

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 113**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2013 E 13194534 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2735609**

54 Título: **Método para aumentar el rendimiento de productos en material de planta**

30 Prioridad:

26.11.2012 US 201261729659 P
05.03.2013 US 201313784877

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.11.2017

73 Titular/es:

ARKANSAS STATE UNIVERSITY-JONESBORO
(100.0%)
P.O. Box 10
State University, AR 72467, US

72 Inventor/es:

MEDINA-BOLIVAR, LUIS FABRICIO y
YANG, TIANHONG

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 644 113 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para aumentar el rendimiento de productos en material de planta

Antecedentes.

5 Los productos de plantas, incluidos metabolitos especializados (también conocidos como metabolitos secundarios de plantas o productos naturales de plantas) tienen aplicaciones importantes como suplementos dietéticos, cosmeceúticos, productos farmacéuticos y productos agroquímicos. El término producto natural se refiere a compuestos químicos producidos por un organismo vivo. En una realización, tales compuestos son moléculas pequeñas. En muchos casos, debido a la complejidad de sus estructuras químicas, la producción de estos productos no es factible mediante síntesis orgánica y por lo tanto su disponibilidad depende de la extracción a partir de fuentes de plantas. Los cultivos *in vitro* de plantas son reconocidos como plataformas sostenibles de bioproducción para productos de plantas. De hecho, los productos farmacéuticos de alto valor tales como taxol y ginsenosidos se producen a escala industrial a través de cultivos de suspensión celular y de raíz, respectivamente. Se han intentado esfuerzos para aumentar los niveles de productos de plantas en cultivos de plantas mediante estrategias de elicitación y de ingeniería metabólica. Los enfoques de elicitación sólo han conducido a aumentos parciales en el rendimiento, particularmente debido a los mecanismos de regulación transcripcional y post-transcripcional, tales como la inhibición de retroalimentación, que limitan su acumulación en la planta. En muchos casos, estos mecanismos reguladores son utilizados por la planta para prevenir su acumulación a niveles tóxicos. Además, los esfuerzos de ingeniería metabólica se han restringido porque muchas de las enzimas implicadas en la biosíntesis de productos de alto valor son actualmente desconocidas.

20 **Compendio.**

Se proporciona un proceso para aumentar la cantidad de un producto de interés en plantas y partes y células de plantas. Un precursor del producto de interés se pone en contacto con la planta o parte de la planta, que puede incluir opcionalmente un inductor del producto de interés. El proceso proporciona además una realización para un agente atrapante para evitar la inhibición de retroalimentación. Además, se proporciona un procedimiento para producir derivados mediante el uso del precursor que pueden incluir un agente inductor y/o atrapante. Los hidratos de carbono que incluyen glucosa y ácido glucurónico se pueden añadir mediante el material de la planta para producir un derivado del precursor. Aún en una realización más, las células de plantas son tejido de raíz pilosa, en otra realización son cultivos de raíces y aún en una realización más son cultivos de células en suspensión.

Breve descripción de los dibujos.

30 La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra una ruta de alcaloide terpenoide indol.

La figura 2 es un diagrama de flujo que muestra una ruta de los terpenoides y los alcaloides esteroideos.

La figura 3 es un diagrama de flujo que demuestra la biosíntesis de flavonoides.

La figura 4 es un diagrama de flujo que muestra una ruta biosintética de estilbenos, incluyendo derivados de resveratrol y pinosilvina y derivados.

35 La figura 5 es un diagrama en el que se muestran las estructuras químicas de resveratrol y derivados seleccionados de resveratrol.

Las figuras 6A-C son gráficas que muestran la inducción de estilbenoides por acetato de sodio (figura 6A) y donde se añadió piceatannol (figuras 6B) y donde piceatannol se usó solo sin acetato sódico (figura 6C).

40 La figura 7A-C son gráficos que muestran el rendimiento de araquidina-1 en cultivos de control (7A), en cultivos tratados con ciclodextrina y metil jasmonato (MeJA) (7B) y en cultivos tratados con ciclodextrina, MeJA y piceatannol (7C).

La figura 8 es un diagrama que muestra la estructura química de la crisina.

La figura 9 es un gráfico que muestra el espectro UV de la crisina.

La figura 10 es un diagrama que muestra el patrón de fragmentación de la crisina

45 La figura 11A-B es un gráfico que muestra el espectro de espectrometría de masas (MS) del espectro de crisina (A) y MS2 del ion 255 (B) seleccionado.

Las figuras 12A-B son gráficos que muestran la producción de nuevos derivados de crisina en 12A y que muestran un mayor detalle en 12B.

50 La figura 13 es un gráfico que muestra compuestos derivados de crisina con el pico 1 identificado por flecha y número.

La figura 14 es un gráfico que muestra el análisis de espectrometría de masas del glucósido de crisina producido en el pico 1.

La figura 15 es un gráfico que muestra el espectro MS2 del pico 1.

La figura 16 es un gráfico que muestra el espectro UV del pico 1.

- 5 La figura 17 es un gráfico que muestra el espectro MS3 del pico 1 y los patrones de fraccionamiento predichos del compuesto.

La figura 18 es un gráfico que muestra compuestos derivados de crisina con el pico 2 identificado por flecha y número.

- 10 La figura 19 es un gráfico que muestra el análisis de espectrometría de masas del glucurónido de crisina producido en el pico 2.

La figura 20 es un gráfico que muestra el espectro MS2 del pico 2.

La figura 21 es un gráfico que muestra el espectro UV del pico 2.

La figura 22A es un gráfico que muestra el espectro MS3 del pico 2 y la figura 22B los patrones de fraccionamiento predichos del compuesto.

- 15 Las figuras 23A-B son gráficos que muestran la producción de nuevos derivados de naringenina en 23A y que muestran un mayor detalle en 23B.

La figura 24 muestra la estructura química de la naringenina.

La figura 25 es un gráfico que muestra el espectro UV de la naringenina.

- 20 La figura 26 es un gráfico que muestra compuestos derivados de la naringenina con el pico 1 identificado por flecha y número.

La figura 27 es un gráfico que muestra el espectro MS del pico 1.

La figura 28 es un gráfico que muestra el espectro MS2 del pico 1.

La figura 29A es un gráfico que muestra el espectro UV del pico 1 y la figura 29B muestra los patrones de fraccionamiento predichos del compuesto.

- 25 La figura 30 es un gráfico que muestra compuestos derivados de la naringenina con el pico 2 identificado por flecha y número.

La figura 31 es un gráfico que muestra el espectro MS del pico 2.

La figura 32 es un gráfico que muestra el espectro MS2 del pico 2.

La figura 33 es un gráfico que muestra el espectro MS3 del pico 2.

- 30 La figura 34A es un gráfico que muestra el espectro UV del pico 2 y la figura 34B muestra los patrones de fraccionamiento predichos del compuesto.

La figura 35 es una vista de una realización de la presente invención aplicada a cultivos de raíz pilosa de cacahuete.

La figura 36 es un gráfico que muestra la acumulación de araquidina-1 de una realización de la presente invención.

La figura 37 es un gráfico que muestra la acumulación de araquidina-3 de una realización de la presente invención.

- 35 **Descripción de las realizaciones preferentes.**

Este proceso aborda el problema de proporcionar un método para producir altos niveles de uno o más productos valiosos en un material de planta. La solución proporcionada por la invención se basa en la adición de un precursor putativo o xenobiótico al cultivo de planta que también se puede combinar con un agente atrapante y también se puede combinar además con un elicitador.

- 40 El procedimiento podría aplicarse a cualquier material de planta y es particularmente útil para cultivos *in vitro*. El procedimiento es útil con material de planta, incluyendo una planta, parte de planta, tejido de planta, cultivos de plantas, cultivo de células en suspensión u otro material de planta que puede producir el producto de interés. El término planta o material de planta o parte de planta se utiliza ampliamente en la presente memoria para incluir cualquier planta en cualquier etapa de desarrollo, o parte de una planta, incluyendo un corte de planta, una célula de planta, un cultivo de células de plantas, un órgano de planta, una planta semilla, y una plántula. Una célula de planta
- 45

es la unidad estructural y fisiológica de la planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. Una célula de planta puede estar en forma de una sola célula aislada o agregado de células tal como un callo friable, o una célula cultivada, o puede ser parte de una unidad organizada superior, por ejemplo, un tejido de planta, un órgano de planta o planta. Así, una célula de planta puede ser un protoplasto, una célula productora de gametos, o una célula o conjunto de células que pueden regenerar en una planta entera. Como tal, una semilla, que comprende múltiples células de planta y es capaz de regenerar una planta entera, se considera una célula de planta para los propósitos de esta descripción. Un tejido de planta o un órgano de una planta puede ser una semilla, protoplasto, callo o cualquier otro grupo de células de planta que esté organizado en una unidad estructural o funcional. En una realización, se pueden usar cultivos de raíz pilosa o cultivos de raíces como el material de planta, como se discute más adelante. Se puede usar con material de planta de cualquier especie de planta y con cualquier clase de producto. Una realización proporciona que el producto se produce como resultado de etapas enzimáticas en la planta. Otra realización proporciona que la planta opcionalmente se puede transformar con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima que convierte un sustrato en el producto deseado.

El proceso se puede usar con cualquier planta que produce un producto de interés ya sea monocotiledónea o dicotiledónea o gimnosperma, que incluye pero no limitado a maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorgo bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), zanahoria (*Daucus carota*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), cítricos (*Agrios* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), aceituna (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), el anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), avena (*Avena*), cebada (*Hordeum*), rábano (*Raphanus sativus*), soja (*Glycine max*), fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), hortalizas, plantas ornamentales y coníferas y plantas medicinales y médicamente activas que incluyen especies tales como cáñamo (*Cannabis sativa* L.), mostaza india (*Brassica juncea* L.), *Salvia miltiorrhiza*, *Salvia austriaca*, *Withania somnifera*, *Pueraria candollei*, *Polygonum cuspidatum*, *Polygonum multiflorum*, *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora*, *Scutellaria viscidula*, *Azadirachta indica*, *Panax ginseng*, *Anisodus acutangulus*, *Artemisia annua*, *Cassia obtusifolia*, *Phytolacca americana*, *Tephrosia purpurea*, regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), *Psammosilene tunicoides*, granada (*Punica granatum*), *Peganum harmala*, *Sylibum marianum*, *Nicotiana benthamiana*, *Calotropis gigantean*, *Linum mucronatum*, *album Linum*, *Chenopodium murale*, *Catharanthus roseus*, hierba mora (*Solanum nigrum*), *Atropa belladonna*, *Rauvolfia verticillata*, *Panax quinquefolium*, *Aconitum coreanum*, *Coleus forskohlii*, remolacha roja (*Beta vulgaris* L.), beleño egipcio (*Hyoscyamus muticus*), *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst, melón oriental (*Cucumis melo* L. cv. *Geumssaragi-euncheon*), muskelelon (*Cucumis melo* L.), *Latuca virosa*, *Sesamum indicum*, *Abelmoschus esculentus*), bígaro (*Vinca minor* L.), bígaro rosado (*Catharanthus roseus* G. Don syn. *Vinca Rosea* L. *Eurycoma longifolia*, alforfón tártaro (*Fagopyrum tataricum*), alforfón común (*Fagopyrum esculentum* Moench), *Sapium sebiferum*, *Datura innoxia*, *Lithospermum canescens*, *Trigonella foenum*, garra del diablo (*Harpagophytum procumbens*), *Angélica gigas*, *Plumbago zeylanica*, *Echinacea purpurea*, *Psammosilene tunicoides*, *Ocimum basilicum*, *Ophiorrhiza alata*, *Ophiorrhiza rugosa*, valeriana (*Valeriana officinalis* L.), *Picrorhiza kurroa*, berro (*Nasturtium officinale*), *Camptotheca acuminata*, *Pogostemon cablin*, *Taxus x medios*, *Taxus* spp., *Anatto* (*Bixa orellana*), *Veratrum californicum*, *Astragalus membranaceus*, *Rhodiola kirilowii*, *Calendula officinalis*, *Arnebia euchroma*, *Papaver bracteatum*, *Linum narbonense*, *Lotus japonicas*, *Panax quinquefolium*, *Sinapis alba*, *Coleus blumei*.

Ejemplos de plantas que producen naturalmente un estilbeno incluyen *Pinus sibirica*, *Pinus sylvestris*, *Gnetum parviflorum*, *Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia*, *Polygonum cuspidatum*, *Arachis hypogaea*, *Eucalyptus* spp *Artocarpus lakoocha*, *Nothofagus fusca*, *Phoenix dactilifera*, *Festuca versuta*, *Carex fedia*, *Veratrum grandiflorum*, *Cassia quinquangulata*, *Lycopersicon esculentum*, *Gossypium hirsutum* y cualquier otra especie de planta que muestre que produce resveratrol, pinosilvina o sus derivados o análogos.

Como se discute más adelante, la producción de cualquier producto de interés puede mejorarse usando el proceso. Los compuestos en esta categoría de productos incluyen pero no se limitan a fenoles, terpenoides y alcaloides. Estos compuestos se pueden o bien producir constitutivamente por la planta, producir a niveles basales e inducir su biosíntesis por un inductor o bien inducir de nuevo tras el tratamiento con elicitor.

Se identifica un producto de interés o compuesto objetivo producido por una planta. El producto de interés o compuesto objetivo puede ser cualquier producto, incluyendo un intermedio de un producto deseado, producido por una planta que tenga utilidad comercial. Puede ser un compuesto en una realización que la planta produce en presencia de una sustancia elicitora, y en otra realización es una producida en ausencia de una sustancia elicitora. En una realización se puede seleccionar un producto comercialmente útil que no se hace sintéticamente, o se produce sintéticamente, pero a un coste mayor que cuando se produce por la planta. Ejemplos de tales productos de interés sin limitación son los grupos principales de compuestos producidos por plantas, los fenólicos, alcaloides y terpenoides. La familia de compuestos está relacionada estructuralmente y regulada por la maquinaria de la planta. A título de ejemplo adicional sin limitación, los terpenoides incluyen diterpenos (tales como taxol producido por plantas de tejo), saponinas (tales como ginsenósidos producidos por *Panax ginseng*), sesquiterpenos (como artemisinina producida por *Artemisia annua*). Ejemplos, sin pretender limitar los compuestos fenólicos, incluyen

estilbenoides (tales como araquidina-1 producida por el cacahuete) y flavonoides (tales como wogonina producida por *Scutellaria*). Ejemplos sin pretender limitar los alcaloides incluyen alcaloides de monoindole (tales como vinblastina producida por *Catharanthus roseus*), alcaloides esteroideos (tales como ciclopamina producida por *Veratrum californicum*), alcaloides de tropano (tales como hiosciamina producida por *Hyoscyamus muticus*). En una realización, los procesos descritos son particularmente útiles en la producción de estilbenoides. A continuación se proporciona una descripción de los compuestos estilbenoides que pueden producir plantas.

Como resultado de emplear un precursor que también puede incluir un agente atrapante y, cuando sea necesario, un elicitador, la cantidad del producto de interés puede aumentarse al menos diez veces, al menos 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 100 veces, 1.000 veces, 2.000 veces, 3.000 veces, 4.000 veces, 5.000 veces, 10.000 veces, 250.000 veces y más y cantidades intermedias en comparación con aquellos cultivos que no incluyen al menos un precursor, y que opcionalmente incluía también un elicitador y/o agente atrapante. En una realización, el producto de interés, tal como araquidina, se incrementa al menos 250.000 veces.

Además, los inventores han descubierto nuevos compuestos de valor comercial y médico que se pueden producir usando un elicitador, un agente atrapante y un precursor. El proceso puede producir como un producto de interés, derivados valiosos de un compuesto. Estos derivados son compuestos que se obtienen a partir de otro compuesto. En una realización, el compuesto original se puede transformar en un producto de estructura química similar. Una realización proporciona la producción de derivados valiosos del precursor. A modo de ejemplo, se añade al precursor un hidrato de carbono tal como glucosa o ácido glucurónico. A modo de ejemplo sin limitación, se puede usar tal combinación para añadir un hidrato de carbono para producir un glucósido o glucurónido del precursor. La mayoría de las plantas cuando se exponen a un compuesto xenobiótico, un producto químico extraño tal como un fármaco o un precursor putativo añaden glucosa al compuesto xenobiótico y lo almacenan, pero los derivados del ácido glucurónico se encuentran en animales pero rara vez en plantas. Sin embargo, aquí, fue posible añadir ácido glucurónico al precursor para producir un glucurónido. La glucuronidación es un importante proceso bioquímico para el metabolismo de fármacos en seres humanos y hasta la fecha no existen medios eficaces para producir estos compuestos. Aquí, con el uso de un elicitador, precursor y agente atrapante, es posible producir glucurónidos. Es posible mejora adicional de la producción de glucurónidos sembrando el medio con ácido glucurónico.

El precursor puede estar implicado en la biosíntesis del compuesto objetivo/producto de interés. Cuando tal precursor es un xenobiótico puede ser cualquier compuesto extraño (no producido en el cultivo de la planta) que podría ser biotransformado en un intermedio o producto de la ruta biosintética del compuesto objetivo. Una vez identificado el compuesto objetivo, se pueden identificar precursores potenciales que tienen una estructura similar y/o están en la ruta que conduce a la producción del producto. Un compuesto similar, por ejemplo, puede ser la misma estructura de esqueleto químico, pero tiene un grupo químico adicional que se modifica o se elimina para producir el producto. En un ejemplo, el compuesto puede tener un grupo hidroxilo unido, donde el producto carece del grupo hidroxilo, habiendo sido eliminado por una reacción en la planta. Después el precursor putativo se puede probar para determinar si proporciona la producción mejorada descrita en la presente memoria. Cuando se examina la ruta que conduce a la producción del producto de interés, en una realización se identifican precursores putativos que están más próximos en la ruta al producto al contrario que antes en la ruta. Aquellos compuestos antes en la ruta podrían convertirse en un compuesto diferente del producto de interés deseado. A modo de ejemplo sin limitación, si un compuesto está diez o veinte etapas antes en la ruta que el producto de interés, puede ser demasiado temprano en la ruta para ser un precursor útil. Esos compuestos, a modo de ejemplo sin limitación, que son de una etapa, dos etapas, tres etapas, cuatro etapas o cinco etapas en la ruta son precursores putativos útiles. Después las pruebas pueden confirmar su utilidad como precursores. Ejemplos de precursores de terpenoides son acetato, acetil-CoA, pirofosfato de isopentenilo, piruvato, gliceraldehído-3-fosfato, difosfato de dimetilalilo, difosfato de geranilo, difosfato de farnesilo, escualeno y fitoeno; ejemplos de precursores de compuestos fenólicos incluyen fenilalanina, tirosina, ácido cumárico, cumaroil-CoA, ácido cafeico, cafeoil-CoA, ácido cinámico, cinamoil-CoA, ácido ferúlico, feruloyl-CoA y naringenina y malonil-CoA; ejemplos de precursores de alcaloides incluyen triptófano, fenilalanina, triptamina, secologanina, estricoidina, tirosina, tiramina, dopamina, reticulina y putrescina. Los precursores pueden añadirse una o más veces antes, después o junto con el agente atrapante y el elicitador.

La figura 1 muestra a modo de ejemplo partes de una ruta de alcaloide terpenoide indol y la figura 2 muestra a modo de ejemplo partes de las rutas del terpenoide y alcaloide esteroideo. La figura 3 muestra a modo de ejemplo biosíntesis de flavonoides. Los compuestos indicados con un cuadrado se seleccionaron como precursores metabólicos para experimentos de alimentación en combinación con ciclodextrina y jasmonato de metilo.

Aquí se ha descubierto que el uso de al menos un precursor de este tipo aumenta drásticamente la cantidad de producto de interés producido en la planta. El uso de un precursor puede resultar en la inhibición de la retroalimentación de la producción del producto de interés. Con la combinación de un agente atrapante descrito aquí, dicha inhibición de retroalimentación no ha limitado la producción del producto.

En una realización, la capacidad del precursor para aumentar significativamente la cantidad de producto de interés se mejora cuando se usa un agente atrapante para ayudar a prevenir la inhibición de retroalimentación. Un agente atrapante o aglutinante es aquel que puede complejarse con compuestos en la ruta y atrapar el producto o intermedio. En una realización preferente, el agente atrapante es uno que no está permanentemente unido al producto de interés.

Un ejemplo de un tal agente atrapante, sin pretender ser limitante, es ciclodextrina. Esta familia de compuestos son azúcares cíclicos que son el resultado de la descomposición enzimática del almidón y típicamente tienen estructuras toroidales formadas por 6 a 8 (o hasta 10) restos de glucosa. Ejemplos incluyen α , β y γ -ciclodextrinas. Las ciclodextrinas se han caracterizado bien, según publica, por ejemplo, National Office for Research and Technology que proporciona una base de datos en www.cyclodextrin.net y publicaciones tales como Szejli (1998) "Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry" *Chem Rev.* 98(5):1743-1754; Loftsoon et al. (2007) "Cyclodextrins and their pharmaceutical applications" *Int. J. Pharm.* 329 (1-1): 1-11. La ciclodextrina se ha utilizado como elicitador de resveratrol en cultivos celulares (véase la patente de EEUU 7.309.591). Sin pretender estar limitado por una teoría particular, se cree en el presente proceso, la ciclodextrina actúa no sólo como un elicitador, sino para prevenir la inhibición de retroalimentación de la producción de un producto de interés. Este compuesto soluble tiene la ventaja de que no está permanentemente unido al producto de interés y se cree que actúa para prevenir la inhibición de la enzima que produce el producto posterior, permitiendo de este modo la continuación de la ruta biosintética. Diferentes tipos de ciclodextrina, incluyendo β -ciclodextrina, se sabe que se complejan con compuestos hidrófobos aumentando con ello su solubilidad. El complejo del precursor putativo o xenobiótico con ciclodextrina podría aumentar su solubilidad. Además, las ciclodextrinas pueden atrapar intermediarios tóxicos en la ruta o atrapar el producto deseable, evitando así la inhibición de la retroalimentación de la ruta.

Se puede usar resina hidrófoba donde el producto o un precursor es hidrófobo. La resina hidrófoba también puede servir como un agente atrapante para productos de interés. Un ejemplo, sin pretender ser limitante, de tal resina es una resina de poliestireno, tal como resina de poliestireno DIAION HP-20 fabricada por Supelco (Bellefonte, PA). Esta resina se describió en Abbot y Medina-Bolivar et al. (2010) "Purification of resveratrol, arachidin-1 and arachidin-3 from hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogaea*) and determination of their antioxidant activity and cytotoxicity", American Institute of Chemical Engineers, DOI 10/1002/btpr.454, publicado en línea el 7 de julio, 2010 en Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). Allí, la resina se utilizó para extraer los estilbenoides. La resina absorbió los estilbenoides que luego se extrajeron de la resina con acetato de etilo. Otro ejemplo que podría usarse en cultivos de tejidos es la resina polimérica hidrofóbica X-5, cuya resina está descrita por Yan et al. (2005) en "Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation".

Elicidores comunes utilizados en los cultivos de plantas son ácido jasmónico y su derivado metil jasmonato. Estos elicidores actúan como moléculas señal para aumentar rutas biosintéticas especializadas. Hay muchos de tales elicidores conocidos por los expertos en la técnica y que estarán disponibles para los expertos en la técnica. Ejemplos de tales elicidores, sin pretender ser limitantes, se discuten a continuación.

Se pueden ensayar diferentes períodos de incubación del precursor putativo o xenobiótico que puede incluir el agente atrapante y elicitador para obtener diferentes niveles del producto objetivo. En un ejemplo, el agente atrapante se combina con el elicitador durante periodos diferentes. En otro ejemplo, el precursor se combina con el agente atrapante y el elicitador para diferentes períodos. Los períodos pueden ser desde cualquier número de horas a cualquier número de días. Después del período de incubación, el medio de cultivo y el tejido se eliminan y se analizan los productos deseados. En un ejemplo, el medio de cultivo se elimina después del período de incubación y el cultivo se vuelve a inducir con medio fresco que contiene el elicitador con el agente atrapante que puede incluir también el precursor putativo o xenobiótico. Después el proceso de re-inducción se repite cualquier número de veces.

Además, cultivos en diferentes etapas de desarrollo pueden responder de manera diferente al tratamiento del agente atrapante, precursor putativo o xenobiótico y elicitador. La conductividad del medio de cultivo podría utilizarse como una estimación de la etapa de desarrollo del cultivo de plantas. Por lo tanto, los niveles de producción más altos en respuesta al tratamiento del agente atrapante, precursor putativo o xenobiótico y elicitador dependerán de la realización del experimento en un intervalo particular de valores de conductividad del medio de cultivo. Una realización proporciona que para los niveles más altos de producción de producto, se usa una etapa preferente de crecimiento del cultivo de plantas. Se puede probar la etapa preferente evaluando el impacto de diferentes etapas de crecimiento del cultivo. Se puede usar cualquier medio para medir la etapa de crecimiento de un cultivo que sea conveniente. A modo de ejemplo sin limitación, un medio para medir la etapa de crecimiento del cultivo de raíz pilosa es medir la conductividad. La conductividad se puede medir por cualquier método conveniente, y un ejemplo es usar un medidor de conductividad SevenEasy™ (Mettler Toledo). Existe una relación inversa entre conductividad y crecimiento del cultivo. En la fase estacionaria, no se observa ningún cambio en la conductividad. La conductividad mide el cambio de la composición iónica total en el medio. Véase Condori et al. (2010) "Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage" *Plant Physiology and Biochemistry* 48:310-318; Yang et al. (2005) "Conductivity and pH dual detection of growth profile of healthy and stressed *Listeria monocytogenes*" *Biotechnol. Bioeng.* 92:685-694. Se puede medir H^+ y otros iones. A medida que el cultivo absorbe nutrientes, la conductividad disminuye. La etapa óptima del cultivo puede ser una etapa temprana, o etapa posterior dependiendo de las enzimas que se expresan en el desarrollo. En un ejemplo, la etapa óptima es la etapa de crecimiento exponencial. En un ejemplo sin pretender ser limitante, Condori et al (2010), *supra*, miden el impacto de la elicitación de los estilbenoides en diferentes etapas de crecimiento los días 6, 9, 12 y 15. Mientras que las etapas variables producen los estilbenoides, *trans*-resveratrol, *trans*-aracidin-1 y *trans*-acacidin-3 deseados, se encontró que el uso del medio MSV produjo niveles más altos de *trans*-resveratrol en todas las edades de cultivo, y hubo más variabilidad en los niveles de

trans-aracidin-1 y *trans*-araquidina-3 comparado con resveratrol tanto en medio B5 como en MSV. Para la producción más alta de estilbenoides en la línea Hull3 del cacahuete, el uso del medio MSV el día 9 dio como resultado los niveles más altos. El uso de plantas de cultivos de raíces pilosas y cultivos de raíces para producir estilbenos se discute en la patente de EEUU número 7.666.677 y también en la publicación de patente de EEUU número 2010/0130623.

Los estilbenos, incluyendo resveratrol y pinosilvina, han ganado mucho interés durante las últimas décadas debido a varios beneficios para la salud asociados con estos metabolitos secundarios de plantas. El resveratrol es una molécula antioxidante popular, natural, asociada con beneficios para la salud cardiovasculares y anticancerígenos. El resveratrol existe tanto como isómero *trans*-y *cis*- con numerosos informes que sugieren que el *trans*-resveratrol es la forma más bioactiva de esta molécula (Roupe et al., 2006a). *Trans*-resveratrol se puede convertir fácilmente en *cis*-resveratrol cuando se expone a la luz UV y es inestable cuando se expone a condiciones de alto pH. Además de los isómeros de resveratrol, derivados de resveratrol incluyen, pero no se limitan a, modificaciones glucosiladas, preniladas, metiladas, hidroxiladas así como tetrámeros de resveratrol se han relacionado con actividades beneficiosas. Varias de estas formas de resveratrol pueden, de hecho, proporcionar una biodisponibilidad mejorada y perfiles de comportamiento superiores a los observados para los isómeros de resveratrol libres (Chang et al., 2006; Roupe et al., 2006b; Wenzel y Somoza, 2005; Soleas et al., 2001). Algunos ejemplos incluyen análogos de monometiléter que se dan naturalmente de resveratrol que pueden ser importantes en la inhibición de la actividad quimiopreventiva potencial de CYP1A2 y CYP2E1 (Mikstacka et al., 2006). Varios derivados de resveratrol nuevos y previamente identificados que incluyen varios vitisinoles, viniferol y ϵ -viniferina de las raíces de *Vitis thunbergii* mostraron actividades antioxidantes y antiplaquetarias significativas (Huang et al., 2005). La reciente identificación de una forma tetramérica de resveratrol, el vaticanol B, parece tener propiedades antiinflamatorias potentes en la protección de las células contra la muerte celular inducida por estrés ER (Tabata et al., 2007). Arachidin-1 y -3 son derivados prenilados de resveratrol que se encuentran en cacahuetes y muestran actividades antiinflamatorias y antioxidantes favorables en un modelo celular (Chang et al., 2006). Del mismo modo, pinosilvina y sus derivados han demostrado ser prometedores como agentes antiinflamatorios y quimiopreventivos (Park et al., 2004; Lee et al., 2006). Las anteriores enumeran algunos ejemplos y muchos otros derivados son conocidos o permanecen para ser identificados e incluidos dentro del alcance de la invención. Mientras que resveratrol, pinosilvina y sus respectivos derivados se pueden recuperar como un extracto de una variedad de plantas, estos productos procedentes de material botánico crudo pueden no ser adecuados para todas las aplicaciones en los sectores alimentario/farmacéutico debido a impurezas de plantas endógenas/color asociado (es decir compuestos fenólicos, taninos, etc.) o impurezas de producción (es decir, residuos químicos, metales pesados, patógenos del suelo). Además, estos metabolitos secundarios se recuperan generalmente del material botánico crudo a concentraciones relativamente bajas. Finalmente, los rendimientos de estilbeno pueden ser muy variables de un lote a otro de este material botánico crudo debido al impacto de factores ambientales en el campo.

En la patente '677 y en la publicación de EE.UU. 201030623, se mostró que las raíces pilosas de las plantas, producidas por infección con *Agrobacterium*, ofrecen un sistema nuevo y sostenible basado en tejido de planta para la bioproducción de metabolitos secundarios valiosos que incluyen los estilbenoides resveratrol, pinosilvina y sus respectivos derivados. Estas raíces reflejan el fenotipo metabólico de la planta huésped, pero son únicas en su estabilidad genética y biosintética, proporcionando ventajas en la sostenibilidad de la producción en comparación con los sistemas de cultivo de células de plantas. Los avances recientes en el aumento de tamaño de los cultivos de raíz pilosa, como el uso de un biorreactor de niebla de bajo costo para la producción comercial de la camptotecina anticancerígena, continúan haciendo avanzar este sistema como una herramienta atractiva para procesos industriales (Wink et al., 2005; Guillon et al., 2006). Además, se ha demostrado la producción de cantidades incrementadas del isómero *trans* de resveratrol así como otros derivados de estilbeno valorados en medio y raíz, a través de la obtención de raíces pilosas de esta plataforma de cultivo de tejidos de plantas.

A continuación se utilizan las siguientes abreviaturas: B5, medio B5 de Gamborg con sacarosa al 2% (Gamborg et al., 1968); cv., cultivar; HPTLC, cromatografía de capa fina de alto rendimiento; HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento; R_f, factor de retardo; R_t, tiempo de retención; TLC, cromatografía en capa fina

Con el establecimiento de cultivos de raíz pilosa a partir de una amplia variedad de especies de plantas seleccionadas, la publicación y la patente mostraron que los estilbenos, incluyendo resveratrol, pinosilvina y sus respectivos derivados se pueden producir sin la inclusión de un transgén que codifica enzimas clave (tales como los que codifican la resveratrol sintasa, la enzima implicada en la síntesis del resveratrol, Chun et al., 2001). Se ha informado que estos estilbenos se producen naturalmente en una amplia gama de especies de plantas (Aggarwal et al., 2004). Además, los cultivos de raíz pilosa también se pueden usar con plantas transformadas con genes que codifican una enzima estilbeno sintasa. Los estilbenos son compuestos de defensa de origen natural derivados de la actividad de una sintasa de estilbeno (es decir, resveratrol sintasa o pinosilvina sintasa). Una enzima estilbeno sintasa define un importante punto de entrada regulador a la ruta biosintética de estilbeno como se muestra en la figura 4. Mediante el uso del término estilbeno o composición de estilbeno se entiende: (i) resveratrol y/o todos los derivados y análogos del resveratrol natural, que incluye, por ejemplo, los mostrados en la figura 5 y cualquier otro identificado como derivados de resveratrol y (ii) pinosilvina y/o todos los derivados y análogos de pinosilvina naturales.

Dado que estos derivados de estilbeno están típicamente presentes y recuperables en sólo pequeñas cantidades de material botánico crudo cultivado en el campo, la plataforma de producción de raíces pilosas ofrece una alternativa de producción viable, comercializable para resveratrol de origen natural, derivados de resveratrol y otros estilbenos valiosos. Cuando se hace referencia a una composición de resveratrol se entiende que incluye resveratrol, derivados de resveratrol o combinaciones de los mismos. Del mismo modo, cuando se hace referencia a una composición de pinosilvina se entiende pinosilvina, derivados de pinosilvina, y combinaciones de los mismos.

La enfermedad de la raíz pilosa se identificó por primera vez como un problema en plantas seleccionadas causado por *Agrobacterium rhizogenes*, que puede aislarse del suelo. La bacteria gram-negativa transfiere el ADN de su plásmido inductor de la raíz (Ri) al genoma de la célula de planta infectada que da lugar a la formación de raíces. Su uso en el control del crecimiento beneficioso de las raíces fue descrito por Strobel, patente de EEUU número 4.588.693. En la producción de cultivos de raíz pilosa, la planta está infectada con *Agrobacterium* por exposición de células de plantas o partes de plantas a *Agrobacterium*. Por ejemplo, los genes *rol* que contienen genes *rolA*, *rolB* y *rolC* (F. F. White et al., (1985)) están presentes en el T-DNA de plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* y la expresión de estos genes inducen la formación de raíces pilosas. Se puede usar cualquier parte de planta, tejido o célula capaz de producir raíces pilosas. Tales partes de plantas pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, vástago de planta, pecíolo, nodo cotiledonar, hipocótilo u otras partes o células de plantas. Se emplea preferentemente un medio semisólido o disolución líquida de nutrientes que se optimiza para el mantenimiento de las raíces, dando como resultado una mayor velocidad de crecimiento de las raíces en comparación con las células de plantas no infectadas. Aunque se conocen muchos tipos de materiales y disoluciones y medios y se pueden usar en la invención, varios ejemplos preferentes incluyen medio Murashige y Skoog y Gamborg B5. Se pueden emplear varias modificaciones de medios optimizados para cumplir los requerimientos de nutrientes *in vitro* de diferentes plantas huésped usadas en la producción de cultivos de raíces pilosas sostenibles.

Además, la patente y publicación muestran vectores para producir raíces pilosas en plantas, que contienen tanto los genes *rol* y genes *auxiliar* en una sola transferencia de ADN (T-DNA). Este vector permite el crecimiento sostenido de la línea de la raíz pilosa sin el uso de auxinas ya que tanto los genes *rol* como *aux* se insertan en el mismo ADN de la célula de la planta. El cribado de varias líneas de raíces pilosas tiene como resultado la identificación de una línea que puede mantener el crecimiento en líquido después de varios sucesos de subcultivo en medio semisólido. Un vector con ambos genes *rol* y *auxiliar* reduce el tiempo en la obtención raíces pilosas estables de alto crecimiento /secretoras de estilbeno. Tales vectores se pueden usar en *A. tumefaciens*, tales como cepas EHA105 y LBA4404 o cepas de *A. rhizogenes* tales como R1000 y ATCC 15834.

Las raíces pilosas después se exponen a una sustancia elicitora para producir los compuestos estilbenoides que incluyen resveratrol, pinosilvina y derivados asociados de estas moléculas. Un gran número de elicitors son conocidos por un experto en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Raskin, publicación de EEUU número 20020132021. Entre los elicitors conocidos por ser eficaces para elicitar resveratrol, se incluyen las ciclodextrinas, incluyendo β -ciclodextrina metilada aleatoriamente, celulosa, laminarina, quitosano, acetato de sodio, sulfato de cobre, luz ultravioleta, jasmonatos, ortovanadato sódico. (Rudolf y Resurreccion, 2005; Tassoni et al., 2005; Bru et al., 2006; WO 2009/106662). Aunque ciertos elicitors pueden producir resultados óptimos, el experto en la técnica apreciará que están disponibles para su uso en la invención una serie de elicitors diferentes.

Resveratrol, pinosilvina y derivados se pueden obtener a partir de las raíces, medio o disolución y extraer por procedimientos conocidos, y la invención no está limitada por ningún procedimiento de extracción particular. Por ejemplo, cromatografía en columna, cristalización, destilación, extracción en fase líquida o sólida se encuentran entre muchas técnicas conocidas en la técnica. Un ejemplo de uno de tales procesos es el uso de un disolvente que puede crear dos fases capaces de separación, tal como acetato de etilo. Esto proporciona ventajas sobre el uso de disolventes tales como metanol, donde se requiere secado porque metanol y agua son miscibles y no se producen dos fases. Sin embargo, dado que los medios utilizados pueden ser ricos en azúcares, estos pueden unirse a algunos de los estilbenoides, resveratrol y pinosilvina, causando una drástica disminución en la recuperación.

Además, los inventores han descubierto que los cultivos de raíces se pueden usar para producir estilbenoides y son eficaces para producir cantidades incrementadas de derivados. El término cultivos de raíz en la presente memoria se refiere a un cultivo de raíces distinto de los cultivos de raíz pilosa, y son aquellos que no requieren infección con *Agrobacterium* ni requieren la introducción de un gen o genes de *Agrobacterium* como con la producción de cultivos de raíz pilosa. Los cultivos de raíces que se pueden utilizar para producir estilbenos u otros compuestos son un sistema proliferante de cultivo de raíz derivado de puntas radiculares de origen apical o lateral cultivadas en condiciones estériles (*in vitro*) o condiciones no estériles que no requieren infección con *Agrobacterium*. Las puntas de raíces o biomasa derivan de raíces de plántulas, plántulas, plantas cultivadas hidropónicamente o cualquier explante de planta o callo inducido a producir raíces. La producción de estilbeno u otra composición objetivo puede aumentar en una realización aumentando la producción de cultivos de raíces, exponiendo el cultivo a estímulos químicos o físicos o mediante modificación genética de las raíces. La composición de estilbeno puede estar en una realización adicional aislada de raíces o medios de cultivo de raíces y en una realización se puede ser purificar por procesos conocidos tales como cromatografía y extracción con disolvente químico, por ejemplo. En una realización, con el fin de aumentar la biomasa de las raíces, los cultivos de raíz aislados *in vitro* (cultivos de raíces adventicias) se suplementan con hormona(s) auxina exógena [p. ej. ácido indol acético (IAA), ácido naftaleno acético (NAA), ácido indol butírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D)]. Alternativamente se proporcionan hormonas

directamente del sistema en el caso de cultivos de raíces derivados de plantas cultivadas hidropónicamente. En tales cultivos de raíz la biomasa de raíz puede producirse igualmente en cultivos en lotes y/o biorreactores como se describe en la presente memoria.

De este modo, como se ha expuesto anteriormente, se produce estilbeno, estilbeno que tiene una estructura de esqueleto común que consiste en un hidrato de carbono con un doble enlace etano *trans* o *cis* sustituido con un grupo fenilo en ambos átomos de carbono del doble enlace. Dichos derivados de estilbeno incluyen precursores y análogos y, por ejemplo, pero sin limitación, incluyen modificaciones glicosiladas, preniladas, metiladas e hidroxiladas así como oligómeros y polímeros de las mismas. Otros ejemplos específicos, sin pretender ser limitantes, incluyen *trans*- y *cis*- resveratrol, piceida, araquidina incluyendo araquidina-1 y 3, vitisinol, viniferol y ϵ -viniferina, vitanol B, derivados de pinosilvina, entre otros. El aumento de la producción de derivados valiosos proporciona una actividad mejorada de tales composiciones de estilbeno. Las composiciones que tienen derivados de estilbeno aumentados en comparación con resveratrol tienen ventajas particulares y beneficios médicos y de mejora de la salud. Los beneficios son particularmente útiles cuando la cantidad de derivado producido en la composición en comparación con el resveratrol es al menos diez veces más, al menos 20 veces más, al menos 30 veces más, al menos 40 veces más, al menos 50 veces más, al menos 100 veces más, al menos 1.000 veces más y cualquier cantidad entre ellas.

Se puede llevar a cabo ensayo y análisis de resveratrol a través de cualquier variedad de métodos, y puede incluir, por ejemplo, aprovechar la fluorescencia natural del compuesto cuando se exponen a la luz ultravioleta. Cromatografía en capa fina, cromatografía de capa fina de alto rendimiento (Babu et al., 2005), cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases-espectrometría de masas están entre los ejemplos de ensayos que se pueden usar para analizar el resveratrol producido.

La referencia a plantas incluye plantas enteras, así como células de plantas y partes de plantas, tales como tejidos, o protoplastos de la planta u organismo, cultivos celulares, cultivos de tejidos, callos, embriones y semillas. Las plantas que son particularmente útiles son aquellas que producen naturalmente resveratrol, que incluyen *Pinus sibirica*, *Pinus sylvestris*, *Gnetum parviflorum*, *Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia*, *Polygonum cuspidatum*, *Arachis hypogaea*, *Eucalyptus* sp *Artocarpus lakoocha*, *Nothofagus fusca*, *Phoenix dactylifera*, *Festuca versuta*, *Carex fedia*, *Veratrum grandiflorum*, *Cassia quinquangulata*, *Lycopersicon esculentum*, *Gossypium hirsutum* y cualquier otra especie de planta que muestre que produce resveratrol. En una realización preferente de la invención, la planta es *Arachis hypogaea*. En otra realización preferente la planta es *Vitis rotundifolia*. En otra realización preferente la planta es *Polygonum cuspidatum*. En otra realización preferente se producen estilbenos a partir de *Nicotiana* no transgénica como *Nicotiana benthamiana*.

Como se describe en la patente y publicación, también se puede emplear en el proceso una planta que no produce naturalmente estilbenos incluyendo resveratrol y pinosilvina, pero que ha sido diseñada por ingeniería genética para producir estilbenos. Como se discute en la presente memoria, cualquier planta que pueda ser diseñada por ingeniería genética se podría transformar con una secuencia de nucleótidos que expresa una estilbeno sintasa (es decir, resveratrol sintasa o pinosilvina sintasa). En una realización adicional, una planta puede ser modificada genéticamente para coexpresar una estilbeno sintasa (es decir, resveratrol sintasa o pinosilvina sintasa) con uno o más genes implicados en la producción de un resveratrol o derivado de pinosilvina. Por ejemplo, Hall y De Luca (2001) clonaron una glucosil transferasa de uva Concord (*Vitis labrusca*) que puede utilizar el resveratrol como sustrato. En un ejemplo, la coexpresión de resveratrol sintasa y esta resveratrol glucosil transferasa puede conducir a la producción de glucósidos de resveratrol. Hall y De Luca también muestran que resveratrol glucosil transferasa puede utilizar diferentes compuestos fenólicos como sustratos. Debido a que muchas de las enzimas que catalizan las modificaciones posteriores de resveratrol o pinosilvina pueden aceptar también diferentes compuestos fenólicos como sustratos, se puede predecir que otras enzimas que también utilizan como sustratos otros compuestos fenólicos también pueden aceptar resveratrol o pinosilvina y producir resveratrol o derivados de pinosilvina. Estas enzimas no se limitan a glucosil transferasas, preniltransferasas, metiltransferasas e hidroxilasas. Ejemplos específicos de estas enzimas son flavonoides-O-metiltransferasas, cafeilo-CoA metiltransferasa, cinamoyl-CoA metiltransferasa, geraniltransferasa y cualquier otra enzima que pueda aceptar un compuesto de estilbenos como sustrato. Utilizando métodos generales de transformación de plantas, los genes que codifican estas enzimas se pueden coexpresar con una estilbeno sintasa o expresar en una planta transgénica que ya expresa una estilbeno sintasa. Además, las plantas que producen naturalmente estilbenos pueden ser diseñadas con una enzima para producir una clase específica de derivados y se pueden producir raíces pilosas a partir de estas plantas diseñadas por ingeniería.

Plantas transformadas con un gen que codifica una estilbeno sintasa, por ejemplo resveratrol sintasa o pinosilvina sintasa, incluyen cualquier planta capaz de ser transformada, incluyendo, sin limitación, plantas que se pueden usar para alimentos y piensos, tales como maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorgo bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), patata (*Solanum tuberosum*); y guisantes (*Lathyrus spp.*). Alternativamente, la planta transgénica puede ser una especie que no se consume convencionalmente, tal como tabaco (*Nicotiana tabacum*), té (*Camellia sinensis*), lino (*Linum*), sisal (*Agave sisalana*), abetos y cedros. Se conoce la producción de plantas transgénicas con una secuencia de nucleótidos que codifica resveratrol sintasa, tal como la discutida en Paiva et al., patente de EE.UU. número 6.974.895 y Chia et al.

publicación de EE.UU. número 20040111760. La planta o célula de planta transgénica resultante puede inducirse a producir raíces pilosas utilizando el proceso de la invención, y se puede recuperar resveratrol u otros estilbenoides. Además, se aprecia que cae dentro del alcance de la invención introducir en otras células de plantas otras secuencias de nucleótidos deseables y luego producir raíces pilosas de las células de plantas, si la planta produce naturalmente resveratrol, pinosilvina o derivados relacionados o se diseña por ingeniería genética para producir estos metabolitos secundarios.

En general, los métodos disponibles para la construcción de genes recombinantes, que opcionalmente comprenden diversas modificaciones para mejorar la expresión, pueden diferir en detalle. Sin embargo, los métodos convencionalmente empleados incluyen la amplificación por PCR, o el diseño y síntesis de oligonucleótidos sintéticos complementarios superpuestos, que se recoplan y se ligan entre sí para producir un gen con sitios de restricción convenientes para la clonación, o subclonación de otra fuente ya clonada, o clonación a partir de una biblioteca. Los métodos utilizados son métodos estándar para un biólogo molecular (Sambrook et al., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY).

Se prepara típicamente un vector que comprende el gen que codifica una molécula, tal como la estilbeno sintasa, que produce estilbenoides o el precursor o producto objetivo o producto intermedio, un promotor que impulsará la expresión del gen en la planta y una región de terminación. A este respecto, se pueden emplear cualesquiera elementos promotores compatibles con plantas en la construcción, influenciados por el resultado final deseado. Pueden ser promotores de genes de plantas, tales como, por ejemplo, el promotor de la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa, o promotores de los plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*, tales como los promotores de la nopalina sintasa y octopina sintasa, o promotores virales tales como los promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) o el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia. Véase Kay et al., (1987) *Science* 236:1299 y solicitud de patente europea número 0 342 926; el promotor de la proteína de transferencia de lípidos de cebada, LTP2 (Kalla et al., *Plant J.* (1994) 6(6): 849-60); el promotor ubiquitina (véase por ejemplo la patente de EE.UU. 5.510.474); el promotor END2 (Linnestad et al. patente de EEUU 6.903.205); y el promotor PG47 de poligalacturonasa (véase Allen y Lonsdale, *Plant J.* (1993) 3: 261-271; documento WO 94/01572; patente de EE.UU. 5.412.085) y promotor de actina de arroz (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171). Véase solicitud internacional WO 91/19806 para una revisión de diversos promotores de plantas también adecuadamente empleados en la expresión génica de plantas.

La gama de promotores compatibles con plantas disponibles incluye promotores específicos de tejidos e inducibles. Un elemento regulable inducible es aquel que es capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes en respuesta a un inductor. En ausencia de un inductor las secuencias de ADN o los genes no se transcribirán. Típicamente el factor de proteína que se une específicamente a un elemento regulador inducible para activar la transcripción está presente en una forma inactiva que después se convierte directa o indirectamente a la forma activa por el inductor. El inductor puede ser un agente químico tal como una proteína, metabolito, regulador del crecimiento, herbicida o compuesto fenólico o un esfuerzo fisiológico impuesto directamente por elementos térmicos, fríos, salinos o tóxicos o indirectamente por la acción de un patógeno o agente infeccioso tal como un virus. Una célula de planta que contiene un elemento regulador inducible se puede exponer a un inductor aplicando externamente el inductor a la célula o planta tal como mediante pulverización, riego, calentamiento o métodos similares.

Se puede usar cualquier promotor inducible en relación con un gen que expresa una molécula. Véase Ward et al. *Plant Mol. Biol.* 22:361-366 (1993). Los promotores inducibles de ejemplo incluyen promotores del receptor ecodisona, patente de EE.UU. número 6.504.082; promotores del sistema ACE1 que responde al cobre (Mett et al. *PNAS* 90: 4567-4571 (1993)); gen In2-1 e In2-2 del maíz que responden a los fitoprotectores herbicidas de la bencenosulfonamida (patente de EEUU número 5.364.780; Hershey et al., *Mol. Gen. Genetics* 227: 229-237 (1991) y Gatz et al., *Mol. Gen. Genetics* 243: 32-38 (1994)); el promotor de GST de maíz, que es activado por compuestos electrofílicos hidrófobos que se usan como herbicidas de preemergencia; y el promotor de PR-1a de tabaco, que es activado por ácido salicílico. Otros promotores regulados por productos químicos de interés incluyen promotores que responden a esteroides (véase, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10421-10425 y McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14 (2): 247-257) y promotores inducibles por tetraciclina y represor de la tetraciclina (véase, por ejemplo, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227: 229-237, y la patente de EE.UU. número 5.814.618 y 5.789.156).

Se pueden utilizar promotores preferentes de tejidos para dirigir la transcripción y/o expresión mejoradas dentro de un tejido de planta particular. Los promotores se pueden expresar en el tejido de interés, junto con la expresión en otros tejidos de plantas, pueden expresarse fuertemente en el tejido de interés y en un grado mucho menor que otros tejidos, o pueden expresarse muy preferentemente en el tejido de interés. Es preferente un promotor específico de tejido con expresión preferente en raíces pilosas. Un promotor de este tipo es, por ejemplo, el promotor Super P que alberga elementos de los genes de la manopina sintasa y de octopina sintasa. Este promotor ha demostrado tener una fuerte expresión en la raíz pilosa y baja en hojas (Nopo-Olazabal et al., 2005). Hay una amplia variedad de otros promotores preferentes de tejidos y, a modo de ejemplo, incluyen los descritos en Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12 (2): 255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7): 792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3): 337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(3): 1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2): 525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.*

112(2): 513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5): 773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6): 1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90 (20): 9586-9590; y Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J.* 4 (3): 495-505.

Se pueden incluir otros componentes del vector, también dependiendo del uso pretendido del gen. Los ejemplos incluyen marcadores seleccionables, secuencias de direccionamiento o regulación, secuencias estabilizadoras o líder, intrones, etc. Se pueden encontrar descripciones generales y ejemplos de vectores de expresión de plantas y genes informadores en Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" in *Method in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick et al eds; CRC Press pp. 89-119 (1993). La selección de un vector de expresión apropiado dependerá del huésped y del método de introducción del vector de expresión en el huésped. El casete de expresión también puede incluir en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos heteróloga, una región de terminación transcripcional y de traducción funcional en plantas. Las regiones de terminación convenientes están disponibles a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tal como la octopina sintasa y la nopalina sintasa (*nos*) regiones de terminación (Depicker et al., *Mol. y Appl. Genet.* 1: 561-573 (1982)). Véase también, Guerineau et al. *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144 (1991); Proudfoot, *Cell* 64: 671-674 (1991); Sanfacon et al. *Genes Dev.* 5: 141-149 (1991); Mogen et al. *Plant Cell* 2: 1261-1272 (1990); Munroe et al. *Gene* 91: 151-158 (1990); Ballas et al. *Nucleic Acids Res.* 17: 7891-7903 (1989); Joshi et al. *Nucleic Acid Res.* 15: 9627-9639 (1987).

Los genes informadores seleccionables para la selección de células o tejidos transformados pueden incluirse en los vectores de transformación. Estos pueden incluir genes que confieren resistencia a antibióticos o resistencia a herbicidas. Ejemplos de genes marcadores seleccionables adecuados incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican resistencia al cloranfenicol, Herrera Estrella et al. *EMBO J.* 2: 987-992 (1983); metotrexato, Herrera Estrella et al. *Nature* 303: 209-213 (1983); Meijer et al. *Plant Mol. Biol.* 16: 807-820 (1991); higromicina, Waldron et al. *Plant Mol. Biol.* 5: 103-108 (1985), Zhijian et al. *Plant Science* 108: 219-227 (1995); estreptomycin, Jones et al. *Mol. Gen. Genet.* 210: 86-91 (1987); espectinomycin, Bretagne-Sagnard y col. *Transgenic Res.* 5: 131-137 (1996); bleomicina, Hille et al. *Plant Mol. Biol.* 7: 171-176 (1990); sulfonamida, Guerineau et al. *Plant Mol. Biol.* 15: 127-136 (1990); bromoxinil, Stalker et al. *Science* 242: 419-433 (1988); glifosato, Shaw et al. *Science* 233: 478-481 (1986); y fosfinotricina, DeBlock et al. *EMBO J.* 6: 2513-2518 (1987). Esta última es la fosfinotricina acetil transferasa ("PAT") o PAT optimizada de maíz o gen *bar* que confiere resistencia al bialafos (Gordon-Kamm. 1990. *The Plant Cell* 2: 603; Uchimiya et al. 1993. *Bio/Technology* 11: 835; y Anzai et al, 1989. *Mol. Gen. Gen.* 219:492).

También se pueden emplear marcadores medibles o marcables, donde la presencia de la secuencia produce un producto medible. Ejemplos incluyen una β -glucuronidasa o un gen uidA (GUS), que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (por ejemplo, patentes de EEUU 5.268.463 y 5.599.670); cloranfenicol acetil transferasa (Jefferson et al. *The EMBO Journal* vol. 6 no. 13 pp. 3901-3907); y fosfatasa alcalina. Otros marcadores seleccionables incluyen los genes antocianina/flavonoides en general (Véase discusión en Taylor y Briggs, *The Plant Cell* (1990) 2: 115-127) que incluye, por ejemplo, un gen de locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos antocianínicos (color rojo) en tejidos de plantas (Dellaporta et al., *En Chromosome Structure and Function*, Kluwer Academic Publishers, Appels y Gustafson eds., Pp. 263-282 (1988)); los genes que controlan la biosíntesis de los pigmentos flavonoides, tales como el gen C1 del maíz (Kao et al., *Plant Cell* (1996) 8: 1171-1179; Scheffler et al. *Mol. Gen. Genet.* (1994)242: 40-48) y maíz C2 (Wienand et al., *Mol. Gen. Genet.* (1986)203: 202-207); el gen B (Chandler et al., *Plant Cell* (1989) 1: 1175-1183), el gen p1 (Grotewold et al, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1991) 88: 4587-4591; Grotewold et al., *Cell* (1994) 76: 543-553; Sidorenko et al., *Plant Mol. Biol.* (1999) 39: 11-19); los genes del locus de bronce (Ralston et al., *Genetics* (1988) 119: 185-197; Nash et al., *Plant Cell* (1990) 2 (11): 1039-1049), entre otros. Aún otros ejemplos de marcadores adecuados incluyen el gen de la proteína fluorescente cian (CYP) (Bolte et al. (2004) *J. Cell Science* 117: 943-54 y Kato et al. (2002) *Plant Physiol* 129: 913-42), el gen de la proteína fluorescente amarilla (PhyYFP™ de Evrogen; véase Bolte et al. (2004) *J. Cell Science* 117: 943-54); un gen *lux*, que codifica una luciferasa, cuya presencia se puede detectar usando, por ejemplo, una película de rayos X, conteo de centelleo, espectrofotometría fluorescente, cámaras de vídeo de baja luz, cámaras de recuento de fotones o luminometría de pocillos múltiples (Teeri et al. (1989) *EMBO J.* 8: 343); un gen de proteína fluorescente verde (GFP) (Sheen et al., *Plant J.* (1995) 8 (5): 777-84); y genes DsRed donde las células de plantas transformadas con el gen marcador son de color rojo, y por lo tanto visualmente seleccionable (Dietrich et al. (2002) *Biotechniques* 2 (2): 286-293). Ejemplos adicionales incluyen un gen p-lactamasa (Sutcliffe, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* (1978) 75: 3737), que codifica una enzima para la cual se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen *xiloE* (Zukowsky et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* (1983) 80: 1101), que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen de α -amilasa (Ikuta et al., *Biotech.* (1990)8: 241); y un gen de tirosinasa (Katz et al., *J. Gen. Microbiol.* (1983)129: 2703), que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa para formar el compuesto melanina fácilmente detectable. Claramente, muchos de tales marcadores están disponibles para un experto en la técnica.

Los casetes de expresión pueden contener adicionalmente secuencias líder 5'. Tales secuencias líder pueden actuar para mejorar la traducción. Los líderes de traducción son conocidos en la técnica e incluyen a modo de ejemplo, líderes de picornavirus, líder de EMCV (región no codificante de Encephalomyocarditis 5'), Elroy-Stein et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130 (1989); líderes de potyvirus, por ejemplo, TEV líder (Tobacco Etch Virus), Allison y col.; líder MDMV (Maize Dwarf Mosaic Virus), *Virology* 154: 9-20 (1986); proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP), Macejak et al. *Nature* 353: 90-94 (1991); líder no traducido del ARNm de la proteína

de la cubierta del virus del mosaico de la alfalfa (AMV ARN 4), Jobling et al. *Nature* 325: 622-625 (1987); líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), Gallie et al. (1989) *Molecular Biology of RNA*, páginas 237-256; y el líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) Lommel et al. *Virology* 81: 382-385 (1991). Véase también Della-Cioppa et al. *Plant Physiology* 84: 965-968 (1987).

El casete también puede contener secuencias que mejoran la traducción y/o la estabilidad del mRNA, tales como intrones. Otras modificaciones pueden mejorar la expresión, incluyen la eliminación de secuencias que codifican señales de poliadenilación espurias, señales de sitio de empalme exón-intrón, repeticiones tipo transposón, y otras secuencias bien caracterizadas que pueden ser perjudiciales para la expresión génica. El contenido G-C de la secuencia se puede ajustar a los niveles de media para un huésped celular dado, calculado por referencia a genes conocidos expresados en la célula huésped. Cuando es posible, la secuencia se modifica para evitar predecir horquilla secundaria de estructuras de mRNA.

En los casos en que es deseable que el producto expresado de la secuencia de nucleótidos heteróloga se dirija a un organelo particular, en particular al plástido, amiloplasto, o al retículo endoplásmico, o segregado a la superficie de la célula o extracelularmente, el casete de expresión puede comprender además una secuencia codificante para un péptido de tránsito. Tales péptidos de tránsito son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, el péptido de tránsito para la proteína portadora de acilo, la subunidad pequeña de RUBISCO, EPSP sintasa de planta, *Zea mays* péptido de tránsito de cloroplasto Brittle-1 (Nelson et al. *Plant Physiol* 117 (4): 1235-1252 (1998); Sullivan et al. *Plant Cell* 3 (12): 1337-48; Sullivan et al., *Planta* (1995) 196 (3): 477-84; Sullivan et al., *J. Biol. Chem.* (1992) 267 (26): 18999-9004) y similares. Un experto en la técnica apreciará fácilmente las muchas opciones disponibles para expresar un producto a un organelo particular. Por ejemplo, la secuencia de alfa-amilasa de cebada se utiliza a menudo para dirigir la expresión al retículo endoplásmico (Rogers, *J. Biol. Chem.* 260: 3731-3738 (1985)). El uso de péptidos de tránsito es bien conocido (p.ej., véase las patentes de EEUU números 5,717.084; 5.728.925).

En la preparación del casete de expresión, los diversos fragmentos de ADN se pueden manipular, de modo que proporcionen las secuencias de ADN en la orientación apropiada y, según sea apropiado, en el marco de lectura apropiado. Con este fin, se pueden emplear adaptadores o enlazadores para unir los fragmentos de ADN u otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, eliminación de ADN superfluo, eliminación de sitios de restricción, o similares. Para este propósito, puede estar implicado mutagénesis *in vitro*, reparación de iniciadores, digestiones de restricción, recocido y resustituciones, tales como transiciones y transversiones.

En general, los vectores deben ser funcionales en células de plantas. A veces, puede ser preferente tener vectores que sean funcionales en *E coli* (p.e., producción de proteína para producir anticuerpos, análisis de secuencia de ADN, construcción de insertos, obtención de cantidades de ácidos nucleicos). Vectores y procedimientos para la clonación y expresión en *E coli* se discuten en Sambrook et al. (*supra*).

El método de transformación/transfección no es crítico; varios métodos de transformación o transfección están actualmente disponibles. Como nuevos métodos están disponibles para transformar cultivos u otras células huésped pueden ser aplicados directamente. Por consiguiente, se ha desarrollado una amplia variedad de métodos para insertar una secuencia de ADN en el genoma de una célula huésped para obtener la transcripción o transcrito y la traducción de la secuencia heteróloga. De este modo, se puede emplear cualquier método que proporcione una transformación/transfección eficaz.

Los métodos para introducir vectores de expresión en tejido de planta disponibles para un experto en la técnica son variados y dependerán de la planta seleccionada. Los procedimientos para transformar una amplia variedad de especies vegetales son bien conocidos y descritos a lo largo de la literatura. Véase, por ejemplo, Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA in Plant" in *Methods in Plant Molecular Biotechnology*, *supra*; Klein et al., *Bio/Technology* 10: 268 (1992); y Weising et al., *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477 (1988). Por ejemplo, la construcción de ADN se puede introducir en el ADN genómico de la célula de planta utilizando técnicas tales como la administración mediada por microproyectiles, Klein et al., *Nature* 327: 70-73 (1987); electroporación, Fromm et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5824 (1985); precipitación de polietilenglicol (PEG) Paszkowski et al., *EMBO J.* 3: 2717-2722 (1984); transferencia directa de genes WO 85/01856 y EP número. 0 275 069; transformación *in vitro* de protoplastos, patente de EEUU 4.684.611; y microinyección de protoplastos de células vegetales o callos embriogénicos, Crossway, *Mol. Gen. Genetics* 202: 179-185 (1985). Co-cultivo de tejido de plantas con *Agrobacterium tumefaciens* es otra opción, donde las construcciones de ADN se colocan en un sistema de vector binario. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU número 5.591.616; Ishida et al., "High Efficiency Transformation of Maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*" *Nature Biotechnology* 14: 745-750 (1996). Las funciones de virulencia del anfitrión *Agrobacterium tumefaciens* dirigirá la inserción de la construcción en el ADN de la célula de planta cuando la célula está infectada por la bacteria. Véase, por ejemplo Horsch et al., *Science* 233: 496-498 (1984), y Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:4803 (1983).

Los métodos estándar para la transformación de canola se describen en Moloney et al. "High Efficiency Transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* Vectors" *Plant Cell Reports* 8: 238-242 (1989). La transformación del maíz se describe en Fromm et al., *Bio/Technology* 8: 833 (1990) y Gordon-Kamm et al., *supra*. *Agrobacterium* se utiliza principalmente en dicotiledóneas, pero las monocotiledóneas se pueden transformar por

Agrobacterium. Véase *supra* y patente de EEUU número 5.550.318. La transformación del arroz se describe Hiei et al., "Efficient Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) Mediated by *Agrobacterium* and Sequence Analysis of the Boundaries of the T-DNA " The Plant Journal 6 (2): 271-282 (1994, Christou et al, *Trends in Biotechnology* 10: 239 (1992) y Lee et al, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88: 6389 (1991). El trigo se puede transformar por técnicas similares a las utilizadas para transformar maíz o arroz. La transformación del sorgo se describe en Casas et al, *supra* y sorgo en Wan et al., *Plant Physiol.* 104: 37 (1994). La transformación de soja se describe en varias publicaciones, que incluye la patente de EEUU número 5.015.580.

Cuando se hace referencia a la "introducción" de la secuencia de nucleótidos en una planta, se entiende que esto puede ocurrir por métodos de transformación directa, tales como transformación de tejido de planta `por *Agrobacterium* , bombardeo con microproyectiles, electroporación, o cualquiera de los muchos métodos conocidos por los expertos en la técnica; o, puede ocurrir cruzando una planta que tiene la secuencia de nucleótidos heteróloga con otra planta de modo que la progenie tenga la secuencia de nucleótidos incorporada en sus genomas. Tales técnicas de reproducción son bien conocidas por los expertos en la técnica. Para una explicación de las técnicas de reproducción de plantas, véase Poehlman (1995) *Breeding Field Crops*. Avi Publication Co., Westport Conn, 4th Edit. Los métodos de retrocruzamiento se pueden usar para introducir un gen en las plantas. Esta técnica se ha utilizado durante décadas para introducir rasgos en una planta. Un ejemplo de una descripción de esta y otras metodologías de reproducción que son bien conocidas se puede encontrar en referencias tales como Poelman, *supra*, y *Plant Breeding Methodology*, edit. Neal Jensen, John Wiley & Sons, Inc. (1988). En un protocolo de retrocruzamiento típico, la variedad original de interés (padre recurrente) se cruza con una segunda variedad (padre no recurrente) que lleva el único gen de interés que se va a transferir. La progenie resultante de este cruce se cruza después nuevamente con el padre recurrente y el proceso se repite hasta que se obtiene una planta en la que esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas deseadas del padre recurrente se recuperan en la planta convertida, además del único gen transferido del padre no recurrente.

La ampliación de la producción de moléculas a partir de cultivos de raíz pilosa se puede conseguir mediante cualquiera de los sistemas conocidos para la propagación de plantas, y la invención no está limitada por los medios de aumentar la producción de resveratrol y otros estilbenos. Por ejemplo, un ejemplo es corriente de malla de transporte aéreo (Caspeta et al., 2005); otro utiliza un sistema de soporte de malla (Ramakrishnan et al., 2004). A continuación se describe un sistema de biorreactor. Un experto en la técnica aprecia que existen muchas variaciones en los componentes y procesos con los que se puede usar la secuencia de nucleótidos de la invención. Véase en la patente '677 y publicación de EEUU 201030623 las figuras y ejemplos para ilustraciones de métodos para producir estilbenos en plantas.

Para aumentar la cantidad de un producto de interés en plantas, partes de plantas y/o células, se pone en contacto un precursor del producto de interés con la planta o parte de planta. Tales precursores pueden incluir, pero no se limitan a piceatannol, escualeno, acetato, fenilalanina, ácido cumárico, ácido cinámico, triptófano y putrescina. Uno o más de los precursores se pueden aplicar a la planta, parte de la planta, y/o células. La cantidad de precursor aplicada a la planta, parte de planta y/o célula puede variar dependiendo del producto de interés.

El uso del precursor puede dar como resultado una inhibición de retroalimentación de la producción del producto de interés. El uso de un agente atrapante o ligante puede limitar y/o prevenir la inhibición de retroalimentación. El agente atrapante o ligante forma complejo con compuestos en la ruta y atrapa el producto o intermedio.

Dichos agentes atrapantes pueden incluir, pero no se limitan a ciclodextrina, alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, gamma-ciclodextrina. En una realización, el agente atrapante no está permanentemente ligado al producto de interés. En otras realizaciones, el agente atrapante se puede usar si no se produce la inhibición de retroalimentación. Se puede usar uno o más de los agentes atrapantes durante el proceso. Por ejemplo, ciertos agentes atrapantes, tales como una ciclodextrina se puede usar en combinación con jasmonato de metilo para atrapar el producto de interés o intermedio. El período de incubación con el agente atrapante y elicitador puede variar dependiendo del producto deseado.

En una realización, el agente atrapante a utilizar se puede seleccionar en base al producto de interés. Dicho agente atrapante se selecciona para maximizar la captura del producto de interés. En tal realización, las características del producto de interés pueden ser consideradas en la selección del agente de captura. Por ejemplo, la polaridad del producto de interés puede ser considerada al seleccionar el agente atrapante. En tal realización, el agente atrapante a utilizar tiene una polaridad que atraerá el producto de interés basado en la polaridad del producto de interés.

En un ejemplo, la planta o cultivo de planta se pone en contacto con el precursor putativo, elicitador y agente atrapante durante cualquier periodo de tiempo. El producto de interés después se extrae del medio de cultivo o tejido de planta. El producto de interés puede ser cualquier compuesto tal como un fenólico, un terpenoide y un alcaloide. En un ejemplo, el producto de interés deseado se podría producir naturalmente por la planta tras el tratamiento con un elicitador. Como ejemplo, dicho compuesto es un estilbeno. En otro ejemplo, el producto deseado es un nuevo compuesto que se produce cuando se añade un xenobiótico al cultivo. Como ejemplo, dicho compuesto es un glucurónido.

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos.

Ejemplo 1. Mejora de biosíntesis de araquidina-1 en cultivos de raíz pilosa de cacahuete.

Los estilbenoides son compuestos polifenólicos con importantes aplicaciones en la salud humana. Estos productos naturales exhiben propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anticancerosas. El resveratrol, un estilbenoide producido por ciertas especies de plantas como uva y cacahuete, ha sido el más estudiado entre este grupo de compuestos polifenólicos. Anteriormente se demostró la aplicación de cultivos de raíz pilosa como sistema de bioproducción para estilbenoides incluyendo resveratrol y sus análogos y derivados. De hecho, se demostró que los cultivos de raíz pilosa de cacahuete pueden producir resveratrol y varios estilbenoides prenilados, incluyendo arachidin-1 y arachidin-3, sobre el tratamiento con acetato de sodio. Describimos además la purificación de araquidina-1 y araquidina-3 a partir de medio de cultivo de raíz pilosa tratado con acetato de sodio usando cromatografía de partición centrífuga (CPC). En un estudio reciente mostramos que araquidina-1 y araquidina-3 tienen afinidad por receptores cannabinoides. Véase la publicación de la solicitud de patente de EEUU número 20120165281.

Los compuestos que modulan el receptor cannabinoide tienen aplicaciones en neuroprotección, control de obesidad y adicción a drogas. Además, también se demostró que la araquidina-1 tiene mayores actividades antioxidantes que resveratrol *in vitro*. Nuestro reciente estudio con araquidina-1 y araquidina-3 demostró que estos estilbenoides prenilados tienen perfiles metabólicos favorables *in vitro* en comparación con el resveratrol. Véase la publicación de la solicitud de patente de EEUU número 20120165281. Debido a su mayor lipofilia y perfiles metabólicos favorables, las araquidinas pueden estar más biodisponibles que resveratrol. Mientras que resveratrol está disponible comercialmente como un producto sintético y natural, araquidina-1 y araquidina-3 no están disponibles a través de ninguna fuente comercial. Estudios con estos estilbenoides sólo se han llevado a cabo mediante la extracción de estos polifenoles a partir de semillas de cacahuete inoculadas con hongos o raíces pilosas de cacahuete tratados con elicitores. Debido a la importancia de las araquidinas, en particular araquidina-1, diseñamos estrategias para aumentar los niveles de este compuesto en cultivos de raíz pilosa de cacahuete.

Se cultivaron raíces pilosas de cacahuete cv. Hull línea 3 durante 9 días en un medio Murashige & Skoog modificado a 28°C, bajo agitación (90 rpm) y oscuridad continua. El día 9, se retiró el medio agotado y se midió la conductividad del medio. El medio gastado se reemplazó por un medio fresco que contenía entre 0,5 y 75 mM de β -ciclodextrina, tal como 7,5 mM de β -ciclodextrina (agente atrapante) y entre 10 y 500 μ M de jasmonato de metilo, tal como jasmonato de metilo 100 μ M (MeJA, inductor/elicitador) con o sin 0,05 a 10 mM de piceatannol, tal como 1 mM de piceatannol (precursor biosintético putativo o xenobiótico). Los cultivos de control incluían etanol (disolvente de MeJA) solamente. Los cultivos se incubaron durante 24 horas adicionales como se ha descrito anteriormente y después se recogió el medio. Los estilbenoides se extrajeron del medio de cultivo con acetato de etilo y esta fracción orgánica se secó hasta completarse bajo corriente de nitrógeno. El extracto se resuspendió en metanol y se analizó por HPLC de fase inversa. La detección se realizó con un detector de matriz de fotodiodos. Se confirmó araquidina-1 por comparación con el tiempo de retención y el espectro UV de un estándar auténtico de araquidina-1. Además, análisis previos por espectrometría de masas confirmaron la presencia de araquidina-1 en cultivos de raíz pilosa inducidos de cacahuete. La cuantificación de araquidina-1 se realizó por HPLC usando una curva de calibración de los estándares auténticos de araquidina-1.

En un primer experimento, se examinó el efecto de la alimentación con piceatannol en cultivos de raíz pilosa de cacahuete tratados con acetato de sodio, con resultados mostrados en las figuras 6A y 6B. Como se puede ver, la adición de acetato de sodio elicitador resultó en la producción de estilbenoides (resveratrol, araquidina-1 y araquidina-3) en cultivos de raíz pilosa de planta (figura 6A). La adición de piceatannol dio como resultado la inhibición de la producción de estilbenoides (figura 6B). El impacto de la inhibición por piceatannol se resolvió por la adición del agente atrapante ciclodextrina, que detuvo la inhibición de retroalimentación, como se ve en la figura 7A-C. Utilizado solo sin un elicitador, no se produjeron estilbenoides (figura 6C).

La figura 7 muestra el cromatograma de HPLC de los estilbenoides a 340 nm (UV máx de araquidina-1):

Figura 7A: cultivos de control. El rendimiento de araquidina-1 (pico con tiempo de retención de 14,217 minutos) fue de aproximadamente 0,00006 mg/l;

Figura 7B: cultivos tratados con ciclodextrina y MeJA. El rendimiento de araquidina-1 (pico con tiempo de retención de 14,5 minutos) fue de aproximadamente 0,2 mg/l;

Figura 7C: cultivos tratados con ciclodextrina, MeJA y piceatannol. El rendimiento de araquidina-1 (pico con tiempo de retención de 14,35 minutos) fue de aproximadamente 15 mg/l. Debido a la gran cantidad de araquidina-1 en esta muestra, el extracto se diluyó antes del análisis de cuantificación.

El rendimiento de araquidina-1 aumentó aproximadamente 250.000 veces en los cultivos tratados con ciclodextrina, MeJA y piceatannol cuando se comparó con el cultivo de control. La ruta biosintética de la araquidina-1 no ha sido aclarada. Curiosamente, en este experimento piceatannol se convirtió en arachidin-1 sugiriendo un papel potencial de piceatannol como un precursor metabólico. Un papel alternativo de piceatannol es como un xenobiótico. En este caso, las enzimas en la ruta metabólica de araquidina-1 fueron capaces de convertir piceatannol a araquidina-1. Los altos niveles de araquidina-1 alcanzados en este estudio indican un papel potencial de ciclodextrina en la prevención

de los mecanismos reguladores intrínsecos impulsados por intermediarios y productos en la ruta metabólica de araquidina-1.

Ejemplo 2. Mejora de la biosíntesis de flavonoides en cultivos de raíz pilosa de *Scutellaria lateriflora*.

El género *Scutellaria* ha sido ampliamente estudiado debido a sus beneficios para la salud, que incluye, pero sin limitarse a, antialérgicos, anti-bacterianos, anti-HIV, anti-hepatitis, antioxidantes y antitumorales. Dos de las especies más ampliamente estudiadas de *Scutellaria* son *S. baicalensis* y *S. lateriflora* debido a que ambas exhiben las propiedades antes mencionadas y son fuentes de productos herbolarios reconocidos oficialmente. *S. lateriflora* comúnmente conocido como la calavera americana, ha sido utilizado durante siglos por europeos y nativos americanos como un tónico nervioso, sedante y anticonvulsivo. Estudios recientes han demostrado que los flavonoides presentes en extractos de *S. lateriflora* poseen fuertes propiedades antitumorales y por lo tanto estos compuestos merecen un estudio adicional. Con el fin de estudiar la biosíntesis de los flavonoides bioactivos en *S. lateriflora* desarrollamos cultivos de raíz pilosa de esta especie. La línea 4 se seleccionó para estudios adicionales basados en su rendimiento de crecimiento. Para manipular los niveles de flavonoides, las raíces pilosas de *S. lateriflora* línea 4 se cultivaron durante 30 días en un medio Murashige & Skoog modificado a 28 ° C, bajo agitación (90 rpm) y luz continua. El día 30, se retiró el medio gastado y se midió la conductividad. El medio gastado se reemplazó con medio fresco que contiene entre 0,5 a 75 mM de β -ciclodextrina, tal como 15 mM de β -ciclodextrina (agente atrapante) y 10 a 500 μ M de metil jasmonato tal como 100 μ M de metil jasmonato (MeJA, inductor) con un precursor putativo entre 0,05 a 10 mM de crisina, tal como 1 mM de crisina, o entre 0,05 a 10 mM de naringenina, tal como 1 mM de naringenina. Los cultivos de control incluían β -ciclodextrina y MeJA sin el precursor putativo. Los cultivos se incubaron durante 24 horas adicionales como se ha descrito anteriormente y después se recogieron las raíces y el medio. Los flavonoides se extraen del tejido y del medio de cultivo o bien con acetato de etilo o con metanol y después los extractos se secan hasta completarse bajo corriente de nitrógeno. Los extractos se resuspenden en metanol y se analizan por HPLC de fase inversa. La detección de flavonoides se realiza con un detector de matriz de fotiodos. Los niveles de acteosido, wogonina, wogonosido, baicaleína baicalina, escutellareína y escutellarina se determinan en extractos del tejido. Además, los niveles de compuestos inducibles y secretados se determinan en el medio de cultivo.

El análisis de absorción y espectrometría de masas del estándar de referencia de crisina se muestra en las figuras 8-21. En la figura 8 se muestra la estructura química de la crisina, la figura 9 muestra el espectro UV, el patrón de fragmentación de la crisina se muestra en la figura 10 y en la figura 11 el espectro de espectrometría de masas (MS) del espectro de crisina (A) 255 (B).

Los resultados del análisis de los compuestos producidos por la adición de crisina se muestran en la figura 12. En la figura 12A, el pico que representa la crisina se identifica junto con nuevos compuestos, mostrados en detalle en la figura 12B. Los nuevos derivados de crisina se muestran en los picos 1, 2 y 3 producidos en el tejido de raíces pilosas de *S. lateriflora*. Estos cultivos se alimentaron con 1 mM de crisina junto con 15 mM de ciclodextrina y 100 μ M de jasmonato de metilo. Como se describió anteriormente, se extrajeron compuestos con metanol a partir del tejido de raíz pilosa liofilizada y se analizaron mediante HPLC-PDA. En otras realizaciones, los cultivos pueden alimentarse con 0,5 a 10 mM de crisina, tal como 1 mM de crisina junto con 0,5 a 75 mM de ciclodextrina, tal como 15 mM de ciclodextrina, y 10 a 500 μ M de metil jasmonato, tal como 100 μ M de metil jasmonato.

Un análisis adicional del compuesto derivado de crisina representado en el pico 1 se muestra en la figura 13-17. La figura 13 muestra el análisis de espectrometría de absorción y masa de glucósido de crisina, visto como pico 1 (flecha) en la figura 13. El espectro MS del pico 1 se muestra en la gráfica de la figura 14, el espectro MS2 del pico 1 en la figura 15 y el espectro UV en la figura 16 y el espectro MS3 del pico 1 en la figura 17 junto con los patrones prediseñados de fraccionamiento del compuesto.

El pico 2 como se identifica en la figura 18 por la flecha es un glucurónido de crisina producido y analizado posteriormente. La figura 19 muestra el espectro MS del pico 2, la figura 20 muestra el espectro MS2 y la figura 21 muestra el espectro UV y la figura 22A el espectro MS3 y la figura 22B el diseño de fraccionamiento predicho del compuesto.

Utilizando otro precursor, naringenina, se produjeron aún más nuevos derivados de naringenina en el tejido de cultivos de raíces pilosas de *S. lateriflora*, como se refleja en la figura 23. La figura 23A muestra la identificación de naringenina, y detalle de cuatro derivados vistos en los picos 1-4 mostrados en la figura 23B. Estos compuestos se extrajeron con metanol a partir del tejido de raíz pilosa liofilizada y se analizaron mediante HPLC-PDA. La estructura química de naringenina se muestra en la figura 24 y un gráfico que muestra el espectro UV de naringenina en la figura 25.

Un análisis adicional del compuesto derivado de naringenina representado en el pico 1 se muestra en las figuras 26-34. La figura 26 muestra el análisis de espectrometría de absorción y masa del glucósido de naringenina, visto como pico 1 (flecha). El espectro MS del pico 1 se muestra en el gráfico de la figura 27, el espectro MS2 del pico 1 en la figura 28 y el espectro UV en la figura 29A junto con los patrones de fraccionamiento predichos del compuesto mostrado en la figura 29B. En la figura 30 el análisis de espectrometría de absorción y masa del ácido glucurónico de naringenina se ve como el pico 2 (flecha). El espectro MS del pico 2 se muestra en el gráfico de la figura 31, el

espectro MS2 del pico 2 en la figura 32, el espectro MS3 del pico 2 en la figura 33 y el espectro UV en la figura 34A junto con los patrones de fraccionamiento predichos del compuesto mostrado en figura 34B.

Por lo tanto, el uso del elicitor con un agente atrapante y precursor produce nuevos compuestos de valor. Particularmente útiles son aquellos que añaden un hidrato de carbono al resto. Los compuestos producidos incluyen glucósidos así como glucurónidos. La glucuronidación es importante para el metabolismo de los fármacos en los seres humanos y hasta la fecha no existen medios eficientes para fabricar estos compuestos. En un ejemplo representativo aquí, las raíces pilosas se trataron con precursor de crisina o naringenina, agente atrapante ciclodextrina y un elicitor para producir glucósido de crisina y glucuronuro de crisina, así como glucósido de naringenina y glucurónido de naringenina y otros compuestos nuevos, como confirmó el análisis UV y MS. De este modo, el proceso puede producir compuestos biológicos valiosos que de otra manera no tienen medios eficaces de producción.

El seguimiento continuado de la producción del producto de interés muestra que la cantidad del producto siguió aumentando durante al menos un período de 90 horas.

Ejemplo 3 Aumento de la biosíntesis de los alcaloides esteroideos en cultivos de células en suspensión de *Veratrum californicum*.

Veratrum californicum es la única fuente de la potente ciclopamina alcaloide anticancerosa. Debido a la estructura química compleja de este alcaloide esteroide, su producción mediante síntesis química no es comercialmente factible. En los esfuerzos por desarrollar un sistema de bioproducción sostenible para la ciclopamina y alcaloides esteroideos relacionados desarrollamos los cultivos de células en suspensión y de raíces adventicias de *V. californicum*. Hemos demostrado mediante HPLC y análisis de espectrometría de masas que varios alcaloides esteroideos importantes incluyendo ciclopamina, cicloposina, veratramina y veratrosina se pueden producir por estos cultivos de plantas. Con el fin de aumentar los niveles de estos compuestos estamos tratando los cultivos de células en suspensión de *V. californicum* con escualeno (un precursor biosintético), ciclodextrina y metil jasmonato.

Los cultivos de células en suspensión de *V. californicum* se mantienen en un medio MS modificado bajo agitación constante bajo oscuridad a 24° C. En una etapa específica de desarrollo, el medio agotado se elimina y se reemplaza con medio fresco que contiene entre 0,5 a 75 mM de β -ciclodextrina, tal como 15 mM de β -ciclodextrina (agente atrapante) y entre 10 a 500 μ M de metil jasmonato, tal como 100 μ M de jasmonato de metilo (MeJA, inductor) con o sin escualeno de 0,5 a 10 mM, tal como 1 mM de escualeno. Los cultivos se incuban durante 24 horas adicionales como se ha descrito anteriormente y después se recogen las células y el medio. Los alcaloides esteroideos se extraen de las células con metanol y del medio de cultivo con diclorometano. Los extractos se secan hasta completarse bajo corriente de nitrógeno, se resuspenden en metanol y se analizan por HPLC de fase inversa acoplada con un espectrómetro de masas de trampa iónica. La detección y cuantificación de los alcaloides esteroideos se realiza mediante espectrometría de masas.

Efecto del período de elicitación sobre los niveles de arachidin-1 y arachidin-3 en cultivos de raíz pilosa de cacahuete.

Se cultivaron raíces pilosas de cacahuete cv. Hull línea 3 durante 9 días en un medio Murashige & Skoog modificado a 28°C, bajo agitación (90 rpm) y oscuridad continua. El día 9, se eliminó el medio gastado y se reemplazó con medio fresco que contenía los siguientes tratamientos: a) entre 10 a 500 μ M de jasmonato de metilo, tal como jasmonato de metilo (elicitor) 100 μ M combinado con 0,9 a 90 g/l de metil β -ciclodextrina tal como 9 g/l de metil- β -ciclodextrina (agente atrapante) b) 1 a 50 mM de acetato de sodio tal como acetato de sodio 10,2 mM, c) 10 a 500 μ M de jasmonato de metilo tal como 100 μ M de jasmonato de metilo y d) 1 a 50 mM de hidrógeno tal como peróxido de hidrógeno 10 mM. Los cultivos de control incluían etanol (disolvente de jasmonato de metilo) solamente. Los cultivos se incubaron durante diferentes períodos como se muestra en la figura 35. Al final de cada período se recogió el medio y se extrajeron estilbenoides (araquidina-1 y araquidina-3) con acetato de etilo. Después, esta fracción orgánica se secó hasta completarse bajo corriente de nitrógeno. El extracto se resuspendió en metanol y se analizó por HPLC de fase inversa. La detección se realizó con un detector de matriz de fotodiodos. La presencia de arachidin-1 y araquidina-3 se confirmó por comparación con los tiempos de retención y los espectros UV de las normas auténticas de araquidina-1 y araquidina-3 y el análisis preliminar de espectrometría de masas. La cuantificación de araquidina-1 y araquidina-3 se realizó mediante HPLC utilizando una curva de calibración de patrones auténticos.

Las figuras 36 y 37 muestran los niveles de araquidina-1 y araquidina-3, respectivamente, en el medio de cultivo después del tratamiento con cualquiera de (A) 10 a 500 μ M tal como 100 μ M de jasmonato de metilo en combinación con 0,9 a 90 g/L tal como 9 g/L de metil- β -ciclodextrina, (B) 1 a 50 mM tal como 10,2 mM de acetato de sodio, (C) 10 a 500 μ M tal como 100 μ M de jasmonato de metilo y (D) 1 a 50 mM tal como 10 mM de peróxido de hidrógeno. Los niveles de araquidina-1 (fig 36) son entre 100 y 4000 veces más altos dependiendo del período de elicitación en cultivos tratados con jasmonato de metilo combinado con ciclodextrina (fig 36A) frente a cualquiera de los otros tratamientos de elicitor (figs. 36B, 36C y 36D). De forma similar, los niveles de araquidina-3 (fig 37) son entre 250 y 1000 veces más altos dependiendo del período de elicitación en el tratamiento con jasmonato de metilo combinado con ciclodextrina frente a cualquiera de los otros tratamientos de elicitor (figs. 37B, 37C y 37D). Como se muestra,

los niveles de araquidina-1 y araquidina-3 disminuyen a niveles casi no detectables después de 48 h cuando los cultivos se trataron con cualquiera de los elicitores solos (acetato de sodio, jasmonato de metilo o peróxido de hidrógeno). Sin embargo, cuando se combina jasmonato de metilo con el agente atrapante ciclodextrina, la producción de araquidina-1 y araquidina-3 se puede mantener a niveles muy elevados en el medio de cultivo.

- 5 La figura 35 muestra el tratamiento de cultivos de raíz pilosa de cacahuete con 100 M de jasmonato de metilo combinado con 9 g/l de metil- β -ciclodextrina durante diferentes períodos. El color amarillento de los cultivos está asociado con la producción de araquidina-1 y araquidina-3.

- 10 La figura 36 muestra el curso del tiempo de acumulación de araquidina-1 después del tratamiento de elicitor en cultivos de raíz pilosa de cacahuete. Los cultivos se trataron con los siguientes elicitores: (A) 100 μ M de jasmonato de metilo en combinación con 9 g/L de metil- β -ciclodextrina, (B) 10,2 mM de acetato de sodio, (C) 100 mM de jasmonato de metilo y (D) 10 mM de peróxido de hidrógeno. Los niveles de araquidina-1 se determinaron por HPLC en extractos de acetato de etilo a partir del medio de cultivo. Cada barra representa la media $\pm$ desviación estándar del rendimiento en ng por gramo de peso seco (DW) de la raíz de tres repeticiones biológicas.

- 15 La figura 37 muestra el curso del tiempo de acumulación de araquidina-3 después del tratamiento de elicitor en cultivos de raíz pilosa de cacahuete. Los cultivos se trataron con los siguientes elicitores: (A) 100 μ M de jasmonato de metilo en combinación con 9 g/L de metil- β -ciclodextrina, (B) 10,2 mM de acetato de sodio, (C) 100 mM de jasmonato de metilo y (D) 10 mM de peróxido de hidrógeno. Los niveles de araquidina-1 se determinaron por HPLC en extractos de acetato de etilo del medio de cultivo. Cada barra representa la media $\pm$ desviación estándar del rendimiento en ng por gramo de peso seco (DW) de la raíz de tres repeticiones biológicas.

- 20 En otra realización, el precursor podría incluir, pero sin limitación, resveratrol, fenilalanina, acetato o coumaroil-CoA. El agente atrapante podría ser una resina macroporosa que incluya pero no se limite a XAD-7.

Aumento de la biosíntesis de estilbenoides en cultivos de raíces pilosas de uva muscadina tratada con jasmonato de metilo combinado con ciclodextrina y piceatannol.

- 25 Se cultivaron raíces pilosas de uva muscadina durante 21 días en un medio Murashige & Skoog modificado a 28° C, bajo agitación (90 rpm) y oscuridad continua. El día 21, se retiró el medio agotado y se reemplazó con medio fresco que contenía o bien 100 μ M de jasmonato de metilo (elicitador) solo o 100 μ M de jasmonato de metilo combinado con 7,5 mM de metil- β -ciclodextrina (agente atrapante) y 1 mM de piceatannol (precursor putativo). Los cultivos de control incluían etanol (disolvente de jasmonato de metilo) solamente. Los cultivos se incubaron durante 24 horas bajo cualquier tratamiento. Al final del tratamiento, se recogió el medio y se extrajeron los estilbenoides con acetato de etilo. Después, esta fracción orgánica se secó hasta completarse bajo corriente de nitrógeno. El extracto se resuspendió en metanol y se analizó por HPLC de fase inversa. La detección se realizó con un detector de matriz de fotodiodos. La presencia de los estilbenoides resveratrol, piceida y ϵ -viniferina se confirmó por comparación con los tiempos de retención y los espectros UV de los estándares auténticos y el análisis preliminar de espectrometría de masas. La cuantificación de los estilbenoides se realizó mediante HPLC usando una curva de calibración de patrones auténticos.

- 40 El medio agotado se eliminó y se reemplazó por medio fresco que contenía entre 10 a 500 μ M de jasmonato de metilo (elicitador) solo o entre 10 a 500 μ M de metil jasmonato combinado con entre 0,5 a 75 mM de metil- β -ciclodextrina (agente atrapante) y entre 0,5 a 10 mM de piceatannol (precursor putativo). El precursor podría incluir, pero no limitarse a, fenilalanina, ácido cumárico o coumaroyl CoA. En otra realización, el agente atrapante podría ser una resina macroporosa que incluye pero no se limita a XAD-7. En otra realización, el elicitor podría estar, pero sin limitarse a, celulosa, extracto de levadura, quitosano

- 45 Los niveles de resveratrol, piceida y viniferina en el medio de cultivo son de media, 208, 17 y 6 ng/g de DW, respectivamente, bajo el tratamiento con el elicitor jasmonato de metilo solo. Sin embargo, cuando el jasmonato de metilo se combina con el agente atrapante metil- β -ciclodextrina y el precursor putativo piceatannol, los niveles de resveratrol, piceida y viniferina aumentan a 33.922, 3.896 y 496 ng/g de DW de raíz, respectivamente. Estos rendimientos representan entre 83 y 229 veces el aumento en los niveles de producción.

Referencias

- Aggarwal. B.B., Bhardwaj. A., Aggarwal. RS., Seeram. NP., Shisodia, S., and Takada, Y. (2004) Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Res.* 24:1-60.
- 5 Babu SK, Kumar KV, Subbaraju GV (2005) Estimation of *trans*-resveratrol in herbal extracts and dosage forms by high-performance thin-layer chromatography. *Chem Pharm Bull* 53:691-693. DOI 10.1248/cpb.53.691
- Baur J, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence *Nat Rev Drug Discov*. 5:493-506
- Becker J. Armstrong GO, van der Merwe MJ, Lambrecht M, Visser MA, Pretorius IS (2003) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res* 4:79-85.
- 10 Bru R, Selles S, Casado-Vela J, Belchi-Navarro S, Pedreno MA (2006) Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J Agric Food Chem.* 54:65-71
- Camilleri, C. Jouanin, L.. 1991. The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, 155-162.
- 15 Caspeta L. Quintero R, Villarreal ML. (2005) Novel airlift reactor fitting for hairy root cultures: developmental and performance studies. *Biotechnol Prog.* 21:735-740
- Celimene C. Micalcs J. Ferge L. Young R (1999) A.Efficacy of pinosylins against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung.* 53: 491-497
- Chen RS. Wu PL. Chiou RY (2002) Peanut roots as a source of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 50:1665-1667
- 20 Chang. J-C., Lai. Y-H., Djoko. B., Wu, P-L., Liu. C-D., Liu. Y-W., and Chiou. R.. Y-Y. (2006) Biosynthesis enhancement and antioxidant and anti-inflammatory activities of peanut arachidin-1, arachidin-3, and isopentadienylresveratrol. *J. Agric. Food Chem.*54: 10281 - 10287.
- Chung 1M. Park MR. Rehman S, Yun Si (2001) Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants. *Mol Cells* 12:353-359
- 25 Condori J. Medina-Bolivar F (2006) *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC 15834 plasmid pRi 15834 3-indoleacetamide hydrolase (aux2) and tryptophan 2-monooxygenase (aux I) genes, complete cds. NCBI Accession No. DQ782955
- Delmas D. Lancon A. Colin D. Jannin B. Latruffe N (2006) Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr Drug Targets* 7:423-442
- Frankel E. Waterhouse A, Kinsella J (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 341:1103-1104.
- 30 Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:15 1-158
- Goh BD. McAndrews JM, Chien PY, Jameson IL (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci* 94:14138-14143
- 35 Guillon S. Tremouillaux-Guiller J. Pati PK. Rideau M. Gantet P (2006) Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr Opin Plant Biol.* 9:341-346
- Hall D. De Luca V (2007) Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (*Vitis labrusca*). *Plant J* 49: 579-591.
- Holsters M, de Vaele D. Depicker A. Messens E. van Montagu M. Schell J (1998) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet.* 163-181-187.
- 40 Huang Y, Tsai W. Shen C, Chen C (2005) Resveratrol derivatives from the roots of *Vitis thunbergii*. *J Nat Prod* 68: 217-220
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S. Sbaghi M. Adrian M. (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food. Chem.* 50:2731-41.
- 45 Komarnytsky S. Ciaumc A. Garvey A. Borisjuk N. Raskin I (2004) A quick and efficient system for antibiotic-free expression of heterologous genes in tobacco roots. *Plant Cell Rep.* 22: 765-773

- Kopp P (1998) Resveratrol. a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox' Eur J Endocrinol. 138:619-620
- Larronde F, Richard T, Delaunay IC, Dccndit A. Monti JP, Krisa S. Mérillon JM (2005) New stilbenoid glucosides isolated from *Vitis vinifera* cell suspension cultures (cv. Cabernet Sauvignon). PLanta Med 71:888-890. DOI 10.1055/s-2005-871294
- Lee J, Jung E. Lim J. Lee J. Hur S. Kim SS. Lim S, Hyun CG. Kim YS, Park D. (2006) Involvement of nuclear factor-kappaB in the inhibition of pro-inflammatory mediators by pinosykin. Planta Med. 72:801-806.
- Medina-Bolívar F. Wright R. Funk V. Schtz D. Barroso L. Wilkins T, Petri Jr. W. Cramer C (2003) A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines. Vaccine 21 :997-1005
- Medina-Bolívar F, Cramer C (2004) Production of recombinant proteins in hairy roots cultured in plastic sleeve bioreactors In: Balbas P, Lorence A (eds) Recombinant gene expression: Reviews and protocols. Humana Press. Totowa, pp 351-363
- Mikstacka, R., Rimando, A. M., Szalaty, K., Stasik, K., and Bacr-Dubowska, W. (2006) "Effect of natural analogues of trans -resveratrol on cytochromes P4501A2 and 2E1 catalytic activities". Xenobiotica, 36: 269-215.
- Miura D. Miura Y. Yagasaki K (2003) Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. Life Sciences 73:1393-400. DOI 10.1016/S0024-3205(03)00469-7 <http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205%2803%290049-7>
- Nepote V, Grosso NR. Guzman CA (2004) Radical scavenging activity of extracts of argentine peanut skins (*Arachis hypogaea*) in relation to its *trans*-resveratrol content. J Argent Chem Soc 92:41-49
- Nopo-Olazabal L, Woffenden B. Reed D. Buswell S, Zhang C. Medina-Bolivar F.. Differential expression of the "super-promoter" in leaves and hairy roots of tobacco. 2005 In Vitro Biology Meeting. Abstract P-2037
- Orallo F (2006) Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. Curr Med Chem. 13:87-98
- Park Ei, Min HY, Ahn YH, Bac CM. Pyce JH, Lee SK. (2004) Synthesis and inhibitory effects of pinosylvin derivatives on prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-induced mouse macrophage cells. Bioorg Med Chem Lett. 14:5895-5898.
- Pitta-Alvarez, S., Giulietti, A., 1999. Influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed mts of *Brugmansia candida* Effect of medium pH and growth phase. Plant Cell Tissue Org. Cult. 59, 31-38.
- Ramakrishnan D. Curtis WR (2004) Trickle-bed root culture bioreactor design and scale-up: growth, fluid-dynamics, and oxygen mass transfer. Biotechnol. Bioeng. 88:248-260.
- Rimando AM, Barney DL (2005) Resveratrol and naturally occurring analogues in *Vaccinium* species. Acta Horticulture Proceedings 6:137-143
- Rimando AM. Nagmani R. Feller DR. Yokoyama W (2005) Pierostilbene. A new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. J Agric Food Chem 53:3403-3407
- Roupe. K., Remsberg, C., Yancz, J., Davics, N., 2006a. Pharmacometrics of stilbenes: seguing towards the clinic. Curr. Clin. Pharm. 1, 81-101.
- Roupe. K., Yanez, J., Teng. X.W., and Daies. N., 2006b. Pharmacometrics of selected stilbenes: srhapontigenin, piceatannol, pinosylvin. J. PharimPharmacol. 58, 1443-1450.
- Rudolf JR. Resurreccion AV (2005) Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. J Agric Food Chem 53:10186-10192. DOI 10.1021/jf0506737
- Savary B. Flores H (1994) Biosynthesis of defense-related proteins in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. Var japonicum (Kitam.). Plant Physiol 106:1195-1204
- Schmülling. T., Schell. J., Spena, A., 19X8. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBO J. 7, 262 1-2629.
- Slightom. J.L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L, Tepfer, D., 19X6. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. J. Biol Chem. 261. 108-121.

- Soleas Gi, Angelini M, Grass L. Diamandis EP & Goldberg DM. (2001) Absorption of *trans*-resveratrol in rats. Methods Enzymol 335:145.
- 5 Tabata Y, Takano K, Ito T, Iinuma M. Yoshimoto T, Miura H, Kitao Y, Ogawa S. hon O. (2007) "Vaticanol B, a resveratrol tetramer, regulates endoplasmic reticulum (ER) stress and inflammation." Am J Physiol Cell Physiol. E- Published; doi: 10.1152/ajpcell.00095.2007
- Tassoni A, Fomalè S. Franceschetti M. Musiani F, Michael Ai. Perry B, Bagni N (2005) Jasmonaics and Na-orthovanadatc promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. New Phytologist 166:895-905. DOI 10.1111/j.1469-8137.2005.01383.x
- 10 Watts KT, Lee PC, Schmidl-Dannrct C (2006) Biosynthesis of plant-specific stilbenc polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. BMC Biotechnology 6:22. DOI 10.1186/1472-6750-6-22
- Wenzel, E., and Somoza, V., (2005) Metabolism and bioavailability of *trans*-resveratrol. Mol. Nutr. Food Res. 49:472-481.
- White. F. F et al, (1985) J. Bacteriol., vol.164, p.33.
- 15 Wink M, Alfermann AW, Franke R. Wettcraucr B, Distl M. Windhovcl J. Krohn O, Fuss E, Garden II, Mohagheghzadeh A, Wildi E, Ripplinger P (2005) Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. Plant Gen Res. 3:90-100
- Yan Q. Hu Z, Tan RX. Wu J (2005) Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation. J Biotechnol. 119:416-24.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para aumentar la producción de un producto estilbenoide prenilado de interés de material de cultivo de raíz pilosa, el proceso comprende identificar un producto estilbenoide prenilado de interés, proporcionar material de cultivo de raíz pilosa capaz de producir dicho producto estilbenoide prenilado de interés, poner en contacto dicho material de cultivo de raíz pilosa con un precursor de dicho producto estilbenoide prenilado de interés, una ciclodextrina y un jasmonato de metilo y producir una cantidad aumentada de dicho producto estilbenoide prenilado de interés en comparación con dicho proceso en el que dicho precursor no se pone en contacto con dicho material de cultivo de raíz pilosa.
2. El proceso según la reivindicación 1, en el que dicho producto estilbenoide prenilado de interés se produce en una cantidad que es al menos diez veces mayor que cuando dicho precursor no se pone en contacto con dicho material de cultivo de raíz pilosa.
3. El proceso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho producto estilbenoide prenilado de interés se produce en una cantidad que es al menos 250.000 veces mayor que cuando dicho precursor no se pone en contacto con dicho material de cultivo de raíz pilosa.
4. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que dicho precursor comprende piceatannol.
5. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho producto estilbenoide prenilado de interés comprende araquidina.
6. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el jasmonato de metilo, el precursor y la ciclodextrina están en contacto con el material de cultivo de raíz pilosa durante al menos una hora.

Figura 1

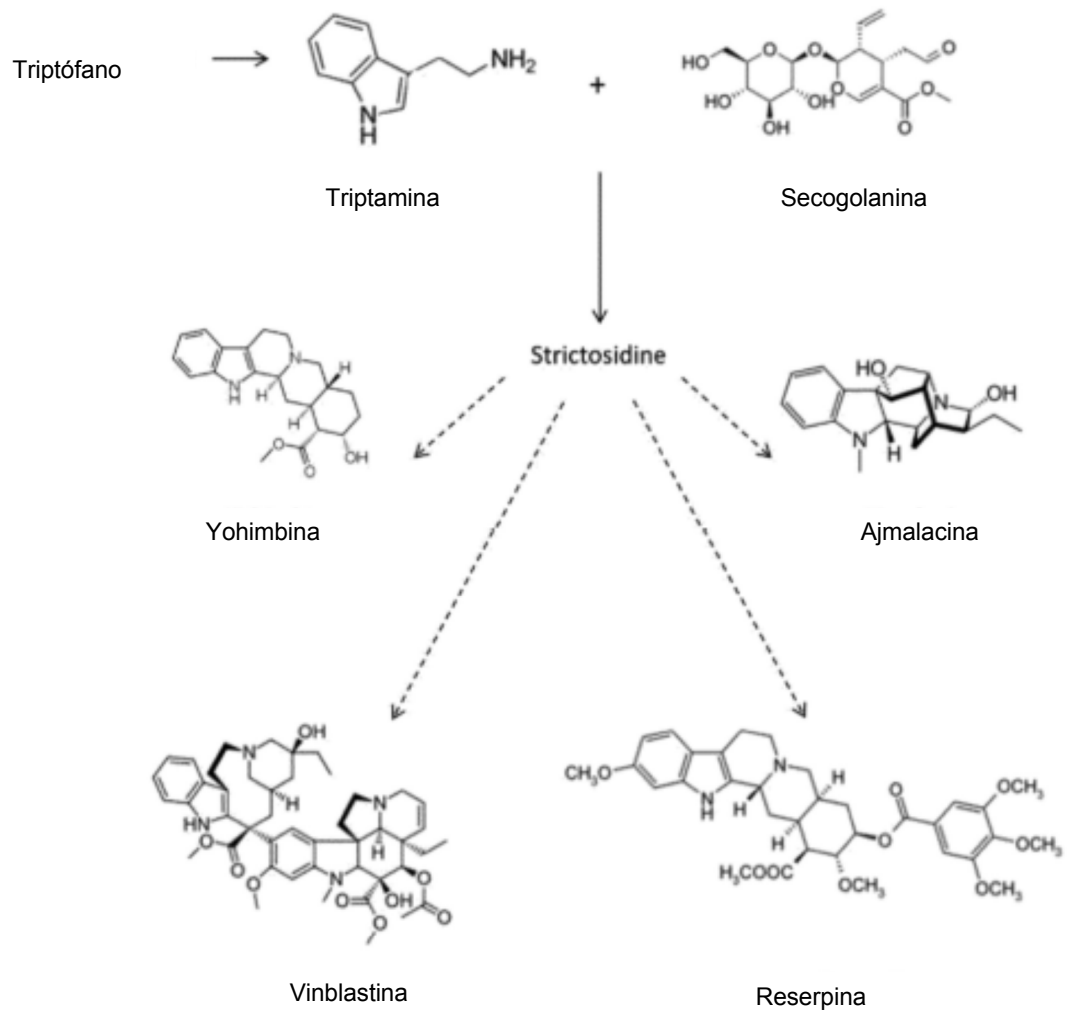


Figura 2

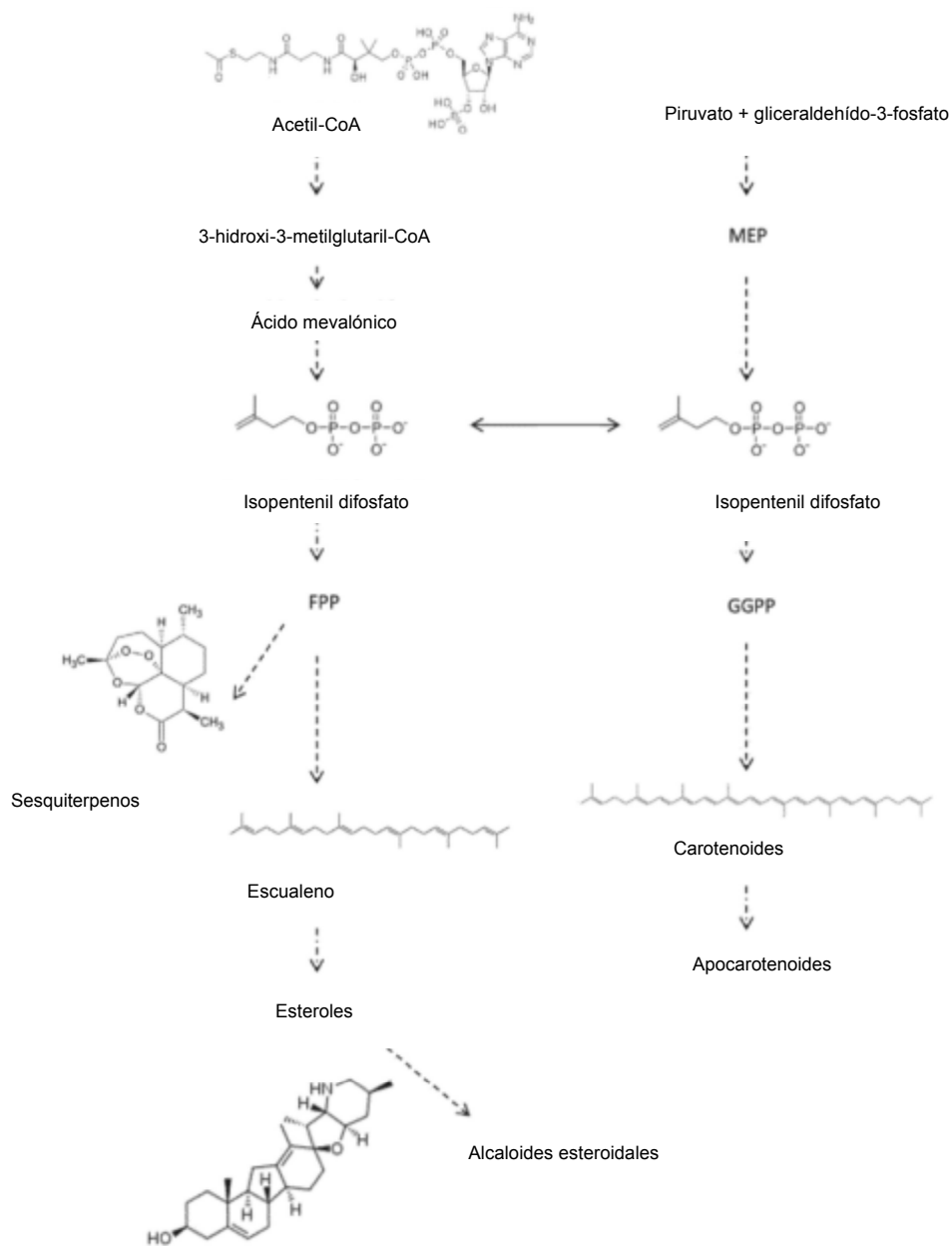


Figura 3

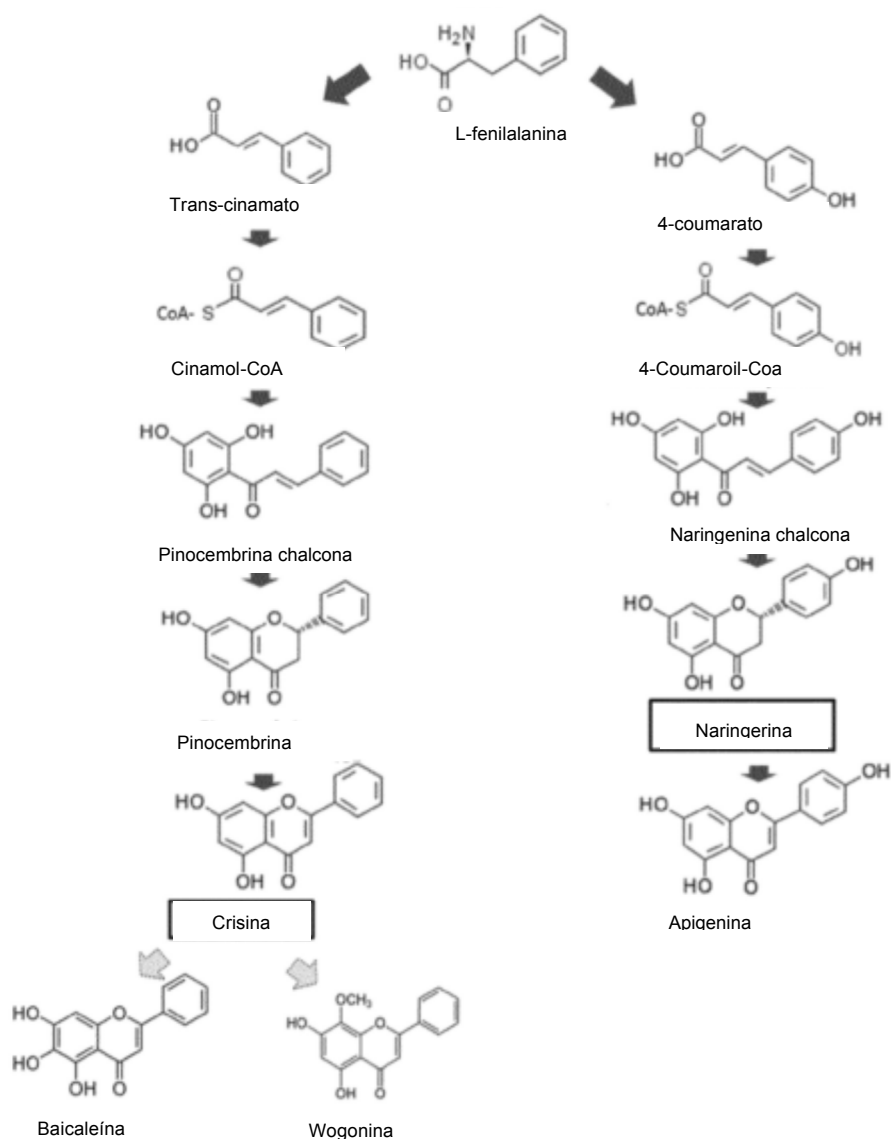


Figura 4

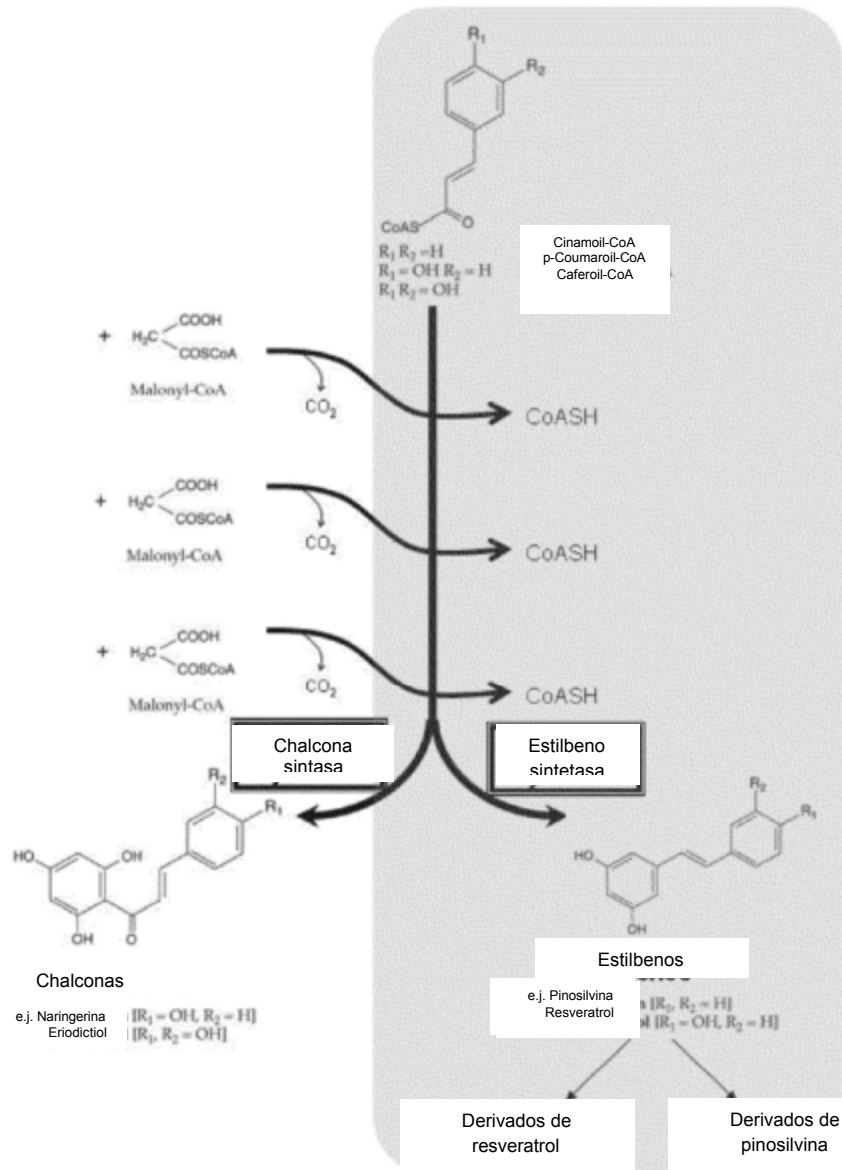
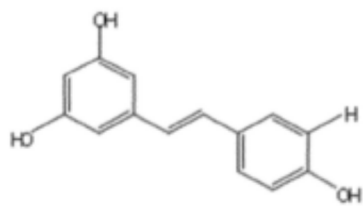
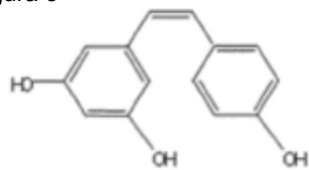


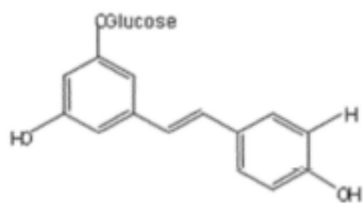
Figura 5



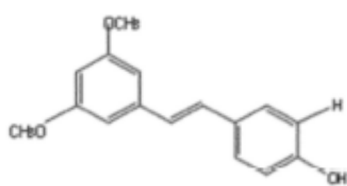
Trans-Resveratrol



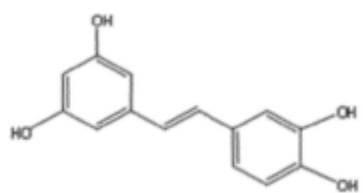
Cis-resveratrol



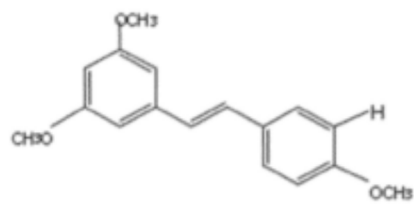
Piceido (polidatina)



Pterostibeno



Piceatanol



Resveratrol trimetil éter

Figura 6

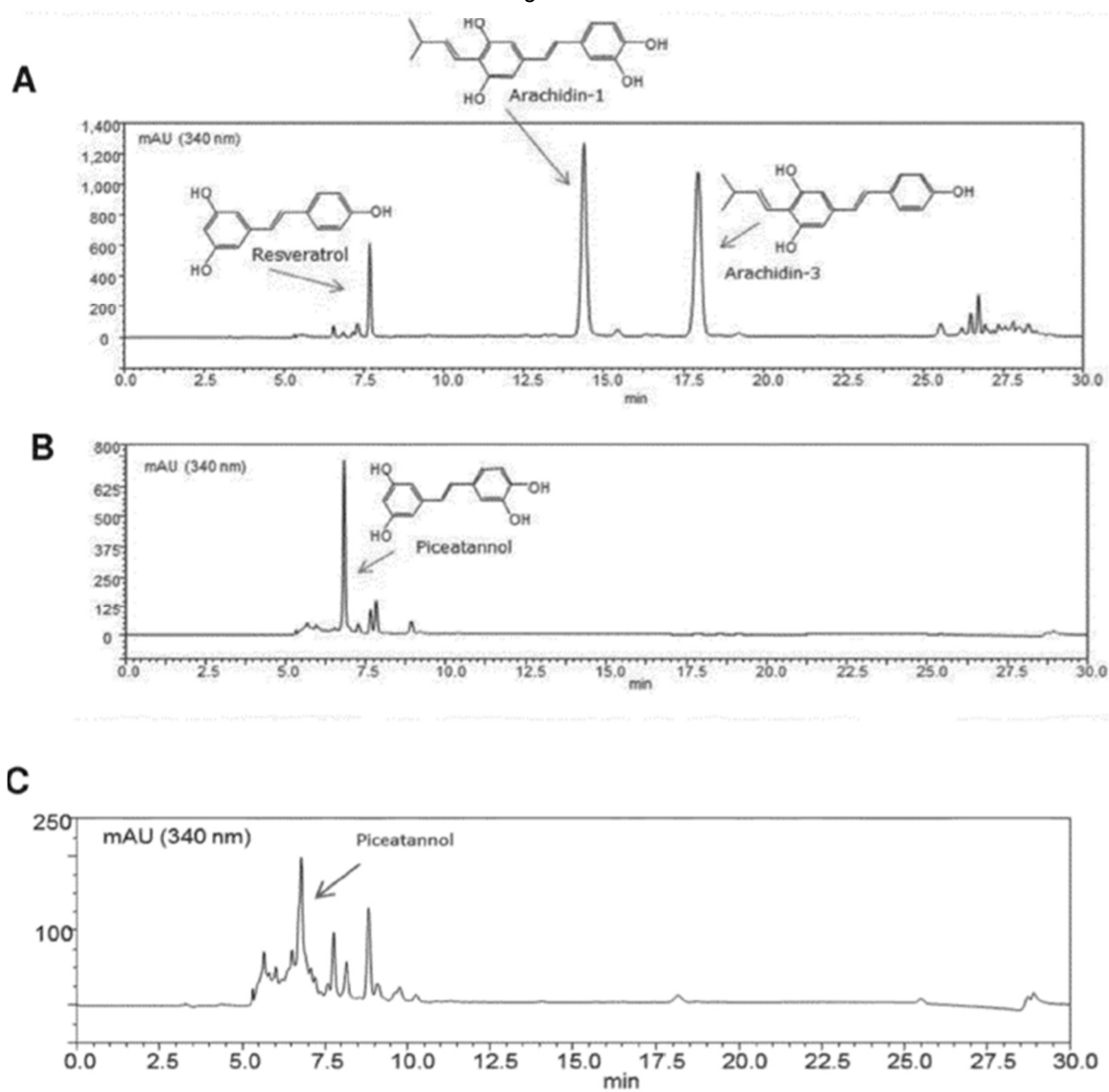
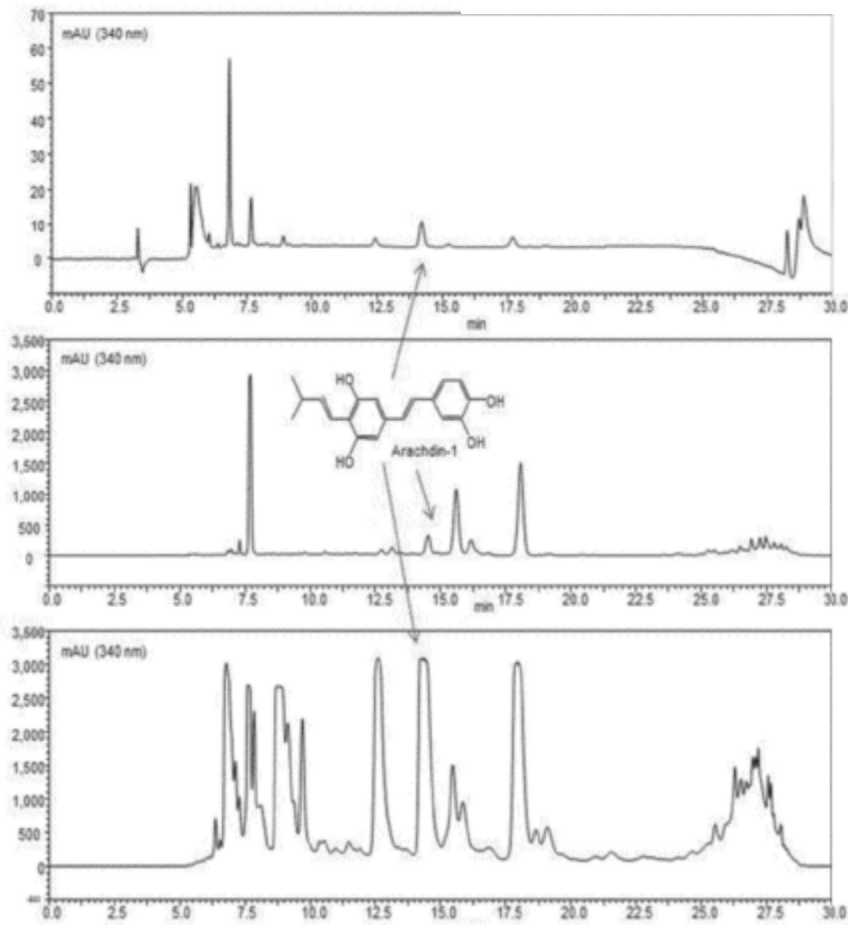


Figura 7



A

Control (EtOH)
(Araquidina-1; 0,00006 mg/L)

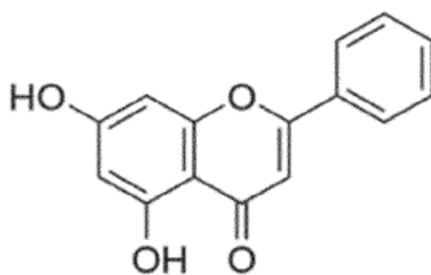
B

MeJA + ciclodextrina
(Araquidina-1; 0,2 mg/L)
Aumento de 3.000 veces

C

MeJA + ciclodextrina
+ Piceatanol
(Araquidina-1; 15 mg/L)
Aumento de 250.000 veces

Figura 8



Crisina

254,24

Figura 9

DT-Crisina | #4630 RT: 15.43 AV: 1 NL: 3.10E6

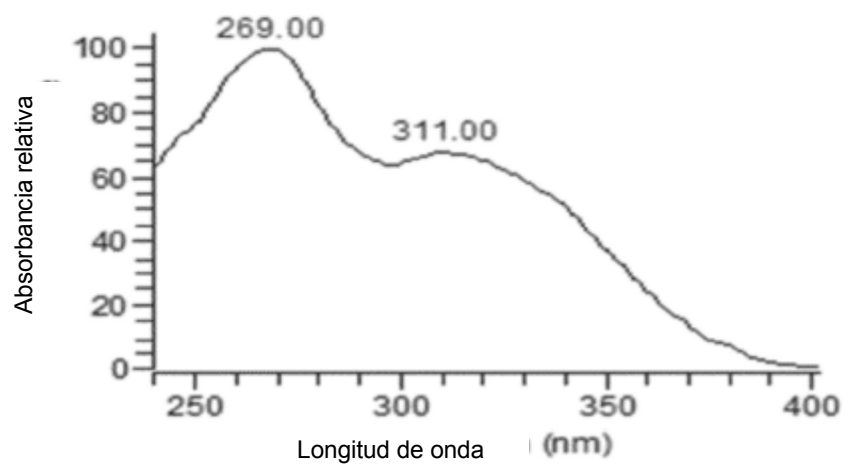


Figura 10

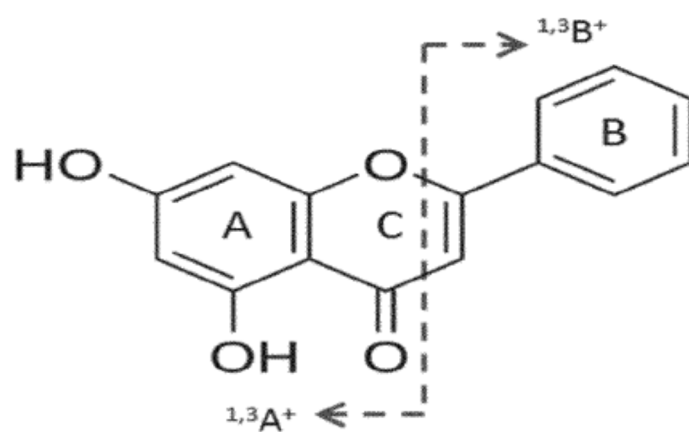
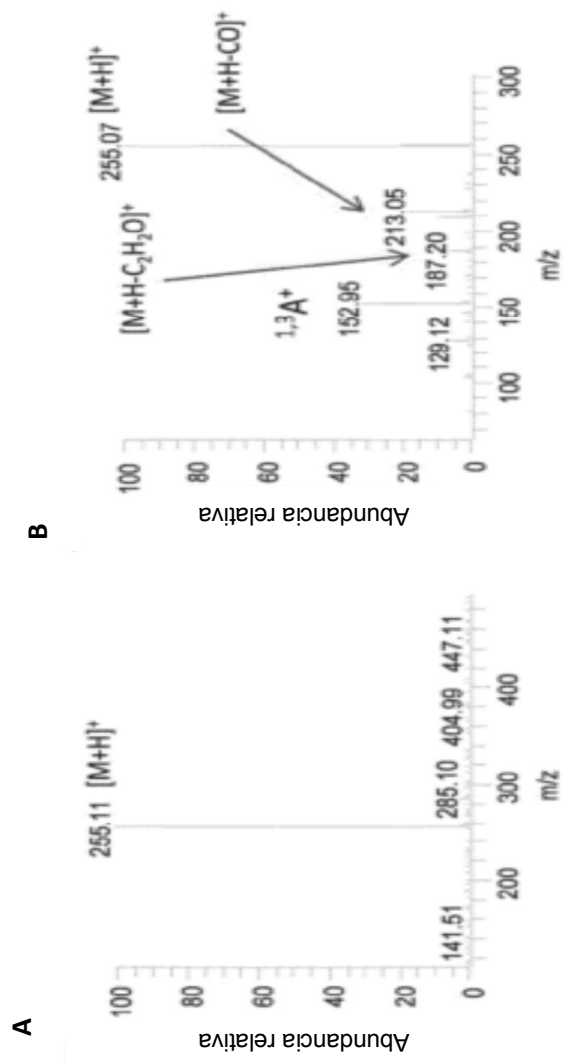
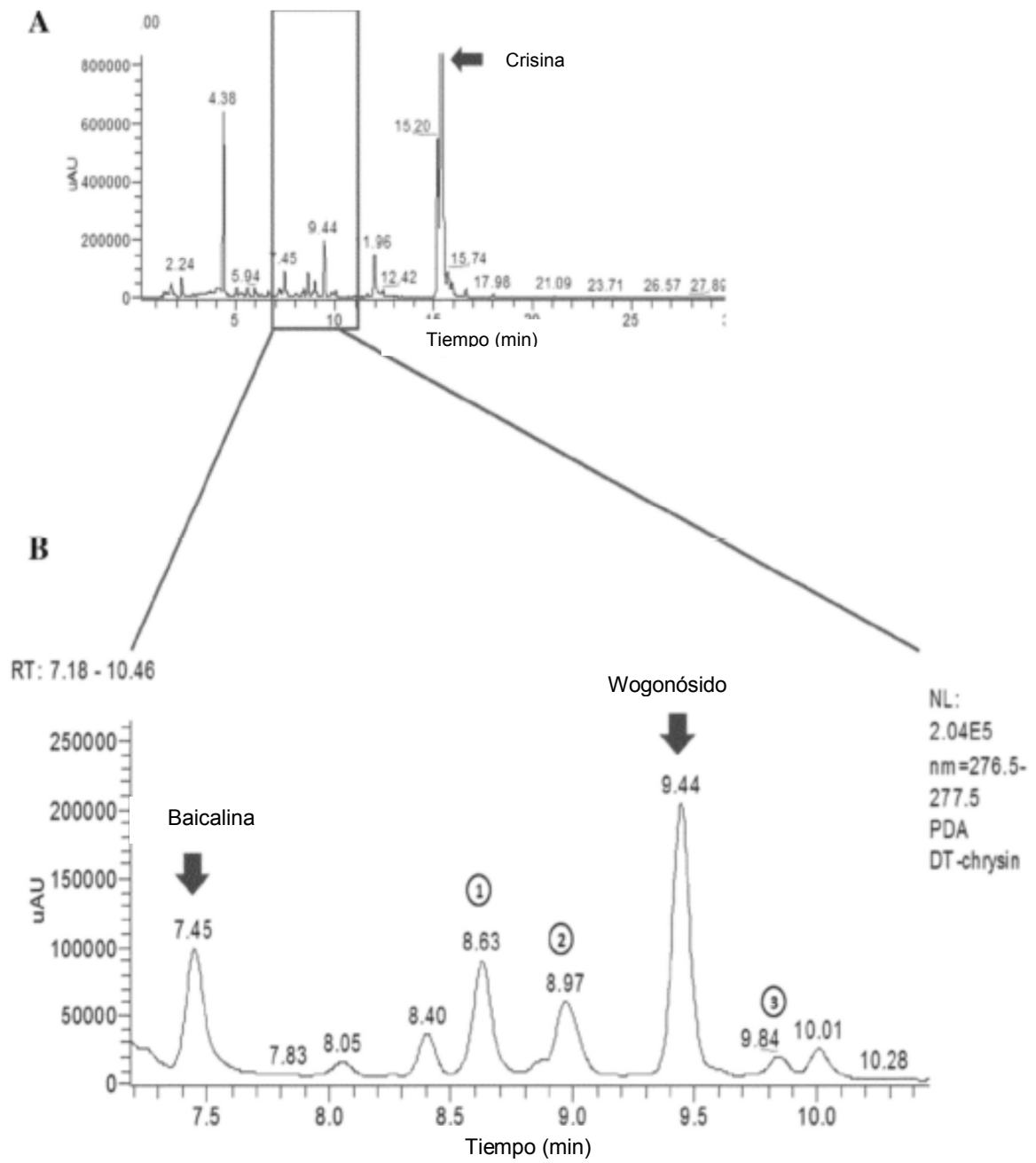


Figura 11





RT: 7.18 - 10.46

Figura 13

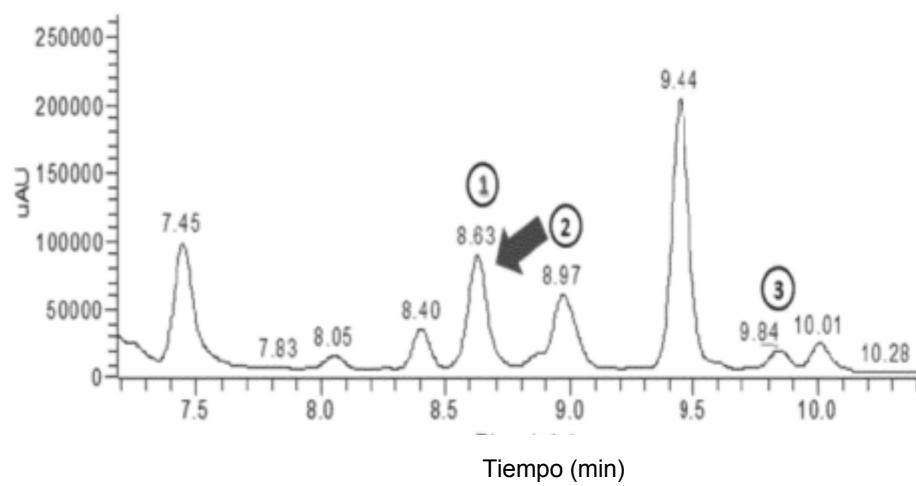


Figura 14

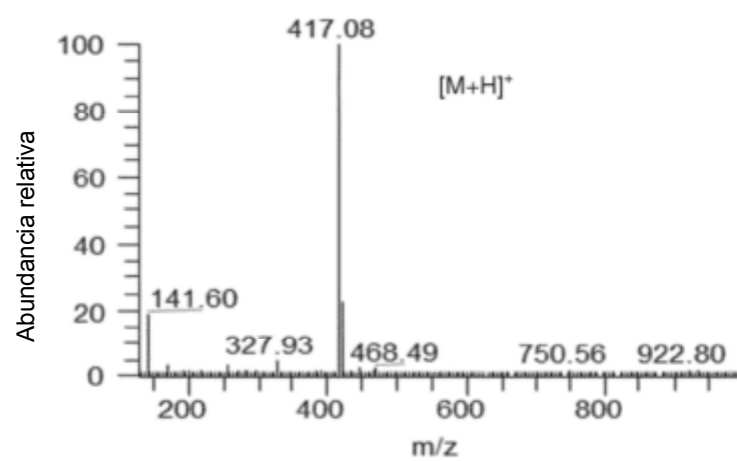


Figura 15

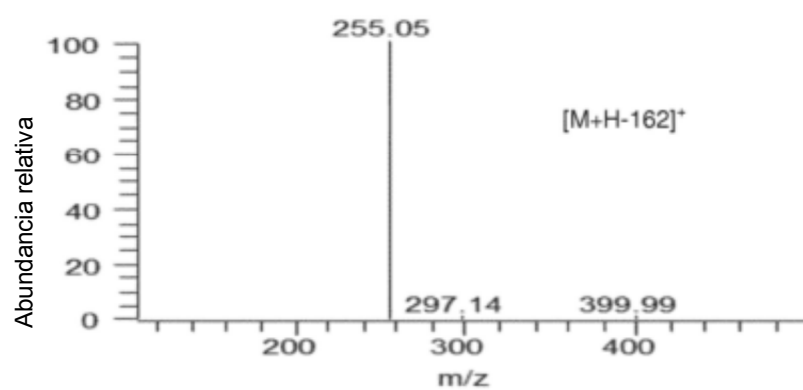


Figura 16

DT-crisina #2686 RT: 8.95 AV: 1 NL: 6.99E 4

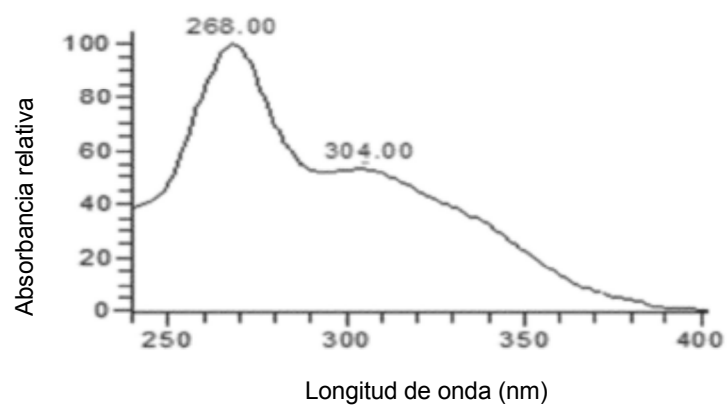
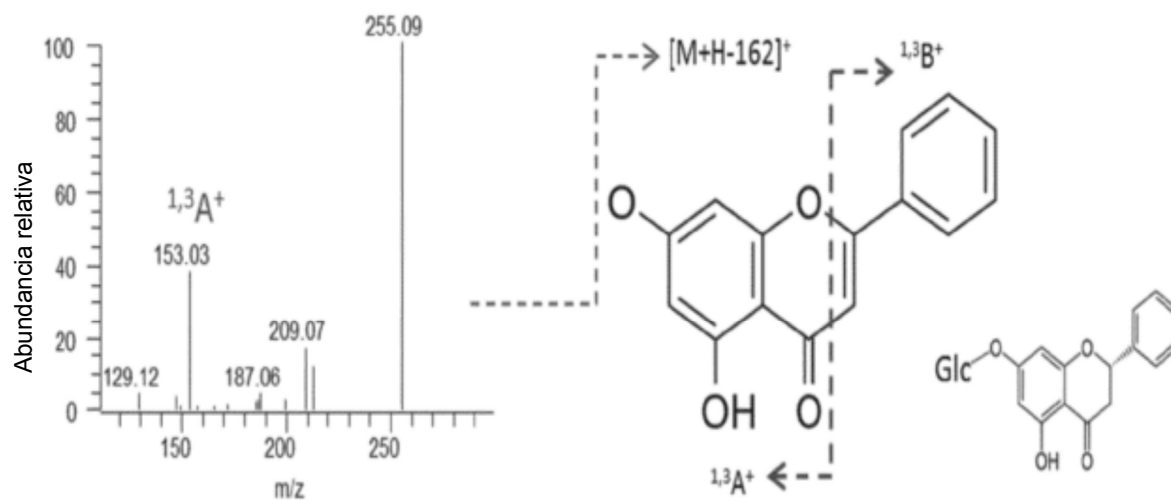


Figura 17



RT: 7.18 - 10.46

Figura 18

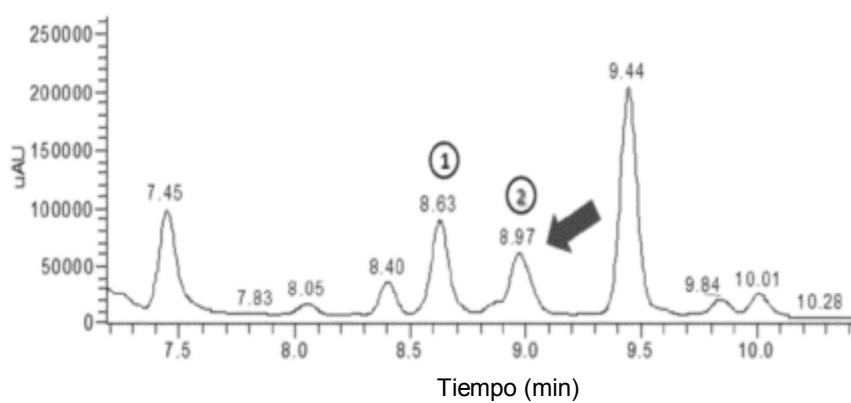


Figura 19

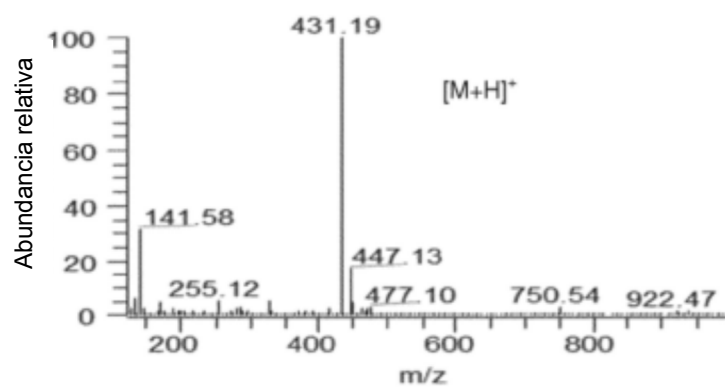


Figura 20

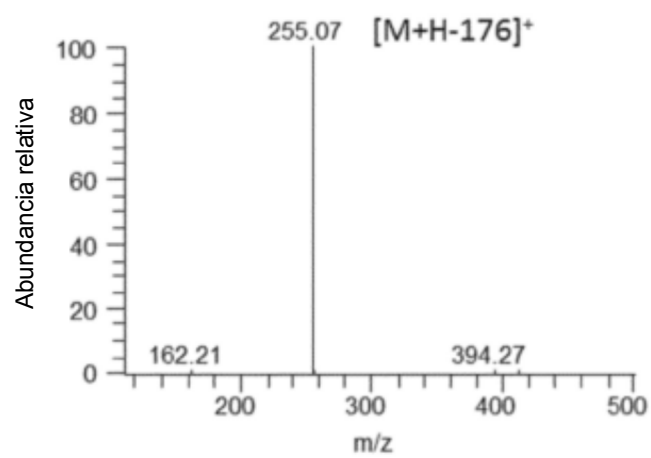


Figura 21

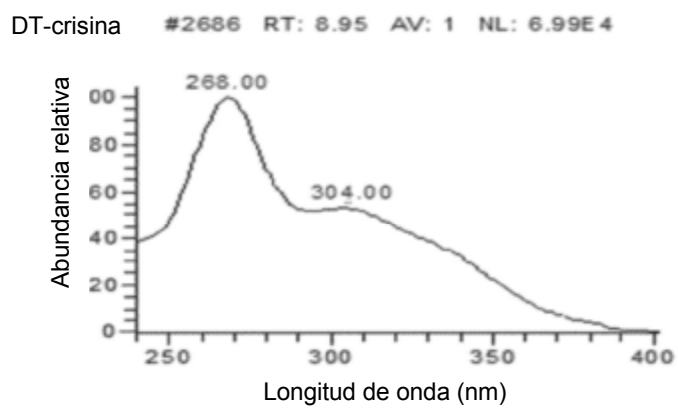
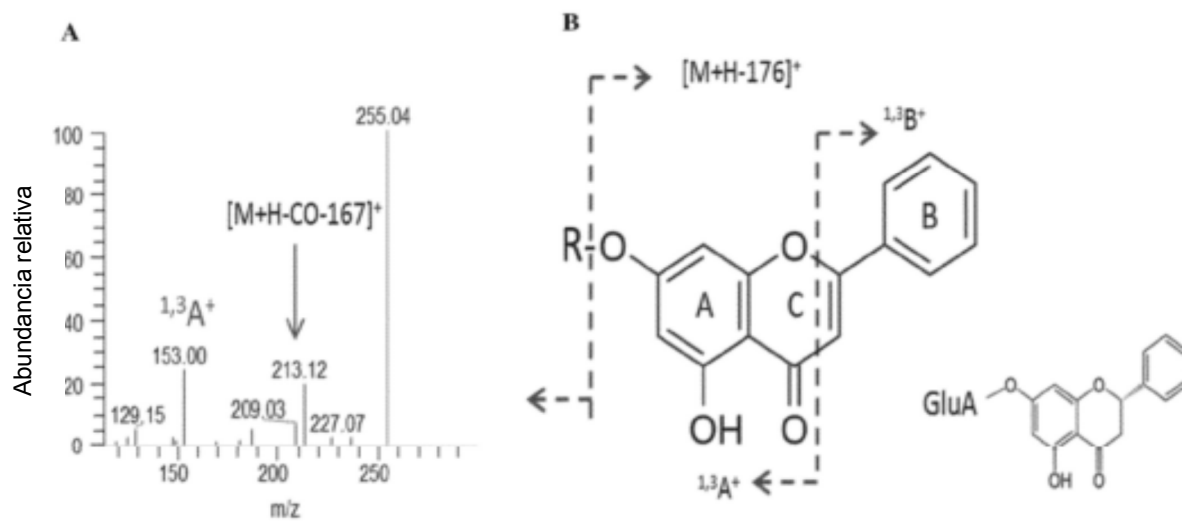
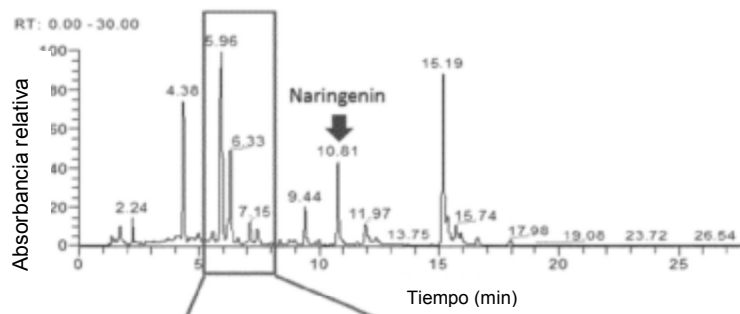


Figura 22



A

Figura 23



Naringenina
272,257

B

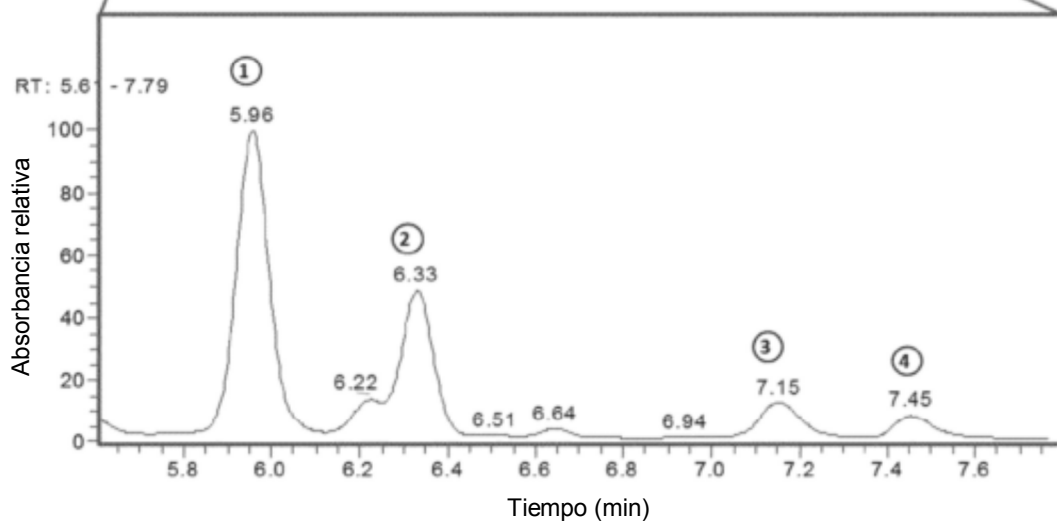


Figura 24

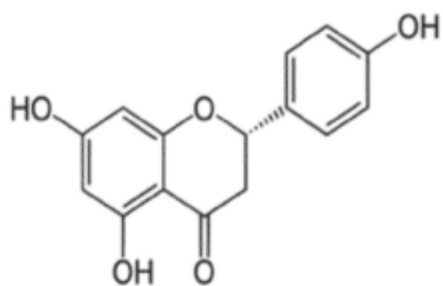


Figura 25

DT-naringenina | #3243 RT: 10.81 AV: 1 NL: 2.78E5

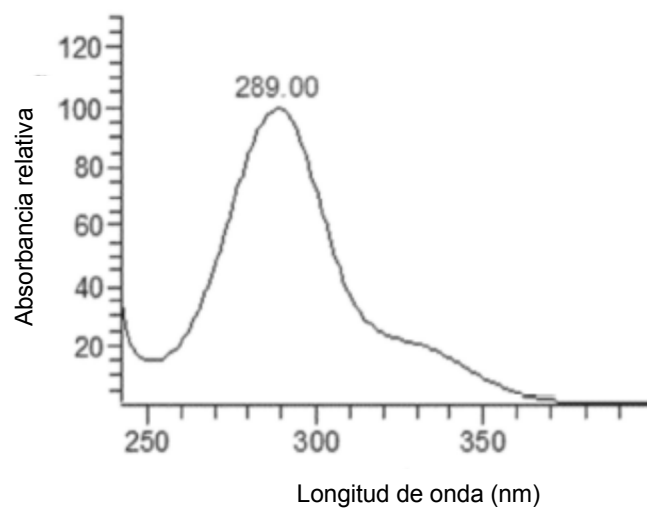


Figura 26

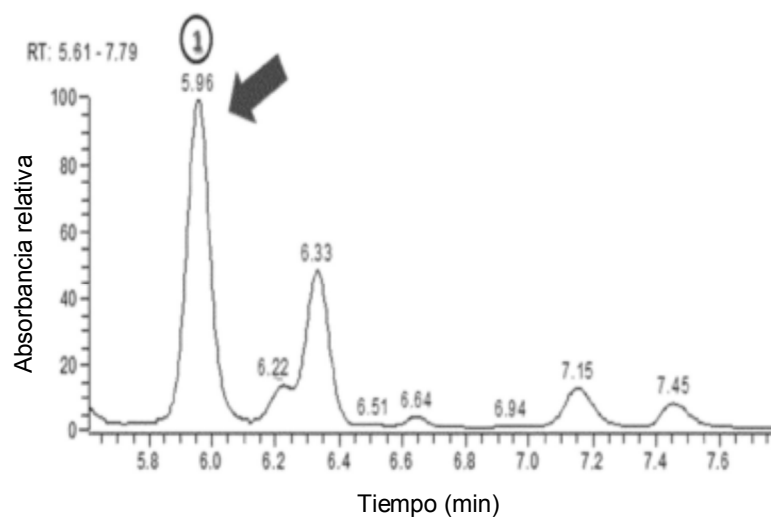


Figura 27

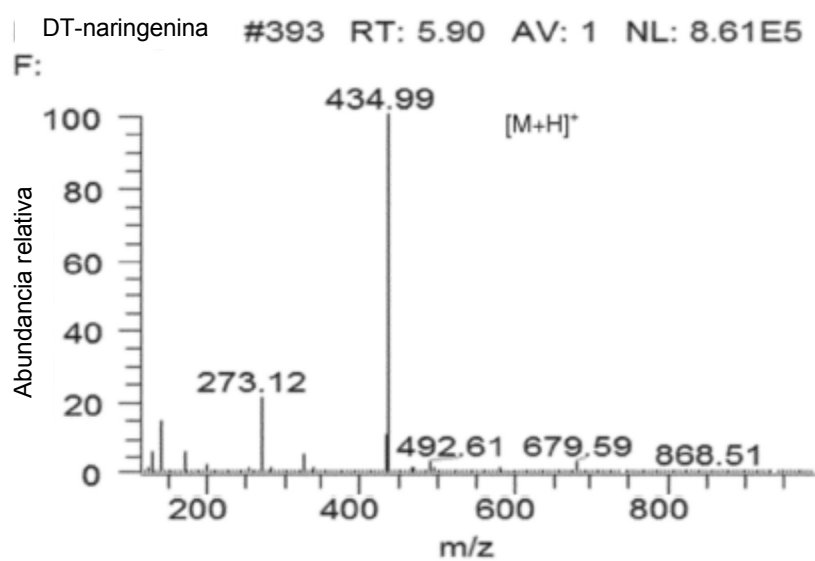


Figura 28

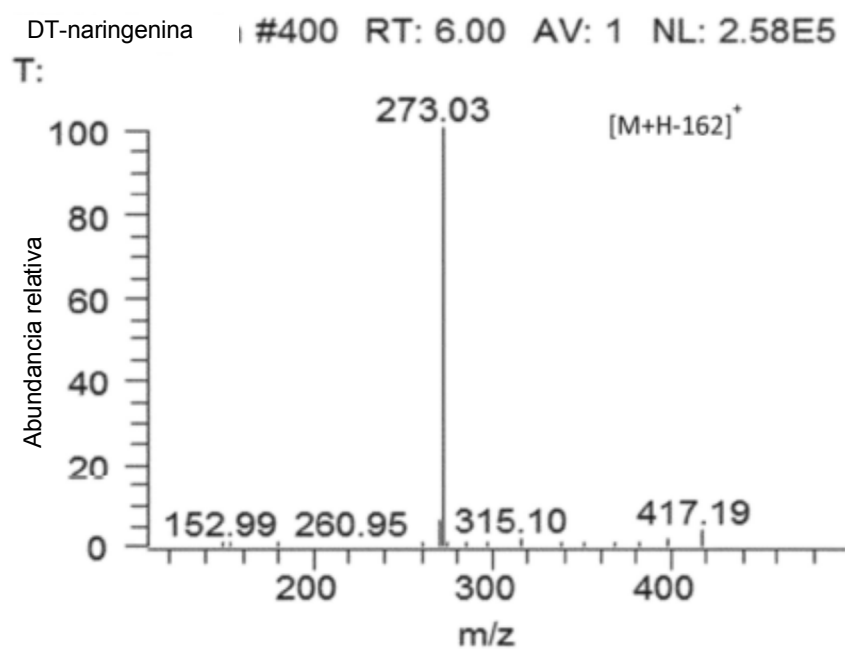


Figura 29

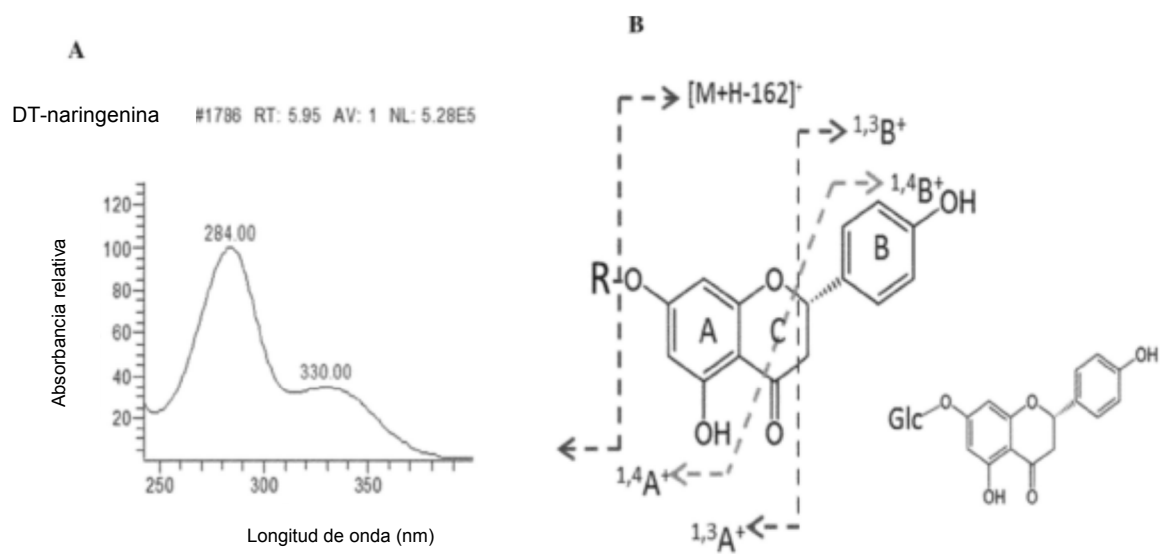


Figura 30

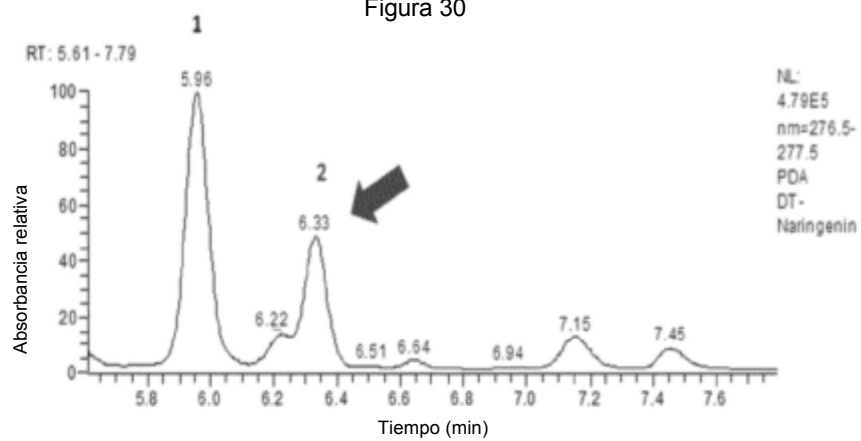


Figura 31

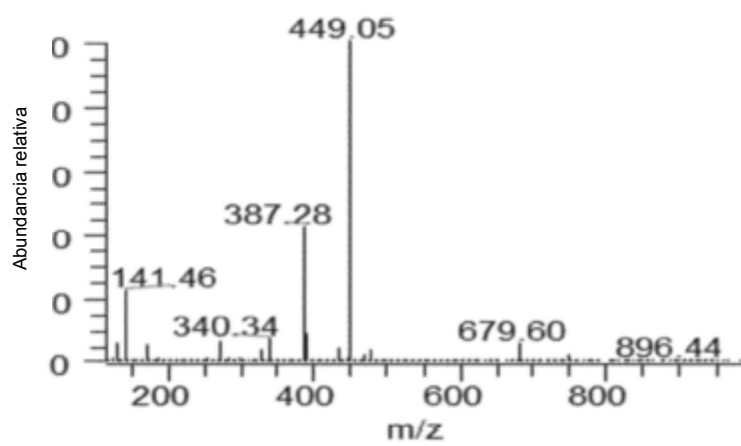


Figura 32

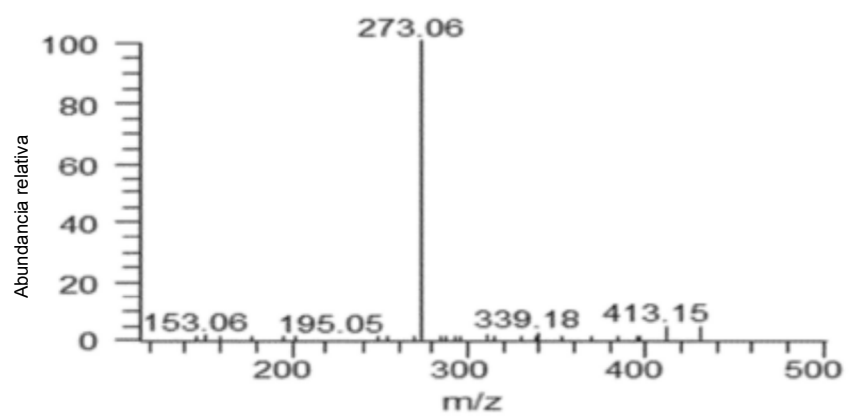


Figura 33

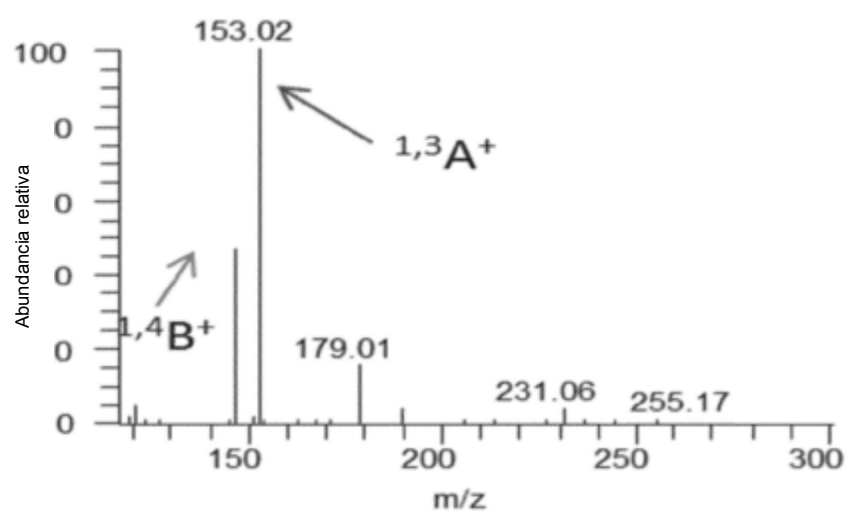
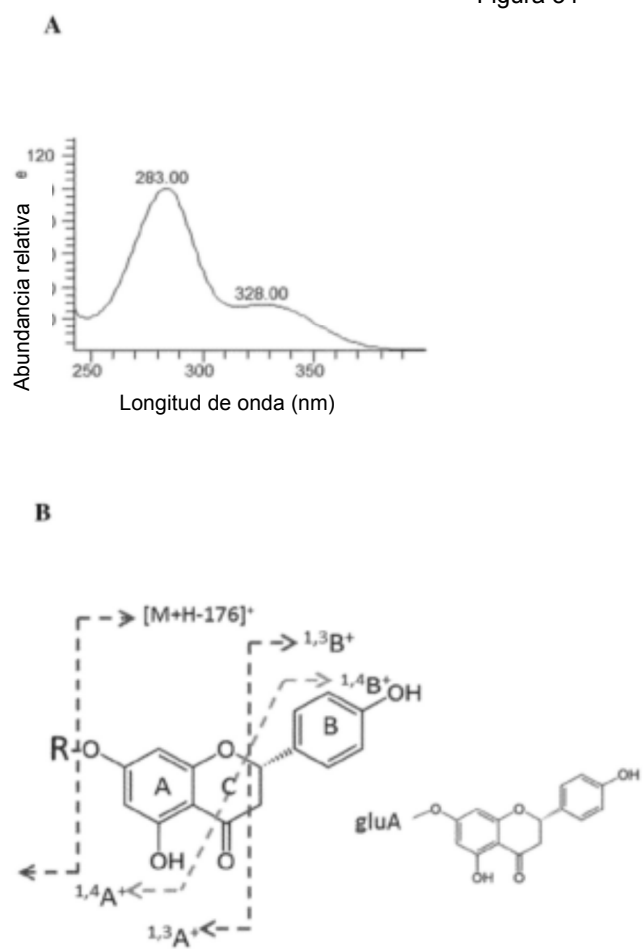


Figura 34



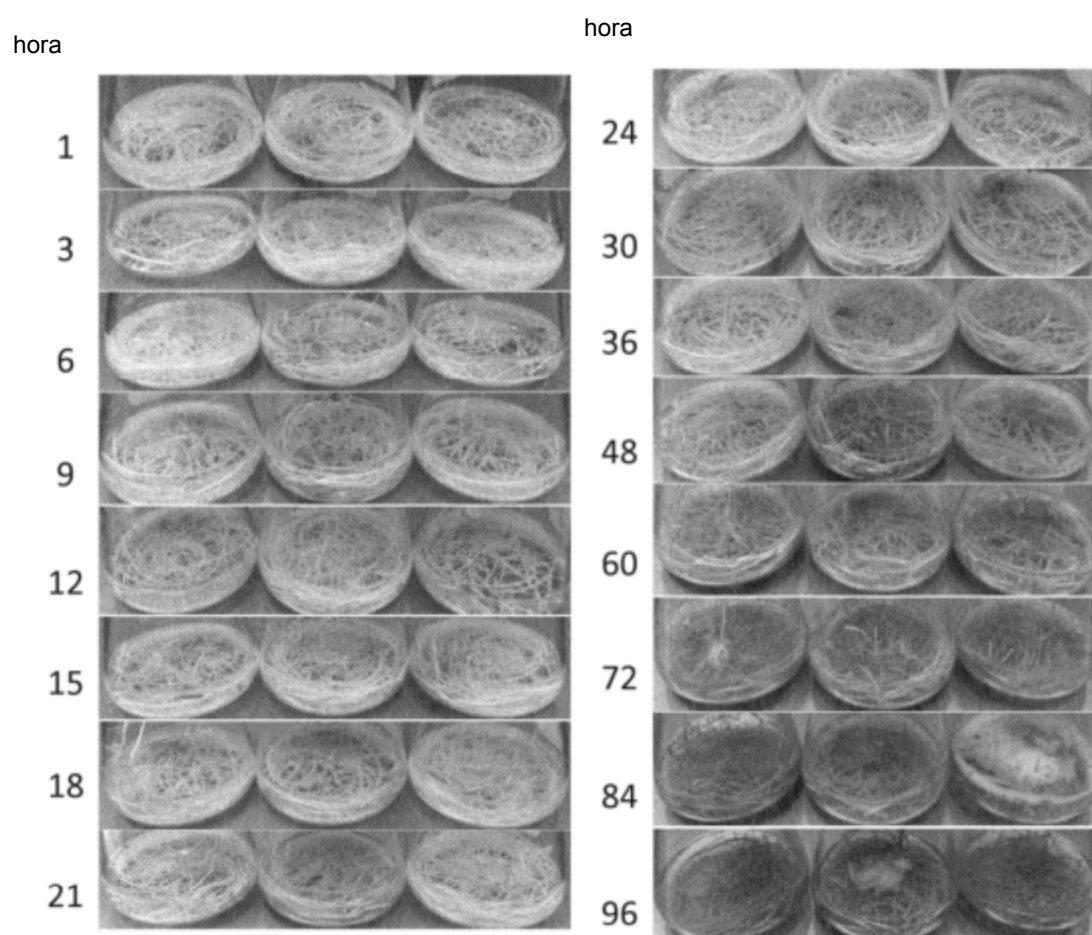


Figura 35

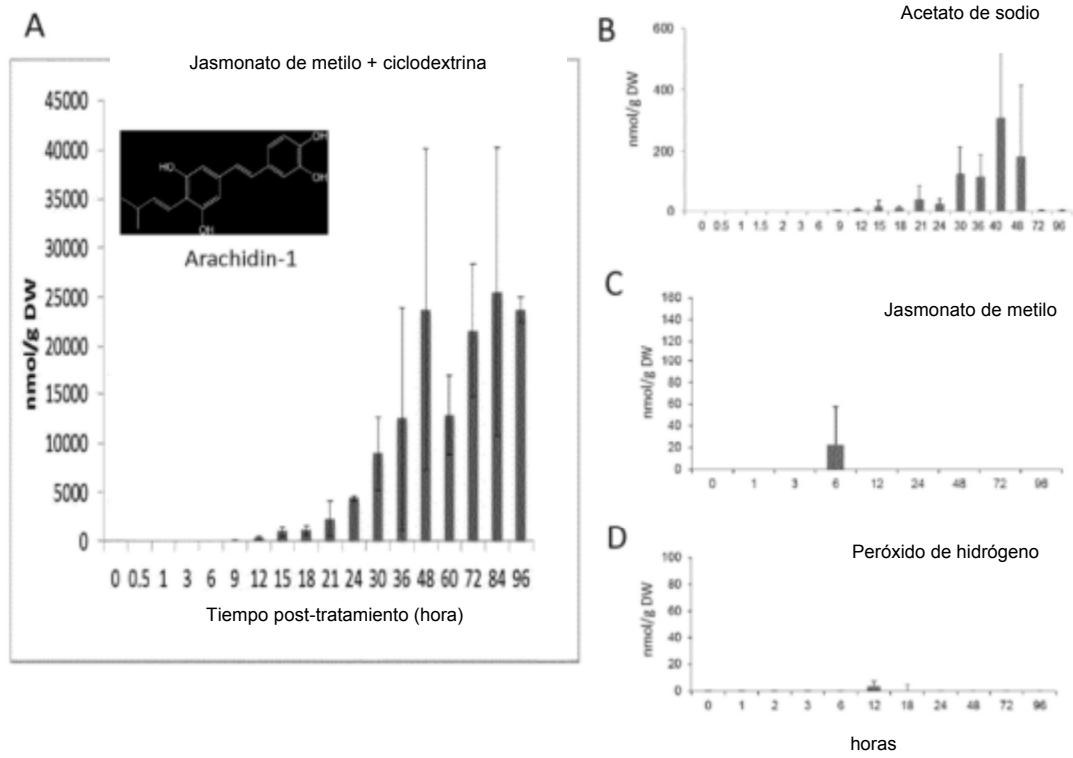


Figura 36

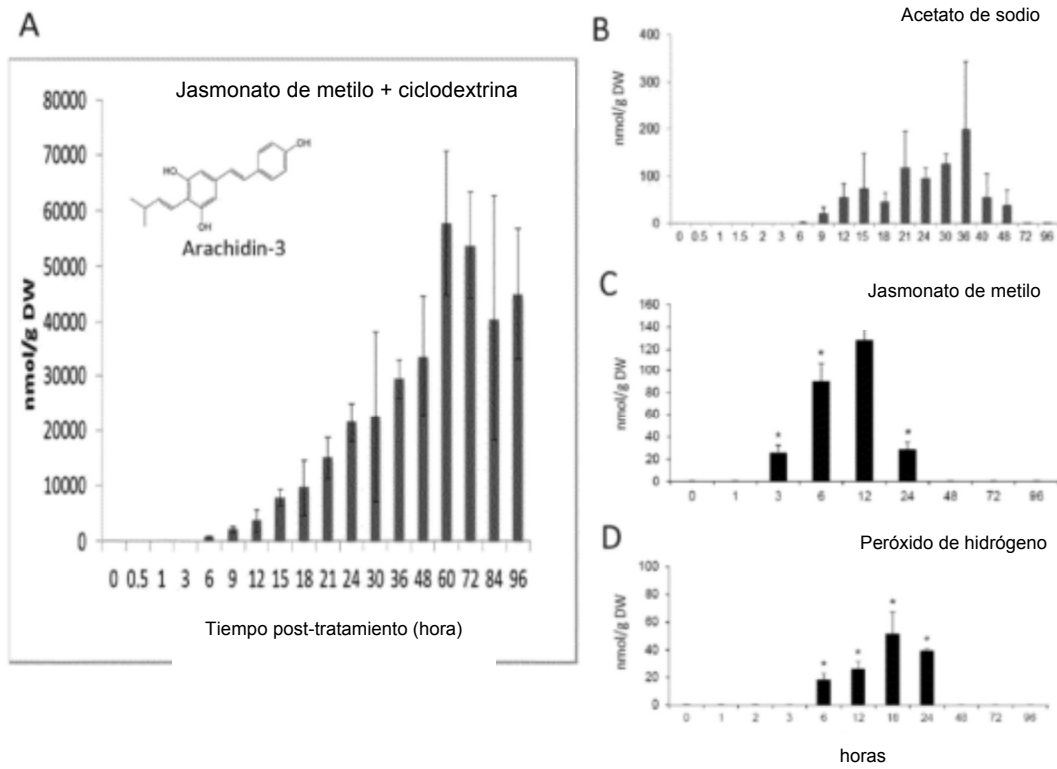


Figura 37