

# Regulación transcripcional de genes involucrados en la producción de alcaloides indol-terpenoides en plántulas de *Catharanthus roseus*

## Transcriptional regulation of genes involved in terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* seedlings

Pedro J. Rocha S\*., MarkJ. Leech\*\*

### RESUMEN

*Catharanthus roseus* es una planta medicinal productora de varios alcaloides indol-terpenoides (AIT) con actividad farmacológica. Empleando plantas y cultivos celulares de *C. roseus* la ruta biosintética de AIT ha sido determinada, además, un considerable número de sus enzimas ha sido caracterizado y sus respectivos genes clonados. La producción de AIT en plantas y cultivos celulares de *C. roseus* está altamente regulada a nivel transcripcional, es dependiente de los estados de desarrollo y puede ser alterada, entre otros factores, por sometimiento a estrés luminoso y tratamiento con elicitores bióticos y abióticos. Estudios sobre la regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de AIT han sido llevados a cabo en cultivos celulares, sin embargo poco se conoce acerca de la regulación de los mismos en plantas. En los experimentos reportados aquí, se presenta un examen cualitativo de los niveles de expresión de los genes *idc*, *strl*, *d4h* y *dat* que codifican enzimas importantes en la biosíntesis de AIT en plántulas de *C. roseus* en una serie de desarrollo que comprende 0 a 18 días. Además, se analiza el efecto del estrés hídrico, luminoso y de la elicitación con metil jasmonato (MeJa) y ácido acetil salicílico (ASA). La comparación entre la evidencia experimental obtenida con plántulas en el presente artículo y los datos reportados en estudios con suspensiones celulares sugiere que la regulación transcripcional de algunos genes difiere de manera considerable.

**Palabras clave:** *Catharanthus roseus*, regulación transcripcional, alcaloides indol-terpenoides.

### ABSTRACT

*Catharanthus roseus* (L.) G Don is a medicinal plant that produces a variety of terpenoid indole alkaloids (TIAs), some of which display pharmacological activity. *C. roseus* plants and cell cultures have been used to elucidate the TIAs biosynthetic pathway. A considerable number of enzymes have also been characterised, and their respective genes cloned. TIAs production in *C. roseus* plant and cell cultures is highly regulated at transcriptional-, developmental-, and environmental-level. Studies into TIAs biosynthetic gene regulation have been carried out using cell cultures. However, regulation in plants is almost unknown. Here, biosynthetic genes *idc*, *strl*, *d4h* and *dat* expression levels are qualitatively examined in a developmental series of *C. roseus* seedlings. The effect of water- and light-stress and methyl jasmonate (MeJa) and acetyl salicylic acid (ASA) elicitation is also examined. Comparison between seedlings and cell cultures strongly suggests that TIAs biosynthetic gene transcriptional regulation is different in *C.roseus* plants and cell cultures.

**Key words:** *Catharanthus roseus*, transcriptional regulation, terpenoid indole alkaloids (TIAs).

---

\* PhD. Investigador Titular Cenipalma. Calle 21C No. 42C-47. Bogotá, Colombia. Tel. 2089680. Fax. 3681152.

E-mail: pedrojrochasalav@hotmail.com, pedro.rocha@cenipalma.org

\*\* Líder de grupo; John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, Reino Unido

**Recibido:** octubre 30 de 2001; **aceptado:** noviembre 8 de 2002

## INTRODUCCIÓN

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don es una planta medicinal de la familia Apocynaceae, originaria de Madagascar, y productora de más de 120 alcaloides (Van der Heijden *et al.* 1989; Moreno *et al.* 1995), 70 de los cuales poseen actividad farmacológica, en especial los alcaloides indol terpenoides (AIT). Los AIT han sido aislados principalmente de las familias *Loganiaceae*, *Apocynaceae* y *Rubiaceae*, todas del orden Gentianales (Roberts 1998). Entre los ejemplos más notables de AIT se encuentra la vinblastina y la vincristina. La vinblastina es efectiva en el tratamiento de tumores testiculares avanzados, carcinoma de seno, coriocarcinoma, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Letterer-Siwe y enfermedad de Hodgkin. La vincristina es empleada para tratar la leucemia linfocítica aguda y atacar linfomas incluyendo tumores sólidos infantiles (Loo y Freireich 1995). Se ha demostrado que la acción biológica de la vinblastina y la vincristina se debe a su unión específica con la tubulina, la proteína precursora de microtúbulos responsables de la mitosis y de otras funciones celulares vitales tales como el transporte de sustratos, la movilidad celular y la integridad estructural. Por su efectividad, el consumo de vinblastina y vincristina se ha incrementado progresivamente. Sin embargo, estas sustancias se producen y acumulan de manera exclusiva en plantas de *C. roseus* y sólo en cantidades traza, alrededor del 0.0005% del peso seco (Van der Heijden *et al.* 1989), haciendo su extracción difícil y costosa. La baja producción de vinblastina y vincristina, el alto valor en el mercado y su eficacia en diferentes tratamientos médicos han fomentado la investigación para determinar su biosíntesis y desarrollar métodos alternativos de producción.

La ruta de biosíntesis de vinblastina, vincristina y demás AIT en *C. roseus* ha sido estudiada desde hace varias décadas empleando plántulas y cultivos celulares (Figura 1). Como resultado de tales estudios, la mayoría de sus estructuras químicas han sido determinadas, más de 20 pasos enzimáticos han sido caracterizados y algunos de sus genes clonados. Por ejemplo, los ADN complementarios (ADNc) para los genes *tdc*, *str1*, *d4h* y *dat* que codifican para las enzimas triptófano decarboxilasa (TDC, EC 4.1.1.28), estrictosidina sintasa (STR1, EC 4.3.3.2), deacetoxivindolina-4-hidroxilasa (D4H, EC 1.14.11.11) y acetil CoA:deacetilvindoline-4-O-acetiltransferasa (DAT, EC

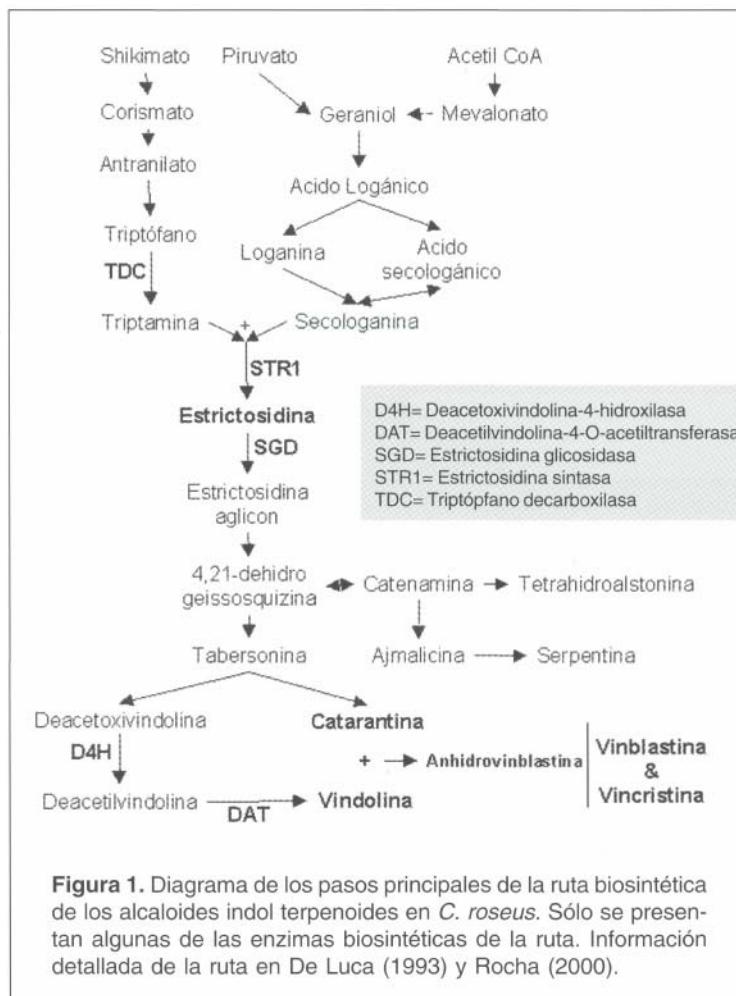


Figura 1. Diagrama de los pasos principales de la ruta biosintética de los alcaloides indol terpenoides en *C. roseus*. Sólo se presentan algunas de las enzimas biosintéticas de la ruta. Información detallada de la ruta en De Luca (1993) y Rocha (2000).

2.3.1.107), respectivamente, han sido aislados de *C. roseus* y, en consecuencia, están disponibles para ser incorporados en programas de ingeniería genética (revisado por Verpoorte *et al.* 1999; De Luca 1993).

Se ha demostrado que la biosíntesis de AIT en *C. roseus* se encuentra bajo estricto control a nivel de células, tejidos y órganos (St-Pierre *et al.* 1999; Rocha 2000), además depende en gran medida de los estados de desarrollo propios de la planta y del medio ambiente circundante (revisado por De Luca y St-Pierre 2000). Varios estudios han abordado la regulación de algunos de los genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de AIT y recientemente se han elucidado algunos de los mecanismos moleculares que controlan la expresión de genes en cultivos de células en suspensión en *C. roseus* (Figura 2, Van der Fits y Memelink 2000). Sin embargo, la evidencia experimental reportada en el presente artículo sugiere que la regulación transcripcional de algunos genes difiere de plantas a cultivos celulares.

## Biosíntesis de los alcaloides indol terpenoides

El primer paso en la biosíntesis de AIT es la formación de triptamina (De Luca 1993) a partir del amino ácido L-triptófano en una reacción catalizada por la enzima TDC (Figura 1). Esta enzima citosólica une al metabolismo primario con el secundario y su actividad ha sido considerada como un paso limitante, aunque no el único, en el control de la biosíntesis de AIT (Knobloch and Berlín 1981; Goddijn *et al.* 1995). Otro paso limitante en la biosíntesis es la unión de la triptamina al monoterpeno secologanina, el producto final de la ruta biosintética de los iridoides, en una reacción catalizada por la enzima STR1. La condensación de triptamina con secologanina resulta en la formación de estrictosidina, el intermediario central en la biosíntesis de todos los tipos de alcaloides indol. Subsecuentemente, la estrictosidina es metabolizada a través de diferentes varios pasos enzimáticos, incluidos aquellos catalizados por las enzimas D4H y DAT que conllevan a la formación de vindolina y catarantina, los alcaloides monoterpenoides precursores de la vinblastina y la vincristina. (De Luca *et al.* 1988; De Luca *et al.* 1986).

## Regulación de los genes *tdc*, *str-1*, *d4h* y *dat* en *C. roseus*

La regulación de los genes y las enzimas que participan en la biosíntesis de AIT en *C. roseus* es dependiente del sistema biológico empleado, es decir difiere de cultivos celulares a plantas y dentro de estas depende del tejido y estado de desarrollo analizados. Además, se ha observado que los mecanismos moleculares de regulación responden de manera diferente a la presencia de elicitores o a condiciones de estrés luminoso y hormonal, entre otros (Verpoorte *et al.* 1999).

### *tdc* y *str1*

En plantas de *C. roseus*, niveles altos de los ARNm para *tdc* y *str1* han sido observados en raíces (Pasquali *et al.* 1992) y en hojas, estos últimos inducidos por luz UV (Meijer *et al.* 1993). Los transcritos *tdc* y *str1* y sus respectivas proteínas exhiben alta especificidad celular y tisular, por ejemplo, han sido detectados exclusivamente en la epidermis superior e inferior de las hojas, en la epidermis de tallos y en primordios florales (St-Pierre *et al.* 1999).

En cultivos celulares de *C. roseus*, *tdc* y *str1* están altamente regulados a nivel transcripcional. La expresión de estos dos genes es inhibida por la presencia de auxinas (Goddijn *et al.* 1992; Pasquali *et al.* 1992) aunque es inducida por elicitación con hongos, extractos de levadura (Menke *et al.* 1999a; Pasquali *et al.* 1992; Roewer *et al.* 1992), metiljasmonato (MeJa), ácido salicílico y quitosán (Menke *et al.* 1999a y 1999b). Estos resultados han sugerido que la expresión de *str1* y *tdc* en cultivos celulares de *C. roseus* es regulada de una manera coordinada por mecanismos moleculares similares.

Se ha determinado la presencia de algunos elementos que responden a la elicitación en el promotor del gen *tdc*. El análisis de la arquitectura de este promotor usando fusiones *tdc-gusA* en tabaco transgénico, mostró que la región comprendida entre las posiciones -538 y -112 es determinante para controlar los niveles de expresión en diferentes órganos de la planta (Ouwkerk y Memelink 1999b). Además, tres regiones funcionales de este promotor fueron identificadas a partir de la posición -160. Una región entre las posiciones -160 y -99 incrementó la transcripción y dos regiones, una entre -99 y -87 y la otra entre -87 y -37 respondieron de manera diferente frente a la elicitación (Ouwkerk y Memelink 1999b).

Para determinar los mecanismos regulatorios de *str1*, deleciones progresivas en la región 5' del promotor de *str1* fueron unidas al gen reportero (3-glucuronidasa (*gusA*) y su actividad estudiada en tabaco transgénico (Pasquali *et al.* 1999). El análisis del promotor del gen *str1* de *C. roseus* mostró que las secuencias activadoras se encuentran localizadas entre las posiciones -339 y -145 (Pasquali *et al.* 1999). En otros experimentos, Menke *et al.* (1999a) demostraron que la ruta biosintética del jasmonato (ruta del ácido octadecanoico) era una parte integral de la ruta de transducción de señales que conlleva a la expresión de los genes *tdc* y *str1* en células en suspensión de *C. roseus*. La expresión del promotor del gen *str1* en cultivos celulares transgénicos de *C. roseus*, transformados con una construcción conteniendo la fusión *str1/gusA*, mostró que un fragmento del promotor de *str1* localizado en la posición -396 es suficiente para inducir la expresión del gen *gusA* en respuesta al MeJa (Menke *et al.* 1999a). En un reporte subsecuente, Menke *et al.* (1999b) identificaron un elemento de 42 pares de bases (pb) dentro del fragmento de 396 pb, el elemento de respuesta al elicitador y al jasmonato (llamado JERE, por *Jasmonate- and Elicitor-Res-*

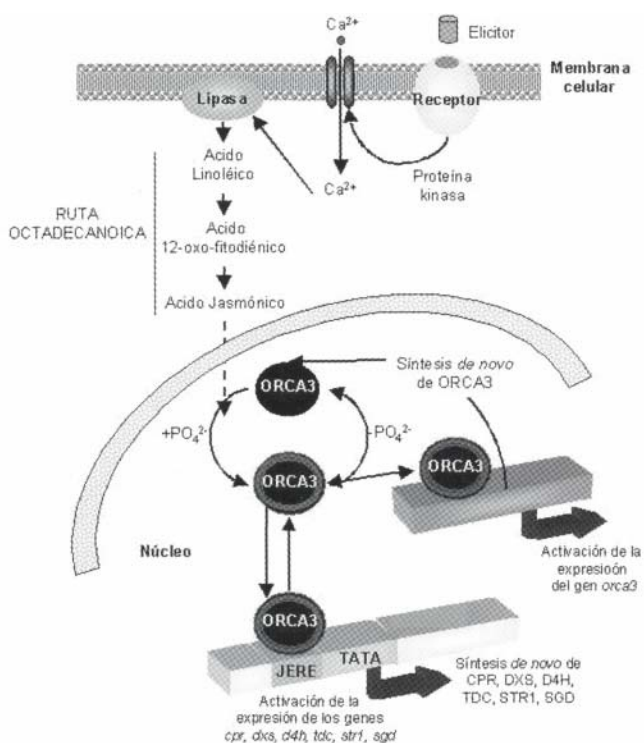
*ponsive Element*). La región JERE presentó una secuencia GCC en el promotor *str1* que fue necesaria y suficiente para la expresión del gen ante el tratamiento con jasmonato y elicitors (Menke *et al.* 1999b). Usando el sistema de hibridación del doble híbrido y la región JERE como "anzuelo" se aislaron dos ADNc que codificaron proteínas ORCA (por *Octadecanoic-derivative Responsivo Catharanthus AP2-domain*, Menke *et al.* 1999b). El dominio AP2 se encuentra de manera exclusiva en factores de transcripción vegetales y está involucrado en la regulación de varios tipos de respuestas a estrés. En cultivos de células en suspensión de *C. roseus*, la expresión de *str1* debida al efecto del jasmonato es mediada por la proteína ORCA2 (*ORCA protein2*). Además, la expresión de su transcrito, *orca2*, fue inducida por elicitors, incluyendo extracto de levadura y MeJa (Menke *et al.* 1999b). Recientemente, se ha descubierto un nuevo factor de transcripción (ORCA3) en cultivos de células en suspensión de *C. roseus*. ORCA3 regula de manera coordinada múltiples genes (Figura 2), incluyendo *dxs*, *tdc*, *str1*, *sgd*, *cpr* y *d4h*, los cuales codifican enzimas de rutas tanto del metabolismo primario como secundario

relacionadas con la formación de AIT (Van der Fits y Memelink 2000).

### **d4h y dat**

En plántulas de *C. roseus*, *d4h* es inducido por presencia de luz y sus niveles de transcripción se incrementan después de tratamiento con MeJa (Vázquez-Flota y De Luca 1998b). Estudios de hibridación *in situ* e inmunolocalización han mostrado que *d4h* y su proteína están localizados en células especializadas (laticíferos e idioblastos) presentes en hojas jóvenes, tallos y primordios florales de plantas de *C. roseus* (St-Pierre *et al.* 1999). Tanto los transcritos del gen *dat* como su proteína se co-localizan con *d4h* y D4H en laticíferos e idioblastos (St-Pierre *et al.* 1999). Adicionalmente, estudios con plantas intactas y plántulas han mostrado que la inducción del ARNm de *dat*, la acumulación y la actividad de DAT se presentan preferencialmente en hojas y cotiledones de plantas etioladas tratadas con luz, pero no se presentan ni en raíces ni en cultivos de células en suspensión, lo cual explica la imposibilidad de producir vinblastina y vincristina en sistemas celulares (Vazquez-Flota y De Luca 1998a; St-Pierre *et al.* 1998).

En resumen, la regulación de algunos de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de alcaloides indol terpenoides ha sido relativamente bien estudiada en cultivos de células en suspensión de *C. roseus*. Sin embargo, los cultivos celulares no han podido ser incorporados en estrategias de producción masiva de compuestos valiosos y la fuente de estos continua siendo la planta. Con el objetivo de estudiar los patrones de expresión de genes biosintéticos involucrados en el metabolismo de AIT en un sistema alternativo a cultivos celulares, en el presente artículo se reportan los patrones de expresión de los genes *tdc*, *str1*, *d4h* y *dat* en plántulas de *C. roseus* en una serie que comprende diferentes estados de desarrollo y tratamientos de elicitación. Estos datos se comparan con aquellos reportados en la literatura para cultivos celulares.



**Figura 2.** Modelo del posible mecanismo de transducción de señales mediadas por elicitors y su efecto sobre la expresión de genes biosintéticos involucrados en la síntesis de AIT. Basado en Van der Fits y Memelink (2000)

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Germinación de semillas**

Semillas de *C. roseus* (L.) G. Don cv. Little Delicata fueron obtenidas de J. Moles & Son (Colchester, UK). Más de 500 semillas fueron desinfectadas en etanol absoluto durante un minuto, se-

guido por incubación en hipoclorito 20% durante 15 minutos y abundantes lavados con agua estéril. Para romper la dormancia de las semillas fue necesario mantenerlas en la oscuridad e hidratarlas durante 4 días. Para su hidratación, las semillas fueron colocadas en cajas Petri de 150 mm, conteniendo discos de papel filtro estéril, e incubadas a 25°C en la oscuridad durante 4 días antes de ser transferidas a un régimen diario de 16 horas de luz (flujo fotónico de 55 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 8 de oscuridad. El instante en el que las semillas fueron transferidas a la luz se consideró como el punto de partida (día cero) para todos los experimentos controlados, incluyendo los de elicitación. Cuarenta plántulas de 4, 6, 10, 12 y 18 días de edad fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C para posterior extracción del ARN.

### Tratamiento de plántulas de *C. roseus* con MeJa y ASA

Cuarenta plántulas de 9 días de edad fueron incubadas en presencia de 4 ppm de vapor de metil jasmonato (MeJa, Aldrich) durante 24 horas a 25°C bajo el régimen de luz ya mencionado). Un volumen de 2ml de 95% MeJa fue agregado a 98µl de etanol absoluto. Un volumen de 10µl de esta solución fue vertido en la tapa de un tubo eppendorf. Cuatro tapas fueron colocadas dentro de cada caja Petri de 150mm. Simultáneamente, otro grupo de 40 semillas fue incubado durante 24 horas en una caja Petri conteniendo papel filtro estéril regado con 5µl de una solución ácido acetil salicílico (ASA) 10mM. Las plántulas fueron incubadas a 25°C bajo el régimen de luz previamente descrito.

Cuando el estrés luminoso fue aplicado en plántulas de 6 días de edad (Tabla 1), los correspondientes grupos de semillas fueron incubados, desde el día cero, a 25°C bajo un régimen de oscuridad total. Un grupo de 40 semillas se germinó sobre papel humedecido con mínima cantidad de agua. Estas semillas fueron recolectadas después de 4 días.

El grupo de plántulas de 10 días de edad fue germinado bajo condiciones de humedad y al día 10 transferidas a papel filtro seco e incubadas durante 48 horas bajo el régimen de luz mencionado anteriormente. Tres replicas de 40 plántulas por muestra fueron utilizadas por cada tratamiento. Resumen de los tratamientos utilizados se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Resumen de los tratamientos experimentales empleados con plántulas de *C. roseus* en diferentes estados de desarrollo.

Muestra	Día de Cosecha	Tratamientos			
		Agua	Luz	ASA	MeJa
A	0	-	-	-	-
B	4	+	+	-	-
C	4	-	+	-	-
D	6	-	-	-	-
E	6	-	+	-	-
F	10	-	+	-	-
G	10	-	+	+	-
H	10	-	+	-	+
I	12	-	+	-	-
J	12	+	+	-	-
K	18	-	+	-	-

### Análisis de ARN

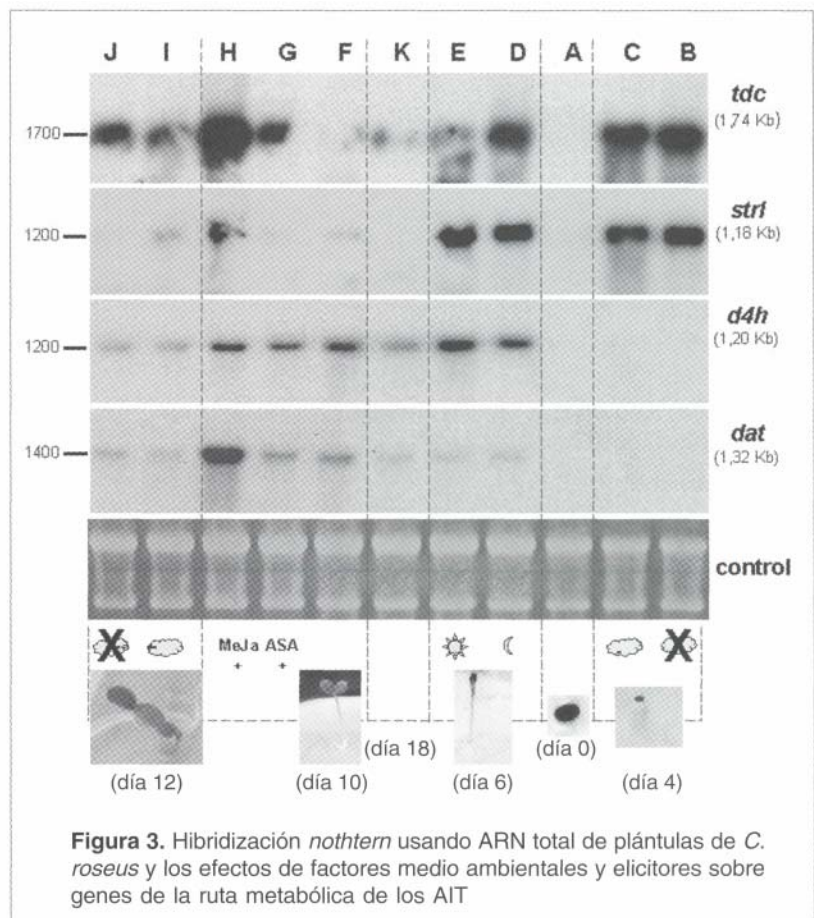
ARN total fue extraído de 2g (peso fresco) de plántulas de *C. roseus* (muestras A-K, Tabla 1) usando el reactivo Trizol (Gibco BRL) y posteriormente separado usando geles de agarosa bajo condiciones denaturantes según el procedimiento de formaldehído-formamida (Sambrook *et al.* 1988). Las muestras de ARN fueron separadas a 5V cm<sup>-1</sup> usando tampón MOPS 1X. La transferencia capilar se hizo usando membranas de nylon Hybond-NX (Amersham) y SSC 10X como solución de transferencia. El ARN se transfirió durante toda la noche y posteriormente se fijo a la membrana usando luz UV (120000 µJ, Stratalinker, Stratagene). Los filtros conteniendo ARN fueron humedecidos en SSC 2X e incubados en solución de hibridación (SETS 4X, solución de Denhardt 10X, SDS 0.1% (peso/volumen) y dextran sulfato 0.1g ml<sup>-1</sup>). Como sondas, clones de los ADN complementarios (ADNc) de los genes *tdc*, *str1*, *dat* y *d4h* de *C. roseus* (amablemente cedidos por el Dr Daniel Burtin, John Innes Centre) fueron marcados radioactivamente con α[<sup>32</sup>P]-dCTP (Feinberg y Volgestein 1993). Los nucleótidos no incorporados fueron removidos utilizando columnas de sefarsa. Cada sonda de ADN fue denaturada por incubación en un volumen de NaOH 1N durante 1 minuto a temperatura ambiente, seguido por neutralización con un volumen de HCl 1N y un volumen de Tris-HCl 1 M,

pH 8.0. Después de 2 horas de prehibridación a 65°C, la sonda de ADN radioactivo fue agregada a la solución de hibridación. La hibridación se llevo a cabo a 65°C durante toda la noche. Los filtros fueron posteriormente lavados a 65°C en soluciones de SSC 2X y SDS 0.1% durante 20 minutos, SSC 1X y SDS 0.1% durante 15 minutos y SSC 0.1 X y SDS 0.1% durante 10 minutos. Las membranas humedecidas fueron envueltas en Sarán Wrap® y expuestas a una película para detección de rayos X (Kodak) a -70°C durante 4 días. Finalmente, los filtros fueron lavados con SDS 0.1% a 95°C y así usados de nuevo en hibridaciones con sondas diferentes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Plántulas de *C. roseus* (Tabla 1) fueron escogidas como fuente de ARN debido a que muchos AITs y varias de las enzimas que participan en su biosíntesis son reguladas en este estado de desarrollo (De Luca *et al.* 1988; Vazquez-Flota y De Luca 1998a). Por ejemplo, las actividades de las enzimas TDC, STR1, DAT y D4H aparecen inmediatamente después de la germinación y alcanzan el máximo nivel de actividad entre los días 4 y 6 después de la germinación de la semilla (De Luca *et al.* 1988; Pasquali *et al.* 1992; Aerts *et al.* 1990, Aerts *et al.* 1994; Vazquez-Flota y De Luca 1998a y 1998b).

Ninguno de los transcritos de los cuatro genes estudiados fue detectado en semillas embebidas durante 4 días (Figura 3, carril A). Este hecho sugiere que: (1) los transcritos para *tdc*, *str1*, *d4h* y *dat* no son almacenados en poblaciones de ARNm materno o (2) que tales transcritos son rápidamente degradados inmediatamente después de la hidratación. La primera posibilidad es plausible si se considera que las semillas secas no necesitan de la misma batería de alcaloides requerida por las plántulas, debido en parte a que la semilla de *C. roseus* es relativamente menos vulnerable al ataque de insectos cuando se compara con plantas jóvenes.



Los niveles más altos de los transcritos *tdc* y *str1* se presentaron en plántulas de 4 días de edad comparados con los niveles observados en estados de desarrollo más tardíos (Figura 3, carril C). Es probable que la activación coordinada de la transcripción de estos dos genes ocurra muy temprano en la germinación de la semilla como un resultado de señales moleculares del desarrollo (Figura 3, carril C). Mientras los niveles del transcrito *tdc* declinaron dramáticamente entre los días 4 y 6, los niveles del transcrito *str1* se mantuvieron similares en el mismo período (Figura 3, carril C comparado con E). Los transcritos para *tdc* en plántulas cosechadas el día 10 fueron indetectables, aunque aparecen de nuevo alrededor del día 12. Los niveles del transcrito *tdc* declinan de nuevo en la población de ARN de plántulas de 18 días comparado con los niveles observados a los 12 días (Figura 3 carriles I y K). Estos datos sugieren la presencia de un patrón de regulación transcripcional sinusoidal para el transcrito *tdc*, además corroboran que la expresión del gen *tdc* está bajo un estricto control dependiente del estado de desarrollo. No hay

información acerca de la regulación de estos genes en plántulas, sin embargo, previos estudios de actividad enzimática llevados a cabo por De Luca *et al.* (1988) establecieron que la actividad de STR1 aparecía tempranamente después de la germinación y alcanzaba un pico hacia el día 5 después del cual los niveles de actividad decaían tanto en los cotiledones como en los hipocótilos. Por su parte, TDC alcanzaba el pico máximo hacia el día 5 manteniéndose durante un período de 48 horas (De Luca *et al.* 1988). En otros experimentos llevados a cabo por Aerts *et al.* (1992), resultados similares fueron reportados para TDC, alcanzando niveles máximos de actividad en plántulas de 7 días de edad y declinando inmediatamente después. El hecho de que los niveles más altos y la subsecuente declinación relativa del transcrito *tdc* concuerdan con las tendencias de las actividades enzimáticas reportadas sugiere que *tdc*, *str1* y sus correspondientes proteínas siguen el mismo patrón de coordinación tanto a nivel transcripcional como traduccional en plántulas de *C. roseus*.

Los transcritos para *d4h* y *dat* fueron detectados en plántulas a partir del día 6 (Figura 3, carril E). Los niveles del transcrito *d4h* fueron relativamente más altos, en particular en el día 6; luego se presenta un declinamiento gradual entre los días 6 y 18 (Figura 3 carriles E, F, I y K). Contrariamente, los niveles de *dat* mostraron un incremento gradual que alcanzó un máximo en el día 10 para luego declinar a niveles similares a los iniciales entre los días 12 y 18. Los transcritos para *d4h* y *dat* aparecieron más tarde que aquellos para *tdc* y *str1* en plántulas en desarrollo. Al igual que para *tdc* y *str1* no hay reportes acerca de su regulación. Sin embargo, estudios de actividad enzimática han establecido que la actividad de DAT es inducida después de que TDC y STR1 alcanzan su máxima actividad en plántulas de *C. roseus* (De Luca *et al.* 1988). Además, en experimentos llevados a cabo por Aerts *et al.* (1994), los niveles máximos de vindolina, cuya biosíntesis requiere de DAT y D4H, fueron detectados en plántulas de 9 días de edad. Es probable, por lo tanto, que los niveles relativamente altos de los transcritos *dat* y *d4h*, junto con sus correspondientes proteínas, aparezcan entre los días 6 y 10 en las plántulas usadas en el presente estudio. Y al igual que para *tdc* y *str1* sean una indicación de la coordinación entre los procesos de transcripción y traducción.

Reportes en la literatura han establecido el efecto de la sequía y del estrés hídrico como responsable de la inducción de algunos genes involucrados en metabolismo secundario (revisión en Verpoorte *et al.* 1999; Rocha 2000). Sin embargo, en el presente estudio, el estrés hídrico aplicado a plántulas de 4 días no tuvo efecto detectable en los transcritos analizados (Figura 3, carriles B y C). En términos generales los niveles de transcritos para *tdc*, *d4h* y *dat* fueron similares en plántulas de 12 días de edad con y sin estrés hídrico (Figura 3 carriles I y J). Sin embargo, para *str1* la situación es diferente, no se detectaron los transcritos en plántulas de 12 días privadas de agua mientras que se aprecia un nivel mínimo pero detectable en plántulas crecidas bajo un régimen hídrico normal. Esto sugiere que el estrés hídrico afecta solamente la expresión del gen *str1* y en particular en plántulas de 12 días.

La calidad de luz y la elicitación inducen genes y enzimas involucrados en la producción de AIT en cultivos de células suspensión de *C. roseus* (Verpoorte *et al.* 1999; De Luca 1993). En el presente reporte, los niveles de los transcritos estables para *str1* y *dat* no fueron afectados por la transferencia de plántulas de 6 días de un régimen normal de luz a un régimen de oscuridad total durante un período de 24 horas (Figura 3, carriles D y E). Los niveles del transcrito *tdc*, sin embargo, fueron significativamente más altos en plántulas transferidas a la oscuridad comparadas con plántulas mantenidas a la luz. Además, los niveles del transcrito *d4h* fueron relativamente más altos en plántulas crecidas a la luz que en plántulas crecidas en la oscuridad. En estudios llevados a cabo por De Luca *et al.* (1988) se ha mostrado que los niveles de TDC y STR1 no son afectados por condiciones de luz en plántulas de *C. roseus*, mientras que la actividad enzimática de DAT se incrementa aproximadamente 10 veces después de un tratamiento de luminosidad aplicado sobre plántulas crecidas en la oscuridad. Adicionalmente, en otros estudios, plántulas etioladas de *C. roseus* posteriormente tratadas con luz afectaron de manera variable los niveles de transcripción del gen *d4h*. Sin embargo se encontró que actividad enzimática de D4H podrían ser incrementadas 8 veces dependiendo del estado de desarrollo de la planta (Vazquez-Flota y De Luca 1998a).

Plántulas de 10 días fueron incubadas con ácido acetil salicílico -ASA- (Figura 3, carril G) y/o metil jasmonato -MeJa- (Figura 3, carril H) durante 24 horas.

No se observaron efectos del ASA sobre los niveles de expresión de *d4h* o *dat*. Sin embargo, una pequeña disminución en los niveles de *str1* fue detectada y, en contraste, un incremento enorme en los niveles de transcripción de *tdc* (Figura 3, carriles G y F). Es posible que la inducción del gen *tdc* haya sido el resultado de la liberación de mecanismos de defensa mediados por ASA, pues esta molécula al igual que el ácido salicílico (SA) se comportan como señales químicas que dirigen la resistencia sistémica adquirida (SAR) en plantas. Por ejemplo, inmediatamente después de ser infectadas con patógenos, plantas de tabaco y *Arabidopsis* han incrementado dramáticamente sus niveles de ASA (Ryals *et al.* 1994; Delaney *et al.* 1994). Sin embargo, Vazquez-Flota y De Luca (1998b) han reportado que el SA no tiene efecto en la activación de TDC, D4H o de los correspondientes genes en plántulas de *C. roseus*. Las variaciones entre los datos observados en el presente estudio y aquellos reportados por Vazquez-Flota y De Luca (1998b) pueden reflejar los diferentes efectos desencadenados por el uso de SA en vez de ASA, además, sugiere una sincronización diferente de los sistemas experimentales empleados. El hecho de que en el presente estudio solamente *tdc* sea regulado por ASA puede ser una indicación de que la producción de AIT requiere de la interacción de varias señales químicas y que ASA es solo una de ellas y no la única que determina los mecanismos de resistencia como ha sido sugerido por otros autores (Ryals *et al.* 1994).

Los niveles de transcripción para *tdc*, *str1* y *dat* fueron significativamente mayores en plántulas de 10 días tratadas con MeJa durante 24 horas comparado con plántulas no tratadas (Figura 3 carriles F y H). Además, para *tdc*, *str1* y *dat* el efecto de inducción con MeJa fue mayor el obtenido con ASA (Figura 3 carriles G y H). En contraste, no se observó variación en los niveles de transcripción de *d4h*. En previos estudios, tanto *tdc* como *str1* han sido inducidos por tratamiento con MeJa (Pasquali *et al.* 1992), además ha sido demostrado que el tratamiento de plántulas de *C. roseus* con MeJa resulta en un incremento significativo de los AIT monoméricos (Aerts *et al.* 1996). Basados en la evidencia obtenida en el presente estudio es probable que tal incremento de alcaloides sea debido a la regulación transcripcional por MeJa. Recientemente, el factor de transcripción ORCA3, ha sido reportado como un regulador de la expresión de múltiples genes biosintéticos de los AIT en cultivos celulares de *C. roseus*, incluyendo *tdc*, *str1*, and *d4h*, entre otros. Sin embargo ORCA3 no parece regular la expresión de

*dat* en cultivos de células en suspensión (Van der Fits y Memelink 2000). Los mecanismos de control que operan en plantas y cultivos celulares, sin embargo, parecen ser diferentes. Experimentos en nuestro laboratorio han mostrado que en contraste con cultivos celulares, *dat* (al igual que *tdc*, *str1*, *sgd*, y *d4h*) son inducidos en plántulas de *C. roseus* por tratamiento con MeJa (D. Burtin, John Innes Centre, Norwich, UK. Datos sin publicar). No se sabe si ORCA3 esta mediando la inducción con jasmonato de múltiples genes de la TÍA biosíntesis y de rutas metabólicas primarias relacionadas en plantas de *C. roseus*. Es posible que otros factores de transcripción, además de ORCA3, actúen para controlar las enzimas biosintéticas del metabolismo de AIT.

Los datos presentados aquí muestran que *tdc*, *str1*, *d4h* and *dat* son regulados a nivel transcripcional mediante señales medio ambientales y de estados de desarrollo. Los transcritos para *tdc* y *str1* aparecieron juntos en los estados tempranos del desarrollo de plántulas y la presencia de las correspondientes enzimas pueden haber resultado en la producción del alcaloide indol monomérico, catarantina. Los transcritos tanto para *d4h* como *dat* aparecieron más tarde que los de *tdc* y *str1* en el desarrollo de plántulas y las correspondientes enzimas son requeridas para la biosíntesis de vindolina. Como los alcaloides indol diméricos vinblastina y vincristina requieren de catarantina y vindolina, es probable que la síntesis de los alcaloides diméricos no ocurra sino hasta después del día 4. Por ejemplo, vinblastina y vincristina han sido detectados en plántulas de *C. roseus* hasta 10 días después de la germinación (De Luca *et al.*, 1986).

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha mostrado que la regulación de la transcripción de algunos de los genes biosintéticos involucrados en la producción de alcaloides indol terpenoides está fuertemente controlada por el estado de desarrollo de la planta y por la presencia de agentes químicos externos tales como el MeJa y el ASA. Por ejemplo, niveles relativamente altos de los transcritos para *tdc*, *str1* y *d4h* fueron acumulados dentro de los 6 primeros días de desarrollo de plántulas de *C. roseus*. La regulación transcripcional de *tdc* y *str1* presentó un patrón sinusoidal con un nivel máximo en plántulas con edades entre los 4 y 6 días. La transcripción de *d4h* presentó su máximo nivel entre los días 6 y 10, mientras que la transcripción de *dat* fue máxima solo el día 10. Dentro de los elicitores



químicos empleados el MeJa fue el agente inductor de mayor efectividad para los 4 genes estudiados, pues indujo la expresión de *tdc*, *str1*, *dat* y mantuvo constantes los niveles de expresión de *d4h*, mientras que el ASA mantuvo constantes los niveles de transcripción para *d4h* y *dat*, incrementó los niveles de *tdc* pero disminuyó los de *str1*. Por lo tanto, un sistema experimental basado en plántulas elicidadas con MeJa podría ser un buen sistema de estudio para identificar otros genes regulatorios, aparte de ORCA, en la ruta biosintética de producción de AIT, incorporando así tal sistema en una estrategia factible de producción de compuestos clave como vinblastina y vincristina.

Finalmente, una observación interesante e inesperada fue el hecho de que en el sistema de plántulas empleado aquí, la variación de factores tales como la luz y el estrés hídrico influyeron muy poco en la regulación transcripcional de los genes estudiados, sugiriendo que son los estados de desarrollo y la presencia de elicitores los que controlan en mayor medida la regulación de los genes *tdc*, *str1*, *d4h* y *dat* en plántulas de *C. roseus*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Esperanza Torres R. por sus valiosos comentarios y constructiva discusión. El presente trabajo ha sido desarrollado gracias a una beca doctoral otorgada a PR por el "Instituto Colombiano para la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas" (COLCIENCIAS) y al aporte del *John Innes Centre* (Norwich, Reino Unido).

## BIBLIOGRAFÍA

- Aerts RJ, Van der Leer T, Van der Heijden R, Verpoorte R. 1990. Developmental regulation of alkaloid production in *Cinchona* seedlings. *J. Plant Physiol.* 136. 86-91.
- Aerts RJ., Alarco A, De Luca V 1992. Auxins induce tryptophan decarboxylase activity in radicles of *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol.* 100. 1014-1019.
- Aerts RJ, Gisi D, De Carolis E, De Luca V, Baumann TW. 1994. Methyl jasmonate vapour increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus roseus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J.* 5. 5. 635-643.
- Aerts RJ, Schafer A, Hesse M, Baumann TW, Slusarenko A. 1996. Signalling molecules and the synthesis of alkaloids in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry* 42. 2. 417-422.
- De Luca V, Balsevich J, Tyler RT, Eilert U, Panchuk BD, Kurz GW. 1986. Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* 125. 147-156.
- De Luca V, Fernandez JA, Campbell D, Kurz GW. 1988. Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 86. 447-450.
- De Luca V. 1993. Enzymology of indole Alkaloid Biosynthesis. *Methods in Plant Biochemistry.* 9. 345-368.
- De Luca V, St. Pierre B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 5. 4. 168-173.
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E. Ryals J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science.* 266. 1247-1250.
- Feinberg A, Vogelstein P 1994. A technique for radio labelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137. 266-267.
- Goddijn OJM, De Kam RJ, Zanetti A, Schilperoort RA, Hoge JHC. 1992. Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol. Biol.* 18. 1113-1120.
- Goddijn OJM, Pennings EJM, Van der Helm P, Schilperoort RA, Verpoorte R, Hoge JHC. 1995. Overexpression of a tryptophan decarboxylase cDNA in *Catharanthus roseus* crown gall cultures results in increased tryptamine levels but not in increased terpenoid indole alkaloid production. *Transgenic Res.* 4. 315-323.
- Knobloch H, Berlín J. 1981. Influence of médium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Z. Naturforsch. Teil C.* 35. 551-556.

- Loo TL, Freireich EJ. 1995. Cáncer quimioterapéuticos. Principios de farmacología. P. L. Munson. Chapman & Hall, London. 1475-1516.
- Meijer AH, Verpoorte R, Hoge JHC. 1993. Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. J. Plant Res. 3. 145-164.
- Menke FLH, Parchmann S, Mueller MJ, Kijne JW, Memelink J. 1999a. Involvement of the octadecanoic pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. Plant Physiol. 119. 1289-1296.
- Menke FLH, Champion A, Kijne JW, Memelink J. 1999b. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *str1* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. EMBO J. 18. 16.4455-4463.
- Moreno PRH, Van der Heijden R, Verpoorte R. 1995. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey II. Updating from 1988 to 1993. Plant Cell Tiss. Org. 42. 1-25.
- Ouwerkerk PBF, Memelink J. 1999a. A G-box element from the *Catharanthus roseus* strictosidine synthase (*Str*) gene promoter confers seed specific expression in transgenic tobacco plants. Mol. Gen. Genet. 261. 635-643.
- Ouwerkerk PBF, Memelink J. 1999b. Elicitor-responsive promoter regions in the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. Plant Mol. Biol. 39. 129-136.
- Pasquali G, Goddijn OJM, De Waal A, Verpoorte R, Schilperoort RA, Hoge JHC, Memelink J. 1992. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. Plant Mol. Biol. 18. 1121-1131.
- Pasquali G, Erven ASW, Ouwerkerk PBF, Menke FLH, Memelink J. 1999. The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. Plant Mol. Biol. 39. 1299-1310.
- Roberts MF. 1998. Enzymology of alkaloid biosynthesis. Alkaloids. Biochemistry, ecology and medicinal applications. Roberts MF, Wink M (editores). Plenum Press, New York. 109-146.
- Rocha PJ. 2000. Engineering secondary metabolite production in transgenic *Nicotiana tabacum* and *Hyoscyamus muticus* and isolation of MYB sequences from *Catharanthus roseus*. John Innes Centre. Norwich, University of East Anglia. PhD. thesis. 163p
- Roewer IA, Cloutier N, Nessler CL, De Lúea V. 1992. Transient induction of tryptophan decarboxylase (TDC) and strictosidine synthase (SS) genes in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Rep. 11. 86-89.
- Ryals J, Uknes S, Ward E. 1994. Systemic acquired resistance. Plant Physiol. 104: 1109-1112.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- St-Pierre B, Vazquez-Flota FA, De Lúea V. 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. Plant Cell 11. 887-900.
- Van der Fits L, Memelink J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. Science 289. 295-297.
- Van der Heijden R, Verpoorte R, Ten Hoopen HJG. 1989. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G Don: a literature survey. Plant Cell 18. 231-280.
- Vazquez-Flota FA, De Lúea V. 1998a. Developmental and light regulation of desacetoxindole 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant Physiol. 117. 1351-1361.
- Vazquez-Flota FA, De Lúea V. 1998b. Jasmonate modulates development- and light-regulated alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Phytochem. 49. 395-402.
- Verpoorte R, Van der Heijden R, Ten Hoopen HJG, Memelink J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolic pathways for the production of fine chemicals. Biotech. Lett. 21. 467-479