membrana, como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, se lisan, y a continuación se degradan aquellos que contienen una doble membrana (Groover y

Jones, 1999; Obara y cols. 2001). La degeneración visible de todos los orgánulos ocurre varias horas después de que los engrosamientos de la pared secundaria lleguen a ser visibles (Figura 8). Por lo tanto, la coordinación entre la biosíntesis de la pared celular secundaria y la muerte celular requiere la segregación de enzimas hidrolíticas y, aunque parte de la cascada metabólica que conduce a la muerte celular en el xilema había sido bien estudiada, poco se sabía acerca de las señales reguladoras que disparaban este inevitable proceso.

Figura 8. Células de mesófilo durante su diferenciación a traqueidas, donde se observa la formación de la pared celular secundaria (flechas).



Una de estas posibles señales era el óxido nítrico (NO) ya que varios autores (Neill y cols., 2003; Wendehenne y cols., 2004) lo habían descrito como una molécula señal implicada en respuestas de defensa y en la consiguiente muerte celular a través de una cooperación, estrechamente equilibrada con las especies reactivas del oxígeno, anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Delledonne y cols., 2001) por lo que no sería descartable que estas tres moléculas trabajasen juntas durante la muerte celular programada que caracteriza la diferenciación del xilema. Sin embargo, no había información ni datos disponibles que nos confirmasen que las células del xilema eran capaces de producir NO y, por lo tanto, la naturaleza y la extensión de la producción de NO por dichas células no había sido investigada por lo que nos propusimos la realización de este estudio.

El NO es una molécula radical, relativamente estable, implicada en multitud de procesos fisiológicos en plantas donde actúa como mensajero químico en procesos de citotoxicidad y muerte celular (Durner y Klessig, 1999). En células animales, la mayor parte de sus propiedades reguladoras se habían explicado en base a su capacidad para actuar como un ligando del hierro en las hemoproteínas, por lo que su efecto activador o inhibidor sobre estas proteínas y la naturaleza de este efecto dependía, en gran parte, del estado de oxidación de la hemoproteína lo que condicionaba las propiedades del ligando y la configuración electrónica del hierro hemínico (Tsai, 1994). Sin embargo el efecto del NO no se restringe a las hemoproteínas ya que, por sus propiedades químicas podría

actuar sobre otras metaloproteínas que contienen cobre o zinc e incluso sobre aquellas que contienen grupos tioles. En este sentido, el NO podría ejercer un efecto directo sobre las enzimas de la ruta biosintética de ligninas interaccionando con ellas (C4H, C3H, CAld5H y peroxidasa). Este hecho es especialmente relevante ya que el NO podría ser entonces una señal clave en el último paso de la biosíntesis de ligninas en el que se produce el ensamblaje de los monolignoles.

Con estos antecedentes, las primeras experiencias realizadas por nuestro equipo investigador se centraron en el análisis del efecto que podría tener la liberación de NO sobre la actividad peroxidasa del xilema en diferenciación de *Z. elegans* *in vitro* e *in planta*. Los resultados que obtuvimos mostraron que la adición del nitroprusiato sódico (NPS), compuesto que es capaz de liberar y mantener en disolución acuosa concentraciones micromoleculares de NO, al menos durante los primeros 45 minutos de descomposición (Stamler y cols., 1992), inhibía más del 50% de la actividad peroxidasa obtenida del fluido intercelular del tallo de *Z. elegans* utilizando TMB (tetrametilbencidina) como sustrato. Esta inhibición se revirtió mediante la adición de PTIO (2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxil-3-óxido) ya que este compuesto reacciona específicamente con NO para dar NO₂ y, por lo tanto, cualquier efecto observable como consecuencia de la adición de NPS que sea reversible por PTIO puede asignarse a un efecto del NO, lo que prueba que el efecto observado se debía al NO (Ros Barceló y cols., 2002b). Estos ensayos se complementaron con estudios electroforéticos en los que se observaba una disminución brusca de la expresión de las isoformas de la peroxidasa debido a la liberación del NO (añadiendo NPS) ya que este efecto fue revertido por la adición de PTIO. De manera similar se procedió a estudiar el efecto de esta molécula liberadora de NO sobre la actividad TMB oxidasa en el xilema en lignificación de la planta *Z. elegans*. Como sucedió en los ensayos realizados *in vitro*, la actividad TMB oxidasa *in vivo* también se inhibió por la adición de NPS y la reversión se produjo con la adición de PTIO (Ros Barceló y cols., 2000).

Todos estos resultados obtenidos en ensayos bioquímicos e histoquímicos sugerían un papel clave para el NO en el control de la diferenciación del tejido vascular de *Z. elegans*, incluyendo probablemente el proceso de lignificación de la pared celular.

Sin embargo, la aplicación de NO a tejidos vegetales y el análisis posterior de la respuesta observada no resultaba una prueba fehaciente de que el NO se produjese en ese tejido y si ocurría, fuese además una molécula reguladora de este proceso fisiológico.

Con estos antecedentes, se planteó la hipótesis de que si localizábamos la producción del NO *in situ* en el xilema en diferenciación, todos los posibles cruces expuestos entre el NO y las rutas metabólicas que se expresan diferencialmente en el tejido vascular, incluyendo la muerte celular, no podrían considerarse fortuitos. Si se demostraba la capacidad del xilema en diferenciación para producir NO y se identificaban los lugares de actuación del NO se podría elucidar la función real que juega el NO en la xilogénesis y en la lignificación de la pared celular. Para la demostración de esta última aseveración también era preciso averiguar la localización precisa de los lugares de producción de H₂O₂ ya que en el xilema y en otros muchos tejidos significantes, el H₂O₂ es necesario para la polimerización oxidativa de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos mediada por la peroxidasa (Ros Barceló 1995, 1997) y también habría que demostrar si existía alguna correlación espacio-temporal entre la manifestación de estas dos señales (NO y H₂O₂) y el proceso de lignificación de la pared celular.

Por lo tanto nuestro objetivo fue estudiar la posibles lugares de producción de NO en el xilema en diferenciación de *Z. elegans*. Estos estudios se extendieron también a su localización en un cultivo de células de mesófilo de *Z. elegans* que se diferencian a elementos traqueales. De manera similar se procedió a realizar un estudio detallado de los lugares de producción del H₂O₂.

Estudio sobre los lugares de producción de óxido nítrico in planta, en los haces vasculares, e in vitro, en los cultivos de células del mesófilo de Zinnia elegans que se diferencian a elementos traqueales

Efectivamente, la producción de NO se localizó en los haces vasculares de los tallos de *Z. elegans*. Estos resultados se obtuvieron utilizando un indicador fluorescente

que permite la visualización en tiempo real del NO *in situ* y la microscopía confocal láser de barrido (Gabaldón y cols. 2005). La tinción fluorescente se localizó principalmente, en las paredes celulares del xilema así como en las fibras del floema, con independencia del estado de diferenciación celular. Sin embargo, se observó un gradiente espacial de producción de NO inversamente relacionado con el grado de diferenciación del xilema ya que las células del xilema jóvenes, en diferenciación, manifestaron una mayor capacidad para producir NO que las células del xilema completamente maduras y diferenciadas lo que indicaba una fuerte relación entre la producción de NO y la muerte celular programada que se produce durante la diferenciación del xilema y que precede a la lignificación de la pared celular (Figura 9).

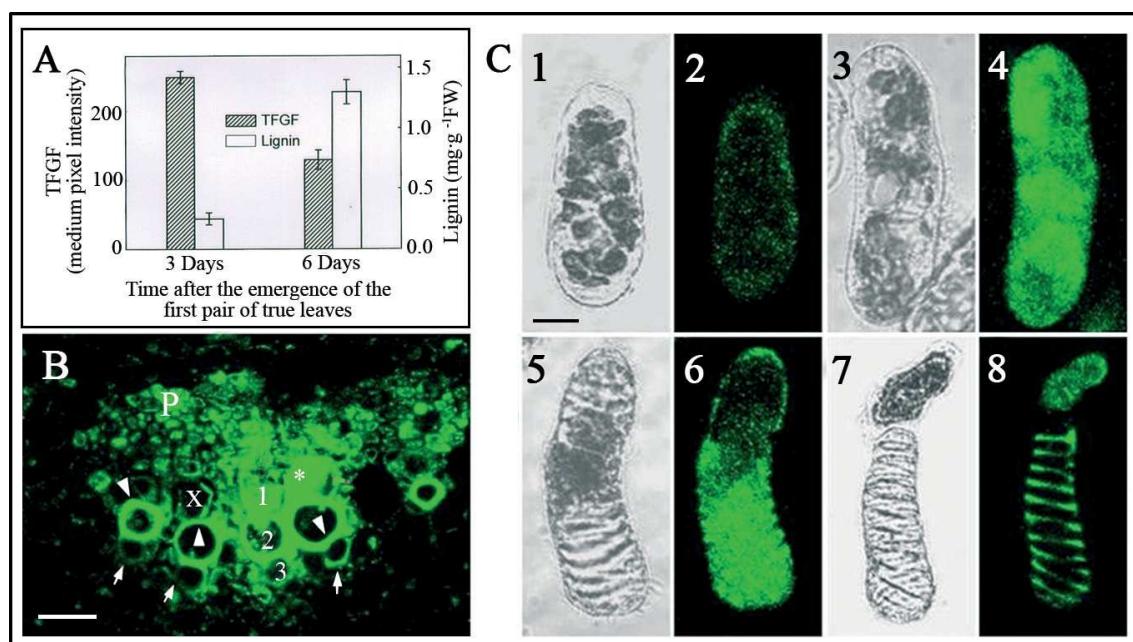


Figura 9. (A) Correlación temporal inversa entre la producción de NO y el contenido en ligninas en el xilema de *Z. elegans*. (B) Producción de NO en el xilema de *Z. elegans* visualizado en el microscopio confocal láser de barrido con la sonda fluorescente diacetato de 4,5-diaminofluoresceina. (1, *), células del xilema de paredes delgadas; (2, punta de flecha), células del xilema de paredes gruesas en diferenciación; (3, flechas), células del xilema de paredes gruesas diferenciadas. P, fibras floema; X, elemento xilema. Barra=40 µm. (C) Producción de NO en células de mesófilo de *Z. elegans* en diferenciación a traqueidas. Imágenes en campo claro (1, 3, 5, 7) y con fluorescencia (2, 4, 6, 8) de células de mesófilo indiferenciadas (1, 2), en diferenciación con paredes delgadas (3, 4), elementos traqueales en diferenciación (5, 6), elementos traqueales completamente (7, 8), teñidos con diacetato de 4,5-diaminofluoresceina y visualizados en el microscopio confocal láser de barrido. Barra=15 µm

Como se observa en la Figura 9B, la producción más elevada de NO se localizó en las células predeterminadas para diferenciarse irreversiblemente a elementos del xilema aún vivas, por lo que son estas células del xilema jóvenes en diferenciación las que generan y mantienen la producción de NO mientras que la síntesis de la pared celular secundaria y la autolisis celular se producen. Estos resultados también demostraban que la producción de NO y la lignificación de la pared celular son dos procesos metabólicos inversamente relacionados durante la diferenciación del xilema (Gabaldón y cols. 2005).

La producción de NO en las células del mesófilo de *Z. elegans* que se diferencian a elementos traqueales *in vitro* mantienen la misma propiedad mostrada por las células del xilema en diferenciación *in planta* ya que la señal fluorescente se detectó, principalmente, en las células predeterminadas y en las que se encontraban en diferenciación a elementos traqueales (Figura 9). Estos resultados confirmaron que la formación de NO en los elementos traqueales en diferenciación estaba directamente relacionada con los procesos tempranos de la diferenciación del xilema que se producen inmediatamente antes de que tengan lugar los procesos de formación de la pared celular secundaria y se produzca la autolisis celular. Por el contrario, las células aisladas del mesófilo que no habían adquirido la capacidad para diferenciarse a traqueidas, manifestaban unos niveles muy débiles de la señal fluorescente lo que contrastaba con la producción elevada de NO mostrada por las células predeterminadas para diferenciarse a traqueidas (Gabaldón y cols. 2005, Ros Barceló y cols. 2004).

Estos resultados sugerían que el NO producido por las células en diferenciación se sintetizaba en el momento preciso en el que éstas adquieren la capacidad para la muerte celular. Estos resultados también explicaban el porqué las células predeterminadas, localizadas en los haces vasculares del xilema también mostraban un estallido de NO que, como ocurría en los sistemas celulares *in vitro*, se mantiene mientras que se produce la ruptura celular confirmado que la formación de NO estaba directamente relacionada con los procesos tempranos de la diferenciación del xilema que se producen inmediatamente antes de que se manifieste la autolisis celular y los

procesos de formación de la pared celular secundaria (Gabaldón y cols. 2005, Ros Barceló y cols. 2004).

Estudio sobre los lugares de producción de H₂O₂ in planta, en los haces vasculares, e in vitro, en los cultivos de células del mesófilo de Zinnia elegans que se diferencian a elementos traqueales

Adicionalmente, se realizó un estudio detallado de los sitios de producción de H₂O₂ en el xilema en lignificación mediante la utilización conjunta de técnicas de microscopía junto con la utilización de sondas fluorescentes que permiten visualizar la formación de H₂O₂. De esta manera, se comprobó que en las células del xilema en diferenciación y en las células del parénquima adyacentes se localizaba la producción de H₂O₂ sugiriendo que estas células parenquimáticas podrían ser las responsables de la producción de H₂O₂ que, posteriormente, difunde de célula a célula, a través del espacio intercelular hacia las células del xilema en diferenciación para que tenga lugar la biosíntesis de ligninas en la pared celular secundaria (Gómez-Ros y cols. 2006).

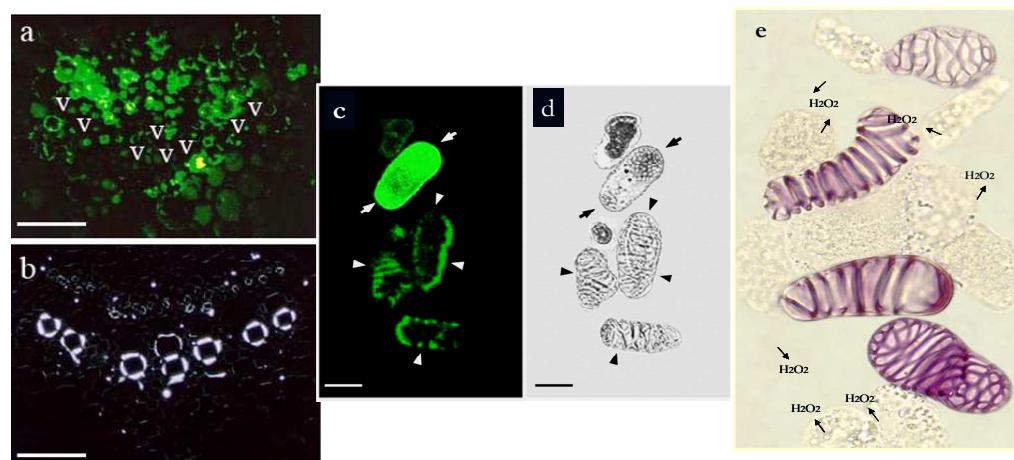


Figura 10. (a) Producción de H₂O₂ en los elementos del xilema de *Z. elegans* visualizada con diacetato de 2,7-diclorofluoresceína en el microscopio confocal láser de barrido. (b) Observación de los engrosamientos de la pared celular secundaria en los elementos del xilema de *Z. elegans* con luz polarizada. (c) Producción de H₂O₂ en células de mesófilo de *Z. elegans* en diferenciación a traqueidas visualizada con diacetato de 2,7-diclorofluoresceína en el microscopio confocal láser de barrido y (d) en campo claro. Las flechas indican células de parenquima no diferenciadas y las puntas de flecha elementos traqueales en diferenciación. (e) Visualización de la deposición de ligninas en cultivos de células de mesófilo de *Z. elegans* en diferenciación a traqueidas.

Una evidencia adicional que apoyó la hipótesis planteada se obtuvo mediante la localización del H₂O₂ en los cultivos celulares de mesófilo de *Z. elegans* en diferenciación a traqueidas (Figura 10). Utilizando este sistema modelo junto con la microscopía confocal láser y el diacetato de 2,7-diclorofluoresceína como sonda fluorescente, la producción de H₂O₂ se localizó mayoritariamente en las células del mesófilo predeterminadas, detectándose un bajo nivel de H₂O₂ en los elementos traqueales completamente diferenciados (Gómez-Ros y cols. 2006) y con un elevado grado de significación (Figura 10e). Además, los niveles de H₂O₂ detectados en el cultivo celular *in vitro* fueron del orden de mM y acordes con los estimados *in situ* en el xilema en significación de la planta *Z. elegans* cuando se utilizó IK/almidón para la detección del H₂O₂ (Ros Barceló y cols. 2002a).

5. Estudios básicos: *Implicación de las peroxidasas y compuestos relacionados con la defensa vegetal.*

Las peroxidasas, además de encontrarse de manera constitutiva en las plantas y estar implicadas en multitud de procesos del crecimiento y desarrollo de las mismas, también se inducen en respuesta a heridas (asociadas al ataque por depredadores), por la infección provocada por patógenos y mediante la aplicación de compuestos químicos que mimetizan el ataque por un patógeno o inducen algún tipo de estrés (van Loon y cols., 2006). De esta manera, sus niveles se acumulan para limitar la extensión de la infección a través de la creación de un entorno altamente tóxico mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (Passardi y cols., 2005). De hecho, catalizan la oxidoreducción de una amplia variedad de sustratos a expensas del H₂O₂ (Passardi y cols., 2004) por lo que confieren resistencia frente a estreses bióticos y abióticos a través de diferentes mecanismos.

Por ello, nos planteamos el estudio de las respuestas de defensa de la vid frente a patógenos de origen fúngico, ya que son causantes de grandes pérdidas económicas en las zonas vitícolas de la Región de Murcia. La peroxidasa parecía estar directamente implicada en estos mecanismos de defensa ya que cumplía todos los requisitos para ser la responsable de la oxidación del *trans*-resveratrol a viniferinas, que son las

fitoalexinas mayoritarias en la vid (compuestos de defensa que presentan actividad biológica frente a un amplio rango de agentes fitopatógenos), a través de un proceso análogo al que se produce durante la oxidación de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos a ligninas. Por este motivo, iniciamos una serie de experiencias centradas en estudios cinéticos y bioquímicos de la oxidación del *trans*-resveratrol por esta isoenzima fuertemente básica de peroxidasa, en este caso, de vid con la finalidad de conocer el mecanismo de acoplamiento oxidativo.

Nuestra gran contribución en este campo fue la de establecer la localización subcelular de la síntesis de viniferinas, que tiene lugar mayoritariamente en la pared celular, y describir el mecanismo molecular a través del cual tiene lugar la reacción de acoplamiento oxidativo de los radicales del *trans*-resveratrol para la formación de viniferinas. En dicho mecanismo se propone que las especies mesoméricas M_β y M_{03} , derivadas del radical del resveratrol, son las que intervienen en la síntesis de viniferinas *in vivo* mientras que *in vitro*, el acoplamiento mayoritario es del tipo M_β y M_{04} , dando lugar al dehidrodímero del resveratrol (Pedreño y cols. 1996).

Junto a esta contribución, parte de nuestro tiempo dedicado a esta línea de investigación, que se inició en 1989 con el primer proyecto de la CICYT, se centró en la búsqueda de un *elicitor* (molécula, compuesto o factor físico) capaz de inducir las reacciones de defensa en plantas de vid susceptibles al ataque fúngico, que pudiera actuar de forma análoga a una *vacuna*, inmunizando a la planta frente a los hongos. Para ello, realizamos el establecimiento del cultivo *in vitro* de plantas (Figura 11), a partir de *segmentos nodales* de los cultivares de vid existentes en el IMIDA en 1990, que mostraban diferentes grados de susceptibilidad/resistencia al ataque fúngico; siendo mi grupo de investigación pionero tanto en el establecimiento de estos cultivos *in vitro* como en la optimización de sus requerimientos nutricionales y hormonales; cultivos de vid que en la actualidad se siguen manteniendo, gracias a nuestra técnica de laboratorio (Pepita Alemán), ya que sirven como material de prácticas, para realizar la multiplicación vegetativa de la vid, de los estudiantes de Grado en Biología y Biotecnología de la Facultad de Biología.



Figura 11. Establecimiento de cultivo *in vitro* de plantas de vid (*Vitis vinifera*) de diferentes cultivares y susceptibilidad/resistencia a los ataques fúngicos.

Después de diferentes pruebas con *elicitores* de tipo abiótico, como la luz ultravioleta o fungicidas sistémicos utilizados en agricultura, como el fosetyl de aluminio, encontramos que un producto de secreción del hongo *Trichoderma viride*, comercializado con el nombre celulasa Onozuka R-10, era capaz de inducir la batería de reacciones de defensa que caracteriza la respuesta hipersensible de las plantas frente a los patógenos (Figura 12, Calderón y cols. 1993). Entre ellas, cabe destacar respuestas plasmolíticas, aparición de pardeamiento, síntesis de *trans*-resveratrol y viniferinas junto con la inducción de la síntesis del precursor del ácido salicílico, el ácido benzoico.

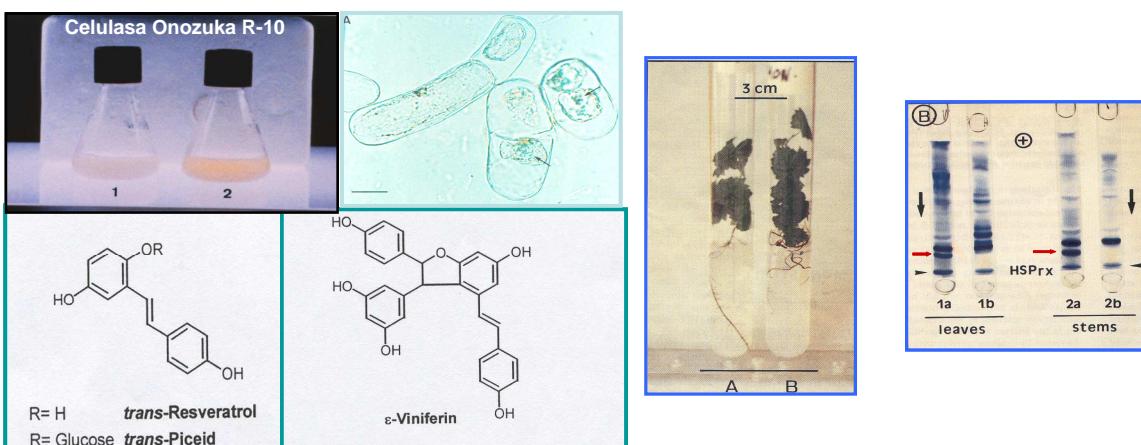


Figura 12. Respuesta hipersensible en los cultivos celulares de vid cv Monastrell por la presencia del *elicitor* celulasa Onozuka R-10. Vitroplantas de vid del híbrido (*Vitis vinifera* x *Vitis rupestris*) x *Vitis riparia* (A) y del cv Monastrell (B). Patrón electroforético de las diferentes isoenzimas de peroxidasa en hojas (1a y 1b) y en tallos (2a y 2b) correspondientes al híbrido (A) y al cv Monastrell (B).

Dicho *elicitor* fue también capaz de inducir una isoenzima de peroxidasa en cultivos susceptibles de *Vitis vinifera* cv Monastrell, HSPrx, y otra isoenzima que se expresaba de forma constitutiva tanto en las hojas como los tallos de cultivos resistentes del híbrido (*Vitis vinifera* x *Vitis rupestris*) x *Vitis riparia* (Figura 12A, 1a y 2a) y que

estaba ausente en la variedad Monastrell (Figura 12B, 1b y 2b) que es susceptible (flecha roja en la Figura 12), y por lo tanto, esta isoenzima de peroxidasa podía ser considerada como un marcador de resistencia (Calderón y cols. 1992a).

6. Estudios aplicados: Elicitación como estrategia para la producción de compuestos relacionados con la defensa vegetal.

A la vista de los resultados anteriores, la curiosidad científica me llevó hacia la búsqueda de compuestos que actuasen de *elicitores*, sobre los cultivos celulares de vid que también habíamos establecido en aquellos años 90, a partir de frutos inmaduros de la variedad Monastrell (Figura 13A) y que mantenemos en la actualidad. Por ello, le propuse al *Prof. Roque Bru* del Dpto de Agroquímica y Bioquímica de la Universidad de Alicante, realizar unos experimentos con unos compuestos de naturaleza oligosacáridica, *las ciclodextrinas* (Figura 13B), que se habían utilizado para la solubilización de sustratos apolares en medios acuosos en catálisis enzimática, de manera que pudiéramos suministrar de forma continuada *trans*-resveratrol (incluido en la cavidad interna de las ciclodextrinas) a un cultivo de células de vid, con la finalidad de protegerlas de posibles infecciones.

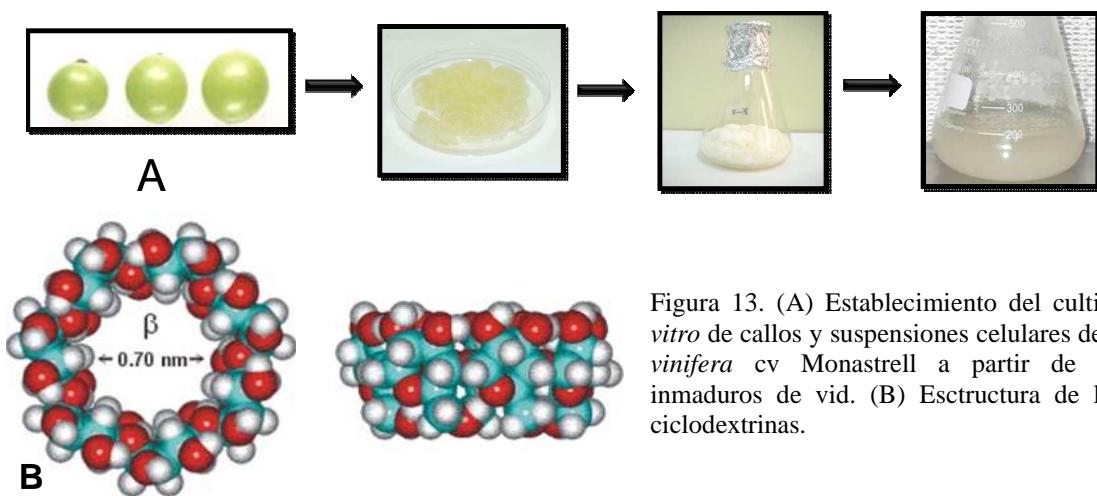


Figura 13. (A) Establecimiento del cultivo *in vitro* de callos y suspensiones celulares de *Vitis vinifera* cv Monastrell a partir de frutos inmaduros de vid. (B) Esctructura de las β -ciclodextrinas.

De esta manera, en 1996 inicié una novedosa línea de investigación que comenzó observando el efecto de las dimetil- β -ciclodextrinas (abreviadamente CDs, Figura 13B) sobre el metabolismo del *trans*-resveratrol en suspensiones celulares de vid inoculadas con la bacteria fitopatógena *Xylophilus ampelinus*. Las suspensiones celulares control y las inoculadas contenían en las células una baja cantidad del

derivado glucosilado del *trans*-resveratrol, *trans*-piceída. Sin embargo, cuando el cultivo se suplementó con CDs, tanto las células infectadas como las no infectadas seguían manteniendo niveles bajos de *trans*-piceída en las células pero secretaban una cantidad significativa de *trans*-resveratrol al medio de cultivo, sobretodo los controles con CDs que no contenían en su interior *trans*-resveratrol.

Estos resultados sugerían que las CDs estaban actuando como *elicitores* de manera independiente a la presencia de la bacteria. Efectivamente, al analizar los medios de cultivo se comprobó que el *trans*-resveratrol se había acumulado en grandes cantidades en el medio de cultivo. Este nuevo descubrimiento nos llevó a profundizar más en detalle en el efecto de las CDs sobre las células de vid confirmándose el papel de las CDs como *elicitores* de una respuesta de defensa de la vid liderada por la síntesis del *trans*-resveratrol (Morales y col. 1998).

Por otra parte, la cantidad de *trans*-resveratrol acumulada en el medio de cultivo (2000 mg/L) excedía enormemente los límites de solubilidad de este compuesto en medio acuoso (48 mg/L). Este resultado ponía de manifiesto, por primera vez, la ventaja de utilizar CDs ya que éstas pueden alojar compuestos de baja polaridad en su cavidad central formando los denominados complejos de inclusión. Además, demostramos que el *trans*-resveratrol segregado por las células era capturado por las CDs permitiendo que se acumulase en concentraciones elevadas, teniendo lugar el proceso que se conoce como “eliminación del producto *in situ*”, proceso muy deseable ya que el crecimiento del cultivo no se ve afectado por las elevadas concentraciones de *trans*-resveratrol que se acumulan en el medio de cultivo, permaneciendo las células viables durante todo el proceso (Bru y cols. 2006).

Con este nuevo procedimiento, la utilización de paredes celulares de hongos como *elicitores* para inducir la biosíntesis de *trans*-resveratrol en cultivos celulares de vid, técnica utilizada por otros investigadores (Liswidowati y cols en 1991), quedó en desuso (0.00324g/L) ya que la concentración de *trans*-resveratrol cuando se utiliza nuestro procedimiento de elicitation con CDs se incrementa más de 700 veces (2 g/L). Además, nuestro proceso era innovador ya que no dependía de la generación de biomasa celular puesto que eran las condiciones del medio de cultivo (la presencia de las CDs en el medio de cultivo) lo que favorecía el proceso de inducción de la

biosíntesis, secreción y acumulación de *trans*-resveratrol en el medio de cultivo (Bru y Pedreño, 2003; Figura 14A). Sin embargo, a pesar de la elevada concentración de *trans*-resveratrol que se obtenía, aún nos quedaban muchas CDs vacías por lo que se nos ocurrió utilizar otros *elicitores* en combinación con las CDs. De todos los *elicitores* ensayados en combinación con las CDs encontramos uno que provocaba un efecto espectacular, el jasmonato de metilo (MJ; Figura 14B).

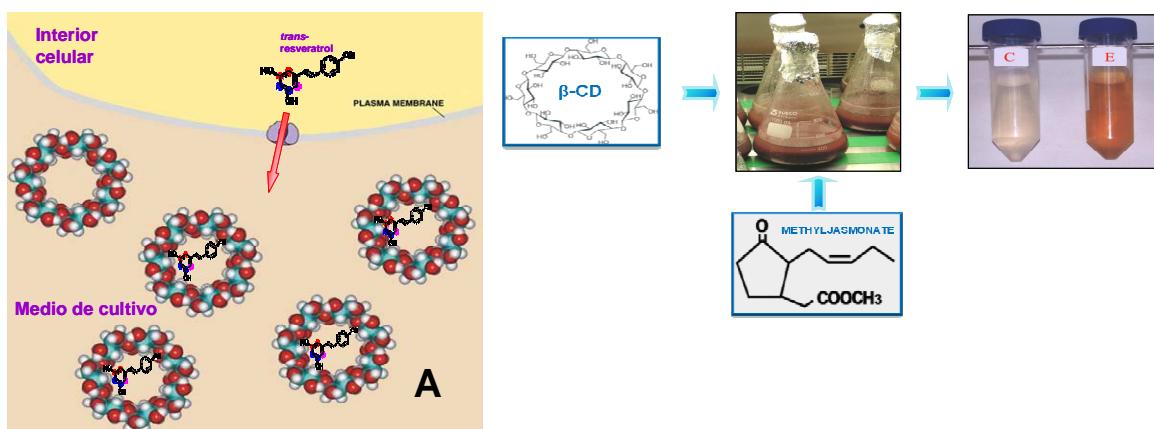


Figura 14. (A) Actuación de las ciclodextrinas en el proceso de acumulación del *trans*-resveratrol en el medio de cultivo. (B) Elicitación de suspensiones celulares de *Vitis vinifera* cv Gamay con β -ciclodextrinas y jasmonato de metilo y recuperación del medio de cultivo enriquecido en *trans*-resveratrol (tubo marcado con E).

Los jasmonatos juegan un papel importante en los procesos de transducción de la señal que regulan las respuestas de defensa en plantas (Farmer y Ryan, 1992). Entre los jasmonatos, el MJ había sido ampliamente utilizado como inductor de respuestas de defensa en numerosos cultivos *in vitro* de diferentes especies vegetales.

Como se observa en la Figura 15, cuando las células se estimularon sólo con CDs, la biosíntesis de *trans*-resveratrol alcanzó el nivel máximo a las 72 horas de tratamiento, mientras que no se detectaron niveles significativos de *trans*-resveratrol en el medio de cultivo cuando las células fueron elicidadas con MJ o en los tratamientos de control. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con ambos *elicitores*, sorprendentemente la acumulación extracelular de *trans*-resveratrol aumentó de forma exponencial alcanzando valores máximos a las 168 horas de tratamiento (Figura 15). Además, la concentración final en presencia de ambos elicidores, 1400 μ moles de *trans*-resveratrol /g peso seco de células fue de un orden de magnitud superior a la concentración final de *trans*-resveratrol obtenida en las células tratadas sólo con CDs, resultados que nos

indicaron que la acción conjunta de MJ y CDs provocaba un efecto sinérgico sobre la producción de *trans*-resveratrol (Lijavetzky y cols. 2008).

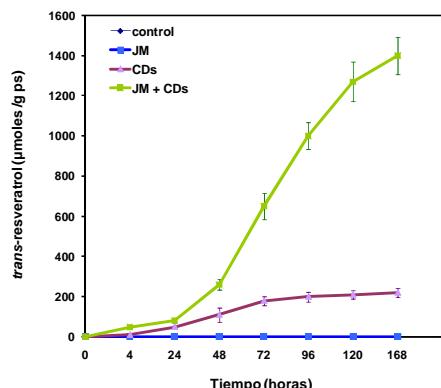


Figura 15. Producción de *trans*-resveratrol durante la elicitation de los cultivos celulares de *Vitis vinifera* cv Monastrell con ciclodextrinas solas (CDs) y/o en combinación con jasmonato de metilo (JM).

Además, comprobamos que la expresión de genes que codifican para la fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4 hidroxilasa (C4H) y 4-cumarato CoA ligasa (4CL), para dar lugar a los precursores comunes para la biosíntesis de flavonoides, ligninas y estilbenoides, junto con la expresión del gen que codifica para la estilbeno sintasa (STS), responsable de la biosíntesis del *trans*-resveratrol (Figura 16), se incrementaban considerablemente en los cultivos de vid *elicitados* conjuntamente con MJ y CDs mientras que los niveles de expresión de los genes que codificaban para la chalcona sintasa (CHS, primera enzima de ruta para la biosíntesis de flavonoides) y la cinamilCoA reductasa (CCR, implicada en la ruta de formación de ligninas) eran muy bajos. Así conseguimos demostrar que la acción conjunta de ambos *elicitores* inducía de manera específica la expresión de la STS por lo que el efecto sinérgico de la producción de *trans*-resveratrol era el resultado del efecto sinérgico de ambos *elicitores* sobre la expresión de este gen (Lijavetzky y cols. 2008). Pero aún fuimos más allá, cuando analizamos el efecto de estos tratamientos sobre la expresión global de genes en los cultivos celulares de vid mediante el uso de micromatrizes de ARN, y observamos que una gran proporción de los genes, que se expresaban diferencialmente, estaban regulados por MJ y CDs (Almagro y cols. 2014). Concretamente visualizamos, mediante el análisis de enriquecimiento funcional, la sobre-expresión de los transcriptos relacionados con la biosíntesis de *trans*-resveratrol (Figura 16).

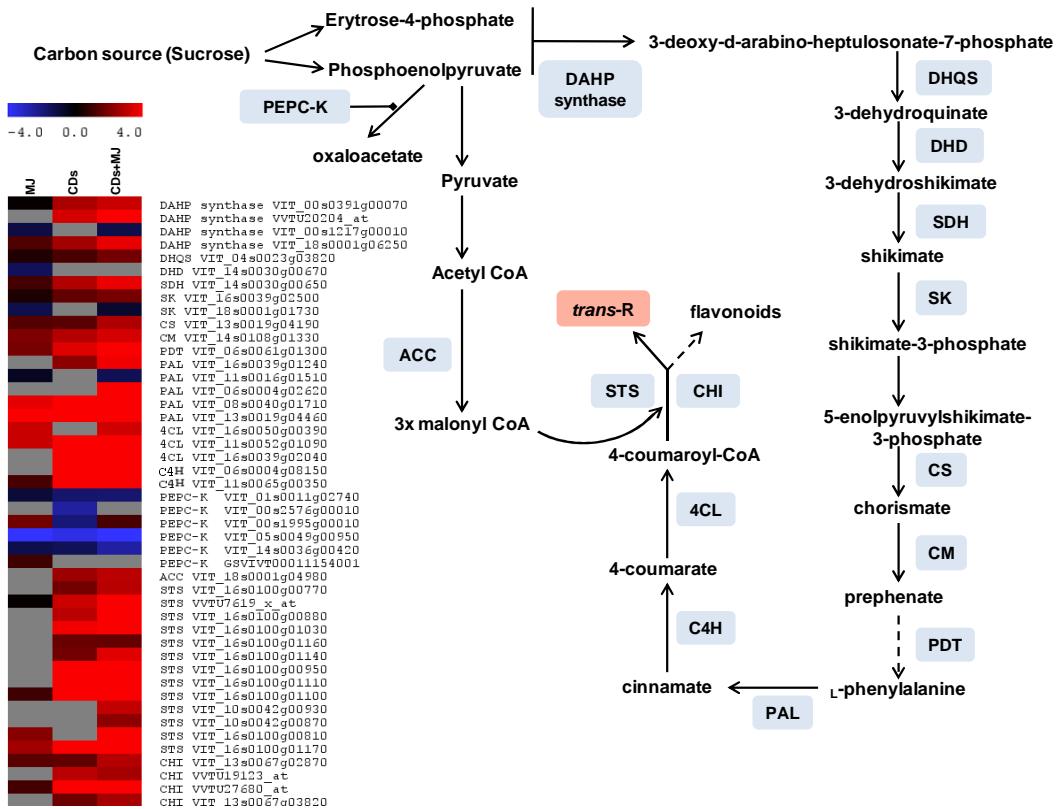


Figura 16. Mapa de calor en el que se expresan en rojo los transcriptos que se sobre-expresan respecto al control y en azul los genes que presentan un nivel de expresión por debajo del control.

Efectivamente como se observa en el mapa de calor (Figura 16), la *elicitación* con CDs solas o en combinación con MJ incrementaba fuertemente la expresión de los genes que se encontraban *aguas arriba* de la ruta de biosíntesis fenilpropanoide, además de la ruta específica en la que se sobre-expresaban varias STS que son las responsables de la formación del *trans*-resveratrol (Almagro y cols. 2014). Llegado a este punto el siguiente paso, fruto de una colaboración con el *Profesor de Investigación Lorenzo Burgos*, del Departamento de Mejora Vegetal del CEBAS-CSIC, consistió en realizar la transformación genética de las células de vid para que sobre-expresasen la STS y a continuación, utilizar estas líneas celulares transgénicas de vid para la producción de *trans*-resveratrol en condiciones de *elicitación* con CDs y MJ (Mingyu y cols. 2016).

De todas las STS analizadas en las micromatrices de ARN (*microarrays*) que se sobre-expresaban en presencia de estos *elicitores* seleccionamos aquella que mostraba una elevada expresión en presencia de CDs (solos o en combinación con MJ) y la utilizamos para transformar los cultivos celulares de Monastrell utilizando la tecnología

de la infección con *Agrobacterium tumefaciens*. De esta manera obtuvimos 40 líneas celulares transgénicas que contenían el transgén de la STS en las dos diferentes orientaciones de lectura, 20 líneas con lectura de derecha a izquierda y otras 20 con la lectura invertida. Una vez realizada la *elicitación* con CDs y MJ y analizadas las líneas transgénicas encontramos varias de ellas, con la primera orientación, que eran capaces de incrementar considerablemente la producción extracelular del *trans*-resveratrol con respecto a la producción analizada en líneas celulares no transgénicas. Sin embargo, cuando la lectura del transgén estaba invertida, la producción de *trans*-resveratrol, aunque estaba incrementada con respecto al cultivo control no transgénico, fue menor.

7. Estudios aplicados: *El poder curativo de las plantas. Producción de principios bioactivos aprovechando las respuestas de defensa de las células vegetales mediante el uso del cultivo celular, la elicitation y la transgénesis como estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios.*

Las plantas sirven para curar. Esto lo sabemos todos, no es nada nuevo. El uso de remedios de origen vegetal se realiza desde que el ser humano comenzó a percatarse de que ciertos vegetales ayudaban a paliar determinadas dolencias y es esta *medicina tradicional* la que se ha extendido en todas las culturas y civilizaciones conocidas incluso hasta nuestros días. En un principio cuando no existía la tecnología apropiada para aislar y purificar los compuestos de las plantas, lo más fácil era tomar la planta con supuestos efectos curativos y comérsela. Sin embargo, las modernas técnicas de análisis de hoy en día, nos han permitido confirmar la utilidad terapéutica de algunas de aquellas plantas utilizadas en la *medicina tradicional* que antes se habían ingerido mediante el arriesgado método de ensayo-error. En la actualidad, sabemos que el efecto terapéutico de ciertas partes de las plantas se debe a que acumulan determinadas sustancias útiles que se denominan *principios activos* (Seguí Simarro, 2011). Sin embargo, las calidades y cantidades de estos principios activos de las plantas varían entre los diferentes cultivares de una misma especie vegetal y también dentro de una misma variedad en función de los diferentes factores que condicionan el crecimiento de las plantas. De esta manera, los extractos de plantas son heterogéneos en la medida en que las plantas se ven afectadas por las condiciones climáticas, geográficas, edáficas y por la presencia de

agentes patógenos ya que la gran mayoría de estos *principios activos*, denominados *metabolitos secundarios*, son sintetizados en pequeñas cantidades por las plantas en el lugar donde se produce la agresión o el daño (físico o biológico) como respuesta de defensa frente a los diversos estímulos externos. De hecho, la gran mayoría de los compuestos vegetales con fines terapéuticos son en realidad compuestos de defensa tóxicos para los organismos parásitos o predadores de la planta. Como en el caso del *trans*-resveratrol y las viniferinas, compuestos *estilbenoides* que la planta de vid y los cultivos derivados de sus bayas sintetizan para defenderse de infecciones fúngicas y bacterianas e incluso frente agresiones físicas como la exposición a la luz UV (Morales y cols. 1998; Bru y cols. 2006; Almagro y cols. 2011). Por otra parte, cientos de estudios han mostrado los efectos beneficiosos del *trans*-resveratrol sobre los sistemas cardiovascular y neurológico aunque la actividad biológica más importante de este compuesto radica en su acción antitumoral previniendo la carcinogénesis en los tres estadios del desarrollo del tumor (Almagro y cols. 2013).

Otro tipo de sustancias que las plantas producen sin una finalidad exclusiva de defensa y que a nosotros nos resultan beneficiosas son los flavonoides y las betalaínas, que son pigmentos nitrogenados de diferentes tonalidades que las plantas sintetizan para dar color a sus flores, frutos, hojas y para resultar más atractivas y que los insectos polinizadores se fijen y se posen en ellas, transportando así el polen de unas flores a otras que es en definitiva lo que a las plantas les interesa, asegurar la reproducción sexual de la especie vegetal a través de la polinización. Estos *metabolitos secundarios* que tienen un importante papel antioxidante frente a los radicales libres y que ayudan a proteger a la planta frente a los efectos nocivos de la radiación ultravioleta poseen también un interés farmacológico. De hecho, se ha descrito en numerosas publicaciones científicas, el efecto vasodilatador de compuestos de naturaleza flavonoide y estilbenoide y la actividad antioxidante, captadora de radicales libres de éstos y de las betalaínas (Escribano y cols. 1998). Es también conocida la actividad de las isoflavonas (principalmente de soja) para tratar los síntomas derivados de los desequilibrios hormonales que padecen las mujeres con la llegada de la menopausia, o el efecto vasoprotector y activador de la microcirculación sanguínea de los flavonoides de los cítricos utilizados para el alivio de los síntomas relacionados con la insuficiencia venosa

de las extremidades inferiores. Sin embargo, existen otros compuestos nitrogenados, los alcaloides, que las plantas utilizan como disuasorios alimentarios (frente a insectos y herbívoros), y que a dosis muy bajas pueden tener un efecto terapéutico beneficioso mientras que a dosis elevadas son muy tóxicos y pueden incluso provocar la muerte por parada respiratoria. Uno de ellos desafortunadamente bastante famoso en nuestra sociedad es la cocaína, alcaloide tropánico derivado de la hoja de coca que a dosis moderadas es un potente anestésico y vasoconstrictor; sin embargo, si la dosis de cocaína aumenta se acelera la frecuencia cardíaca y el ritmo respiratorio produciéndose convulsiones y muerte por parada respiratoria. Otro ejemplo es la fisostigmina del haba de calabar, alcaloide indólico muy venenoso que provoca una crisis colinérgica por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa e incluso la muerte, aunque a dosis bajas, se utiliza para el tratamiento de pacientes con glaucoma. Muchos de estos metabolitos secundarios que las plantas los producen como respuesta de defensa o para interaccionar con los seres vivos que las rodean son de un elevado valor de mercado puesto que son los *principios activos* de muchos cosméticos, nutraceuticos y productos farmaceuticos.

Otra de las plantas que ha sido cultivada desde la antigüedad y utilizada en la *medicina tradicional* para el tratamiento de reumatismos, artritis, afecciones hepáticas y urinarias así como antihelmíntico y antimarialíco ha sido el tejo. Esta extensa actividad biológica se debe a la presencia en esta planta, de numerosos compuestos bioactivos como los lignanos, flavonoides, esteroides y sus derivados glucosilados. Sin embargo, el gran interés que despierta el árbol del tejo es la presencia de los alcaloides diterpénicos complejos, fundamentalmente el taxol y sus derivados, ya que se utilizan actualmente en la quimioterapia frente a diversos tipos de cáncer. Su capacidad antitumoral se basa, a diferencia de la mayoría de compuestos anticancerígenos, en su capacidad para promover la polimerización de la tubulina a la vez que estabiliza los microtúbulos ya formados rompiendo el equilibrio microtúbulo/tubulina y provocando la parada del ciclo celular y consecuentemente, la muerte de las células mitóticamente activas (Schiff y cols. 1979). Esta capacidad ha hecho posible que el taxol se haya aprobado y establecido desde 1992 por la FDA como un importante y efectivo agente antineoplásico frente a un amplio número de tumores, frente al sarcoma de Kaposi asociado al SIDA y también, frente a algún tipo de leucemias.

Hasta hace relativamente poco tiempo, todo el taxol utilizado en la quimioterapia contra el cáncer y en estudios científicos procedía de la extracción directa de la corteza del árbol o de su semi-síntesis química a partir de precursores aislados también directamente de la planta. Sin embargo, la demanda mundial de este compuesto excede el suministro que se realiza a partir de su aislamiento de las diferentes especies de tejo, ya que su contenido es relativamente bajo (< 0.01 % en peso seco de corteza) (Cameron y Smith, 2008). Por tanto, a consecuencia de la elevada demanda que existe, debido a su importante aplicación en medicina, el tejo se está viendo amenazado día tras día como resultado de los procesos de extracción de estos compuestos que implican la muerte de la planta. Además, los árboles de tejo crecen lentamente y, al ser su recolección destructiva, se han investigado otros sistemas de producción alternativos dirigiendo la mayor parte de estos esfuerzos hacia su producción biotecnológica, a través del cultivo *in vitro* utilizando el cultivo celular obtenido a partir de aquellas partes de la planta en donde la biosíntesis de estos compuestos es más activa.

La producción biotecnológica del taxol ha sido estudiada desde principios de la década de los 90. Los primeros trabajos realizados mostraban que los callos y las suspensiones celulares obtenidos a partir de tallos jóvenes de *Taxus* sp producían cantidades similares de taxol al producido por la planta (Fett-Neto y cols. 1992; Wickremesinhe y Artega, 1993). Sin embargo, en la mayoría de los cultivos celulares de *Taxus*, es necesario incrementar la productividad del taxol para hacer el proceso económicamente competitivo. Entre las principales estrategias empleadas para incrementar esa productividad destaca la optimización de las condiciones de cultivo, la selección de líneas celulares altamente productoras y la inducción del metabolismo secundario mediante la adición de *elicitores*.

El aumento de la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares vegetales a través de *elicitación* ha abierto una nueva área de investigación que podría tener importantes beneficios para la industria farmacéutica. Numerosas estrategias y compuestos se han utilizado con el fin de incrementar la producción de taxol; entre ellas se incluyen, variaciones en el medio de cultivo (Cusidó y cols. 2002), la adición de precursores biosintéticos (Bentebibel y cols. 2005), así como *elicitores* abióticos, como sulfato de vanadilo (Cusidó y cols. 1999) o bióticos como extractos fúngicos (Lan y

cols. 2003) o incluso una mezcla de diferentes tipos de *elicitores* entre los que se incluyen el jasmonato de metilo (MJ) (Khosroushahi y cols. 2006).

El primer estudio realizado con MJ en cultivos celulares de *T. baccata* fue realizado por el grupo de investigación de Yukimune y cols., (1996). En este estudio una concentración de 100 µM de MJ permitió incrementar la producción de taxanos del orden de 120-130 veces, obteniendo 48.3 y 53.5 mg/ L de taxol y de su precursor bacatina III, respectivamente. Otro de los *elicitores* que nosotros ya habíamos ensayado y patentado como procedimiento para la producción de *trans*-resveratrol en cultivos celulares de vid, eran las ciclodextrinas (CDs) de las que conocíamos sus características estructurales que permitían alojar en su interior moléculas hidrofóbicas y a su vez, al contener una superficie exterior polar, eran capaces de mantenerse en soluciones acuosas como lo son los medios de cultivo.

De esta manera, trabajando en colaboración con los *Profesores Rosa M^a Cusidó y Javier Palazón* del Área de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, diseñamos una estrategia para mejorar la producción biotecnológica de taxanos que consistía en emplear los cultivos celulares establecidos por desdiferenciación de raíces transformadas de *Taxus media* que sobre-expresaban uno de los genes iniciales de la ruta biosintética de taxol, el gen *txs* que codifica para la enzima taxadieno sintasa; en segundo lugar, se estableció el cultivo en dos fases en el que las células se cultivaron en un medio óptimo para el crecimiento durante 10 días, y transcurridos esos días se transfirieron a un medio óptimo para la producción de taxanos y por último, la estrategia de *elicitación* de los cultivos celulares basada en el empleo del MJ y las CDs (Sabater-Jara y cols. 2014). Además, puesto que la fase de desarrollo del cultivo celular es un factor clave en la biosíntesis de compuestos secundarios, los *elicitores* indicados fueron suplementados al medio óptimo de producción de taxanos en dos momentos diferentes del cultivo. En el caso de las CDs, éstas fueron adicionadas al medio de cultivo en el momento de la transferencia de las suspensiones celulares desde el medio óptimo para el crecimiento al medio óptimo para la producción, mientras que MJ fue adicionado al medio después del mantenimiento de las células durante 7 días en el medio óptimo de producción, es decir, cuando las células se encontraban ya

determinadas y adaptadas a la biosíntesis de los compuestos secundarios de interés tal y como se muestra en la Figura 17:

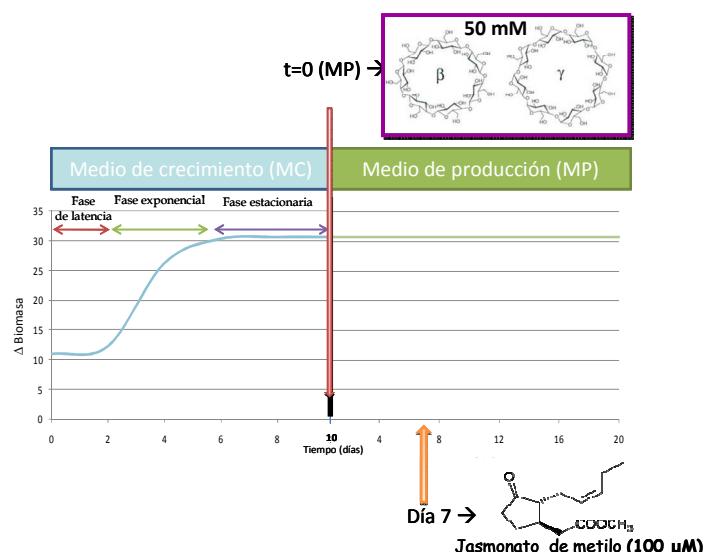


Figura 17. Diseño experimental del crecimiento y de la *elicitación* de los cultivos celulares de tejo.

Como se puede observar en las figuras siguientes (Figura 18), tanto en los cultivos control como en los *elicitados* con CDs y MJ individualmente, los niveles de producción total de taxanos se mantuvieron estables a lo largo de todo el cultivo, observándose un ligero incremento en la producción hacia el final del mismo, siendo este incremento más acusado en el tratamiento con β -CDs metiladas al azar (RM- β -CDs). Sin embargo, cuando las células fueron *elicitadas* simultáneamente con β -CDs o γ -CDs y MJ, la acumulación de taxanos se incrementó exponencialmente alcanzando la máxima producción en el día 16 (que se corresponde con 9 días de tratamiento con MJ) en el caso de las RM- β -CDs (103 mg/L) y en el día 20 en los cultivos *elicitados* con β -CDs hidroxipropiladas (HP- β -CDs, 88 mg/L) y γ -CDs (175 mg/L) en combinación con MJ. Estos resultados sugieren que la presencia conjunta de ambos *elicitores* produce un efecto sinérgico en la producción de taxanos ya que los valores obtenidos en los tratamientos combinados son hasta 10 veces superiores a los obtenidos en los cultivos *elicitados* con CDs o MJ individualmente (Sabater-Jara y cols. 2014).

Por otro lado, el contenido total de taxanos en el interior celular osciló entre el 10-25 % del contenido total, en los tratamientos realizados en presencia de β -CDs y MJ, acumulándose la mayor parte de estos compuestos en el medio extracelular (75-90 %). Sin embargo, cuando las células de tejo se estimularon en presencia de γ -CDs y MJ, el

% de taxanos intra- y extracelular aumentó de manera proporcional con el tiempo de elicitation, localizándose niveles similares de estos compuestos en ambos espacios.

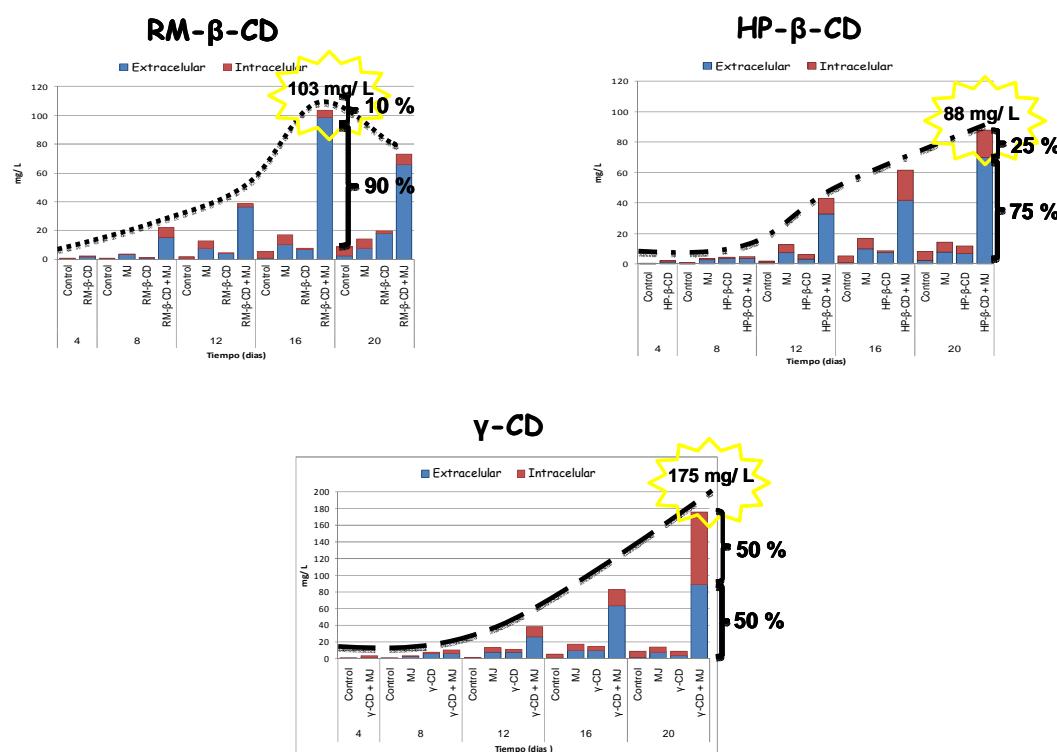


Figura 18. Producción de taxanos intra- y extracelular en las suspensiones celulares de tejo (*Taxus x media*) elicidadas con diferentes tipos de ciclodextrinas sólidas o en combinación con jasmonato de metilo (MJ). RM-β-CD, β-ciclodextrinas metiladas al azar; HP-β-CD, β-ciclodextrinas hidroxipropiladas; γ-CD, γ-ciclodextrinas.

En cuanto a los niveles de producción de cada taxano individualmente (expresado como % del total de taxanos producidos, Figura 19) se puede observar que, el taxano encontrado en mayor proporción en los cultivos celulares de *Taxus x media* varía dependiendo del tipo de CD. En el caso de las β-CDs, el taxano más abundante es el taxol, el cual representa aproximadamente el 80 % del contenido total de taxanos tanto en metiladas al azar (RM-β-CDs) como en hidroxipropiladas (HP-β-CDs), siendo el 2º taxano más importante su precursor, la bacatina III que representa alrededor del 20%. Sin embargo, cuando las células fueron elicidadas con γ-CDs se incrementó significativamente la producción de bacatina III en detrimento del taxol siendo aproximadamente el 60 % frente a un 25 % de taxol. Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de las CDs para formar complejos de inclusión permitiendo no sólo la acumulación en el medio de cultivo de estos compuestos, evitando así su efecto

tóxico sobre las células productoras, sino también facilitando su recuperación del medio de cultivo (Sabater-Jara y cols. 2014).

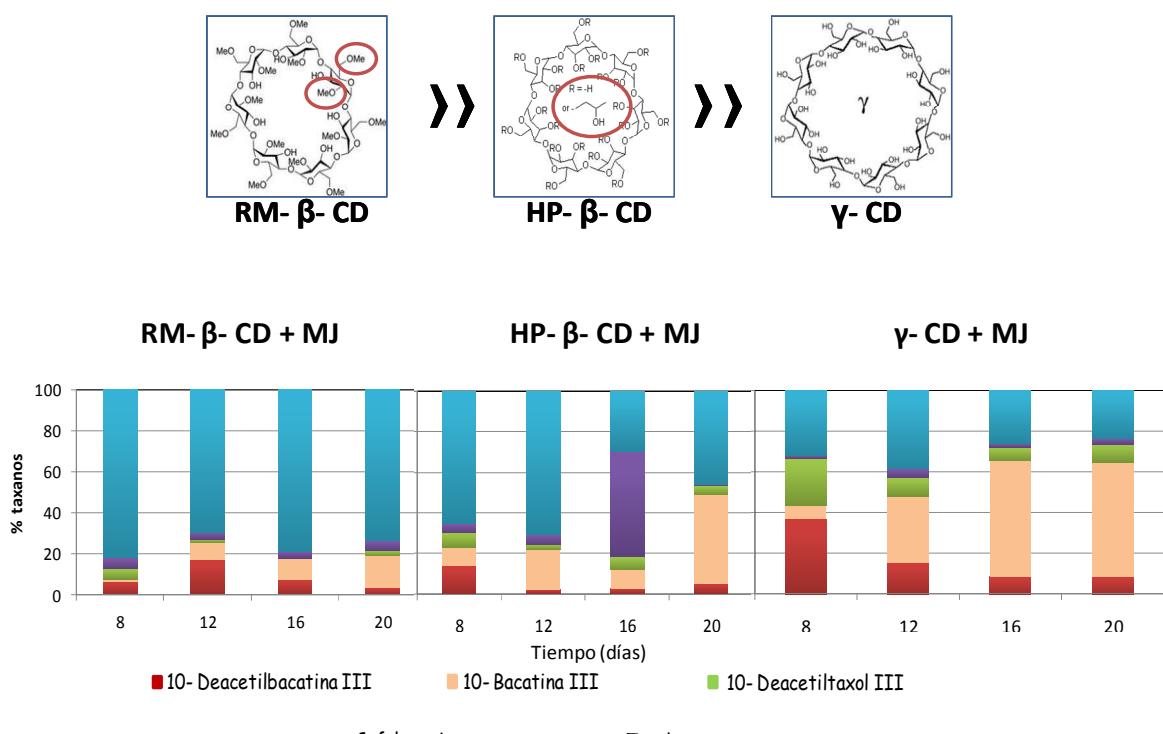


Figura 19. Niveles de producción de taxanos en los cultivos celulares de tejo elicitedos con diferentes ciclodextrinas (RM- β -CD, β -ciclodextrinas metiladas al azar; HP- β -CD, β -ciclodextrinas hidroxipropiladas; γ -CD, γ -ciclodextrinas) en combinación con jasmonato de metilo (MJ).

Esta línea de investigación, basada en la *elicitación* es claramente aplicada y los procedimientos para la estimulación de las células vegetales para la producción de *principios activos* están protegidos bajo patentes nacionales e internacionales y es la base de la actividad inventiva de nuestro actual grupo de investigación. Además hemos comprobado que esta tecnología de producción de estilbenos (*trans*-resveratrol) y taxanos (taxol) obtenidos en cultivos celulares de vid y de tejo es extrapolable a la producción de otros *compuestos bioactivos* como son los carotenoides y fitoesteroles en cultivos de zanahoria, tocoferoles en cultivos de lino, soja, cartamo y girasol por lo que estamos convencidos que dada la diversidad de compuestos de interés comercial que producen las plantas, estas herramientas biotecnológicas nos abren un abanico de oportunidades en este fascinante mundo de las plantas.

Epílogo

A lo largo de esta charla hemos podido comprobar la utilidad de las técnicas biotecnológicas del cultivo *in vitro* diseñadas para obtener el crecimiento y multiplicación de las células, tejidos u órganos vegetales utilizando soluciones nutritivas y reguladores del crecimiento, en condiciones totalmente asépticas y controladas. El hecho de poder disponer de un sistema experimental fácilmente manipulable bajo condiciones controladas en el laboratorio nos ha permitido el abordaje de estudios que con plantas completas habrían sido mucho más difíciles de realizar; y no sólo es una cuestión de dificultad sino también de rapidez a la hora de obtener los resultados. En este sentido, el empleo de cultivos celulares en suspensión de *Zinnia elegans*, obtenidos a partir de callos establecidos por cultivo *in vitro* de hipocotilos, ha sido la herramienta biotecnológica que nos ha permitido, realizar en poco tiempo, el aislamiento y purificación de proteínas que se localizan en la pared celular y en el fluido intercelular (apoplasto) como las peroxidasa de naturaleza fuertemente básica ya que el medio extracelular en el que crecen estos cultivos celulares es considerado como un amplio espacio intercelular que forma un continuo con la pared de la célula vegetal. Además, en comparación con otros métodos utilizados para el aislamiento de proteínas de la pared celular, tales como la infiltración al vacío y el fraccionamiento subcelular, el medio extracelular se obtiene directamente mediante técnicas no destructivas ya que se separa fácilmente de las células sin provocar ruptura celular proporcionando así una fuente adecuada, continua y única de proteínas de la pared celular. De esta manera hemos podido comprobar su implicación en la biosíntesis de ligninas de los elementos conductores del xilema y en los tejidos de sostén como las fibras del floema impermeabilizando las paredes celulares y proporcionando rigidez mecánica a los tallos de las plantas vasculares terrestres.

Otra de las aplicaciones del cultivo *in vitro* que hemos visto se ha centrado en la posibilidad de observar paso a paso cómo las células de mesófilo de *Zinnia elegans* se transformaban en traqueidas en un medio de cultivo aséptico, regulado con hormonas vegetales. La reproducción *in vitro* de la xilogénesis, mediante la desdiferenciación de las células del mesófilo y su diferenciación a traqueidas nos ha permitido confirmar la función reguladora del NO y del H₂O₂ que previamente habíamos observado *in vivo* en el xilema en diferenciación.

Por otra parte como hemos visto a lo largo de esta charla, un aspecto característico de las plantas es su capacidad para sintetizar una enorme variedad de compuestos que si bien no tienen una función directa en los procesos de crecimiento y desarrollo, realizan una función esencial en la supervivencia de las plantas. Estos *metabolitos secundarios* que se sintetizan en pequeñas cantidades en determinadas situaciones de estrés presentan además, aplicaciones muy específicas de gran interés industrial por lo que tienen un alto valor en el mercado ya que suponen un importante recurso natural para la obtención de los *principios activos* para la elaboración de fármacos, como aditivos alimentarios y nutraceuticos, fundamentalmente por sus propiedades antioxidantes, y como ingredientes para su uso cosmético.

La obtención de *metabolitos secundarios* mediante el uso del cultivo *in vitro* de células vegetales ha abierto nuevos caminos como fuente de *compuestos bioactivos* de gran valor añadido debido a las ventajas que presenta su utilización. De hecho, estos cultivos *in vitro* constituyen sistemas de producción estables y sostenibles ya que aseguran la obtención continua de *compuestos bioactivos* con calidad y productividad uniformes. Además, los requerimientos de espacio para el desarrollo de la producción son reducidos sin la necesidad de ocupación de terrenos para su cultivo, ya que éste se realiza en el laboratorio en condiciones de asepsia y el proceso de purificación del compuesto es más respetuoso con el medio ambiente, más fácil de desarrollar y se optimiza cuando los compuestos se secretan al medio de cultivo, pudiendo incluso realizar su producción en tanques (biorreactores) con agitación y sistemas de aireación que permiten el crecimiento de las células a gran escala. Mediante dos ejemplos de producción de estilbenos como el *trans*-resveratrol y taxanos como el taxol, hemos visto cómo la estimulación de los cultivos celulares de vid y de tejo con *elicitores* y su transgénesis, constituye una alternativa biotecnológica muy poderosa con un enorme potencial que aún está por explotar.

En definitiva el uso de las herramientas biotecnológicas nos han servido para ampliar nuestro conocimiento en aspectos básicos de la vida de las plantas como es su adaptación al hábitat terrestre, y su aprovechamiento por el hombre realizando una investigación aplicada para la producción de compuestos bioactivos mediante su cultivo *in vitro*, *elicitación* y transgénesis.

Muchas gracias por su atención.

Bibliografía

- Almagro, L, Carbonell-Bejerano, P, Belchí-Navarro, S, Bru, R, Martínez-Zapater, JM, Lijavetzky, D y Pedreño, MA.** 2014. Dissecting the transcriptional response to elicitors in *Vitis vinifera* cells. *PLoS one*, 9(10), e109777.
- Almagro, L, Sabater-Jara, AB, Belchí-Navarro, S, Fernández-Pérez, F, Bru, R, y Pedreño, MA.** 2011. Effect of UV light on secondary metabolite biosynthesis in plant cell cultures elicited with cyclodextrins and methyljasmonate. *Plants and Environment. Intech*, 115-136.
- Avalos, I.** 1990. Biotecnología e industria: un ensayo de interpretación teórica. IICA (Serie Documentos de Programas 18), San José, Costa Rica.
- Banci L.** 1997. Structural properties of peroxidase. *J Biotechnol* 53: 253-263.
- Belchí-Navarro S, Almagro L, Bru, R y Pedreño, MA.** Uso combinado de metil-jasmonato y ciclodextrinas para la producción de resveratrol. **WO2009106662**
- Bentebibel S, Moyano E, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Eibl R, Piñol MT** 2005. Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnol Bioeng* 89:647-655
- Bernal MA, Pedreño MA, Calderón AA, Muñoz R, Ros Barceló A y Merino de Cáceres F.** 1993. The subcellular localization of isoperoxidases in *Capsicum annuum* leaves and their different expression in vegetative and flowered plants. *Annals of Botany* 72:415-421.
- Braun AC.** 1947. Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. *Am J Bot* 34:234-240.
- Bru, R y Pedreño, MA.** Procedimiento para la producción de resveratrol en cultivos celulares. **WO 03/062406 A1**
- Bru, R; Sellés, S; Casado, J; Belchí-Navarro, S; y Pedreño, MA.** 2006. Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J Agr Food Chem* 54:65-71.
- Calderón AA, García-Florenciano E, Pedreño MA, Muñoz R y Ros Barceló A.** 1992. The vacuolar localization of grapevine peroxidase isoenzymes capable of oxidizing 4-hydroxystilbenes. *Zeitschrift für Naturforschung* 47c:215-221
- Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 1993. Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *New Phytol* 124:455-463.
- Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R, Ros Barceló A** 1993. Localization of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. *Hort Sci.* 28:38-40.
- Calderón AA, Zapata JM, Pedreño MA, Muñoz R y Ros Barceló A.** 1992a. Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive resistance in *in vitro* cultured grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29:63-70.
- Cameron S, Smith R** 2008. Seasonal changes in the concentration of major taxanes in the biomass of wild Canada yew (*Taxus canadensis* Marsh.). *Pharm Biol* 46:35-40.
- Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H, Penel C** 1997. Peroxidase activity in shoot apical meristem from Spinacia. *Acta Histochem*. 99: 177-186.
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT** 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus x media*. *Biotechnol Prog* 18:418-423.
- Cusidó RM, Palazón J, Navia-Osorio A, Mallol A, Bonfill M, Morales C, Piñol MT** 1999. Production of taxol® and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Sci* 146:101-107.
- Czaninski Y y Catesson AM** 1969. Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les tissus conducteurs végétaux au cours du cycle annuel. *J Microscopie* 8: 875-888.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C.** 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13454-13459.
- Demura T, Tashiro G, Horiguchi G, Kishimoto N, Kubo M, Matsuoka N, Minami A, Nagata-Hiwatashi M, Nakamura K, Okamura Y, Sassa N, Suzuki S, Yazaki J, Kikuchi S, Fukuda H** 2002. Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15794-15799.
- Durner J, Klessig DF.** 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2: 369-374.
- Farmer, EE y Ryan, CA.** 1992. Octadecanoid-derived signals in plants. *Trends Cell Biol* 2: 236-241.

- Ferrer MA, Ros Barceló A** 1994. Genistein as an endogenous natural substrate of acidic peroxidases in lupin hypocotyls. Ann Appl Biol 125: 173-178.
- Fett-Neto AG, DiCosmo F, Reynolds WF, Sakata K** 1992. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. Nat Biotechnol 10:1572-1575
- Fukuda H y Komamine A** 1980. Establishment of a experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from mesophyll cells of *Zinnia elegans*. Plant Physiol 65:57-60.
- Fukuda H, Watanabe Y, Kuriyama H, Aoyagi S, Sugiyama M, Yamamoto R, Demura T, Minami A.** 1998. Programming of cell death during xylogenesis. Journal of Plant Research 111:253–256.
- Fukuda H.** 1996. Xylogenesis: Initiation, progression and cell death. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:299-325.
- Fukuda H.** 2004. Signals that control plant vascular cell differentiation. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5:379–391.
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2005. Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. Plant Physiol 139: 1138-1154.
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Merino F, Cuello J, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2006. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. FEBS Lett 580:4311-4316.
- Gabaldón, C; Gómez Ros, L.V., Pedreño, MA y Ros Barceló, A.** 2005. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. New Phytol 165:121-130.
- Gautheret RJ.** 1939. Sur la possibilité de réaliser a culture indefinite des tissues de tubercules de carotte. C R Hebd Seances Acad Sc 208:118–120.
- Goldberg R, Liberman M, Mathieu C, Pierron M, Catesson AM** (1987). Development of epidermal cell wall peroxidase along the mung bean hypocotyl: possible involvement in the cell wall stiffening process. J Exp Bot. 38:1378-1390.
- Gómez Ros, L.V; Paradiso, A; Gabaldón, C; Pedreño, MA; De Gara, L; and Ros Barceló, A.** 2006. Two distinct cell sources of H₂O₂ in the lignifying *Z. elegans* cell cultura system. Protoplasma 227:175-183.
- Gómez-Ros LV, Gabaldón C, López Núñez-Flores MJ, Gutiérrez J, Herrero J, Zapata JM, Sotomayor M, Cuello J, Ros Barceló A.** 2012. The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains cis-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide. Planta 236:327–342.
- Gómez-Ros LV, Gabaldón C, Pomar F, Merino F, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2007. Structural motifs of syringyl peroxidases pre-date not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. New Phytol 173: 63-78.
- Gómez-Tena M, Pedreño MA, Ros Barceló A y Ferrer MA.** 1994. The subcellular localization of a basic peroxidase isoenzyme in crisphead lettuce. Journal of the American Society for Horticultural Science 119: 1276-1278 .
- Groover, A. y Jones, A.M.** 1999 Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. Plant Physiol 119, 375-384.
- Gutiérrez J, López Núñez-Flores MJ, Gómez-Ros LV, NovoUzal E, Esteban Carrasco A, Díaz J, Sotomayor M, Cuello J, Ros Barceló A.** 2009. Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. Planta 230, 767–778.
- Haberlandt G.** 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien. Math Naturwiss 111:69–92.
- Hendriks T, Van Loon LC** 1990. Petunia preoxidase is localized in the epidermis of aerial plant organs. J Plant Physiol. 136: 519-525.
- Herrera-Estrella L, De Block M, Messens E, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J** 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. EMBO J 2:987–995.
- Jespersen HM, Kjaersgaard IV, Østergaard L y Welinder KG.** 1997. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. Biochem J 326: 305-310.
- Kärkönen A, Koutaniemi S.** 2010. Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures. Journal of Integrative Plant Biol 52:176–185.
- Khosrourshahi AY, Valizadeh M, Ghasempour A, Khosrowshahli M, Naghdibadi H, Dadpour MR, Omidi Y** 2006. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biol Int 30:262-269

- Kögl F y Kostermans DGFR.** 1934. Heterauxin als Stoff-wechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen Isolierung aus Hefe, XIII. Z Physiol Chem 228:113-121.
- Lan WZ, Yu LJ, Li MY, Qin WM** 2003. Cell death unlikely contributes to taxol production in fungal elicitor-induced cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Biotechnol Lett 25:47-49
- Li X, Bonawitz ND, Weng JK y Chapple C.** 2010. The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is independent of flavonoids. Plant Cell 22:1620-1632.
- Lijavetzky, D, Almagro, L, Belchi-Navarro, S, Martínez-Zapater, JM, Bru, R, y Pedreño, MA.** 2008. Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. BMC Research Notes, 1:132.
- López-Serrano M, Fernández MD, Pomar F, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2004. *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. J Exp Bot 55: 423-431.
- McCann MC, Domingo C, Stacey NJ, Milioni D, Roberts K.** 2000. Tracheary element formation in an *in vitro* system. Savidge R, Barnett J, Napier R, eds. Cell and molecular biology of wood formation. Oxford BIOS Scientific Publishers, 457-470.
- McEldoon JP y Dordick JS.** 1996. Unusual thermal stability of soybean peroxidase. Biotechnol Prog 12: 555-558.
- Milioni D, Sado PE, Stacey NJ, Roberts K, McCann MC** 2002. Early gene expression associated with the commitment and differentiation of a plant tracheary element is revealed by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis. Plant Cell 14:2813-2824.
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong FM** 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J Am Chem Soc 77:1392.
- Mingyu C, Quinonero C, Akdemir H, Alburquerque N, Pedreño MA y Burgos L** 2016. Agrobacterium-mediated transformation of *Vitis* cv Monastrell suspension-cultured cells: Determination of critical parameters. Biotechnol Prog (en prensa).
- Morales M, Bru R, García-Carmona F, Ros Barceló A y Pedreño MA.** 1998. Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*. Plant Cell Tiss Org Cult 53: 179-187.
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT.** 2003. Nitric oxide signalling in plants. New Phytol 159 :11-35.
- Nobécourt P.** 1939. Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. C R Séances Soc Biol Fil 130:1270-1271.
- Novo Uzal, E. Gómez Ros, L.V. Hernández, J.A. Pedreño, M.A Cuello J. y Ros Barceló A.** 2009. Analysis of the soluble cell wall proteome of gymnosperms. J Plant Physiol 166: 831-843.
- Novo-Uzal E., Fernández-Pérez F., Herrero J., Gutiérrez J., Gómez-Ros LV., Bernal MA., Díaz J., Cuello J., Pomar F., Pedreño MA.** 2013. From *Zinnia* to *Arabidopsis*: approaching the involvement of peroxidases in lignification. J Exp Bot 64: 3499-3518.
- Obara K, Kuriyama H, Fukuda H.** 2001. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. Plant Physiol 125:615-626.
- Østergaard L, Teilmann K, Mirza O, Mattsson O, Petersen M, Welinder KG, Mundy J, Gajhede M y Henriksen A.** 2000. *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. Plant Mol Biol 44: 231-243.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C** 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Rep 24:255-265.
- Passardi F, Penel C, Dunand C** 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall? Trends Plant Sci 9:534-540.
- Pedreño MA, Bernal MA, Calderón AA, Ferrer MA, López-Serrano M, Merino de Cáceres F, Muñoz R y Ros Barceló A.** 1993. A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in Vitaceae, Solanaceae and Leguminosae en Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology (KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds). 307-314. ISBN 2-88164-006-0.
- Pedreño MA, Morales M, Calderón AA, Zapata JM y Ros Barceló A.** 1996. A *trans*-resveratrol oxidizing basic peroxidase isoenzyme from *Vitis vinifera*. En Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology (C Obinger, U Burner, R Ebermann, C Penel, H Greppin, eds). 338-344. ISBN 2-88164-008-7
- Pedreño, MA, Gabaldón, C, Gómez-Ros, L.V y Ros Barceló, A.** 2006. *In vitro* cell culture systems of *Zinnia elegans*. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical. Vol II, 450-457. ISBN 4-903313-03-4.
- Pesquet E, Ranocha P, Legay S, Digonnet C, Barbier O, Pichon M y Goffner D.** 2005. Novel markers of xylogenesis in *Zinnia* are differentially regulated by auxin and cytokinin. Plant Physiol 139:1821-1839.

- Pomar, F. Caballero, N. Pedreño, MA. y Ros Barceló, A.** 2002. H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. FEBS Lett 529:198-202.
- Ralph J, Peng J, Lu F, Hatfield RD y Helm RF.** 1999. Are lignins optically active? J Agr Food Chem 47:2991-2996.
- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet AM y Goffner D.** 2002. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. Plant Physiol 129:145-155.
- Roberts AW, Koonce LT y Haigler CH.** 1992. A simplified medium for *in vitro* tracheary element differentiation in mesophyll suspension cultures from *Zinnia elegans*. Plant Cell Tiss Org Cult 28:27-35.
- Roberts K y McCann MC.** 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. Curr Opin Plant Biol 3: 517-522.
- Roberts LW, Gahan PB, Aloni R.** 1988. Vascular differentiation and plant growth regulators. Springer-Verlag.
- Ros Barceló A y Pomar F.** 2001. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. Phytochemistry 57: 1105-1113.
- Ros Barceló A, Ferrer MA, García-Florenciano E y Muñoz R.** 1991. The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pI in Lupinus. Bot Acta 104: 272-278.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS y Pedreño MA.** 2004. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? Phytochemistry Rev 3: 61-78.
- Ros Barceló A, Gómez-Ros LV, Esteban Carrasco A.** 2007. Looking for syringyl peroxidases. Trends in Plant Science 12, 486-491.
- Ros Barceló A, Muñoz R, Sabater F** 1987. Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. Physiol Plant 71: 448-454.
- Ros Barceló A, Pomar F y Pedreño MA.** 2000. Competitive inhibitor-dissected histochemistry of the peroxidase responsible for syringyl lignin biosynthesis in *Z. elegans* xylem. Aust J Plant Phys 27: 1101-1107.
- Ros Barceló A, Pomar F, López-Serrano M, Martínez P, Pedreño MA.** 2002a. Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. Plant Physiol Biochem 20, 325-332.
- Ros Barceló A, Pomar F, Ferrer MA, Martínez P, Ballesta MC, Pedreño MA.** 2002b. *In situ* characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. Physiol Plant 114:33-40.
- Ros Barceló A.** 1997. Lignification in plant cell walls. Int Rev Cytol 176: 87-132.
- Ros Barceló, A. Gabaldón, C y Pomar, F.** 2004. Nitric Oxide, Peroxidase and Lignification in Higher Plants. En Nitric Oxide Signaling in Higher Plants. (Eds. J.R. Magalhaes, R.P. Singh and L.P. Passos). 277-308.
- Sabater-Jara AB, Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Palazón J, Pedreño MA, Cusidó RM** 2014. Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures. Plant Biotechnology Journal 12:1075-1084.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB** (1979) Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. Nature 277:665-667
- Schleiden MJ.** 1938. Beiträge zur Phytogenes. Arch Anat Physiol Wiss Med 137-176.
- Schwann T.** 1939. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum des Thiere und Pflanzen. W Engelmann: Leipzig No 176.
- Seguí Simarro, JM.** 2011. El siglo de oro de la biotecnología vegetal. Cien años que han cambiado nuestra visión de las plantas. Ed. Santiago Rey Fernández-Latorre. ISBN 978-84-9757-273-6.
- Skoog F y Miller CO.** 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp Soc Exp Biol 11:118-131.
- Smith, HO. y Wilcox KW.** 1970. A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. J. Mol. Biol. 51:379-391.
- Sottomayor M, de Pinto MC, Salema R, DiCosmo F, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 1996. The vacuolar localization of a basic peroxidase isoenzyme responsible for the synthesis of α-3',4'-anhydrovinblastine in *Catharanthus roseus* (L.) Don leaves. Plant Cell and Environment 19: 761-767.
- Sottomayor M, Ros Barceló A** (1997). What can we learn from α-3',4'-anhydrovinblastine synthase? Recent Res Develop Phytochem Pandalai SG. (Ed.) Research Signpost. India. 1: 225-233.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J.** 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science 258: 1898-1902.
- Tsai AL.** 1994. How does NO activate heme proteins? FEBS Letters 341:141-145.

- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM** 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 44: 135-162.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph y Boerjan W.** 2010. Lignin: Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol* 153: 895-905.
- Vasil, IK.** 2008. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep* 27:1423–1440.
- Watson JD y Crick FHC.** 1953. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1953. 18:123-131.
- Welinder K.** 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF.** 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 7: 449–455.
- Went FW.** 1928. Wuchstoff und Wachstum. *Rec Trav Bot Neerl* 25:1–116.
- White PR.** 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol* 9:585–600.
- Wickremesinhe ERM, Arteca RN** 1993. *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tiss Org Cult* 35:181-193.
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y** 1996. Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol* 14:1129-1132.

Discurso de contestación de la Académica de número

Ilma. Sra. Dña. Francisca Sevilla Valenzuela

Excmo. Sr. Presidente
Ilustrísimos Señores Académicos
Dignísimas Autoridades
Señoras y Señores
Queridos amigos,

Me corresponde el honor y el placer de contestar al discurso de investidura de la Dra. M^a Angeles Pedreño como nueva académica de número de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia. Aparte de darle la más cordial bienvenida en nombre de la Academia, también quiero expresar mi agradecimiento a todos los académicos y al Presidente, por confiar en mí para este discurso de contestación y felicitarnos por este ingreso.

He de comentarles que para mí, este es el primer Discurso de Contestación que hago como académica y que me llena de satisfacción el realizarlo, no solo por la calidad de los méritos científicos logrados por la Dra Pedreño en sus más de 32 años de dedicación a la investigación, desde su incorporación al departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Murcia, sino también porque en este caso se trata de contestar hoy al Discurso de Ingreso de una científica que a lo largo de toda su vida profesional ha mostrado una gran entrega y capacidad de trabajo. Estas cualidades han quedado siempre reflejadas, incluso en situaciones de adversidad (que no han faltado), en las que dio muestra de su elevada capacidad de superación. Todo ello ha fructificado tal y como lo atestigua su “Curriculum Vitae”, en una sobresaliente trayectoria científica en la que de forma eficaz y excelente ha logrado compaginar su labor investigadora con una notable actividad docente, de gestión y difusión científica, méritos

reconocidos a todos los niveles y en las instituciones en las que ha colaborado .

Pero además de lo dicho, deseo expresarles mi satisfacción por su ingreso en la Academia, no solo porque se trate de una científica con calidad contrastada y reconocida, como acabo de comentar, sino porque con su incorporación comienza a cumplirse uno de los objetivos que a corto plazo se habían marcado en la actual etapa de nuestra Academia, esto es, aumentar la presencia en ella de “científicas” de reconocida solvencia y con méritos para ello. La Dra Pedreño es la tercera mujer que entra en la Academia que estoy segura, se enriquece al contar con sus servicios ya que la persona elegida, aportará creatividad e innovación y contribuirá eficazmente a implementar nuestras actividades y futuros logros como académicos, enfocados a la difusión y promoción de la Ciencia en nuestra Sociedad.

La tradición de este tipo de acto establece que mi discurso debe subrayar la relevancia de la aportación de la nueva académica a la disciplina de su especialidad y situar su estirpe intelectual en el contexto de la ciencia y la tecnología de las últimas décadas.

A continuación les presentaré un resumen de la labor científica realizada por la Dra Pedreño a lo largo de su carrera investigadora y que ha merecido nuestro reconocimiento a la hora de proponerla como académica numeraria. Resaltaré aquellos méritos que considero puedan resultar más interesantes, con la certeza de que esta breve muestra dará cumplida cuenta de su brillante trayectoria científica

Actividad Científica

La formación universitaria de la Dra Pedreño transcurrió en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Murcia, obteniendo el título de licenciada en Química en 1984. En ese mismo año ingresó en el Dpto. de Biología Vegetal, en el que comenzó su Tesis Doctoral, trabajo que desarrolló bajo la dirección de los *Drs Muñoz-Girón y García-Carmona*, y que presentó en el año 1988. Su título fue CARACTERIZACIÓN DE ISOPEROXIDASAS DE HIPOCOTILOS ETIOLADOS DE ALTRAMUZ. Este trabajo fue un buen exponente del campo de la Fisiología Vegetal, y el punto de partida de su interés por la investigación en “proteínas vegetales”, que han constituido uno de los temas centrales en el que desde entonces, ha desarrollado parte de su labor investigadora.

En esta etapa, cabe recordar que sus trabajos estaban enmarcados en la Enzimología, que entonces y actualmente, aunque con una clara influencia de la biología molecular y la genética, era un campo muy activo. La formación enzimológica de la Dra. Pedreño comenzó tratando de avanzar en el estudio del papel fisiológico y metabólico de las peroxidases localizadas en la vacuola y en las paredes celulares, estudio que estaba enfocado a dos aspectos diferenciales: El primero centrado en analizar la implicación de estas importantes metaloenzimas en los procesos de formación de ligninas y el segundo, en orden de lectura aunque no de importancia biológica, en la oxidación y degradación de compuestos bioactivos, concretamente fenoles, alcaloides y flavonoides.

El interés en la lignificación no era baladí, considerando que se trata de uno de los procesos fisiológicos que ha hecho posible la colonización del paisaje terrestre por las plantas. En esta investigación, como no podía ser de otra forma considerando la calidad científica de sus directores de Tesis, se abordaron aproximaciones experimentales enfocadas a poder establecer la relación estructura/localización celular/función, que llevaron de forma

paralela a su colaboración con el Dr. García Carmona. Se trataba de relacionar la localización celular, en este caso vacuolar, de la actividad peroxidasa con los procesos de pardeamiento de frutas y hortalizas.

Posteriormente para completar su formación, la Dra Pedreño, realizó una estancia postdoctoral en el laboratorio de Biotecnología Vegetal dirigido por el Prof. Jean-Claude Pech, en Toulouse, referencia internacional ya en aquella época, y uno de los laboratorios pioneros en el análisis y empleo de diversas aproximaciones bioquímicas y biotecnológicas del proceso de maduración de frutos y hortalizas, así como en la producción de metabolitos secundarios.

En este punto quiero hacer una pequeña pausa para comentar que fue en esta época cuando coincidí con la recién nombrada doctora, que enviada por mi querido amigo Alfonso Ros, quiso informarse de la calidad del centro de Toulouse y concretamente del Prof. Pech, como grupo de elección para su formación postdoctoral.

La elección de este laboratorio por la Dra Pedreño fue crucial, puesto que de esa formación surgiría su dedicación posterior a la Biotecnología Vegetal tal y como acaba de exponer en su discurso y constituyó el punto de partida para el establecimiento en el Departamento de Biología Vegetal, de una nueva línea de investigación basada en las ventajas y aplicaciones derivadas del cultivo *in vitro* de células vegetales.

De regreso a la Universidad de Murcia (1990) y debido a sus méritos docentes e investigadores obtuvo el nombramiento de Profesora Titular de Universidad en el área de Fisiología Vegetal (1993), obteniendo posteriormente su habilitación nacional a catedrática de esta área en el año 2004, realizando la toma de posesión en 2006.

LÍNEAS FUNDAMENTALES DE INVESTIGACIÓN DESARROLLADAS

A continuación voy a detallar algo más algunos aspectos de sus líneas de investigación. Comenzaré haciendo alusión a que en general la ciencia actual es fruto de grupos de investigación bien compenetrados y la Dra. Pedreño, ha tenido y tiene un elevado número de buenos colaboradores, con los que ha compartido conocimientos y que ha derivado en unos resultados innovadores en sus trabajos de investigación.

En el campo de la enzimología y del estudio funcional de proteínas, el hecho establecido de la influencia que la localización subcelular de una proteína tiene como factor determinante en su funcionalidad biológica, llevó a la Dra. Pedreño a profundizar en este aspecto, empleando para ello los conocimientos y técnicas desarrolladas en su estancia en el Laboratorio del Prof. Pech.

Tal y como ha comentado en su charla, su principal contribución en esta línea fue el establecimiento de un modelo para la compartimentación de las isoenzimas de peroxidasa en los tejidos vegetales, que llevó al resultado pionero de identificar la localización vacuolar específica para las isoenzimas fuertemente básicas y del papel crucial de las mismas en las rutas de biosíntesis y degradación de compuestos de naturaleza fenólica.

En este apartado es importante resaltar que la evidencia comentada por la Dra Pedreño sobre el papel ejercido por las peroxidases de pared celular en el proceso de lignificación, constituye uno de los ejemplos más interesantes en los que la función celular de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y de estas enzimas, es indispensable y beneficiosa en un proceso de importancia capital para las plantas. Estos hechos, junto a los hallazgos destacados que describen la presencia y funcionalidad de este tipo de peroxidases en especies de plantas filogenéticamente distantes

como *Ginkgo biloba*, especie con caracteres pseudo-vasculares hasta angiospermas más evolucionadas como *Zinnia elegans*, reflejan sin duda que este conservacionismo evolutivo está relacionado con la participación funcional de las peroxidases fuertemente básicas en el proceso de la lignificación de la pared celular.

Queda claro el hecho de que la redundancia de isoformas en familias enzimáticas concretas, no es un “capricho biológico” por expresarlo de forma tan poco ortodoxa, sino que responde a demandas evolutivas y funciones celulares específicas. No pretendo sin embargo ser dogmática en esta afirmación, y como tal, admito que nuevas evidencias científicas pudieran cambiarla y por ende habría que aceptarlas. Dicho esto, lo que si que ya no sería susceptible ni merecedor de cambio es el reconocimiento que las contribuciones derivadas de esta investigación tuvieron, por la Federación de Sociedades Europeas de Fisiología Vegetal, otorgándole a la Dra Pedreño, el premio de Jóvenes Investigadores en 1994.

En estos últimos años, la continuación de esta línea de investigación básica por el grupo de trabajo que dirige, ha permitido establecer también el papel relevante de las especies reactivas del nitrógeno (RNS) junto a las del oxígeno, en el proceso de xilogénesis, ampliando así la información sobre los mecanismos implicados en ella, lo que ha contribuido contribuyendo de forma pionera a establecer parte de los procesos de señalización que relacionan la muerte celular programada con la lignificación.

El discurso de la nueva académica nos ha permitido también tener una amplia perspectiva del que constituye el “leit motiv” de su actividad investigadora actual: Las diversas ventajas que presentan los cultivos en suspensión de células vegetales que los hacen adecuados para la producción de compuestos bioactivos y proteínas. Como vemos, se trata

de estudios de carácter básico a los que ha sabido dar un giro aplicado, que resulta modélico para el abordaje de demandas específicas del entorno social.

Evidentemente uno de los aspectos característicos de las plantas es su capacidad para sintetizar una enorme variedad de compuestos que realizan una función esencial en la supervivencia de las mismas. Este hecho constituye uno de los pilares en los que se sustenta el empleo de los cultivos celulares como biofactorías para la producción de metabolitos secundarios y proteínas. Las ventajas de estos cultivos derivan fundamentalmente de su crecimiento en condiciones asépticas, empleando la tecnología de fermentación clásica, que los hace idóneos para la producción a gran escala, y al hecho de que los requisitos necesarios para su empleo como biofactorias sean muy similares a los establecidos en los sistemas de producción bien caracterizados, como son los sistemas microbianos y los de células de mamífero.

Este área emergente y con gran potencial de crecimiento, representa una alternativa a los procesos de obtención de estos metabolitos a partir de materia prima vegetal, de síntesis química convencional y/o de transformación genética. De hecho, como hemos podido deducir a lo largo de la charla de la Dra Pedreño, una de las ventajas primordiales de estos cultivos “in vitro” radica en que son sistemas de producción estables y sostenibles ya que aseguran la obtención continua de compuestos bioactivos y proteínas, con calidad y productividad uniformes con independencia de la localización geográfica y de las condiciones ambientales.

Es comprensible que estos fundamentos sean los que han llevado al estudio de la optimización de los cultivos celulares por parte de la Dra Pedreño para el empleo de estas biofactorías en la producción de

compuestos de alto valor añadido, entre ellos: vitamina E, carotenoides, fitoesteroles, estilbenoides como el resveratrol y taxanos como el taxol y sus derivados. Las aplicaciones específicas de los mismos derivadas de su gran interés industrial, residen en su empleo como principios activos para la elaboración de fármacos, como aditivos alimentarios y como nutracéuticos junto a su utilización en la industria cosmética, debido fundamentalmente a sus propiedades antioxidantes.

Pero a pesar de las ventajas descritas, el interés de los cultivos celulares vegetales en ciertas etapas, se ha visto desplazado en gran medida en comparación con el empleo de las plantas transgénicas y los sistemas de expresión transitoria de origen vegetal más recientes. Si bien esta tendencia ha sufrido un notable giro y el avance experimentado por esta tecnología, se ha comparado recientemente con el del empleo de “*células de ovario de hámster chino*”, actualmente la plataforma de fabricación más extendida y exitosa para productos biológicos.

Estoy convencida de que en este cambio de tendencia no pueden obviarse las aportaciones derivadas de la investigación realizada por el grupo de la Dra. Pedreño.

Como ejemplo interesante del creciente interés del empleo biotecnológico de la plataforma de células vegetales, les voy a comentar que recientemente la **Food and Drug Administration (FDA) USA**, ha aprobado por primera vez, un fármaco producido en cultivos en suspensión de células vegetales, concretamente de zanahoria, específico para pacientes afectados con la “**enfermedad de Gaucher**”. El fármaco en cuestión, llamado **Elelyso®** y químicamente conocido como **taliglucerase**, ha sido desarrollado por científicos de la compañía de biotecnología **Protalix Biotherapeutics Inc. (PLX)** de Israel, que

desarrollaron un método para la fabricación a partir de células de zanahoria modificada genéticamente, de “**glucocerebrosidasa**”, la enzima deficitaria en los afectados por esta enfermedad.

El producto resultante, es mucho más económico (aproximadamente un 25% más barato) y fácil de desarrollar que los medicamentos más empleados hasta ahora (Genzyme® en EEUU y Shire ® en Irlanda), producidos a partir de cultivos de células de mamífero, y que están expuestos a la contaminación por virus y otros patógenos, factores que no son tan determinantes en el caso de que los fármacos procedan de cultivos de células vegetales.

La enfermedad de Gaucher está considerada debido a su baja prevalencia, una enfermedad rara y se incluye dentro del grupo de las lipidosis. Concretamente estoy hablando de una enfermedad de almacenamiento lisosómico, de herencia autosómica recesiva, debida a un acumulo de glucocerebrósidos en órganos como el bazo, el hígado, huesos, médula ósea, riñones y otras partes del cuerpo por déficit de la enzima glucocerebrosidasa, presentando los pacientes síntomas como anemia, agrandamiento del bazo y el hígado, dolor de huesos y articulaciones, entre otros.

De acuerdo con la información aparecida en la revista financiera digital Bloomberg, las acciones de la empresa Protalix BioTherapeutics subieron un 27 por ciento en las operaciones electrónicas, después de que la farmacéutica obtuviera la aprobación para su entrada en el ámbito médico con el tratamiento citado. Creo que es un importante ejemplo de la potencialidad de las aplicaciones biotecnológicas del cultivo de células vegetales.

En este contexto y refiriéndome de nuevo al desarrollo de la línea de investigación en biotecnología vegetal por parte de la Dra Pedreño , comentar que junto a un número elevado de publicaciones científicas a las

que me referiré a continuación, ha permitido una importante transferencia de tecnología basada en el desarrollo de varias patentes nacionales e internacionales, así como al mantenimiento de contratos y a la investigación conjunta con empresas, entre ellas, AMC Grupo Alimentación, Viveros Bermejo, ALIMER, Phyture Biotech, y Agrícola Santa Eulalia, reflejando el interés científico y comercial de su investigación.

CALIDAD CIENTÍFICA DE LA Dra PEDREÑO

Ahondando sobre ello, como último apartado de este discurso, voy a hacer una breve referencia a la calidad científica de la nueva académica.

Los resultados obtenidos descritos en detalle en un total de 104 publicaciones en revistas recogidas en la web of science, y en una veintena de capítulos de libros y revisiones, con más de 2100 citas por parte de otros investigadores, lo que se traduce en un índice de Hirsch de 26.

Estos méritos científicos han merecido la confianza y el apoyo de las agencias financiadoras nacionales y regionales, traducida en 17 proyectos financiados por los ministerios sucesivos, junto a 6 regionales, en los que en su mayor parte ha participado como investigadora principal. Añadir que la nueva académica forma parte de la Red Temática CYTED para el aprovechamiento de subproductos, en la que participa como única representante española junto con grupos de cinco países de Iberoamérica y Portugal y ha sido miembro del Comité de Gestión (representante española) de la acción europea COST FA1006. La colaboración científica con algunos miembros del consorcio dio lugar a resultados innovadores que se tradujeron en la obtención de una nueva patente, y posteriormente, en una publicación en una de las revistas científicas de mayor prestigio, los *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*.

Por otro lado, a nivel regional me gustaría destacar el hecho de que el grupo de investigación de la Dra Pedreño forma parte de uno de los “Grupos de Excelencia” elegido por la Fundación Seneca en su pasada convocatoria de 2015 lo que supone estar entre los 24 mejores grupos de investigación a nivel regional.

En relación a la transferencia de tecnología a empresas, sus méritos han sido objeto de reconocimiento por el Centro Europeo de Empresas e Innovación de Murcia (CEEIM), que otorgó a la Dra Pedreño el “*Primer Premio de Investigación Aplicada en Empresas en 2009*”.

Es destacable también el “*Premio a la Investigación*” financiado por la Fundación Lavoisier que recibió en 2013 por el *Estudio de las defensas inducidas por elictores en cultivos de células vegetales*, actividad enmarcada en la línea de investigación actual.

No querría finalizar este apartado sobre la capacidad científica de la nueva Académica sin hacer mención expresa a otros aspectos que, para mí, son de considerable interés, por la importante y a veces poco reconocida, dedicación que requieren. En este sentido hacer hincapié en el hecho de su contribución en actividades formativas y en las relacionadas con la difusión de la Ciencia. Ha participado activamente en impartir cursos de formación dirigidos a diferentes estamentos (personal de laboratorio, profesores de bachillerato y profesionales de entidades privadas) y ha dirigido e impartido docencia en cursos de formación del Servicio de Promoción Educativa (2004-2009), centrados en *Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas*. El éxito de estos cursos fue el núcleo generador del actual Master de *Biotecnología y Biología del Estrés de Plantas* de la Universidad de Murcia y en el que participan también grupos del CEBAS, que se inició en 2010 y continúa en la actualidad.

Indicar también que desde el año 2007 el grupo de investigación de la Dra Pedreño participa como el único representante de investigación en plantas,

en el Master de *Biología Molecular y Biotecnología* impartido en esta Universidad. Esta actividad formadora de los futuros doctores en el campo de la Biotecnología Vegetal se ha extendido a otros Centros de Investigación (CRAG, Barcelona) y otras Universidades, en las que ha impartido clases de master, entre ellas se incluyen la Universidad de La Coruña, la Universidad Jaume I de Castellón y la Universidad de Valladolid.

Unido a ello comentarles también su experiencia de Gestión Científica. En este aspecto destacar su contribución como Miembro Vocal de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (2009-2013), y su participación como Adjunta del Área ANEP: Biología Animal, Vegetal y Ecología, concretamente para la gestión de proyectos y como experta en Fisiología y Biotecnología Vegetal en los Programas Nacionales de Biotecnología, Agricultura, y Biología Fundamental y de Sistemas, desde 2006 hasta 2011. En estas mismas fechas también fue miembro de la Comisión de Evaluación de los Programas Ramón y Cajal y Juan de la Cierva. En la actualidad continúa colaborando con la ANEP como evaluadora en los diferentes Programas de Investigación así como con otras agencias extranjeras de investigación, como la francesa y la italiana.

Finalmente, en este apartado quiero hacer una breve referencia a su importante labor de difusión de la Ciencia. En este sentido, no creo pertinente el enumerarles detalladamente su amplia participación en Mesas Redondas, Seminarios y Conferencias en diversos Centros de Investigación e Institutos de Secundaria, junto con su contribución en la Semana de la Ciencia y la Tecnología, La Noche de los Investigadores, diferentes Workshops o el envío de comentarios científicos a la Unidad de Cultura Científica y Promoción de la Investigación, de la Universidad de Murcia, así como la autoría de artículos en prensa. Sin embargo, sí que considero interesante destacar su entrega desde 2004 al desarrollo del actual Círculo

de Innovación de Biotecnología de la Región de Murcia (Foro Biomur) patrocinado por la Fundación Séneca.

En suma, creo que a estas alturas de mi intervención, resulta innecesario seguir ahondando en los muchos méritos de la Dra. Pedreño que la hacen sobradamente acreedora a su entrada en esta Academia. Esta Academia no solo no ha cometido un error sino que ha acertado al elegir a una científica de su nivel, y cumple ampliamente con su mandato, reflejado en el Artículo 8 punto 4 de sus estatutos, que le obliga a elegir personas con una cualificación relevante en la instancia siguiente: ***“Haberse distinguido con publicaciones originales de importancia en cualquiera de las Ciencias de que se ocupa la Academia”*** Considero que a la nueva académica le adornan estas características en el ámbito de la Biología Vegetal, cumpliendo sobradamente estos requisitos. Le doy por tanto mi más cordial bienvenida y mi enhorabuena. Aún a sabiendas de que los detalles finos de la conducta de un ser vivo son impredecibles, estoy segura de su importante participación en los logros futuros de nuestra institución, como indiqué inicialmente.

Finalizo haciendo referencia a una reciente crítica literaria a la última novela de la escritora Lola López Mondéjar, que empezaba así: ***“interesar, agitar el ánimo, provocar la reflexión, son algunos de los efectos benéficos de la buena literatura y es lo que logra la escritora en su novela”***... Obviamente no es mi intención comparar este pequeño discurso con la importante e interesante obra literaria a la que me he referido, pero sí me agradaría que al menos haya conseguido el interés de todos ustedes.

Muchas gracias a la audiencia

He dicho

Francisca Sevilla Valenzuela

