



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA REDUNDANCIA GENÉTICA EN LA
RUTA DE SÍNTESIS DE ALCALOIDES
BENCILISOQUINOLÍNICOS EN *Argemone
mexicana* L.**

Tesis que presenta

Mariela Vergara Olivares

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Mariela Vergara Olivares titulado “**Análisis de la redundancia genética en la ruta síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* L.**” fue realizado en la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, línea de investigación: metabolismo secundario en el laboratorio 25 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Felipe A. Vázquez Flota** dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este centro.

Atentamente

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 28 noviembre de 2016.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Mariela Vergara Olivares

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. y forma parte del proyecto “Análisis del transcriptoma relacionado con la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana*. Una planta de la medicina tradicional” bajo la dirección del Dr. Felipe Vázquez Flota y con apoyo de CONACYT, fondo de ciencia básica (CONACYT-CB-0181880).

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por darme vida y permitir el cumplimiento de esta meta.

Antes que nada agradezco al Dr. Felipe Vázquez Flota por ser mi asesor, por admitirme en su grupo de investigación, por su tiempo, por su paciencia (que fue mucha), por su gran apoyo. Mucho de lo que hoy he aprendido, es gracias a él y a sus diversas metodologías de enseñanza, le reconozco que efectivamente nunca se equivoca, excepto una vez que pensó que se había equivocado.

A todas las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo a través de las facilidades proporcionadas especialmente a CONACYT por la beca otorgada (becaria número 338224) para mis estudios de maestría.

A la Dra. Yahaira Tamayo Ordoñez, gracias por su paciencia, su buena disposición, sus enseñanzas desinteresadas, porque sin ella este trabajo no se hubiera podido realizar, gracias por su confianza y amistad.

A mi ejemplo a seguir, la M.C. Miriam Monforte, como explicarlo, es como una cobijita de algodón que te apapacha cuando más frío sientes, gracias por su comprensión, por su amistad, gracias por sus consejos, gracias por todo el apoyo personal y también por todo el apoyo técnico por su buena disposición para hacer bien las cosas en el laboratorio y gracias por siempre estar ahí explicando con mucha paciencia.

A mi comité tutorial y revisor, integrado por la Dra. Georgina Estrada Tapia, Dra. Neyi Estrella, Dra. Elizabeth Ortiz, Dr. Felipe Vázquez y Dr. Sergio Peraza por su valioso tiempo invertido en la revisión de este trabajo y por los consejos que me ayudaron a mejorar, así mismo, quiero agradecer a la Dra. Lourdes Miranda por sus sabios consejos y palabras de aliento que me motivaron.

A mis compañeros y amigos del Lab. 25 Dr. Jorge Xool, Germán, Román, Neptis, Angel, Zurisadai, Ignacio, Marijón, gracias por su ayuda, fueron parte fundamental para el desarrollo de este trabajo, y gracias por hacer más amena la estancia en el lab., a la doctora María Tamayo por su gran apoyo en la realización de este proyecto y por su apoyo moral, a todos ustedes muchas gracias por estar ahí y por su amistad.

A mis compañeros y amigos de unidad Susi, Adris, Carlos, Max, Don Lalo, Lili, Pedro, Ruth, Cleire, Hugo, Jhony, Rosita, Erika, gracias por su ayuda, sus consejos y los ratos de convivencia que pasamos.

Gracias a todas las personas que se me estuvieron dando ánimo a lo largo de este tiempo, sus palabras me alegraban los días y me ayudaron a seguir adelante, Martha De Jesús Hernández, Emmanuel Córdova, Janeth García, Adela De Rosas, Oliva Martínez, Lucía Osorio, Natalia Tirado, Carlos Sánchez, Armando Sosa, Saúl Méndez, Carlos Fragosó, Trinidad Sánchez, Fátima Paéz, Roció Vázquez, Silvia Juárez.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a:

Mi ángel guardián, Yolanda Olivares

Mi mamá, Altagracia Olivares

Mis pilares, Antonio, Edgar, Octavio, Lino, Alberto, Antonio, a mi papa y abuelo

Mi motor, Goyito

Mis padrinos Flor y Ramón

A la maestra Natalia Tirado

Edgar Noé Melo Osorio

El apoyo de la persona que amas es una gran bendición, gracias por ser parte de esa fuerza y ejemplo que me impulsa a seguir adelante

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I.....	5
ANTECEDENTES.....	5
1.1.1 Estudio de las plantas medicinales	5
1.1.2 Metabolismo secundario	6
1.1.3 <i>Argemone mexicana</i> L.....	7
1.1.4 Compuestos presentes en <i>Argemone mexicana</i> L.....	9
1.1.5 Alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs).....	10
1.1.6 Síntesis de berberina y sanguinarina	13
1.1.7 Síntesis y localización de las enzimas para la síntesis de ABIs	15
1.1.8 Redundancia genética y expresión diferencial de genes que codifican para enzimas participantes en la síntesis de ABIs	17
1.1.9 Acumulación de alcaloides en plantas maduras de <i>A. mexicana</i>	19
1.1.10 Acumulación de alcaloides durante la germinación y desarrollo de plántulas de <i>A. mexicana</i>	20
1.1.11 Acumulación de alcaloides en cultivos de tejidos de <i>A. mexicana</i>	21
1.1.12 Recapitulación de los antecedentes	23
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
1.2.1 JUSTIFICACIÓN.....	24
1.3 HIPÓTESIS.....	25
1.4 OBJETIVOS	25
1.4.1 Objetivos generales	25
1.4.2 Objetivos específicos	25
1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
CAPITULO II	27
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1.1 Material biológico.....	27
2.1.2 Tratamientos de inducción de cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i>	29
2.1.3 Extracción de ARN total y síntesis del ADN complementario.....	29
2.1.4 Análisis de la expresión relativa por RT-PCR final de punto final y RT-qPCR en tiempo real.....	31
2.1.5 Clonación de los genes <i>NCSAm1</i> , <i>NCSAm2</i> , <i>BBEAm1</i> , <i>BBEAm2</i> , <i>CheSyn</i> y <i>SOMT</i>	35
2.1.6 Extracción y cuantificación de alcaloides (sanguinarina y berberina).....	35
CAPÍTULO III	37
3.1. RESULTADOS	37

3.1.1 Distribución de alcaloides	37
3.1.2 Análisis de la redundancia genética en la ruta de síntesis de ABI en <i>A. mexicana</i>	39
3.1.2.1 Análisis de la redundancia genética mediante RT-PCR en la ruta de síntesis de ABI en tejidos de plantas adultas en <i>A. mexicana</i>	39
3.1.2.2 Análisis de la expresión relativa de los genes <i>NCSAm1</i> , <i>NCSAm2</i> , <i>BBEAm1</i> y <i>BBEAm2</i> en tejidos de planta adulta de <i>A. mexicana</i> por Δ Ct-qPCR tiempo real.....	40
3.1.2.3 Análisis de la distribución de los transcritos correspondientes a <i>NCSAm1</i> , <i>BBEAm2</i> , <i>BBEAm1</i> y <i>BBEAm2</i> de <i>A. mexicana</i> en los tejidos de plántulas en desarrollo	43
3.1.2.4 Análisis de la expresión relativa de <i>NCSAm1</i> , <i>NCSAm2</i> , <i>BBEAm1</i> y <i>BBEAm2</i> en tejidos de plántulas en desarrollo de <i>A. mexicana</i> por Δ Ct-qPCR tiempo real.....	44
3.1.2.5 Análisis de la expresión mediante RT-PCR de <i>NCSAm1</i> , <i>NCSAm2</i> , <i>BBEAm1</i> , <i>BBEAm2</i> , <i>SOMT</i> y <i>CheSyn</i> en cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> en condiciones basales y de inducción	46
3.1.2.6 Análisis de la expresión relativa de <i>NCSAm1</i> , <i>NCSAm2</i> , <i>BBEAm1</i> y <i>BBEAm2</i> en cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> en condiciones de inducción	48
3.1.3 DISCUSIÓN GENERAL	51
3.1.3.1 Expresión preferencial de las copias de los genes NCS y BBE asociada a la síntesis de sanguinarina y berberina	51
CAPÍTULO IV.....	53
4.1 CONCLUSIONES	53
4.2 MODELO PROPUESTO	54
4.3 PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFÍA	57
DATOS COMPLEMENTARIOS	67
ANEXOS.....	72
Anexo1.- Inducción de la línea de callos de <i>A. mexicana</i> (am) con diferentes tratamientos	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIs	alcaloides bencilisoquinolínicos
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
BBE	enzima del puente de berberina
CheSyn	quelantifolinasa
DEPC	dietilpolicarbonato
dNTP	desoxirribonucleotidos trifosfatos
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EL	extracto de levadura
ETOH	etanol
MeJa	jasmonato de metilo
M-MLV	transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney
MS-FR	medio Murashige y Skoog sin fitoreguladores
NCS	norcoclaurina sintasa
PC	medio Phillips y collings
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PVPP	polivinilpolipirrolidona
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SA	ácido salicílico
SOMT	escoulerina-9-O-metiltransferasa
TE	Tris-EDTA
HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1	Aspectos biogénicos para la clasificación de los alcaloides.....	7
Figura 1. 2	Litografía de la descripción botánica de <i>Argemone mexicana</i>	8
Figura 1. 3	Síntesis de S-norcoclaurina	11
Figura 1. 4	Síntesis de S-reticulina.....	12
Figura 1. 5	Rutas de diversificación de los ABIs.....	13
Figura 1. 6	Ruta de biosíntesis de berberina y sanguinarina..	15
Figura 1. 7	Distribución de sanguinarina y berberina en <i>A. mexicana</i>	20
Figura 1. 8	Acumulación de ABIs en plántulas en desarrollo	21
Figura 1. 9	Estrategia experimental planteada para este trabajo.....	26
Figura 2. 1	Tejidos seleccionados en planta adulta.....	27
Figura 2. 2	Material vegetal en diferentes estadios de desarrollo de <i>A. mexicana</i>	28
Figura 2. 3	Cultivo <i>in vitro</i> de callos de <i>A. mexicana</i>	29
Figura 2. 4	Alineamiento de los nucleótidos de NCS.....	33
Figura 2. 5	Alineamiento de los nucleótidos de BBE	34
Figura 3. 1	Cuantificación de berberina y sanguinarina en los diferentes tejidos de planta adulta de <i>A. mexicana</i>	37
Figura 3. 2	Cuantificación de berberina y sanguinarina en plántulas en desarrollo de <i>A. mexicana</i>	38
Figura 3. 3	Análisis de los transcritos de NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1 y BBEAm2, SOMT, CheSyn y 18S en tejidos de planta adulta mediante RT-PCR punto final.....	40
Figura 3. 4	Expresión relativa de los genes NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1, BBEAm2, CheSyn y SOMT, en diferentes tejidos de planta adulta de <i>A. mexicana</i>	42
Figura 3. 5	Análisis de los transcritos NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1, BBEAm2, SOMT, CheSyn y 18S en tejidos de plantas en desarrollo de <i>A. mexicana</i>	43
Figura 3. 6	Expresión relativa de los genes NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1, BBEAm2, CheSyn y SOMT, en plántulas en diferentes estados de desarrollo.....	46
Figura 3. 7	Análisis de los transcritos en inducciones individuales.	48
Figura 3. 8	Expresión relativa de los genes NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1, BBEAm2, CheSyn y SOMT, en callos de <i>A. mexicana</i> en condiciones basales y de inducción con extracto de levadura	49
Figura 3. 9	Expresión relativa de los genes NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1 BBEAm2, CheSyn y SOMT en cultivos de callos de <i>A. mexicana</i> durante la inducción con jasmonato de metilo.....	50
Figura 4. 1	Representación de la sinergia entre las copias redundantes NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1 y BBEAm2..	55
Figura S. 1	Perfil cromatográfico en capa delgada de plántulas en estados de desarrollo iniciales empleando el sistema de elución para berberina.....	67
Figura S. 2	Perfil cromatográfico en capa delgada de tejidos de planta adulta, empleando el sistema de elución para berberina.....	68
Figura S. 3	Perfil cromatográfico en capa delgada de plántulas en estados de desarrollo iniciales empleando el sistema de elución para sanguinarina.	68

Figura S. 4 Perfil cromatográfico en capa delgada de tejidos de planta adulta, empleando el sistema de elución para sanguinarina.	69
Figura S. 5 Análisis de los transcritos de los genes NCSAm1, NCSAm2, BEEAm1, BBEAm2, SOMT y CheSyn de <i>A. mexicana</i> . Inducción con ácido salicílico	69
Figura S. 6 Análisis de los transcritos de los genes NCSAm1, NCSAm2, BEEAm1, BBEAm2, SOMT y CheSyn de <i>A. mexicana</i> . En inducción simultánea y secuencial,	70
Figura S. 7 Expresión relativa de los genes NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1, BBEAm2, CheSyn y SOMT durante la inducción de callos de <i>A. mexicana</i> con ácido salicílico.....	70
Figura S. 8 Expresión relativa de los genes NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1, BBEAm2, CheSyn y SOMT en cultivos de callos de <i>A. mexicana</i> durante la inducción simultánea	71
Figura S. 9 Expresión relativa de los genes NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1, BBEAm2, CheSyn y SOMT en cultivos de callos de <i>A. mexicana</i> durante la inducción secuencial.	71
ANEXO 1. 1 Respuesta a diferentes inductores mediante Inducción individual.	72
ANEXO 1. 2 Respuesta defensiva de la línea de callos Am de <i>A. mexicana</i> a diferentes inductores mediante Inducción simultánea.	73
ANEXO 1. 3 Respuesta defensiva de la línea de callos Am de <i>A. mexicana</i> en inducción secuencial.....	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2. 1 Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los cDNA de los genes NCS1, NCS2, BBE1, BBE2, SOMT, CheSyn y 18S.....	32
Cuadro 2. 2 Características de los oligonucleótidos de qPCR diseñados para los genes NCSAm1, NCSAm2, BBEAm1, BBEAm2, SOMT y Chesyn	34

RESUMEN

Con frecuencia, los diferentes integrantes de una familia génica en las plantas se expresan de manera preferencial en ciertos tejidos o bajo ciertas condiciones ambientales o de desarrollo. Para el caso de la producción de metabolitos secundarios, esto se ha asociado con los patrones de acumulación que despliegan en dichos tejidos o condiciones. De este modo, es posible que los integrantes de estas familias o isoformas atiendan diferentes necesidades. En *Argemone mexicana* se han encontrado isoformas distintas para algunas enzimas que participan en las reacciones iniciales de la ruta de biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIS), sanguinarina y berberina, incluyendo de la norcoclaurina sintasa (*NCS*) y de la enzima del puente de berberina (*BBE*). En este trabajo se llevó a cabo un análisis de expresión mediante RT-PCR y qPCR de dos isoformas para la *NCS* (*NCSAm1* y *NCSAm2*), así como de las dos isoformas reportadas para *BBE* (*BBEAm1* y *BBEAm2*) en diferentes tejidos y condiciones de inducción. Los análisis incluyeron tejidos de hoja, tallo, raíz, pétalo y semilla inmadura de plantas adultas, plántulas en tres etapas tempranas de desarrollo y cultivos *in vitro* en condiciones de inducción de la síntesis de alcaloides por exposición de jasmonato de metilo y extracto de levadura. Se encontró, que las copias de los genes de *NCS* y *BBE* se expresan en tejidos que acumulan tanto berberina como sanguinarina, ya sea de planta adulta, plántulas en desarrollo o de cultivos *in vitro*. Estos resultados sugieren que en *A. mexicana* la presencia de múltiples isoformas de *NCS* y *BBE*, no guarda relación directa con los patrones de acumulación diferencial de berberina y sanguinarina. Tomando en cuenta los datos obtenidos, se propone un modelo en el que se plantean las posibles vías que puede seguir la ruta de biosíntesis para estos ABIs en función de una posible redundancia genética.

ABSTRACT

Often in plants different members of a gene family are expressed preferentially in some tissues, environmental, developmental conditions. In the case of the production of secondary metabolites, associated with accumulation patterns in these tissues deploying or conditions. Thus, it is possible that members of these families or isoforms attend different needs. In *A. mexicana* were found different isoforms for some enzymes involved in the initial reactions of the biosynthesis pathway of benzylisoquinolinic alkaloids (ABI's), sanguinarine and berberine, including the norcoclaurine synthase (*NCS*) and berberine bridge enzyme (*BBE*). This work was carried out an analysis of expression two isoforms reported for *NCS* (*NCSAm1* and *NCSAm2*) and and two isoforms for *BBE* (*BBEAm1* and *BBEAm2*) by RT-PCR and qPCR in different tissues and conditions. Analyses included tissues of leaf, stem, root, petal and immature seed, seedlings three early stages of development and *in vitro* cultures in conditions inducing the synthesis of alkaloids by exposing whit methyl jasmonate and yeast extract. It was found, that copies of genes *NCS* and *BBE* are differentially expressed in tissues that accumulate berberine and sanguinarine either adult plant, developing plantlets or *in vitro* cultures so it suggested that in *Argemone mexicana* the genetic redundancy of *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm2* and *BBEAm1* associated with the synthesis of alkaloids not related to patterns differential accumulation berberine and sanguinarine. Taking this into account the data obtained, is proposed a model that shows the possible pathways can take the way of biosynthesis of these ABI's.

INTRODUCCIÓN

Las plantas productoras de los diferentes tipos de alcaloides (Fig. 1.1), son muy apreciadas en la medicina tradicional y se han realizado diversos estudios sobre la biosíntesis de los metabolitos que producen, tanto a nivel de sus productos finales, como de sus intermediarios biosintéticos. Estos estudios se han realizado a nivel de las enzimas y de los genes involucrados. En algunos casos estos análisis han tenido como fin la manipulación del metabolismo para la explotación comercial de algunas de estas sustancias fisiológicamente activas (Verpoorte *et al.*, 2002).

Argemone mexicana (Papaveraceae) (Fig. 1.2) produce más de 20 alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs), derivados de tirosina, siendo berberina y sanguinarina los más abundantes. Los alcaloides de este tipo son comunes en plantas de los superórdenes Magnoliflorae y Ranunculiflorae, pero en pocas especies su producción coincide de manera simultánea. Por ejemplo, *Berberis* y *Coptis* acumulan berberina, pero no sanguinarina, mientras que *Estcholtzia* y *Papaver* producen sanguinarina, pero no berberina. Estos dos alcaloides comparten la primera parte de las reacciones biosintéticas, hasta la formación del intermediario S-reticulina (Fig. 1.3 y 1.4). A partir de este punto, la ruta que conduce a la biosíntesis de cada alcaloide sigue una ruta diferente (Fig. 1.5 y 1.6). En *A. mexicana*, la berberina se distribuye en todos los tejidos, mientras que sanguinarina únicamente se encuentra en raíces y semillas maduras (Fig. 1.7) (Rubio-Piña *et al.*, 2009). Además, durante el desarrollo de plántulas se detectaron patrones de acumulación diferencial para ambos alcaloides (Xool-Tamayo *et al.*, 2014).

Por otro lado, en *A. mexicana* se han encontrado al menos dos isoformas distintas para algunas enzimas que participan en las reacciones iniciales de la ruta de biosíntesis de sanguinarina y berberina, como la norcoclaurina sintasa (*NCS*) y la enzima del puente de berberina (*BBE*) (Rubio-Piña *et al.*, 2009). Con frecuencia, los integrantes de una familia génica se expresan de manera diferencial en tejidos o condiciones definidas y esto se asocia con diferentes patrones de acumulación de los productos finales. Por ejemplo, se han encontrado varias isoformas de la enzima fenilalanina amonio liasa (*PAL*) en diferentes especies. Algunas de estas isoformas se expresan en respuesta a diferentes condiciones, conduciendo a la producción de distintos productos. Aunque todos estos productos son derivados fenólicos cumplen con diferentes funciones y/o pueden

acumularse en diferentes tejidos, sugiriendo que las diferentes isoformas de *PAL* atienden necesidades diferentes (Ochoa-Alejo *et al.*, 1992; Kim y Hwang, 2014).

Con el fin de establecer el posible papel de las diferentes isoformas de la *NCS* y *BBE*, en este trabajo se propone el análisis de sus patrones de expresión en diferentes tejidos y condiciones, así como su relación con la acumulación de los alcaloides berberina y sanguinarina en estos mismos tejidos.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1.1 Estudio de las plantas medicinales

Las plantas han desempeñado un papel fundamental en la historia del hombre, quien las ha utilizado para satisfacer necesidades básicas como alimento, medicina, vivienda, vestido e incluso en actos rituales. Entre la vasta diversidad de plantas, existen algunas con propiedades de interés para la investigación y para el descubrimiento de nuevos productos. Sin embargo, se calcula que menos del 10% de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de compuestos con actividad biológica (Harvey *et al.*, 2000). En México, las plantas han sido y siguen siendo utilizadas por los habitantes de culturas indígenas para el tratamiento de diversas afecciones del hombre e incluso de animales. El conocimiento del uso y de las propiedades curativas de cierto tipo de plantas ha sido transmitido de generación en generación en forma empírica, lo que ha permitido la recopilación de un amplio conocimiento sobre la variada gama de plantas utilizadas, surgiendo así los estudios fitoquímicos para determinar la estructura de los principios activos de familias químicamente conocidas, que podrán dar posteriores formulaciones farmacológicas (Santizo *et al.*, 2004).

Como parte de su metabolismo, las plantas producen una diversidad de compuestos químicos, algunos de los cuales no parecen tener participación directa en su crecimiento y desarrollo. A estos compuestos se les conoce como metabolitos secundarios, o metabolitos especializados y sus propiedades químicas son de interés humano. El reconocimiento de las propiedades bioactivas de los metabolitos secundarios ha resultado en el descubrimiento de nuevos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas, tales como la aspirina, la xilocaína, el sativex, la atropina, la morfina, entre otros (Croteau *et al.*, 2000).

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas son los principios activos en diferentes formulaciones, o presentan actividad terapéutica potencial. Además, en las preparaciones hechas con partes de plantas con propiedades medicinales, la actividad farmacológica puede deberse a una única sustancia o a una mezcla de ellas. Estos

constituyentes pueden ser de diferentes tipos, tales como alcaloides, glucósidos, fenoles, etc. (Valencia *et al.*, 1995).

Una de las plantas que se reconoce por sus propiedades medicinales es *Argemone mexicana*, conocida comúnmente como cardosanto (Siddiqui *et al.*, 2002). Esta planta puede deber sus propiedades a su composición química, principalmente a los alcaloides que acumula.

1.1.2 Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios se definen como compuestos de baja masa molecular que, aunque no tienen un papel directo en el crecimiento y desarrollo de las plantas que los producen, sí tienen una función para su defensa contra el ataque de depredadores, o en la respuesta a señales de estrés biótico y/o abiótico (Kutchan *et al.*, 2001). Los metabolitos secundarios se clasifican de acuerdo a su origen biosintético (Harborne *et al.*, 1999) en tres principales familias: fenoles, terpenos y alcaloides.

Los fenoles presentan la mayor distribución en las plantas, debido a que están involucrados en diferentes procesos, dentro de los cuales se encuentra la síntesis de lignina y, por lo tanto, son comunes en todas las plantas superiores (Bourgaud *et al.*, 2001). Los terpenos, por su parte, representan un grupo diverso de productos naturales que participan en interacciones benéficas y antagónicas entre organismos, ya que definen a muchas especies de plantas, animales y microorganismos contra sus depredadores, patógenos y competidores (Gershenzon y Dudareva, 2007). Los alcaloides tienen una distribución más restringida en el reino vegetal, ya que son mucho más específicos para una familia, género y, en algunos casos, para una sola especie (Dixon *et al.*, 2001). Debido a estas características algunos autores los han dividido en cuatro grupos: 1) alcaloides verdaderos: poseen un nitrógeno heterocíclico y su esqueleto de carbono proviene parcial o totalmente de un aminoácido proteínico, por ejemplo la papaverina; 2) protoalcaloides: no forman un sistema heterocíclico y se crean a partir de un aminoácido proteínico. Muchos de estos compuestos contienen un grupo amino o amida, por ejemplo

la colchicina; 3) pseudoalcaloides: poseen un nitrógeno, pero son compuestos que no han sido biosintetizados a partir de aminoácidos, sino que se forman por transferencia de nitrógeno en forma de amoníaco a un compuesto de origen terpénico, esteroide, policétido, monosacárido o a un ácido graso, por ejemplo la coniina o la aconitina, y 4) alcaloides imperfectos; son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides, por ejemplo la cafeína.

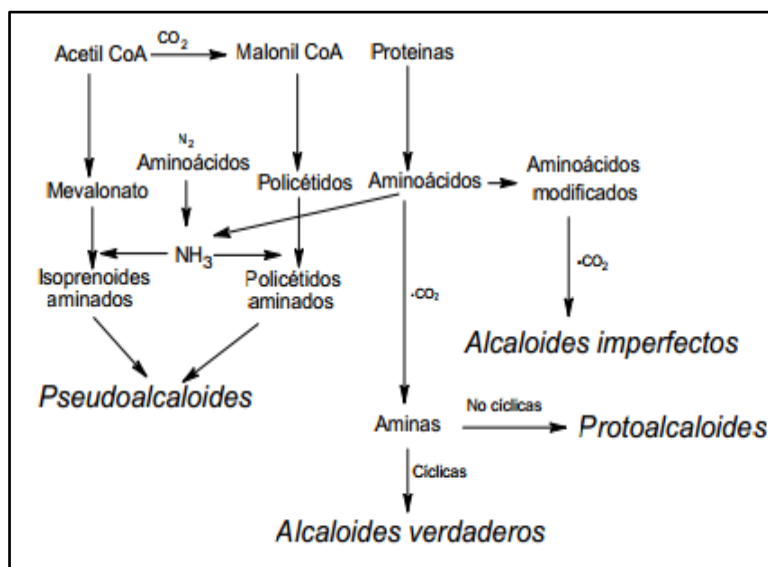


Figura 1.1 Aspectos biogénéticos para la clasificación de los alcaloides (Arango-Acosta 2008).

Los metabolitos secundarios y en particular los alcaloides son de gran interés, para la ingeniería metabólica, la cual busca incrementar la producción de estos compuestos para su aprovechamiento comercial (Verpoorte *et al.*, 2002). Sin embargo, para aplicarla es necesario el buen entendimiento de la bioquímica y de la regulación de las rutas de biosíntesis.

1.1.3 *Argemone mexicana* L.

Argemone mexicana es una planta con una larga historia en la medicina tradicional mexicana. Distintas preparaciones con este ejemplar se han utilizado en el tratamiento contra diferentes enfermedades como las cataratas, las úlceras cutáneas y afecciones de

la garganta (Lozoya y Lozoya, 1982). La presencia de diversos alcaloides bencilisoquinolínicos en sus tejidos podría explicar las propiedades que se le atribuyen a esta especie (Capasso *et al.*, 2002).

A. mexicana es una planta herbácea de entre 0.40 y 1.00 m de altura, de color glauco o verdoso, con nervios blanquecinos, tallos más o menos aculeados, produce látex amarillo, sus hojas son caulinares sésiles, oblongas u obovadas, con bordes irregularmente dentados espinescentes y con 3-6 pares de lóbulos. Las flores terminales, por lo general tienen corola de color amarillo, raro blanco, el fruto es oblongo, elíptico, ovoideo, fusiforme o aculeado. Las semillas son globosas de aproximadamente 2 mm de diámetro (Fig. 1.1). La planta es originaria de América, se ha naturalizado en diferentes países y por sus flores vistosas se cultiva en Estados Unidos y Europa. Se puede encontrar en los rastrojos, en los campos de pastoreo, en las orillas de caminos, en los terrenos baldíos, en los terraplenes de ferrocarril, etc., por lo general se encuentran sobre los suelos fértiles y soleados (Rzedowski *et al.*, 1991).

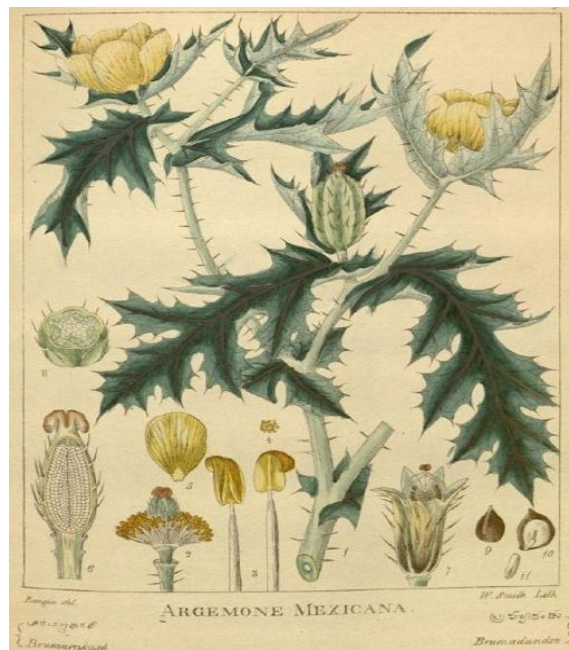


Figura 1.2 Litografía de la descripción botánica de *Argemone mexicana* (tomada de Wight, R.,1840).

1.1.4 Compuestos presentes en *Argemone mexicana* L.

Argemone mexicana puede acumular una gran variedad de productos naturales. Por ejemplo, se han identificado varios flavonoides en las flores y se ha logrado aislar el flavonoide conocido como isorharmnetina y también se han identificado glucósidos. Las semillas contienen un alto contenido de ácidos grasos, de los cuales el 80% corresponden a ácidos grasos insaturados tales como los ácidos linoleico, oleico, palmitoleico y linolénico mientras que el resto lo constituyen los ácidos grasos saturados como el ácido palmítico y el ácido esteárico (Lozoya y Lozoya, 1982). El alto contenido de aceite en las semillas, hace que esta planta tenga un buen potencial para la explotación industrial con fines alimenticios y cosméticos; sin embargo, el alto contenido de compuestos tóxicos ha impedido su utilización (Siddiqui *et al.*, 2002).

Los estudios químicos de los diferentes tejidos han revelado la presencia de metabolitos secundarios, que podrían explicar las propiedades medicinales y tóxicas que le son atribuidas a esta especie (Bhardwaj *et al.*, 1982; Harbone y Williams, 1983; Hussain *et al.*, 1983). Entre los ABIs producidos por esta planta se incluyen la protopina y la berberina, que se encuentra en mayor cantidad en las partes aéreas (Lozoya y Lozoya, 1982). La berberina se usa para el tratamiento de las cataratas y otras afecciones oculares. Además, presenta propiedades inhibitorias sobre la transcriptasa reversa del VIH1, así como un efecto favorable contra la hepatitis tóxica inducida por fármacos (Roberts y Wink, 1988). La sanguinarina es otro de los alcaloides que se produce en esta planta (Siddiqui *et al.*, 2002). Se encuentra en mayor cantidad en la raíz y en las semillas y se utiliza contra la formación de la placa dentobacteriana, y como expectorante (Roberts y Wink, 1988). El empleo experimental de la sanguinarina en el tratamiento de la leucemia ha arrojado resultados prometedores (Ahmad *et al.*, 2000).

Otros alcaloides que se encuentran en una menor proporción son la quelantiofilina, la queleritrina, la coptisina, la escoulerina, y la estilopina (Lozoya y Lozoya, 1982). Esta planta es una especie poco estudiada, por lo que se dispone de poca información sobre las enzimas y los genes involucrados en su metabolismo secundario.

1.1.5 Alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs)

Los ABIs representan un grupo de metabolitos secundarios, derivados de la tirosina, farmacológicamente activos, que se encuentran predominantemente en las familias Berberidaceae, Fumariaceae, Menispermaceae, Papaveraceae y Ranunculaceae. Hasta ahora se han identificado alrededor de 2,500 productos pertenecientes a estas familias estructurales, por lo que representan uno de los grupos de alcaloides más numerosos (Facchini *et al.*, 2000). Algunos de estos alcaloides presentan actividades biológicas sumamente importantes. Por ejemplo, la morfina es un potente analgésico, mientras que la tubocurarina es un bloqueador neuromuscular (Facchini *et al.*, 2000). Dada la importancia comercial de algunos de los alcaloides de este grupo, las rutas metabólicas involucradas en su biosíntesis han sido estudiadas con detalle y en los últimos años se han dilucidado algunas de éstas. Sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares y los controles bioquímicos que regulan su biosíntesis es limitado (Facchini *et al.*, 2000).

La ruta de biosíntesis de los ABIs es larga y compleja, pero puede agruparse en tres etapas: 1) la producción del intermediario (S)-norcoclaurina a partir de dos unidades de L-tirosina (Fig. 1.3); 2) la transformación de (S)-norcoclaurina a (S)-reticulina, el último intermediario común de los alcaloides de este tipo (Fig. 1.4); y 3) las rutas de diversificación que dan origen a los diferentes tipos de ABIs (Fig. 1.5).

En la primera etapa, se utilizan dos moléculas de L-tirosina como sustrato, estas son descarboxiladas, y como producto se obtienen dos moléculas de tiramina. La enzima tirosina dopadescarboxilasa (*TYDC*) es la encargada de sintetizar esta reacción desviando a la tirosina para iniciar la síntesis de los ABIs, para la *TYDC* se han reportado más de quince familias de genes en *Papaver somniferum*, en las cuales se ha observado expresión diferencial en diversos tejidos de esta planta (Facchini y De Luca, 1994). El siguiente paso en la ruta de síntesis es la adición de un grupo hidroxilo, donde participan dos enzimas diferentes, una para cada molécula de tirosina, respectivamente, una de estas enzimas es la monofenoloxidasas (*MFO*), resultando como producto dopamina, un alcaloide empleado como fármaco que actúa como simpaticomimético, promoviendo el incremento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, su administración como

droga no afecta directamente el sistema nervioso central debido a que no puede atravesar la barrera hematocefálica. La otra enzima que utiliza como sustrato a la molécula de tirosina es la monoaminooxidasa (*MAO*) sintetizando 4-hidroxifenilacetaldehído (4-HPAA). Una vez que se han formado la dopamina y 4-HPAA, la enzima norcoclaurina sintasa (*NCS*) cataliza la condensación de ambos para producir *S*-norcoclaurina, el precursor central de todos los ABIs (Fig. 1.3). La *NCS* ha sido purificada a partir de cultivos de células de *Eschscholzia tenuifolia* (Rueffer *et al.*, 1989) y de *P. somniferum*, en los cuales el tratamiento con inductores produjo un notable aumento de la actividad enzimática (Samanai y Facchini, 2001), hay estudios que emparentan genéticamente a la enzima *NCS* con proteínas que aparecen en la planta en condiciones patológicas, agrupadas bajo el nombre genérico de Pathogenesis-Related, proteínas PR o de patogenicidad. La enzima *NCS* es la única proteína conocida de la familia PR10 tipo Betv1 (proteínas alergénicas) que demuestra de manera inequívoca actividad catalítica en las plantas. Recientemente se aislaron dos genes que codifican para la *NCS* en *A. mexicana*, los cuales se expresan casi a un mismo nivel en todos los tejidos de la planta adulta en donde la presencia de los mensajeros es constante, al igual que durante la germinación y en las primeras etapas de desarrollo de la planta (Rubio-Piña *et al.*, 2009).

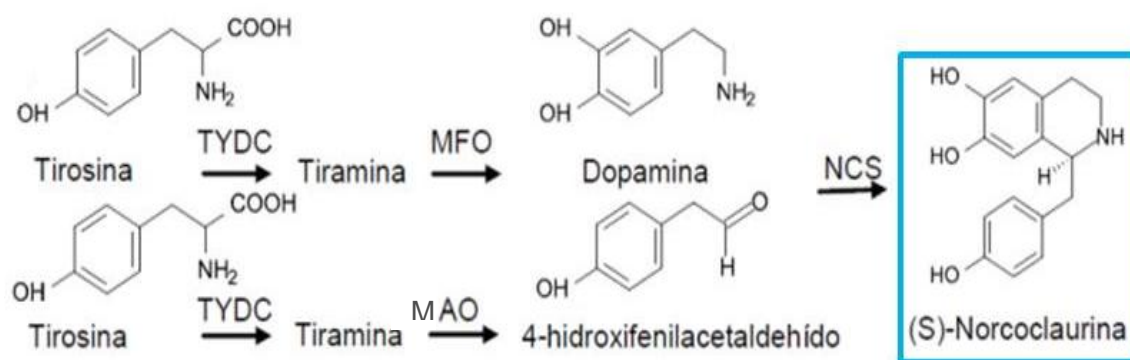


Figura 1.3 Síntesis de (*S*)-norcoclaurina (cuadro azul), a partir de dos moléculas de tirosina. Tirosina/dopa descarboxilasa (*TYDC*), monofenoloxidasas (*MFO*), monoaminooxidasa (*MAO*), norcoclaurina sintasa (*NCS*).

En la segunda etapa, la (*S*)-norcoclaurina es convertida a (*S*)-reticulina por una serie de cuatro reacciones, en la primera ocurre una hidroxilación, la enzima encargada de sintetizar esta reacción es la norcoclaurina 6-*O*-metiltransferasa (6-*OMT*) (Sato *et al.*, 1994), produciendo (*S*)-coclaurina. La enzima coclaurina *N*-metiltransferasa (*CNMT*) (Loeffler *et al.*, 1995) es la siguiente en participar haciendo una reacción de metilación para sintetizar *N*-metilcoclaurina, mientras que la *N*-metilcoclaurina 3'-hidrolasa, (*Cyp80B3*) (Pauli y Kutchan, 1998), es la responsable de la tercera reacción en donde igual ocurre una metilación y el producto es (*S*)-3-hidroxi-*N*-metilcoclaurina. Por último la enzima 3'-hydroxy-*N*-methyl-(*S*)-coclaurine 4'-*O*-methyltransferase (4*OMT*) (Frenzel y Zenk, 1990), lleva a cabo la última reacción de metilación, formandose así la (*S*)-reticulina (Fig. 1.4).

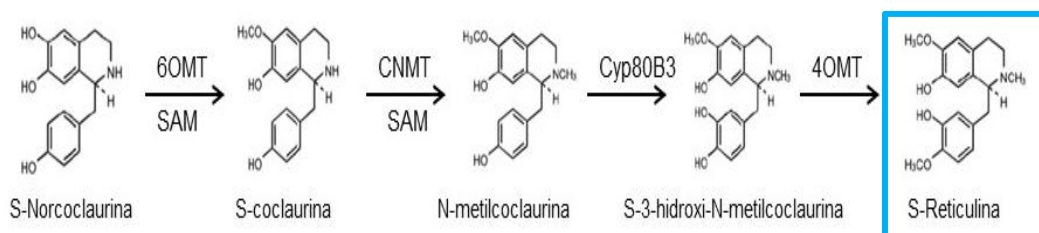


Figura 1. 4 Síntesis de (*S*)-reticulina (cuadro azul), a partir de (*S*)-norcoclaurina. norcoclaurina 6-*O*-metiltransferasa (6-*OMT*), coclaurina *N*-metiltransferasa (*CNMT*), *N*-metilcoclaurina 3'-hidrolasa (*Cyp80B3*), 3'-hydroxy-*N*-methyl-(*S*)-coclaurine 4'-*O*-methyltransferase (4*OMT*).

Las dos primeras etapas (Figs. 1.3 y 1.4) que forman el núcleo de la biosíntesis están bastante bien caracterizadas a nivel proteómico y genómico, sin embargo, los avances más importantes se han centrado sobre seis ramas que inician con (*S*)-reticulina y permiten la biosíntesis de alcaloides: a) bencilisoquinolínicos simples (papaverina), b) tipo protoberberina (berberina), c) tipo benzofenantidrina (sanguinarina), d) morfina (morfina), e) aporfina (magnoflorina) y f) tipo ftáldoisoquinolina (noscapina) (Fig. 1.5). Así también se conocen las enzimas que producen los ABIs diméricos como la berbaminina, que se origina de un precursor que precede a la (*S*)-reticulina. Dependiendo de la ruta de diversificación, se necesitan entre diez y veinte enzimas para obtener un alcaloide como producto final.

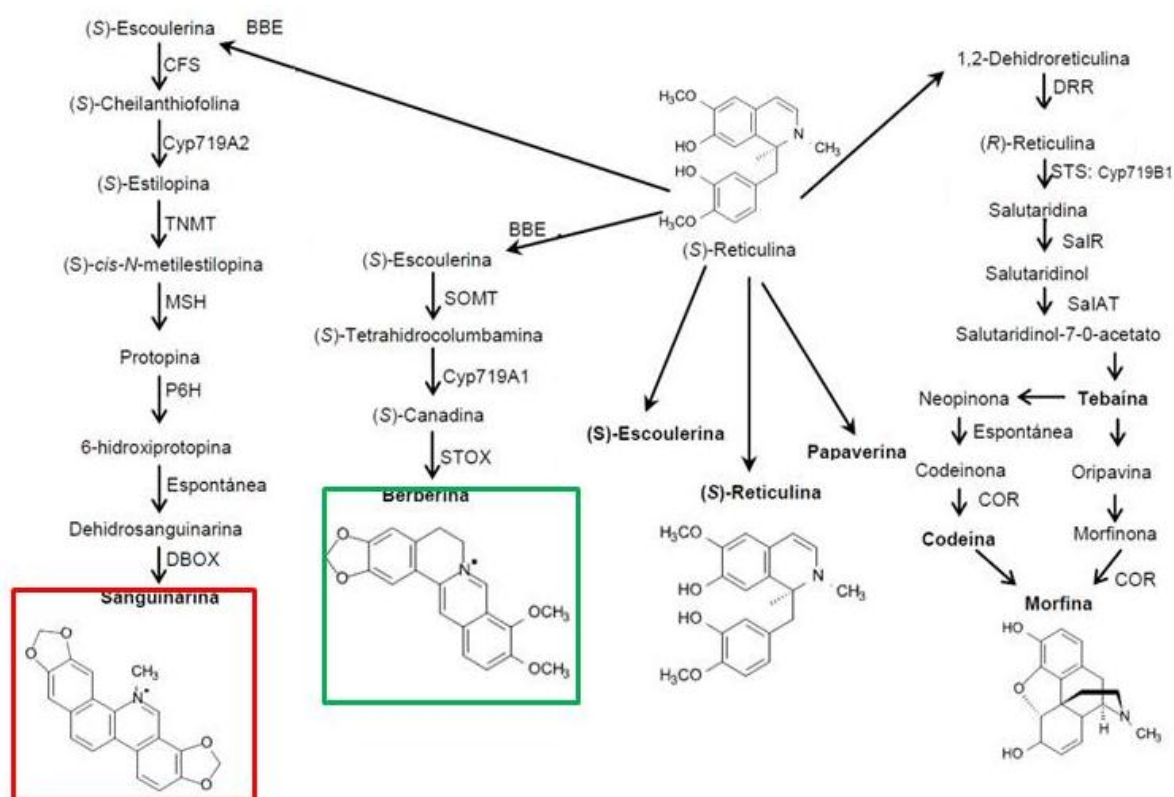


Figura 1. 5 Rutas de diversificación de los ABIs a partir de la síntesis de (S)-reticulina. En el cuadro rojo se encuentra seleccionada la sanguinarina y en el cuadro verde la berberina. Se observa que ambos comparten reacciones hasta la formación de (S)-escoulerina, siendo esta reacción catalizada por la enzima del puente de berberina (BBE).

1.1.6 Síntesis de berberina y sanguinarina

Los metabolitos secundarios berberina y sanguinarina pertenecen al grupo de alcaloides ABIs y comparten las primeras reacciones en su ruta de síntesis, teniendo como precursor dos moléculas de L-tirosina para la síntesis de (S)-escoulerina (Fig. 1.3 -1.5), a partir de este punto la ruta se ramifica de manera que cada metabolito sigue una ruta diferente (Fig. 1.6). La última reacción que comparten consiste en la conversión del grupo N-metil de la S-reticulina en el componente del puente metilénico de la (S)-escoulerina, por acción de la enzima formadora del puente de berberina (BBE) (Kutchan y Dittrich, 1995) (Fig. 1.5). Recientemente, se clonaron dos genes que codifican para esta enzima en *A. mexicana*, uno de los cuales se expresa en todos los tejidos de la planta, presentando una mayor acumulación de mensajeros en la hoja, cápsula y brote floral, mientras que el otro

tiene un nivel menor de expresión y sus transcritos están ausentes en la semilla inmadura (Rubio-Piña *et al.*, 2009). En cultivos celulares de *A. mexicana* en condiciones basales no se observó acumulación en niveles detectables sin embargo, al ser inducidos con metil jasmonato, ácido salicílico y extracto de levadura, se observó un incremento en la acumulación (Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010). Se ha observado que la inducción transcripcional y de la actividad de la *BBE* ocurre en respuesta a la aplicación de homogenados fúngicos en cultivos celulares de *Estcholtzia californica* (Kutchan Y Dittrich *et al.*, 1995), así como a daños mecánicos en cultivos de *P. somniferum* (Facchini y Park, 2003). Esto indica que la inducción transcripcional de estas enzimas podría ser un punto clave para la regulación de la ruta.

La síntesis de sanguinarina y otros alcaloides de tipo benzofenantridina inicia a partir de la (S)-escoulerina, siendo la enzima quelantifolina sintasa (*CheSyn*) (Bauer y Zenk, 1991), la encargada de desviar la ruta en una reacción en la que son liberados cuatro hidrogenos, oxidando la molécula, resultando un grupo metilendioxi, obteniendo como producto (S)-quelantifolina. La enzima estilopina sintasa (*STS*) (Bauer y Zenk, 1991), cataliza la siguiente reacción en donde sucede lo mismo que en la reacción anterior y en este caso el producto es (S)-estilopina. La enzima (S)-tetrahidroprotoberberina *N*-metiltransferasa (*TNMT*) (Rueffer, *et al.*, 1990), produciendo (S)-*cis-N*-metilestilopina seguida de dos hidroxilaciones, catalizadas por la (S)-*cis-N*-metilestilopina 14-hidroxilasa (*MSH*) y la protopina-6-hidrolasa (*PRH*), obteniendo como productos protopina y didihrosanguinarina, respectivamente. Finalmente la dihidrobenzofenantridina oxidasa (*DBOX*) (Arakawa, *et al.*, 1992), convierte la dihidrosanguinarina en sanguinarina (Fig. 1.6).

Para la síntesis de berberina, la (S)-escoulerina es metilada, en lugar de ser oxidada, por la escoulerina-9-*O*-metiltransferasa (*SOMT*) (Muemmler, *et al.*, 1985) para producir (S)-tetrahidrocolumbamina, el segundo paso involucra la formación de un puente metilendioxi en la (S)-tetrahidrocolumbamina, llevada a cabo por la enzima canadina sintasa (*CAS*) (Rueffer y Zenk, 1994), que es dependiente del citocromo P-450. Finalmente, la canadina es oxidada para producir berberina por acción de la (S)-tetrahidroprotoberberina oxidasa (*STOX*) (Okada *et al.*, 1988).

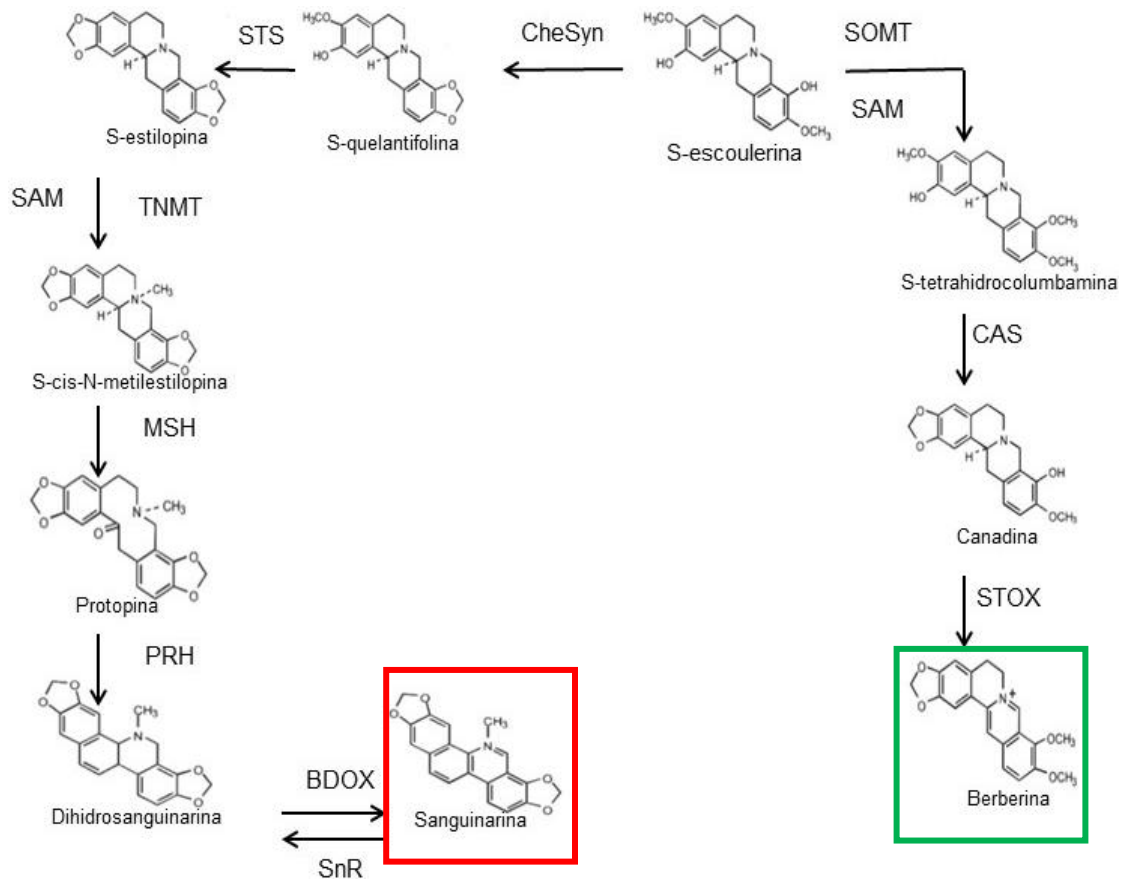


Figura 1. 6 Ruta de síntesis de berberina y sanguinarina. En los cuadros verdes y rojo se muestra la ruta específica para la síntesis de berberina y sanguinarina, respectivamente. Quelanthifolina sintasa (*CheSyn*) estilopina sintasa (*STS*), (S)-tetrahydroprotoberberina N-metiltransferasa (*TNMT*), S-cis-N-metilestilopina 14-hidroxilasa (*MSH*), Dihydrobenzofenantridina oxidasa (*DBOX*) Sanguinarina reductasa (*SnR*) Scoulerina-9-O-metiltransferasa (*SOMT*), canadina sintasa (*CAS*), Tetrahydroprotoberberina oxidasa (*STOX*).

1.1.7 Síntesis y localización de las enzimas para la síntesis de ABIs

Se ha avanzado en la comprensión de la biosíntesis del metabolismo especializado, incluso de la expresión y regulación de los genes implicados, sin embargo, son escasos los estudios sobre los mecanismos que gobiernan la distribución espacial de las enzimas, cofactores y sustratos que intervienen en la síntesis de alcaloides (Roze *et al.*, 2011). La distribución y localización específica en diferentes sitios celulares o tisulares es importante para todo el metabolismo en general, ya que por sí solas las enzimas han sido

consideradas como mecanismos de regulación, la compartimentalización permite la optimización de reacciones enzimáticas al procurar diversos entornos de pH subcelulares, permitiendo el funcionamiento simultáneo de las vías que compiten por los mismos sustratos, evita además, los ciclos fútiles y confina los metabolitos tóxicos (Lunn *et al.*, 2007). En la síntesis y almacenamiento de los ABIs participan diferentes tipos de tejidos, células y organelos, por ejemplo, en *P. somniferum* la síntesis de morfina y noscapina ocurre en los tallos y raíces y se acumulan en el citoplasma de células especializadas (células laticíferas) de los carpelos y de las cápsulas de los frutos, mientras que la sanguinarina es sintetizada y acumulada en las raíces; en *B. stolonifera*, la berberina es sintetizada y almacenada en todos los órganos (Facchini y De Luca, 1995 y Facchini *et al.*, 2007). Esta diferenciación espacial puede ser mayor, ya que la expresión genética y la actividad de las enzimas correspondientes se ubica exclusivamente en ciertas células o compartimentos subcelulares. Por ejemplo, en *P. somniferum* en la síntesis y acumulación de morfina, sanguinarina y alcaloides relacionados, participan distintos tipos de células del floema tanto de los tallos como de las raíces (Bird *et al.*, 2003; Samanani *et al.*, 2006). Utilizando técnicas de inmunofluorescencia e hibridación de ARN *in situ* encontraron que siete de las 14 enzimas de la ruta para alcaloides tipo morfina (*6OMT*, *CNMT*, *NMCH*, *4'OMT*, *BBE*, *SalAT* y *COR*) están localizadas en los elementos cribosos, mientras que los transcritos de éstas se encuentran en las células acompañantes y los alcaloides en células laticíferas (Bird *et al.*, 2003; Samanani *et al.*, 2006). En *Thalictrum flavum*, la enzima *BBE* está en los idioblastos de las hojas, en distintas células de las raíces y rizomas donde se producen y acumulan abundantes cantidades de ABIs tipo protoberberina (Bock *et al.*, 2002); en raíces, los ABI se localizan en las células maduras de la endodermis al inicio del crecimiento secundario, mientras que los transcritos génicos de nueve de las doce enzimas implicadas en su síntesis (*TYDC*, *NCS*, *6OMT*, *CNMT*, *NMCH*, *4'OMT*, *BBE*, *SOMT*, *CAS*), están ubicados en la endodermis inmadura, periciclo y en algunos casos en las células adyacentes corticales del meristemo apical. En tanto que en los rizomas los alcaloides se depositan en la médula y el córtex y los transcritos génicos de las nueve enzimas en el protodermis del primordio foliar (Samanani, *et al.*, 2002; 2005). Esto significa que los sitios de síntesis y acumulación están separados espacialmente y que en distintas especies o en la misma pueden participar distintos tipos de células.

Las enzimas para la síntesis de ABIs están separadas en compartimentos subcelulares, las dos primeras partes de la ruta de tirosina a (S)-norcoclaurina y de (S)-norcoclaurina a (S)-reticulina se realizan en el citosol, mientras que las rutas de diversificación en vesículas membranosas cuya independencia o asociación al retículo endoplásmico está en discusión (Zenk y Juenger, 2007; Ziegler y Facchini, 2008; Facchini y Bird, 1998; Facchini *et al.*, 2001). Esta compartimentalización de enzimas, sustratos y productos implica la coordinación y regulación de la ruta, de no ser así, las enzimas y los sustratos se desplazarían libremente en el citosol (Ziegler y Facchini, 2008). Por otra parte, se sabe que los ABIs, así como otros compuestos, se almacenan en vacuolas; los alcaloides berberina, codeína, morfina, noscapina, papaverina, (S)-reticulina, sanguinarina, (S)-escoulerina y tebaína, fueron encontrados en vacuolas de diferentes densidades en cultivos celulares de *Papaver bracteatum* y *Coptis japonica* (Facchini y Bird, 1998; Roberts y Wink, 1988; Kutchan *et al.*, 1986; Otani *et al.*, 2005; Yasaki *et al.*, 2008). En las vacuolas laticíferas de *Chelidonium majus* las concentraciones de sanguinarina, chelidonina y berberina se aproximaron a 500 y 1,000 mM, mientras que en las del látex de *P. somniferum* a 500 mM de morfina y en vacuolas de células de *C. japonica* hasta 72 mM de berberina (Roberts y Wink, 1988; Otani *et al.*, 2005).

1.1.8 Redundancia genética y expresión diferencial de genes que codifican para enzimas participantes en la síntesis de ABIs

La duplicación de genes es de importancia fundamental en la evolución. Se han propuesto tres teorías alternativas (Lynch *et al.*, 2002; Lynch y Conery, 2000). La primera es la no-funcionalización de una copia por la acumulación de mutaciones degenerativas, esto ocurre principalmente en las familias con un gran número de copias, ejemplo: las familias génicas de la α y β globina humanas contienen respectivamente cinco y seis genes. La familia alfa ubicada en el cromosoma 16 (HSAp16) con 30,000 pares de nucleótidos (30Kb) contiene cinco genes; el gen zeta que se expresa en el estadio embrionario, dos pseudogenes no funcionales, y dos copias del gen alfa que se expresan durante los estadios fetal y adulto. La segunda es neo-funcionalización: en este escenario, una copia adquiere una nueva función beneficiosa y se preserva por selección natural, con la otra copia de retención de la función original. Una variación de este escenario es que los dos genes podrían adquirir funciones divergentes pero mantener un solapamiento funcional.

Selección sería entonces actuar sobre estas propiedades divergentes e indirectamente a mantener la superposición de funciones. La selección también puede actuar en un recién emergente, propiedad única a la acción combinada de dos genes estrechamente relacionados, o en algún aumento de la eficiencia o la fidelidad logrado por la acción combinada de dos genes (Thomas *et al.*, 1993), por ejemplo el gen que codifica para la enzima shiquimato cinasa (*SK*), una enzima clave en la vía del shikimato, que adquirió nuevas funciones y nuevos patrones de expresión génica en comparación con la secuencia ancestral, un proceso impulsado en parte por la selección positiva (Fucile *et al.*, 2008). En el tercer escenario, sub-funcionalización, se dan mutaciones en ambas copias del gen duplicado, adquiriendo funciones complementarias y hay una repartición de las funciones del gen ancestral, ejemplo: Zebrafish presenta dos copias del citocromo P450, una se expresa en el ovario y otra en el cerebro, pero el análisis de genes ortólogos en organismos con una única copia, muestra que se expresa en ambos tejidos.

Muchos de los componentes cruciales de la transducción de señales, de desarrollo, y las vías metabólicas tienen copias funcionalmente redundantes, estas redundancias muestran una estabilidad sorprendente de evolución en escalas de tiempo prolongadas en donde la sinergia derivada de la retroalimentación entre las copias redundantes puede servir como un elemento de procesamiento de la información que facilita la transducción de señales y el control de la expresión génica (Ran-Kafri, 2009). En las cascadas de señalización, componentes cruciales de señalización se asocian con frecuencia isoformas redundantes, por ejemplo las MAP cinasas, inhibidores de NF-kappa B, proteínas Wnt, entre otras (Dean *et al.*, 2008, De Luna *et al.*, 2008, Kafri *et al.*, 2008 y Musso *et al.*, 2008).

En el caso de vías metabólicas específicamente en la ruta de biosíntesis de los ABIs se han reportado isoformas para las enzimas: *TYDC* en *P. somniferum* y *T. flavum*, las cuales tienen expresión diferencial y específica de tejido (Facchini y De Luca, 1994; Samanani *et al.*, 2005); así mismo, se sabe que familias del gen *NCS* se expresan abundantemente en el rizoma, peciolo y raíces de *T. flavum* (Samanai *et al.*, 2004), *P. somniferum* (Liscombe *et al.*, 2005) y *C. japonica* (Minami *et al.*, 2007), de este mismo gen en *A. mexicana* se aislaron dos isoformas que codifican para *NCS* (*NCSAm1* y *NCSAm2*) (Rubio-Piña *et al.*, 2009), para las cuales se reportó expresión diferencial en células en suspensión sometidas a inducción con SA, MeJa y EL simultáneamente (Trujillo-

Villanueva *et al.*, 2010). En el caso de los genes que codifican para las enzimas 6-OMT, CNMT y 4-OMT se sabe que forman parte de la familia de las N-metiltransferasas, clasificadas básicamente por el tipo de reacción que catalizan (Lacoste *et al.*, 2002). Siguiendo el orden y como último gen involucrado en las reacciones comunes, se conocen tres genes para BBE en *E. californica* (*BBE1*, *BBE2*, y *BBE3*), a partir de los cuales se aislaron dos genes de BBE en *P. somniferum* (*BBE2* y *BBE3*) (Facchini *et al.*, 1996). En *P. somniferum* se demostró que *BBE1* se expresa en raíces y tallos de plantas maduras; en plántulas de tres días después de la germinación y en cultivos celulares sometidos a tratamiento con un inductor de hongos o con jasmonato de metilo. En *A. mexicana* se aislaron dos isoformas del gen *BBE* (*BBEAm1* y *BBEAm2*) (Rubio-Piña *et al.*, 2009), para las cuales se reportó una expresión muy similar de ambas copias en tejidos de plantas en desarrollo y cultivos celulares sometidos a inducción con SA, EL y MeJa (Rubio-Piña *et al.*, 2009; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010). El análisis filogenético mostró que hay una relación cercana entre las isoformas de *BBE* de *E. californica*, *P. somniferum* y *A. mexicana*, permitiendo agruparlas en un mismo clado y sugiriendo un grupo monofilogenético (Rubio-Piña *et al.*, 2009).

1.1.9 Acumulación de alcaloides en plantas maduras de *A. mexicana*

A. mexicana acumula diferentes alcaloides ABIs tipo benzofenantridina, como queleritrina, sanguinarina y dihidrosanguinarina, y tipo protoberberina como berberina. Es una de las pocas plantas que tiene la capacidad de acumular alcaloides de estos grupos simultáneamente (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013). Estos alcaloides se distribuyen siguiendo un patrón tejido específico: la sanguinarina se encuentra solamente en raíces y semillas maduras, mientras que la berberina se distribuye en todos los tejidos, excepto en las semillas maduras (Fig. 1.7) (Rubio-Piña *et al.*, 2009).

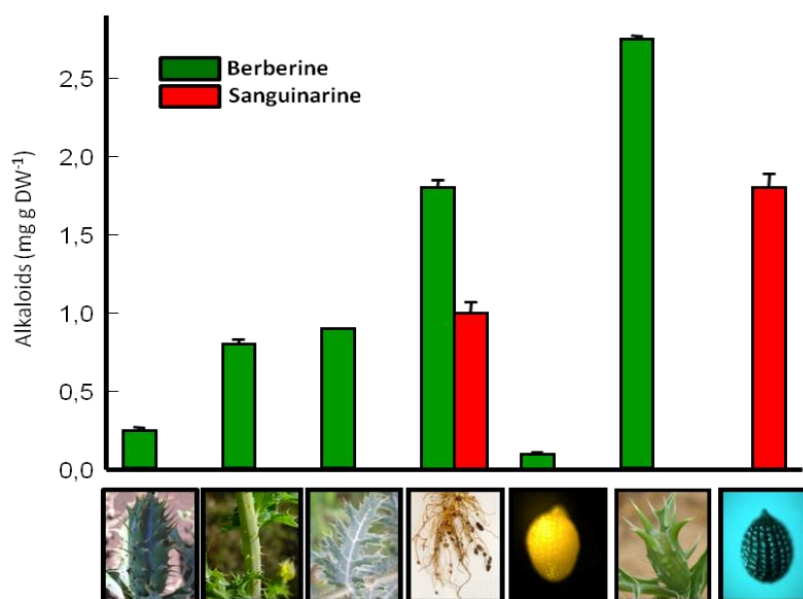


Figura 1. 7 Distribución de sanguinarina y berberina en *A. mexicana* (Rubio-Piña, 2010).

1.1.10 Acumulación de alcaloides durante la germinación y desarrollo de plántulas de *A. mexicana*

Las semillas de *A. mexicana* acumulan sanguinarina solamente en estado maduro, aunque también se detecta la presencia de sanguinarina durante la germinación de las semillas; en la emergencia y durante el desarrollo de las plántulas solamente se detecta en las etapas tempranas, antes de la emergencia de los cotiledones (Fig. 1.7 A) (Rubio-Piña *et al.*, 2009). Una vez que se forman los cotiledones, se puede observar la presencia de berberina, tanto en la radícula, como en la parte aérea mientras que la sanguinarina solamente se observa en la radícula (Fig. 1.7 B) (Rubio-Piña *et al.*, 2009). No obstante, cuando aparecen las hojas verdaderas, la berberina predomina en los tejidos aéreos mientras que la sanguinarina se restringe a la radícula (Rubio-Piña *et al.*, 2009; Xool-Tamayo *et al.*, 2014).

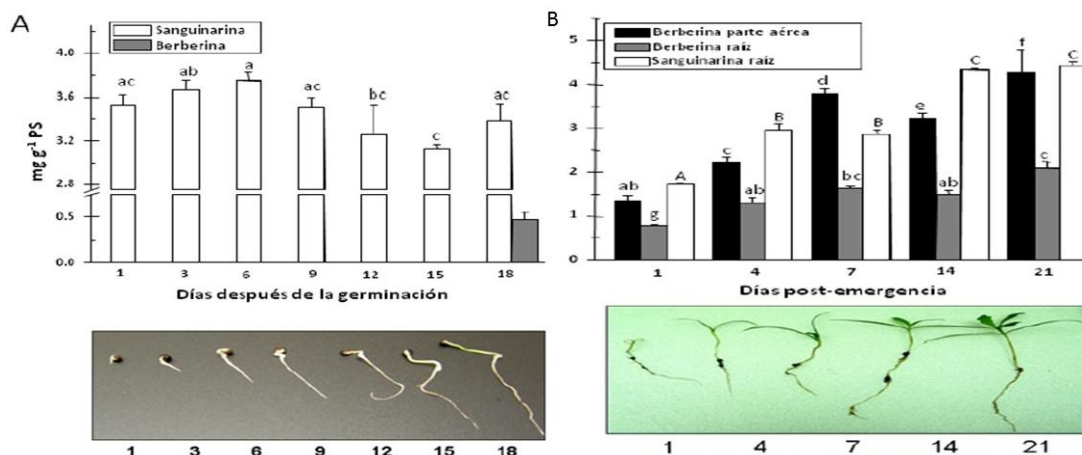


Figura 1.8 Acumulación de ABIs en plántulas en desarrollo después de la germinación de semillas de *A. mexicana*. A) acumulación de sanguinarina y berberina durante los primeros días de la germinación de la semilla. B) Acumulación de sanguinarina y berberina en parte aérea y radical de plántulas en desarrollo temprano. Las barras representan el margen de error (3n). Las letras (minúsculas: sanguinarina) señalan diferencias significativas entre medias (ANOVA $P < 0.001$) (Rubio-Piña *et al.*, 2009).

1.1.11 Acumulación de alcaloides en cultivos de tejidos de *A. mexicana*

En nuestro grupo de trabajo se obtuvo una línea de células en suspensión derivada de hojas que se denominó como AmMiF. Esta línea, tanto en cultivos de callos como de células en suspensión, acumula cantidades significativas de sanguinarina en condiciones normales de mantenimiento (Carrillo-Pech *et al.*, 2006; Vázquez-Flota *et al.*, 2007). Por otra parte, la berberina solamente se acumula en trazas (Guizar-Gonzales *et al.*, 2012). La propiedad de esos cultivos de acumular sanguinarina aun sin ningún tratamiento de inducción es interesante, ya que en cultivos de otras especies como *E. californica* y *P. somniferum* este alcaloide solamente se acumula después de un tratamiento de inducción (Campos-Tamayo *et al.*, 2002; Carrillo-Pech *et al.*, 2006). Los tratamientos de inducción en los cultivos *in vitro* tienen como objetivo reproducir condiciones semejantes a las que se dan en un ataque por patógenos, activando los mecanismos de defensa, entre los cuales se encuentra la producción de metabolitos bioactivos, para el caso de *A. mexicana*, consiste principalmente en sanguinarina. No obstante, en esta línea el tratamiento con

inductores del metabolismo secundario, tales como el jasmonato de metilo (MeJa) o el extracto de levadura (EL) (Guízar-González *et al.*, 2012) de manera individual, tiene efectos limitados en cuanto a promover la acumulación de sanguinarina, comparado con otras especies, por ejemplo, en *E. californica*, la exposición de cultivos a MeJa, resulta en la acumulación de entre 10 y 100 veces los contenidos del metabolito antes del tratamiento (Facchini *et al.*, 2000) mientras que en *A. mexicana* ocurren aumentos de entre dos y cuatro veces los contenidos basales (Guízar-González *et al.*, 2012; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010). En nuestro grupo de trabajo, se reportó que la aplicación secuencial de jasmonato de metilo (MeJa), ácido salicílico (AS) y extracto de levadura (EL), con diferencias de 24 h entre las aplicaciones, puede conducir a aumentos de entre 10 y 15 veces los valores iniciales (Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

En nuevas líneas de callos de *A. mexicana* generados a partir de hoja joven (AM) (Campos-Tamayo, 2002; y Chan-Canto, 2014) se aplicaron tratamientos de inducción siguiendo estos esquemas: **inducción individual**, adicionando por separado cada uno de los tres inductores SA, MeJa y EL: **inducción simultánea**, aplicando en un solo evento los tres inductores; e **inducción secuencial**, aplicando en ese orden cada inductor con una diferencia de 24 h; las muestras se colectaron a las 12, 24, 36, 48 y 72 h. La inducción individual con extracto de levadura jugó un papel sobresaliente en la inducción de respuesta defensiva en la línea de callos AM aumentando la acumulación de sanguinarina a las 36 h, comparado con MeJa y AS. Dicha respuesta puede ser explicada debido a que EL es un agente externo a la biología de la especie; aunque el ácido salicílico logró un aumento en la respuesta defensiva, esta fue mucho menor en comparación con EL, pero mayor que el tratamiento con MeJa. Es imprescindible mencionar que en la inducción con EL y AS, el tiempo de mayor actividad de una respuesta defensiva significativa del cultivo, se dio cumplidas las 36 h para ambos casos (Chan-Canto, 2014). Exponiendo los callos a los inductores (EL, MeJa, AS) de forma simultánea, estos no presentaron una respuesta defensiva. Y por último, en la inducción secuencial se observó que la adición de AS + MeJa a las 48 h aumentó la acumulación de sanguinarina, aunque en muy pocas cantidades (Chan-Canto, 2014) (Anexo 1, Fig. 1-3).

1.1.12 Recapitulación de los antecedentes

De la revisión de los antecedentes se observa que las plantas de *A. mexicana* sintetizan alcaloides del tipo ABI que incluyen, entre los más abundantes, a la berberina y a la sanguinarina. En pocas especies estos dos tipos de alcaloides se presentan de manera simultánea. Estos dos alcaloides se distribuyen de manera diferencial, tanto en los tejidos de la planta adulta, como a lo largo de su desarrollo temprano. De este modo, mientras que berberina se localiza en todos los tejidos de las plantas adultas, sanguinarina sólo se detecta en raíces y semillas maduras. Por otra parte, sanguinarina se acumula en etapas muy tempranas de plantas en desarrollo (hipocótilos y cotiledones), mientras que berberina se detecta en las etapas posteriores (con aparición de hojas verdaderas) (Rubio-Piña *et al.*, y Vázquez-Flota, 2013). Más aún, los cultivos *in vitro* en condiciones basales y de inducción acumulan sanguinarina pero no berberina (Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010; Guízar-González *et al.*, 2012; Chan-Canto 2014). Por otro lado, se ha demostrado la presencia de al menos dos isoformas para *BBE* y la *NCS* (*BBEAm1*, *BBEAm2*, *NCSAm1* y *NCSAm2*) en *A. mexicana* (Rubio-Piña *et al.*, 2009) y la reciente obtención de los transcriptomas de las raíces y partes aéreas de plántulas en desarrollo sugiere la existencia de familias génicas para algunas de las enzimas involucradas. De este modo, y considerando que la existencia de estas familias génicas frecuentemente se asocia con mecanismos de expresión diferencial que definen los patrones de acumulación de metabolitos en distintos tejidos o condiciones, es probable que la existencia de las isoformas de *BBE* y *NCS* de *A. mexicana* forme parte de un mecanismo regulatorio para la síntesis de alcaloides en esta planta.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La existencia de familias génicas, formadas por diferentes genes que codifican para enzimas con las mismas actividades catalíticas, puede cumplir funciones redundantes o bien participar en mecanismos de regulación diferencial. En el primer caso, los integrantes de las familias se expresan en niveles, sitios y condiciones similares. Aquí, las funciones de los diferentes miembros se relacionan con potenciar el nivel de actividad o de acumulación del producto final, o bien operan como un mecanismo de protección contra la pérdida en la funcionalidad de alguno de los integrantes. No obstante, en algunos casos,

los diferentes integrantes se expresan de manera preferencial o exclusiva en algunos tejidos o bajo ciertas condiciones, por ejemplo, se han reportado varias isoformas de la enzima fenilalanina amonio liasa (*PAL*) en diferentes especies. Algunas de estas isoformas se expresan en respuesta a diferentes condiciones, conduciendo a la producción de distintos productos. Aunque todos estos productos son derivados fenólicos cumplen con diferentes funciones y/o pueden acumularse en diferentes tejidos, sugiriendo que las diferentes isoformas de *PAL* atienden necesidades diferentes (Kim y Hwang, 2014). En estos casos, la existencia de estas familias representa un mecanismo de regulación que permite controlar la acumulación de un producto en un sitio o condición definida. Si bien en *A. mexicana* se ha documentado la existencia de estas familias génicas para al menos algunas de las enzimas involucradas en la síntesis de alcaloides, no se ha establecido si estas participan como copias redundantes o forman parte de un mecanismo regulatorio. Saber lo que ocurre es importante debido a que si hay una participación específica de alguna copia en el mecanismo de regulación de la síntesis de sanguinarina o berberina, en un futuro se podrían establecer condiciones óptimas para la manipulación de las vías, con fines comerciales.

1.2.1 JUSTIFICACIÓN

La existencia de familias génicas sugiere la posibilidad de mecanismos de control que involucren su expresión en diferentes condiciones, tiempos de desarrollo o tejidos. Con el fin de analizar si la acumulación diferencial de los alcaloides en *A. mexicana* se relaciona con la expresión preferencial de alguna de estas isoformas, se propone analizar los patrones de expresión en tejidos y condiciones que muestran un patrón de acumulación específico de alcaloides. Estos son; raíces que acumulan ambos alcaloides; hojas y tallos que acumulan preferencialmente berberina, y callos (cultivos *in vitro*) que solamente acumulan sanguinarina. Se incluirán plántulas en desarrollo cuyo patrón de acumulación varía en función del avance de este proceso, así como cultivos *in vitro*, expuestos a condiciones que modifican los niveles de acumulación de estos alcaloides.

1.3 HIPÓTESIS

En *Argemone mexicana*, la redundancia genética asociada con el proceso de síntesis de alcaloides, está relacionada con los patrones de acumulación diferencial de berberina y sanguinarina.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivos generales

Estudiar la redundancia génica en la ruta de síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana*, en función de la acumulación diferenciada de berberina y sanguinarina.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Analizar los patrones de expresión de los genes correspondientes a *NCSAm1* y *NCSAm2*, así como de *BBEAm1* y *BBEAm2*, en los tejidos de plantas adultas de *A. mexicana*, mediante RT-PCR y qPCR.
2. Investigar los patrones de expresión de los genes correspondientes a *NCSAm1* y *NCSAm2*, así como de *BBEAm1* y *BBEAm2*, en los diferentes tejidos de plántulas de *A. mexicana* en desarrollo, mediante RT-PCR y qPCR.
3. Analizar los patrones de expresión de los genes correspondientes a *NCSAm1* y *NCSAm2*, así como de *BBEAm1* y *BBEAm2*, en cultivos in vitro de *A. mexicana* en condiciones basales y de inducción mediante RT-PCR y qPCR.
4. Determinar la distribución y acumulación de los alcaloides en los diferentes tejidos y condiciones seleccionados, mediante la técnica de cromatografía de capa fina.

1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para el cumplimiento de los objetivos se planteó la siguiente estrategia experimental: se emplearon tres modelos de trabajo; 1) cultivos *in vitro*, 2) plántulas en desarrollo y 3) plantas maduras. Estos modelos se seleccionaron con base en la distribución de alcaloides que presentan. Se analizó el contenido y distribución de los alcaloides en estos tejidos utilizando técnicas de cromatografía en capa fina (CCF), también se analizó la distribución y abundancia relativa de los genes que codifican para diferentes isoformas de *NCS* y *BBE* por PCR punto final y PCR tiempo real (qPCR). Con el fin de analizar la activación de las rutas de síntesis que conducen de manera específica a la formación de cada uno de los alcaloides de interés, también se analizaron los patrones de expresión del gen que codifica para la enzima scoulerina O-metiltransferasa (*SOMT*) y del gen que codifica para la enzima, quelantifolina sintasa (*CheSyn*) como indicadores de la posible síntesis de berberina y sanguinarina, respectivamente (Fig. 1.8).

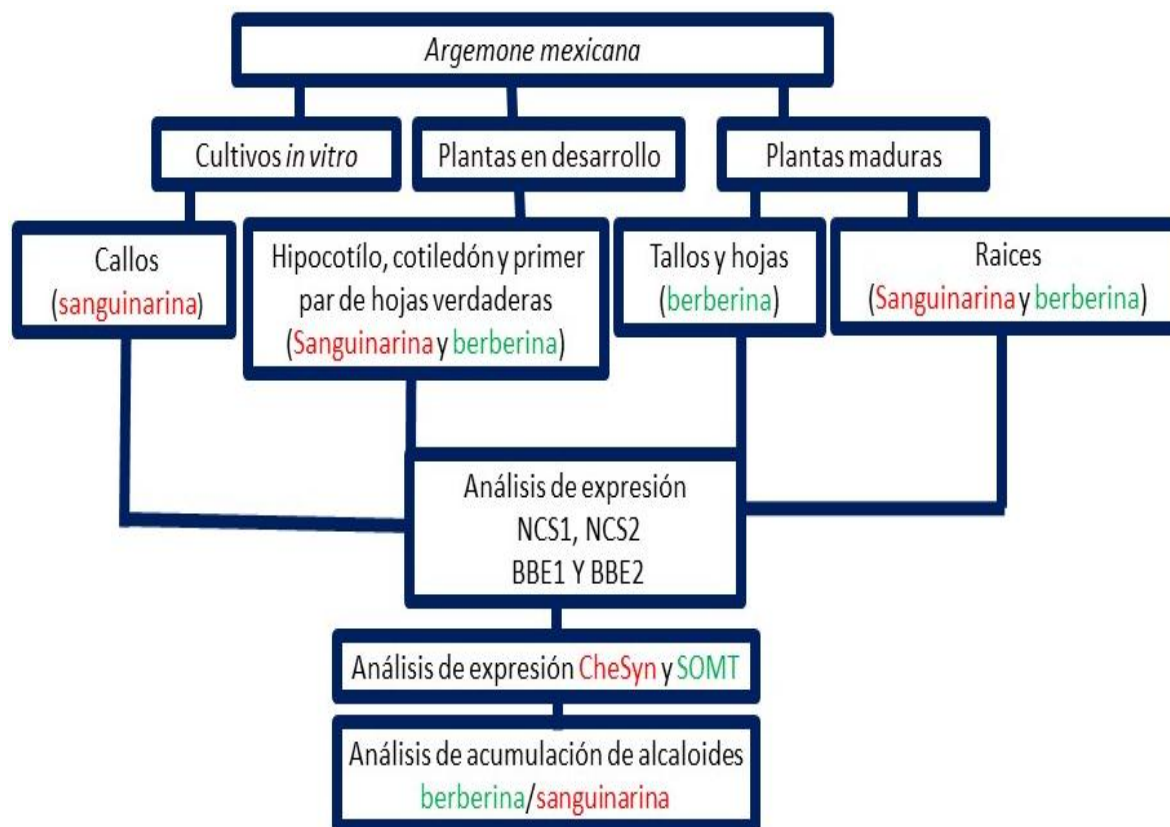


Figura 1.9 Estrategia experimental planteada para este trabajo.

CAPITULO II

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Material biológico

Los materiales biológicos para este estudio fueron plantas adultas, plántulas en diferentes etapas iniciales de desarrollo y cultivos *in vitro* en condiciones basales y de inducción de la síntesis de alcaloides.

Las plantas adultas se colectaron de poblaciones silvestres con flores y cápsulas (frutos) entre 40 y 60 cm de altura. Las plantas fueron extraídas del suelo con la raíz incluida y llevadas al laboratorio donde se lavaron con agua y jabón, se separaron los tejidos de hoja, tallos, raíces, cápsulas con semilla inmadura y pétalos de las flores (Fig. 2.1).

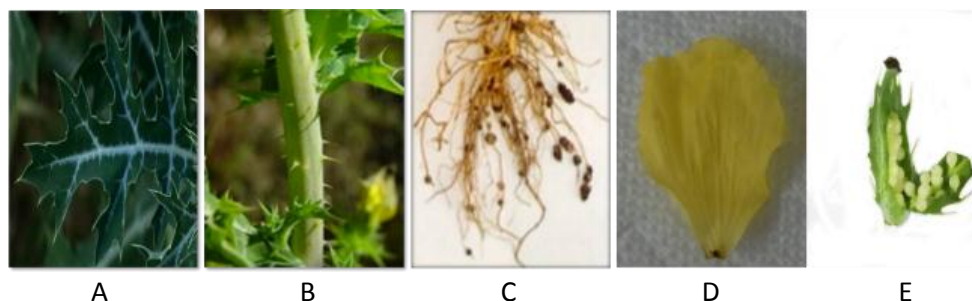


Figura 2. 1 Tejidos seleccionados en planta adulta. Se seleccionaron diferentes tejidos de planta adulta de *A. mexicana* tales como **A)** hoja, **B)** tallo, **C)** raíz, **D)** pétalo y **E)** semilla inmadura.

Las plántulas germinaron a partir de semillas de cápsulas maduras y dehiscentes colectadas a partir de poblaciones silvestres localizadas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. para la germinación de las semillas, éstas se escarificaron en ácido sulfúrico (H_2SO_4 10%) por 2 h en agitación continua. Después se enjuagaron con agua estéril y se desinfectaron en etanol al 70% por 2 min. Luego se enjuagaron con agua estéril y se incubaron en hipoclorito al 30% (blanqueador comercial Cloralex®) por 10 min. Posteriormente, se enjuagaron tres veces y se embebieron en ácido giberélico a una

concentración final de 100 mg/L por 72 h. Las semillas asépticas se colocaron en cajas magenta con 40 mL de medio MS-FR (sales a la mitad de la concentración normal, libre de reguladores de crecimiento y adicionado con 10 mg/L de tiamina y 25 mg/L de L-cisteína a pH de 5.8). Para la colecta se establecieron tres estadios de desarrollo: estadio I, correspondiente a hipocótilos con cotiledones cerrados; estadio II, plántulas con cotiledones abiertos y estadio III, plántulas con el primer par de hojas verdaderas ya formadas (Fig. 2.2). Una vez colectadas, las plántulas fueron disectadas en radículas y partes aéreas. Estas etapas de desarrollo se seleccionaron con base en los perfiles de acumulación de alcaloides observados (Xool-Tamayo *et al.*, 2014).



Figura 2. 2 Material vegetal en diferentes estadios de desarrollo de *A. mexicana*. El estadio I mide aprox. 0.5 cm y se colectaron 3.74 g, el estadio II mide aprox. 3 cm y se colectaron 4.75 g y el estadio III mide aprox. 4.5 cm y se colectaron 6.76 g.

En los cultivos *in vitro* se utilizaron callos previamente propagados (Chan-Canto *et al.*, 2014) y mantenidos en un medio basal Phillips y Collins (PC) (Phillips y Collins, 1979). El cultivo *in vitro* de callos se mantuvo en condiciones de luz continua con una intensidad de entre 40 y 50 $\mu\text{M}/\text{m}^2$ provista por lámparas fluorescentes de 39 W a 25 °C y con resiembras periódicas cada 14 días (Fig. 2.3). Todas las manipulaciones se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar. Se preparó el medio PC, de acuerdo a las concentraciones de macro/micronutrientes originales, suplementado con 25 g/L de

sacarosa, 0.5 mg/L de benciladenina (6-BAP) y 1.5 mg/L de ácido naftalenacético (ANA); el pH se ajustó a 5.8 y después de aforar al volumen deseado se adicionó gel rite (2 g/L) como agente gelificante, después se procedió a distribuir el medio a frascos de vidrio (30 mL/frasco) para su esterilización en el autoclave a 121 °C por 15 minutos. Los tejidos colectados se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a –80°C hasta su uso.



Figura 2. 3 Cultivo *in vitro* de callos de *A. mexicana* de la línea AM, empleados para los diferentes tratamientos de inducción.

2.1.2 Tratamientos de inducción de cultivos *in vitro* de *A. mexicana*.

Se analizaron cultivos de callos (línea Am), previamente sometidos a condiciones de inducción de acumulación de sanguinarina (Chan-Canto *et al.*, 2014). Los tratamientos aplicados fueron ácido salicílico (AS, 100 μ M), jasmonato de metilo (MeJa, 100 μ M) y extracto de levadura (EL, 0.2 g/L). La inducción se llevó a cabo mediante los esquemas de tratamiento individual (cada inductor aplicado de manera individual, en un periodo de 72 h. con colectas por triplicado cada 12 h.), simultáneo (los tres inductores aplicados al mismo tiempo, en un periodo de 72 h con colectas por triplicado cada 12 h.) y secuencial (aplicando AS, MeJa y EL, con espacios de 24 h entre cada uno), las muestras fueron colectadas por triplicado cada 24 h (Anexo 1).

2.1.3 Extracción de ARN total y síntesis del ADN complementario.

La extracción de ARN total de los diferentes tejidos se realizó de acuerdo a lo reportado por Rubio-Piña y Vázquez-Flota (2008). Para la extracción, se maceró 1 g de tejido con

nitrógeno líquido y 250 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) hasta obtener un polvo fino. El tejido se homogeneizó con 10 mL del amortiguador de extracción (Trizol), y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 × g por 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo al que se le agregó 1 mL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Las fases se separaron centrifugando a 13,000 × g durante 10 min a 4 °C, la fase acuosa se transfirió a un tubo estéril (este paso se realizó 2 veces). La fase acuosa se mezcló con 0.625 volúmenes de 8 M de LiCl₂ y se incubó durante 1 h a 4 °C, la mezcla se centrifugó a 13,000 × g durante 30 min a 4 °C, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante. La pastilla de ARN se lavó con etanol al 70%, centrifugando las muestras a 13,000 × g durante 10 min a 4 °C, finalmente la pastilla se resuspendió en 20 µL de amortiguador TE y se almacenó a -80 °C hasta su uso. La integridad y calidad del ARN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogene). La concentración y pureza del ARN fue confirmada por espectrofotometría A_{260}/A_{280} de 2.0 (una preparación pura de ARN deberá de tener una relación mínima de 2.0) en un Nanodrop-1000 (Thermo Scientific®).

Para la eliminación del ADN genómico de las muestras de ARN total, un µg de ARN total se incubó con 1µL de DNasa I y con amortiguador de DNasa 1X en volumen final de 10 µL según las instrucciones del fabricante (paquete RQ1 RNase-Free DNase I de Promega). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, la DNasa I se inactivó a 65 °C durante 10 min. La ausencia de contaminación de ADN se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa (1%) y PCR negativo, utilizando 50 ng de ARN tratado con DNasa I y cADN como molde de amplificación en un volumen final de 25 µL.

Para la síntesis de ADN complementario (cADN) se realizó la siguiente reacción: 1 µg de ARN total, 2 µL de DNasa (10X buffer), 2 µL de buffer 10X y 6 µL de agua DEPC, se incubó a 37 °C por 30 min, se inactivó la reacción a 65 °C durante 10 min. Posteriormente, se agregó 1µL de Oligo-dT (500 µg/mL), 1 µL de DNT (10 Mm), 5 µL de H₂O DEPC a 65 °C por 20 min, se dejó reposar 10 min. Por último, se agregó 1 µL de transcriptasa reversa (M-MLV), 4 µL de 5X First Strand Buffer, DTT 2 µL, a 37 °C por 60 min, en un volumen final de 30 µL. La reacción se inactivó a 70 °C por 15 min, las concentraciones de cADN

fueron verificadas mediante mediciones con el Nanodrop y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

2.1.4 Análisis de la expresión relativa por RT-PCR final de punto final y RT-qPCR en tiempo real.

El análisis de la expresión de los genes en estudio se llevó a cabo por RT-PCR de punto final, mientras que la abundancia relativa se estimó por PCR en tiempo real (RT-qPCR). La mezcla de reacción del RT-PCR contenía 50 ng de cADN, 0.5 pmol de cada oligonucleótido iniciador (cuadro 2.1), 1.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 1X buffer y 0.025 U de Taq polimerasa en un volumen final de 25 μL . Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 min y 35 ciclos en las siguientes condiciones: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 50 s (desnaturalización), la temperatura de alineamiento osciló entre 60 a $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 s (ver Cuadro 2.1) y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min (extensión). Al finalizar se efectuó una última extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.

Se analizó la expresión de los genes correspondientes a norcoclaurina sintasa 1 y 2 (*NCSAm1* y *NCSAm2*); enzima de puente de berberina 1 y 2 (*BBEAm1* y *NCSAm2*); escoulerina O-metiltransferasa (*SOMT*) y quelantifolina sintasa (*CheSyn*). Estos últimos fueron seleccionados como marcadores de actividad biosintética para berberina y sanguinarina, respectivamente (Rubio-Piña *et al.*, 2009). Se incluyó como gen constitutivo 18S (Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2015).

Cuadro 2. 1 Características de los iniciadores utilizados para la amplificación de los genes *NCS1*, *NCS2*, *BBE1*, *BBE2*, *SOMT*, *CheSyn* y *18S* (Rubio-Piña, 2009; Tamayo-Ordoñez, 2015).

<i>Gen</i>	<i>SENTIDO 5' - 3'</i>	<i>ANTISENTIDO 5' - 3'</i>	<i>Tm</i>	<i>Tamaño (pb)</i>
NCS1	TAGATGTGATTGAGGGCAATGGTG	GGAAGCAGAACATCCCTGAGAAT	67°C	457
NCS2	CTCCAGGTGCGGTGCCCGAAGA	CAGTAAACCTCCGAGAATAACCAAAC	67°C	379
BBE1	CATCTTTGTTTCATCATCATCTTCTTCT	ATCGGCTGCGAGACCGTATTT	66°C	562
BBE2	CTCATCTTTGTTTCATCTTCTTTCTGTGC	ATCGGCTGCGAGCCGTATTT	66°C	549
CheSyn	AGGTCTCAAGGTGTTGCC	TCTTTTCCCGCCGTAACAT	60°C	500
SOMT	ATCCTATCCATGTCTACGAGGGCTATT	CCAGTACCACCACCAACATCTAACA	63°C	400
18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	63°C	186

Para la cuantificación por qRT-PCR de los transcritos correspondientes a los genes en estudios se utilizó como molde 50 ng de cADN en un volumen final de 10 µL. La mezcla de reacción contenía: 1 µL de cada oligonucleótido iniciador (10mM), 5 µL master mix (2x). Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron un evento inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min y 35 ciclos en las siguientes condiciones: 94 °C durante 1 min (desnaturalización), 61 °C y 64 °C, respectivamente para *BBEAm1* y *BBEAm2* durante 1 min (alineamiento), 72 °C durante 1min (extensión). Al finalizar se efectuó una última extensión a 72 °C durante 10 min.

Para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en estos análisis se compararon las secuencias nucleotídicas de *A. mexicana* reportadas *BBEAm1*, (EU881889), *BBEAm2* (EU881890), así como *NCSAm1* (EU881891) y *NCSAm1* (EU881893) (Rubio-Piña et al., 2009). Los programas utilizados para el alineamiento y análisis de secuencias fueron BioEdit, Mega 4.1 y Dnasp5. El diseño de oligonucleótidos se realizó utilizando los programas DNAMAN y OligoAnalyzer. Las características que se consideraron para el diseño de oligonucleótidos fueron la temperatura de alineamiento, contenido de guaninas y citosinas, la complementariedad, la especificidad, el tamaño de oligonucleótidos y el tamaño de fragmento amplificado. Las secuencias de nucleótidos se compararon entre sí utilizando la plataforma de BioEdit, con la finalidad de encontrar

regiones específicas (Fig. 3.1 y 3.2). Las posiciones correspondientes a cada iniciador se indican en el cuadro 2.2.

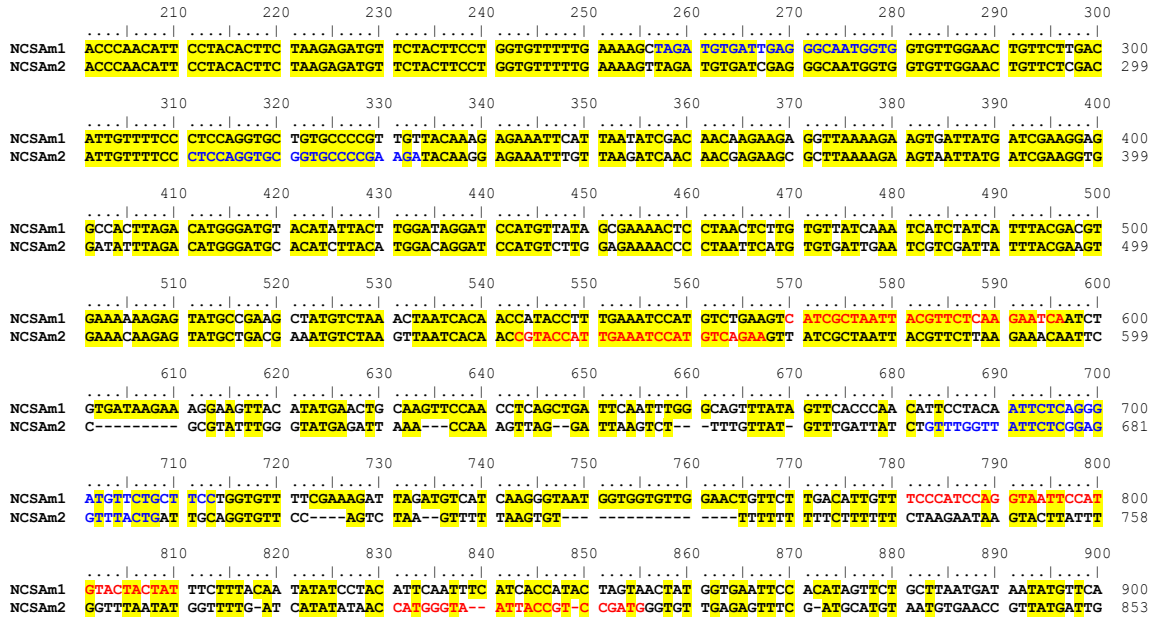


Figura 2. 4 Alineamiento de los nucleótidos de *NCSAm1* y *NCSAm2*, con un porcentaje de identidad entre ellos del 76.48%. Se señala de color rojo los oligonucleótidos diseñados para qPCR-RT (PCR tiempo real) y en azul los empleados para RT-PCR (PCR punto final), se ilustra de amarillo la similitud de las secuencias.

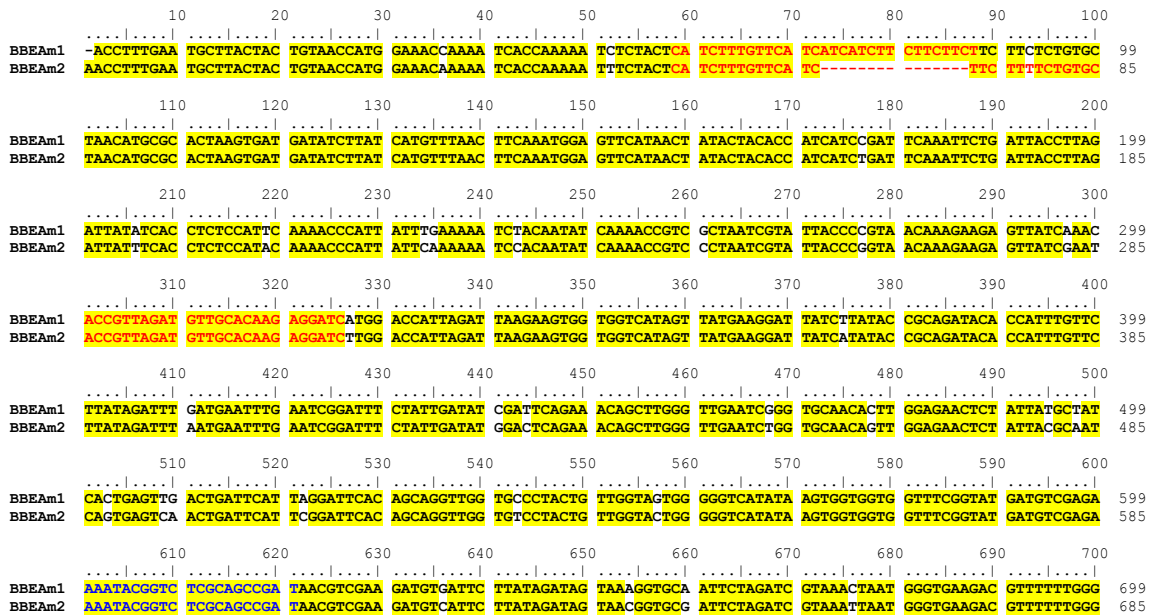


Figura 2. 5 Alineamiento de los nucleótidos de *BBEAm1* y *BBEAm2*, con un porcentaje de identidad entre ellos de 93.17%. Se señala de color rojo los oligonucleótidos diseñados para qPCR-RT (PCR tiempo real) y en azul los empleados para RT-PCR (PCR punto final), cabe mencionar que los iniciadores forward son comunes para tiempo real y punto final. Se ilustra de amarillo la similitud de las secuencias.

Cuadro 2. 2 Características de los iniciadores de qPCR diseñados para los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *SOMT* y *CheSyn* a partir de secuencias reportadas en el GENE BANK de *A. mexicana*.

Gen	SENTIDO 5' - 3'	ANTISENTIDO 5' -3'	Tm	Tamaño (pb)
NCS1	CATCGCTAATTACGTTCTCAAGAATCA	ATAGTAGTACATGGAATTACCTGGATGGGA	61°C	241
NCS2	CGTACCATTGAAATCCATGTCAGAA	CATCGGACGGTAATTACCCATG	61°C	273
BBE1	CATCTTTGTTTCATCATCTTCTTCTTCTTCTT	GATCCTCTTGTGCAACATCTAACGGT	64°C	268
BBE2	CTCATCTTTGTTTCATCTTCTTTTCTGTGC	GATCCTCTTGTGCAACATCTAACGGT	64°C	255
CheSyn	CGTCCACATATTGTTTCGAATCCTC	ATGTTACGGCGGGAAAAGA	61°C	180
SOMT	CAGGATTTGGACCAGAAGCAC	ACGATACTCCATCCTCCTCGC	61°C	219
18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	63°C	186

La cuantificación relativa por RT-qPCR se realizó de acuerdo al valor Ct (ciclo en el cual inicia la amplificación del gen), el cual se encuentra relacionado con la concentración inicial de cADN que nos indica los niveles de expresión por cada muestra.

Para esto, primero se calculó la ΔCt , parámetro que consiste en calcular el cambio del ciclo umbral de un gen de interés respecto al ciclo umbral de un gen de referencia, es decir, que la $\Delta Ct = Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{normalizador}}$. La ΔCt de la muestra que presente el valor más alto se le denomina ΔCt de la línea base. Este valor se restará al valor de ΔCt de las otras muestras y se la denominará $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{línea base}} - \Delta Ct_{\text{muestra}}$). El último paso en la comparación del nivel de expresión es calcular las unidades relativas con la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.1.5 Clonación de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *CheSyn* y *SOMT*

Para confirmar la identidad de las secuencias amplificadas, los amplicones correspondientes a *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *CheSyn* y *SOMT* fueron clonados en el vector pGEM-T (Promega, USA). Una vez ligados, se introdujeron en células *E. coli* INV α DH10b. La transformación se realizó por choque térmico y las clonas fueron seleccionadas por resistencia a ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$). La verificación de que los productos se insertaron correctamente se realizó mediante su digestión con la enzima *EcoRI* y amplificación del inserto usando oligonucleótidos M13 (–20/–40), que se posicionan en los extremos del sitio múltiple del vector de clonación pGEM-T. Como máximo 10 de las clonas recuperadas fueron secuenciadas utilizando los cebadores universales M13 y el método NGS del secuenciador ABI 3730 XL en MacroGen Corea. El ADN plasmídico se aisló por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979) que se basa en el intervalo de pH estrecho que existe de 12.0 a 12.5, dentro del cual hay fragmentación y desnaturalización del ADN cromosomal que no se encuentra superenrollado, generándose una masa de ADN lineal y proteínas, la cual puede ser separada por centrifugación.

2.1.6 Extracción y cuantificación de alcaloides (sanguinarina y berberina)

Los alcaloides se extrajeron de acuerdo al protocolo de Monforte-González y colaboradores (2012). En matraces de 125 mL se colocaron, entre 0.1 y 0.2 g del tejido

vegetal seco y se les adicionó 10 mL HCl al 0.5% en metanol. La mezcla se incubó a 42 °C durante 2 horas en agitación constante. Después de este periodo, 1.8 mL del extracto se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 mL, para ser centrifugados a 11,500 g durante 10 min, con el fin de eliminar los residuos y 0.5 mL del extracto y se transfirieron a un tubo de 1.5 mL para secarse a presión reducida en un rotaevaporador (Heto). Al término del secado, el residuo se disolvió con 50 µL de metanol grado HPLC, se agitó en un vortex y se centrifugaron a 11,500 g durante 5 min. Este extracto se aplicó en una placa cromatográfica para su separación.

La separación de los alcaloides se realizó mediante cromatografía de capa fina utilizando placas de silica (cromatofolios de gel de sílice 60 F254, Merck). Las placas se cortaron en rectángulos de 10 x 6 cm y se marcaron con lápiz los puntos de partida y del frente de término, respetando un espacio de 1 cm en ambos casos. Las muestras se cargaron en volúmenes de 1 µL, dejando un espacio de 0.7 cm de separación entre ellas, utilizando micropipetas (Rainin), especialmente calibradas para la aplicación de volúmenes pequeños. Para la identificación de los alcaloides en los extractos también se aplicaron estándares de berberina y sanguinarina (Sigma-Aldrich Chemical Co). Los alcaloides presentes en los extractos se separaron utilizando los diferentes sistemas reportados (Monforte-González *et al.*, 2012). Se seleccionaron dos diferentes sistemas de disolventes, ambos con excelente resolución para los compuestos de interés, el primero de ellos (sistema 1), resuelve a berberina y contenía n-butanol: agua: hidróxido de amonio (8: 1: 1), mientras que el sistema 2, que resuelve a sanguinarina contenía benceno: etanol (9: 1) (Monforte-González *et al.*, 2012). Para la separación cromatográfica, una vez que las aplicaciones se secaron, las placas se depositaron en cámaras para cromatografía, previamente saturadas con la mezcla de disolventes seleccionada, durante el tiempo necesario para que el frente del sistema de disolventes alcance el frente de corrida indicado. Una vez terminado el desarrollo de la cromatografía, las placas se secaron al aire y posteriormente los alcaloides se visualizaron por sus características de fluorescencia bajo luz ultravioleta a 365 nm. La cuantificación se realizó utilizando el estadígrafo SigmaPlot.

CAPÍTULO III

3.1. RESULTADOS

Con el fin de establecer si las diferentes isoformas estudiadas participan de manera preferencial en diferentes tejidos o en la síntesis de los diferentes tipos de alcaloides de *A. mexicana*, se analizaron los tejidos de plantas adultas, de plántulas en desarrollo y cultivos *in vitro* expuestos a condiciones en las que se activan la síntesis de alcaloides. Estos análisis incluyeron la acumulación de alcaloides y de los transcritos correspondientes a las isoformas de interés.

3.1.1 Distribución de alcaloides

Los contenidos de berberina (protoberberina) y sanguinarina (benzofenantridina), en los tejidos hoja, tallo, raíz, pétalo y semillas inmaduras de plantas adultas de *A. mexicana* colectadas en campo mostraron una distribución diferencial, ya que se observó que mientras que la berberina se encuentra en todos los tejidos de la parte aérea, la sanguinarina se acumuló principalmente en la parte radical (Fig. 3.1). Estos datos son similares a los reportados por Rubio-Piña, 2009 (Fig. 1.7).

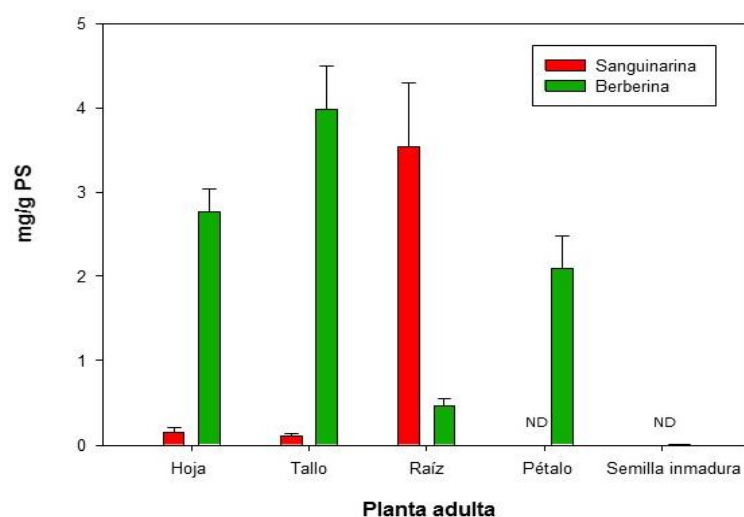
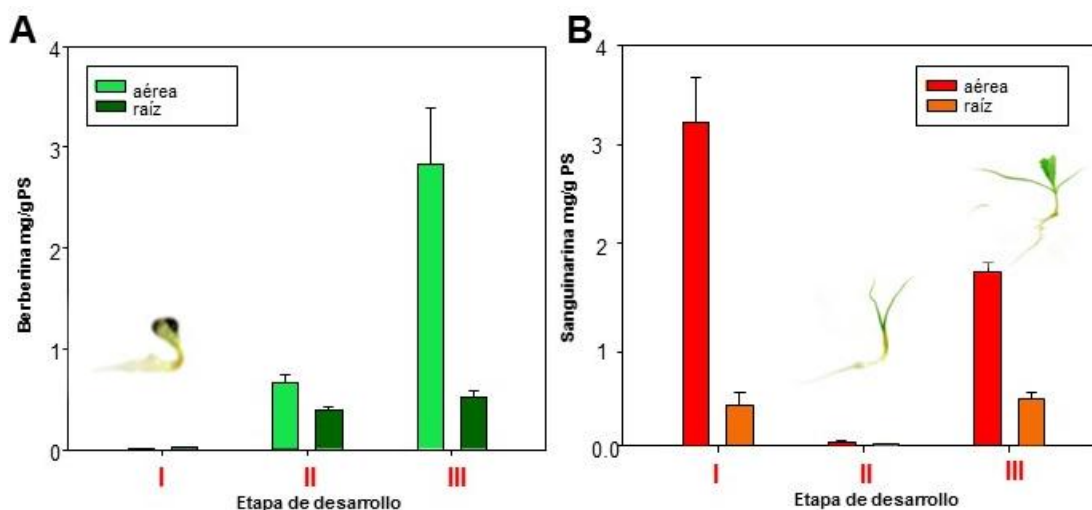


Figura 3.1 Cuantificación de berberina (barra verde) y sanguinarina (barra roja), en los diferentes tejidos de planta adulta de *A. mexicana*, en donde ND= no detectado utilizando como rango mínimo 0.005 mg/g PS. Promedio de 3 repeticiones con su respectiva desviación estándar.

La acumulación de berberina y sanguinarina se analizó de igual manera en plántulas de *A. mexicana* en tres estadios de desarrollo iniciales; en etapa de plántulas hipocotilares (antes del despliegue de los cotiledones, estadio I); de plántulas cotiledonares (con los cotiledones desplegados, estadio II) y de plántula con el primer par de hojas verdaderas (estadio III) (Fig. 3.2). Las plántulas se seccionaron en las partes cotiledonares o aéreas e hipocotilodenares o radículas. En estas etapas, la berberina se detectó principalmente en cotiledones de plántulas de estadios II y III, mientras que en las radículas se detectó menores cantidades, la sanguinarina, por su parte se detectó en menores cantidades, desde el inicio de la germinación, antes de la emergencia de los cotiledones (estadio I) (Figs. 3.2-A y B respectivamente). Es interesante notar que una vez que se desplegaron los cotiledones, solamente se observaron trazas de este alcaloide, tanto en la parte aérea como en las radículas (Fig. 3.2-B). No obstante, cuando se formaron las hojas verdaderas (estadio III), la sanguinarina se pudo detectar de nuevo predominando en los tejidos aéreos (Fig. 3.2-A). Estos datos coinciden con los de Rubio-Piña, (2009) (Fig. 1.8); así mismo, muestran una distribución diferenciada de berberina y sanguinarina reportando acumulación de sanguinarina en el estadio I y a partir de los estadios II y III, acumulación de sanguinarina y berberina.



3.1.2 Análisis de la redundancia genética en la ruta de síntesis de ABI en *A. mexicana*

Con el fin de establecer si la distribución diferencial de alcaloides en los distintos tejidos se relaciona con la participación preferencial de alguno de los miembros de las familias génicas identificadas para la *NCS* y *BBE*, se analizó la presencia de los transcritos correspondientes a *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1* y *BBEAm2* en tejidos de plantas adultas colectadas en el campo y de plántulas en desarrollo. Como indicadores de que las rutas de biosíntesis para la berberina y la sanguinarina se encontraban activas en los tejidos analizados, se incluyeron los genes *SOMT* y *CheSyn*, respectivamente (Fig.3.3). Estos genes se seleccionaron debido a que ambos participan en las reacciones biosintéticas tardías de cada alcaloide. Los análisis de los transcritos se llevaron a cabo tanto por RT-PCR de punto final utilizando como control de carga y gen de referencia el ADN ribosomal, así como por tiempo real, con fines cuantitativos (Δ Ct-qPCR). Para ello, se empleó como gen normalizador al ADNr 18S y como calibradores los distintos tejidos con la menor expresión.

3.1.2.1 Análisis de la redundancia genética mediante RT-PCR en la ruta de síntesis de ABI en tejidos de plantas adultas en *A. mexicana*.

La presencia de los transcritos correspondientes a *NCSAm1* detectada como producto de amplificación de 457 pb en el PCR de punto final, fue observada en hoja, raíz, pétalo y semilla inmadura, pero no en tallos, mientras que los correspondientes a *NCSAm2* observado como producto de amplificación de 379 pb, se detectaron en todos los tejidos analizados (Fig. 3.3). La tendencia observada para las copias *BBEAm1* y *BBEAm2*; productos de amplificación de 562 y 549 pb, respectivamente en el PCR de punto final, fue similar para ambos casos, al observarse los transcritos en hojas, tallos, raíces, pétalos y semillas inmaduras (Fig. 3.3).

Como ya se señaló, *NCS* y *BBE* participan en las reacciones comunes para la biosíntesis de todos los ABIs en *A. mexicana*. Con el fin de analizar si los alcaloides detectados en los diferentes tejidos son formados en éstos mismos o transportados de sitios distantes, se analizó la acumulación de los transcritos correspondientes a *SOMT* y *CheSyn*, indicadores de la síntesis de berberina y sanguinarina, respectivamente. De

manera interesante, los transcritos correspondientes a *SOMT* y *CheSyn* se detectaron en todos los tejidos analizados (Fig. 3.3). Los productos de PCR en ambos casos, fueron de los tamaños esperados de 400 y 500 pb para *SOMT* y *CheSyn*, respectivamente (Fig. 3.3); no obstante, aunque los productos de PCR para *SOMT* fueron bandas bien definidas (Fig. 3.3), para el gen *CheSyn* se observaron bandas difusas (Fig. 3.3).

La presencia de los transcritos, tanto de las diferentes *NCS*'s y *BBE*'s, así como de *SOMT* y *CheSyn*, en todos los tejidos analizados, sugiere que la ruta de síntesis completa para ambos alcaloides se encuentra activa en los tejidos de las plantas maduras.

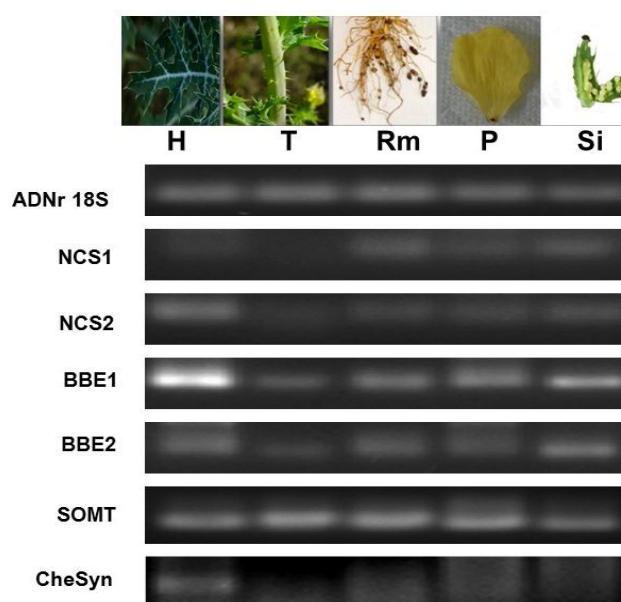


Figura 3.3 Análisis de los transcritos de *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1* y *BBEAm2*, *SOMT*, *CheSyn* y *18S* en tejidos de planta adulta mediante RT-PCR punto final. Los tejidos analizados fueron hoja (H), tallo (T), raíz (Rm), pétalo (P) y semilla inmadura (Si) de planta adulta de *A. mexicana*, las electroforesis se corrieron en gel de agarosa 1%.

3.1.2.2 Análisis de la expresión relativa de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1* y *BBEAm2* en tejidos de planta adulta de *A. mexicana* por Δ Ct-qPCR tiempo real

Si bien los resultados previos mostraron que la expresión de los genes de interés ocurrió en todos los tejidos, se observaron diferencias en las intensidades de las bandas correspondientes a los productos de PCR de los diferentes tejidos analizados (Fig. 3.3).

Para estimar la magnitud de estas variaciones se llevó a cabo un análisis cuantitativo y con mayor precisión, mediante qPCR (ΔCt -qPCR), en los mismos tejidos de planta adulta. Para realizar estos análisis se necesita un gen normalizador (un gen normalizador es aquel que se expresa constitutivamente en todos los tipos de muestra del experimento), en este caso se empleó al ADNr *18S*, también se necesita un calibrador que es una muestra de estudio en las condiciones experimentales contra las cuales deseamos comparar las diferencias de expresión, en este caso se empleó el ARN de semilla inmadura ya que mostró la menor acumulación de alcaloides con respecto a los demás tejidos de planta adulta.

En las hojas, se acumula berberina (Fig. 3.1), y se observó la expresión de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm1*, es de casi el doble de la isoforma, *NCSAm2* (Fig. 3.4). En contraste con esto, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de las isoformas de la *BBE* (Fig. 3.4). Este tejido también mostró una alta expresión de *SOMT*, pero no de *CheSyn*, coincidiendo con el patrón de alcaloides que acumula (Figs. 3.4 y 3.1).

En tallo, se acumula berberina (Fig. 3.1), se observa que la expresión de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm2*, es mayor a la de la isoforma, *NCSAm1* (Fig. 3.4). De manera similar, se observa que la expresión de una de las isoformas de la *BBE*, la *BBEAm2*, es mayor a la de la isoforma *BBEAm1* (Fig. 3.4). Este tejido también mostró una mayor expresión de *CheSyn* comparada con *SOMT*, lo que indica que probablemente la sanguinarina se sintetiza en tallo pero es transportada a otro tejido, por ejemplo, la raíz.

En raíz, se acumula sanguinarina (Fig. 3.1), se observa que la expresión de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm2*, es mayor a la de la isoforma *NCSAm1* (Fig. 3.4). De manera similar, se observa que la expresión de una de las isoformas de la *BBE*, la *BBEAm2*, es mayor a la de la isoforma *BBEAm1* (Fig. 3.4). Este tejido también mostró una alta expresión de *CheSyn*, pero no de *SOMT*, coincidiendo con el patrón de alcaloides que acumula (Fig. 3.4 y 3.1).

En pétalo, donde se acumula berberina (Fig. 3.1), se observa que en la expresión de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm2*, es mayor a la de la isoforma *NCSAm1* (Fig. 3.4). En contraste con esto no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de las

isoformas de la *BBE* (Fig. 3.4). Este tejido también mostró una mayor expresión de *SOMT*, pero no de *CheSyn*, coincidiendo con el patrón de alcaloides que acumula (Figs. 3.4 y 3.1).

De manera general, el gen indicador de biosíntesis de berberina (*SOMT*) se expresa todos los tejidos analizados tanto en RT-PCR (Fig. 3.3) como en qPCR (Fig. 3.4), sugiriendo que hay biosíntesis y acumulación de este metabolito, lo cual se corrobora en la cuantificación, al detectarse cantidades de berberina en todos los tejidos (Fig. 3.1). Por otra parte, el gen indicador de biosíntesis de sanguinarina (*CheSyn*) duplicó su expresión relativa en tallo en comparación con el gen *SOMT*, sin embargo, la cuantificación de este metabolito mostró que no hay acumulación coincidiendo con los análisis de expresión por RT-PCR (Fig. 3.3).

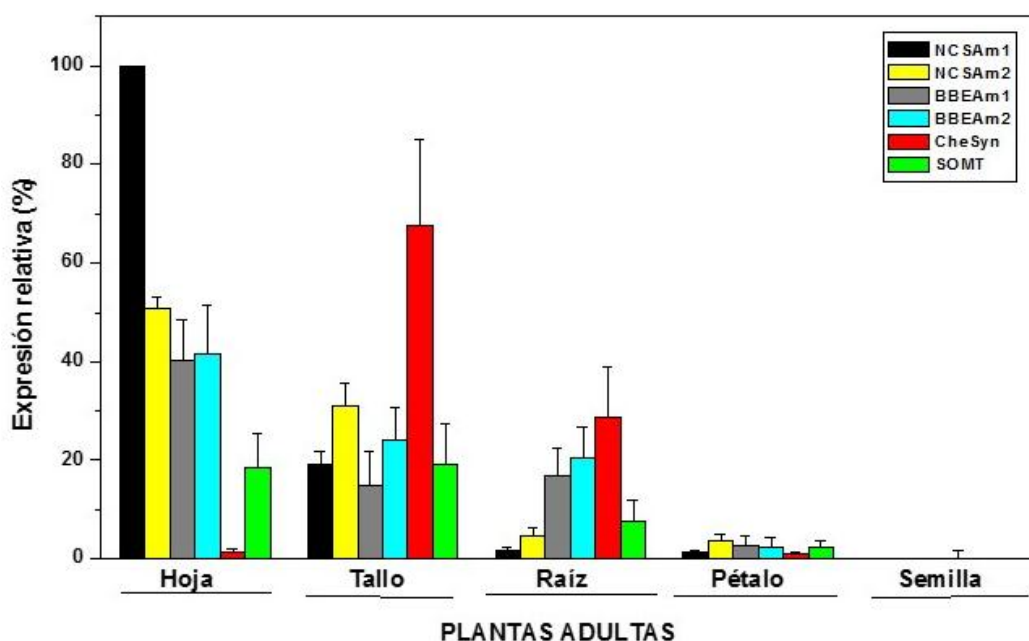


Figura 3.4 Expresión relativa de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *CheSyn* y *SOMT*, en diferentes tejidos de planta adulta de *A. mexicana*. En la determinación de expresión relativa se empleó como gen de referencia 18S y como calibrador semilla inmadura. Las barras de error representan el error estándar (n = 3).

3.1.2.3 Análisis de la distribución de los transcritos correspondientes a *NCSAm1*, *BBEAm2*, *BBEAm1* y *BBEAm2* de *A. mexicana* en los tejidos de plántulas en desarrollo

Los transcritos del gen *NCSAm1*, detectados como un producto de 457 pb, se observaron en la parte aérea y radical de los tres estadios de desarrollo seleccionados (Fig. 3.5); en el caso de los transcritos de *NCSAm2*, detectados como un producto de 379 pb, se observaron en los tres estadios de desarrollo de la parte aérea y radical; sin embargo, bandas con mayor intensidad se observaron en la parte radical de la etapa I y en la aérea del estado II (Fig. 3.5), coincidiendo con los tejidos en los cuales hubo detección de sanguinarina (Fig. 3.2-B). La menor expresión de *NCSAm2* fue en la parte aérea de la etapa I (Fig. 3.5); sin embargo, en este tejido es donde hay mayor acumulación de sanguinarina (Fig. 3.2-B), probablemente, debido a que contiene parte de la testa que era parte de la semilla. Los genes, *BBEAm1* y *BBEAm2*, detectados como productos de 562 y 549 pb, respectivamente, y los genes *SOMT* y *CheSyn*, detectados como productos de 400 pb y 500 pb, respectivamente, demostraron una expresión constante en los diferentes estadios de desarrollo (Fig. 3.5), lo que sugiere que está activa toda la ruta de biosíntesis de berberina y de sanguinarina en plántulas en etapas de desarrollo, lo cual coincide con la detección de ambos alcaloides en los tres estados de desarrollo (Fig. 3.2).

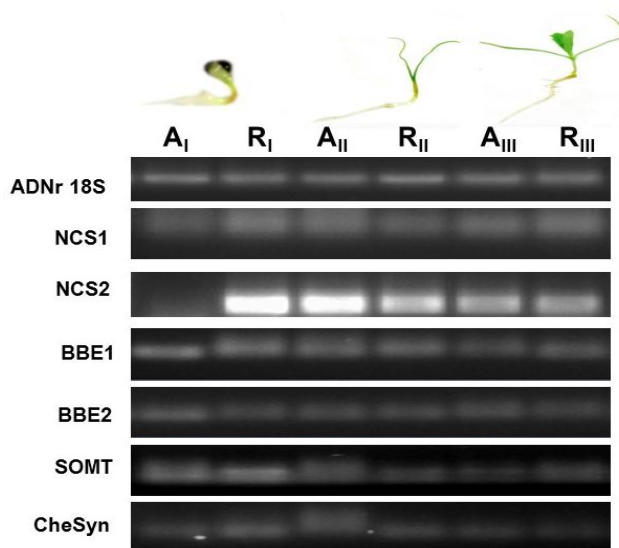


Figura 3.5 Análisis de los transcritos *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *SOMT*, *CheSyn* y *18S* en tejidos de plantas en desarrollo de *A mexicana*. El análisis de los transcritos fue mediante RT-PCR punto final y se evaluaron en plantas en estado de desarrollo I: hipocótilo, II: cotiledón y III: primer par de hojas verdaderas de partes aérea (A) radical (R). Las electroforesis en gel de agarosa 1%.

3.1.2.4 Análisis de la expresión relativa de *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1* y *BBEAm2* en tejidos de plántulas en desarrollo de *A. mexicana* por Δ Ct-qPCR tiempo real

En plántulas en desarrollo disectadas en parte aérea y radical, los resultados previos mostraron que la expresión de los genes de interés ocurrió en todos los tejidos, se observaron diferencias en las intensidades de las bandas correspondientes a los productos de PCR de los diferentes tejidos analizados (Fig. 3.5). Así mismo, se observaron patrones de acumulación de berberina y sanguinarina diferenciados y que en el caso de sanguinarina en el estadio I, al parecer, son moderados por la expresión del gen *NCSAm2*.

Debido a que estos análisis de expresión son meramente cualitativos, para estimar la magnitud de estas variaciones se llevó a cabo un análisis cuantitativo y con mayor precisión, mediante qPCR (Δ Ct-qPCR) en las partes aéreas y radicales de los estadios de desarrollo, utilizando como normalizador al ADNr *18S* y como calibrador el ARN del estadio I, en el caso del gen indicador de berberina (*SOMT*), en aérea estadio I, y el gen indicador de sanguinarina (*CheSyn*), en radical del estadio II.

En el estadio I, en donde se acumuló sanguinarina, en parte aérea, se observa que la expresión de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm2*, es mayor a la de la isoforma *NCSAm1* (Fig. 3.6). En contraste con esto, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de las isoformas de la *BBE* (Fig. 3.6). Este tejido también mostró una alta expresión de *CheSyn*, pero no de *SOMT*, coincidiendo con el patrón de alcaloides que acumula (Figs. 3.6 y 3.1).

En parte radical, se observa que la expresión de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm2*, es casi del doble de la isoforma *NCSAm1* (Fig. 3.6). En el caso de la expresión de las isoformas de la *BBE*, la *BBEAm1*, es mayor (con poca diferencia) que la de la isoforma *BBEAm2* (Fig. 3.6). Este tejido también mostró una alta expresión de *CheSyn*, pero no de *SOMT*, coincidiendo con el patrón de alcaloides que acumula (Figs. 3.6 y 3.1).

En el estadio II, en donde se acumuló berberina, en la parte aérea, se observa que la expresión de una de las isoformas de la *NCS*; la *NCSAm2* es mayor a la de la isoforma

NCSAm1 (Fig. 3.6). En contraste con esto, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de las isoformas de la *BBE* (Fig. 3.6). Este tejido también mostró una baja expresión de *SOMT* y *CheSyn* (Fig. 3.6).

En parte radical, se observa que en la expresión de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm2* es casi del doble de la isoforma *NCSAm1* (Fig. 3.6). En el caso de la expresión de las isoformas de la *BBE*, la *BBEAm1* es mayor (con poca diferencia) que la de la isoforma *BBEAm2* (Fig. 3.6). Este tejido también mostró una alta expresión de *SOMT*, pero no de *CheSyn*, coincidiendo con el patrón de alcaloides que acumula (Figs. 3.6 y 3.1).

En el estadio III, donde se acumuló tanto sanguinarina como berberina en cantidades similares, en parte aérea, se observa que la expresión de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm2*, es casi del doble de la isoforma *NCSAm1* (Fig. 3.6). En el caso de la expresión de las isoformas de la *BBE*, la *BBEAm1*, es mayor (con poca diferencia) que la de la isoforma *BBEAm2* (Fig. 3.6). Este tejido también mostró una alta expresión de *SOMT* y *CheSyn*, coincidiendo con el patrón de alcaloides que acumula (Figs. 3.6 y 3.1).

En parte radical, se observa que en la expresión de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm2*, es casi del doble de la isoforma *NCSAm1* (Fig. 3.6). Algo similar ocurre en el caso de las isoformas de la *BBE*, la *BBEAm2*, se expresa en niveles casi del doble de la isoforma *BBEAm1* (Fig. 3.6). Este tejido también mostró una expresión de *SOMT* y *CheSyn*, que coincide con el patrón de alcaloides que acumula (Figs. 3.6 y 3.1).

De manera general, tanto en RT-PCR como en qPCR el gen que se expresó mayormente fue *NCSAm2* en todos los tejidos analizados (Figs. 3.5 y 3.6). La expresión de los genes indicadores de la acumulación de sanguinarina y berberina coinciden con la acumulación de ambos metabolitos, por ejemplo, en la parte aérea del estadio I donde se acumula sanguinarina, la expresión del gen *CheSyn* fue de 82%; otro ejemplo es el incremento excesivo del gen *SOMT* (91%) en la parte radical estadio II donde se acumula berberina (Fig. 3.6).

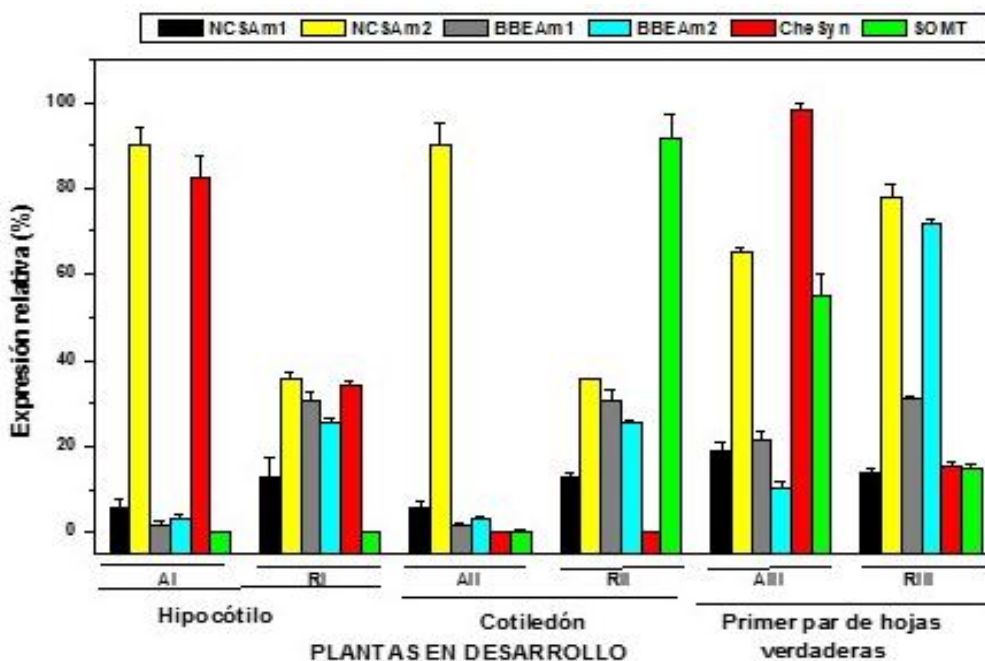


Figura 3.6 Expresión relativa de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *CheSyn* y *SOMT*, en plántulas en diferentes estados de desarrollo (hipocótilo I, cotiledón II y primer par de hojas verdaderas III) de *A. mexicana* de la parte aérea (A, AI, AII, AIII) y radical (R, RI, RII, RIII). En la determinación de expresión relativa se empleó como gen de referencia 18S y como calibrador como el ARN del estadio I, en el caso del gen (*SOMT*) aérea estadio I y el gen (*CheSyn*), radical estadio II. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

3.1.2.5 Análisis de la expresión mediante RT-PCR de *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *SOMT* y *CheSyn* en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* en condiciones basales y de inducción

Para la determinación de la expresión de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *SOMT* y *CheSyn* en callos cultivados *in vitro*, se indujo la síntesis de los alcaloides sanguinarina y berberina utilizando como inductores: el extracto de levadura (0.2 g/L), ácido salicílico (100 μ M) y jasmonato de metilo (100 μ M), en tres tipos de ensayos diferentes que fueron: inducción individual, simultánea y secuencial, tal como se menciona en el ANEXO 1.

En estos resultados se seleccionaron dos inducciones, la primera fue extracto de levadura, debido a la respuesta positiva, a la acumulación de sanguinarina y la segunda inducción fue con jasmonato de metilo, la cual no respondió. El comportamiento de la expresión de los genes con respecto a las inducciones con ácido salicílico, inducción simultánea y secuencial se puede observar en las imágenes suplementarias (Figs. S4-S9).

Tanto en este experimento como en antecedentes se ha descrito que la inducción con extracto de levadura propicia una mayor acumulación del alcaloide sanguinarina (Anexo 1, Fig. 1, Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010). En esta inducción el comportamiento de los genes fue el siguiente: la presencia de los transcritos correspondientes para *NCSAm1* detectada como un producto de 457 pb en el PCR de punto final se observó en el control y el tiempo inicial, ya que a partir de las 12 h no hubo expresión del gen (Fig. 3.7), por lo cual, se infiere que *NCSAm1* no es indispensable para la síntesis de este alcaloide debido a que cuando aumentó la síntesis de este metabolito no hay expresión de este gen. La presencia de los transcritos correspondientes para *NCSAm2* detectada como producto de 379 pb en el PCR de punto final se observó durante todo el curso temporal en donde la banda se intensifica en TI, 12 y 36 h (Fig. 3.7). La presencia de los transcritos correspondientes para *BBEAm1* y *BBEAm2* detectados como productos de 562 y 549 pb, respectivamente, en el PCR de punto final, mostraron una expresión constante durante todo el curso temporal. La presencia de los transcritos correspondientes para *SOMT* y *CheSyn* detectados como productos de 400 y 500 pb, respectivamente, en el PCR de punto final, mostraron una expresión constante durante el curso temporal de inducción con extracto de levadura (Fig. 3.7).

En cuanto al comportamiento del inductor con jasmonato de metilo tanto en este trabajo (Anexo1 Fig. 1), como en el de Trujillo-Villanueva (2010), no se observa aumento de sanguinarina, más bien se comporta parecido al control que son callos en condiciones basales. En este tratamiento el comportamiento de los genes fue el siguiente: la presencia de los transcritos correspondientes para *NCSAm1* se aprecia de manera constante, excepto a las 12 h, en donde disminuye la intensidad de la banda (Fig. 3.7). Con respecto a los transcritos correspondientes a *NCSAm2*, se observaron bandas más tenues que las

del gen alterno *NCSAm1*, sin embargo, fueron constantes durante todo el curso temporal (Fig. 3.7). La presencia de los transcritos correspondientes para *BBEAm1* y *BBEAm2* fue constante durante todo el curso temporal, sin embargo, se observaron bandas con mayor intensidad para *BBEAm1* (Fig. 3.7). Los transcritos correspondientes a *SOMT* y *CheSyn* se observan de manera constante durante todo el curso temporal (Fig. 3.7).

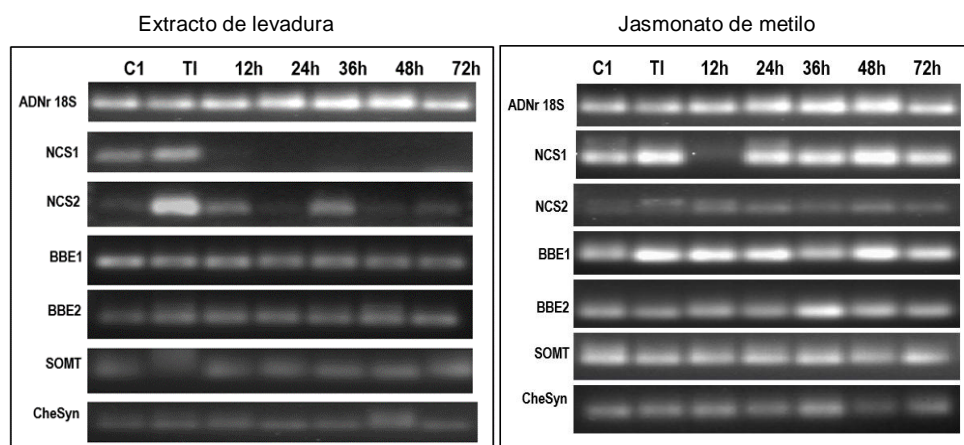


Figura 3.7 Análisis de los transcritos en inducciones individuales de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BEEAm1*, *BBEAm2*, *SOMT* y *CheSyn* de *A. mexicana* en condiciones de inducción con extracto de levadura (0.2g/L) y jasmonato de metilo (10 μ M). El comportamiento de estos fue evaluado en un curso temporal de TI, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de inducción. Se utilizó ADNr 18S como gen control.

3.1.2.6 Análisis de la expresión relativa de *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1* y *BBEAm2* en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* en condiciones de inducción

Los resultados previos mostraron que la expresión de los genes ocurrió de manera diferenciada en el caso de extracto de levadura con el gen *NCSAm2*, indicando que al parecer este gen es el responsable en esta inducción de la biosíntesis de sanguinarina; en el caso de la inducción con jasmonato de metilo se observaron diferencias en las intensidades de las bandas correspondientes a los productos de PCR de las isoformas así como de los indicadores. Para estimar la magnitud de estas variaciones se llevó a cabo un análisis cuantitativo y con mayor precisión, mediante qPCR (Δ Ct-qPCR) en condiciones de inducción con extracto de levadura (0.2 g/L) y jasmonato de metilo (10

μM). En la determinación de la expresión relativa se empleó como gen de referencia ADNr 18S y como calibrador el tiempo inicial (Ti) (Fig. 3.8).

En callos inducidos con extracto de levadura, en los que se acumula sanguinarina (Anexo 1, Fig. 1), se observa durante todo el curso temporal, que de una de las isoformas de la NCS, la *NCSAm1* se expresa en niveles inferiores de la isoforma *NCSAm2* (Fig. 3.8). Lo mismo ocurre con una de las isoformas de la BBE, la *BBEAm2*, la cual se expresa en niveles inferiores de la isoforma *BBEAm1* durante todo el curso temporal (Fig. 3.8). Este tejido también mostró una alta expresión de *CheSyn* a las 12 y 36 h, coincidiendo con el patrón de alcaloides que acumula, así mismo se observa una alta expresión de *SOMT* a las 24, 48 y 72 h, sin embargo, no se detectó acumulación de berberina, por lo que se infiere que algo está ocurriendo con las reacciones de biosíntesis posteriores a la participación de este gen (Fig. 3.8).

De manera general tanto en RT-PCR como en qPCR se observó una mayor expresión de los genes *NCSAm2* y *BBEAm2* en callos en condiciones de inducción con extracto de levadura que mostraron un incremento en la síntesis de sanguinarina (Figs. 3.7 y 3.8).

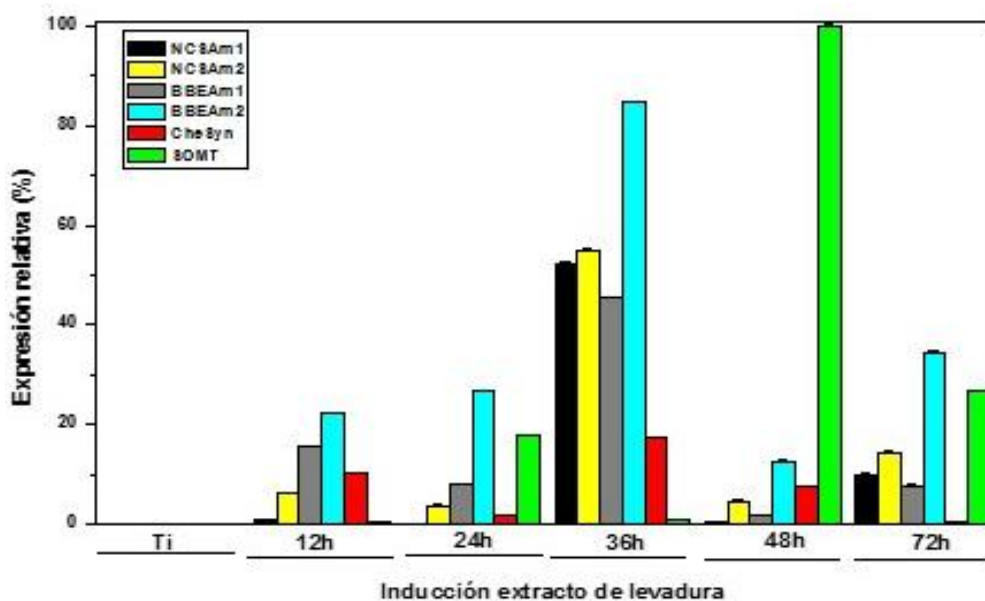


Figura 3.8 Expresión relativa de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *CheSyn* y *SOMT*, en callos de *A. mexicana* en condiciones basales y de inducción con extracto de levadura, en un periodo de 72 h (Ti, 12, 24, 36, 48 y 72). En la determinación de expresión relativa se empleó como gen de referencia 18S y como calibrador el tiempo inicial (Ti). Las barras de error representan el error estándar ($n=3$).

En callos inducidos con jasmonato de metilo, que no respondieron a la acumulación de sanguinarina (Anexo 1, Fig. 1), se observa a las 12, 24 y 72 h en el curso temporal, que los transcritos de una de las isoformas de la *NCS*, la *NCSAm1*, se expresó en niveles superiores de la isoforma, *NCSAm2* (Fig. 3.9), sin embargo, a las 48 h la *NCSAm2* se expresó en niveles superiores a la *NCSAm1*, así mismo a las 36 h la expresión de ambas es similar. Se observa a las 36, 48 y 72 h del curso temporal que la expresión de una de las isoformas de la *BBE*, la *BBEAm1*, es mayor de la isoforma, *BBEAm2* (Fig. 3.9), sin embargo, a las 12 y 24 h la *BBEAm2* se expresa en niveles superiores a la *NCSAm1* (Fig. 3.9). Este tejido también mostró una alta expresión de *SOMT* durante todo el curso temporal, sin embargo, no se detectó acumulación de berberina, por lo que se infiere que algo está ocurriendo con las reacciones de biosíntesis posteriores a la participación de este gen (Fig. 3.9).

De manera general, en callos en condición de inducción con jasmonato de metilo en donde no hubo respuesta de síntesis de sanguinarina, los genes que mayormente se expresaron tanto en RT-PCR como en qPCR fueron *NCSAm1*, *BBEAm1* y *SOMT* (Figs. 3.7 y 3.9).

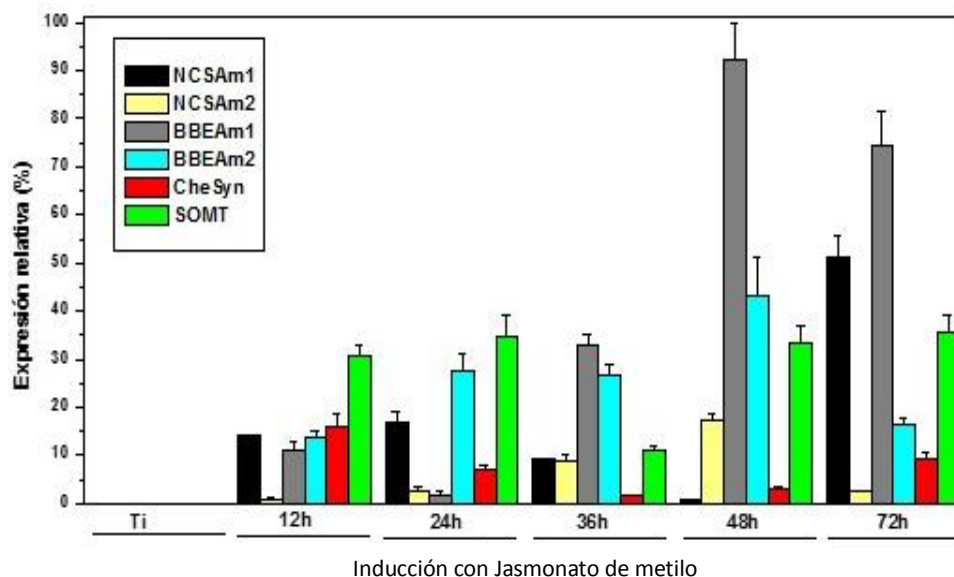


Figura 3.9 Expresión relativa de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *CheSyn* y *SOMT* en cultivos de callos de *A. mexicana* durante la inducción con jasmonato de metilo. Para la determinación de expresión relativa se empleó como gen de referencia *ADNr 18S* y como calibrador el tiempo inicial de inducción. Las barras de error representan el error estándar ($n=3$).

3.1.3 DISCUSIÓN GENERAL

3.1.3.1 Expresión preferencial de las copias de los genes *NCS* y *BBE* asociada a la síntesis de sanguinarina y berberina

Argemone mexicana L. es una planta de gran importancia en la medicina tradicional de México. En esta especie se ha descrito la capacidad de sintetizar y acumular berberina y sanguinarina simultáneamente. Esta acumulación ocurre de manera diferencial en tejidos, tanto en plantas adultas como en plántulas en estadios de desarrollo iniciales (Rubio-Piña, 2009; Xool-Tamayo, 2014). Ambos alcaloides pertenecen al grupo de los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs) y comparten las reacciones iniciales de su síntesis. Algunos de los genes que codifican para enzimas que participan en esta vía común son *NCS* (norcoclaurina sintasa) y *BBE* (enzima del puente de berberina). En esta especie, se han reportado isoformas de los genes *NCS* y *BBE* (Rubio-Piña, 2009). Así mismo, se ha descrito una expresión diferencial de estas isoformas.

En células en suspensión de *A. mexicana* en condiciones de inducción a la síntesis de sanguinarina con extracto de levadura, jasmonato de metilo y ácido salicílico se reportó que las isoformas de *NCS* y *BBE* se expresan diferencialmente (Trujillo-Villanueva, 2010). Aunado a esto, en *P. somniferum* (especie perteneciente a la misma familia) se ha caracterizado una familia de genes de TYDC (tirosina dopa descarboxilasa) con expresión tejido específico (Facchini y De Luca, 1994). Por lo cual, en este trabajo se estudió la expresión de las isoformas de *NCS* y *BBE* en diferentes tejidos de planta adulta, plántulas en estadios de desarrollo iniciales y callos en condiciones basales y de inducción (acumulación de sanguinarina), con la finalidad de discernir las isoformas específicas involucradas en la síntesis de berberina y sanguinarina.

En este estudio se demostró que tanto berberina como sanguinarina se acumulan de manera diferencial en tejidos de planta adulta y en plántulas en estadios de desarrollo iniciales, estos resultados coinciden con los reportados por Rubio Piña (2009). De tal modo, los tejidos en los que se acumuló berberina fueron en parte aérea de planta adulta y después de la apertura de los cotiledones en plántulas en estadios de desarrollo iniciales; mientras que se detectó la presencia de sanguinarina en raíz de planta adulta y parte aérea del estadio I en plántulas en estadios de desarrollo iniciales.

En cuanto a los análisis de expresión de RT-PCR y qPCR, se observó que ambas isoformas tanto para *NCS* como para *BBE* se expresan simultáneamente en la mayoría de las condiciones, probablemente asociado a la alta redundancia de estos genes. Kousuke y colaboradores (2010) han descrito que, en el metabolismo secundario, las isoformas desempeñan un papel compensatorio importante debido al pequeño número de vías metabólicas alternas relacionadas a la síntesis de un metabolito.

De este modo, se cumplieron los objetivos que proponían analizar la redundancia génica de las isoformas reportadas tanto para *NCS* como para *BBE* en la ruta de síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *A. mexicana*, en función de la acumulación diferenciada de berberina y sanguinarina en diferentes tejidos de planta adulta, plántula en desarrollo y cultivos *in vitro* en condiciones basales y de inducción.

Así mismo, se encontró que las copias de los genes de *NCS* y *BBE* se expresan en tejidos que acumulan tanto berberina como sanguinarina de manera diferenciada, ya sea de planta adulta, plántulas en desarrollo o de cultivos *in vitro*, lo que se sugiere que en *A. mexicana* la redundancia genética asociada con el proceso de síntesis de alcaloides no se relaciona con los patrones de acumulación diferencial de berberina y sanguinarina.

CAPÍTULO IV

4.1 CONCLUSIONES

1. En hoja de planta adulta en donde se acumuló principalmente berberina se expresó dos veces más la isoforma *NCSAm1* con respecto a la isoforma *NCSAm2*. En los demás tejidos no se observaron grandes diferencias en los niveles de expresión de las isoformas *NCS* y *BBE*.
2. En plántula en estadios de desarrollo iniciales la isoforma *NCSAm2* se expresó en magnitudes de cinco y dos veces más en estadios I y II de la parte aérea y estadio I, II y III en la parte aérea y radical, respectivamente, en comparación con *NCSAm1*. Por otra parte, las isoformas de *BBE* no mostraron diferencias significativas a excepción de *BBEAm2*, que se expresó dos veces más en parte radical de estadio III en comparación con *BBEAm1*.
3. En cuanto a los cultivos *in vitro* de callos, en la inducción con extracto de levadura se detectó un incremento en la acumulación de sanguinarina pero no se mostraron diferencias significativas en la expresión de las isoformas de *NCS*; sin embargo, la isoforma *BBEAm2* se expresó dos veces más en comparación con *BBEAm1*. En la inducción con jasmonato de metilo no hubo un incremento en la síntesis de sanguinarina y los genes *NCSAm1*, *BBEAm1* y *SOMT* tuvieron una mayor expresión relativa. Así mismo, se observó que cuando hay inducción con ácido salicílico ambas isoformas de la *BBE* aumentan sus porcentajes de expresión en comparación con los otros sistemas de inducción.
4. En tejidos de planta adulta de *A. mexicana* se observó una distribución diferencial de alcaloides. Siendo así, que la berberina se acumula en tejidos de parte aérea y sanguinarina se encuentra en las raíces. En plántulas en estadios iniciales de desarrollo, se observó que durante la germinación de las semillas y antes de la emergencia de los cotiledones sólo hay acumulación de sanguinarina; por el contrario, la acumulación de berberina inició a partir de la apertura de los cotiledones. Por último, cuando aparecen las hojas verdaderas (estadio III) se acumuló tanto berberina como sanguinarina en cantidades similares.

5. Ambos resultados indican que en planta completa de *A. mexicana* hay una acumulación diferencial de alcaloides en donde al parecer la parte aérea es la responsable de la biosíntesis y por ende de acumulación de berberina y sanguinarina; pero ambos alcaloides son transportados y acumulados en la raíz.

4.2 MODELO PROPUESTO

Tomando en cuenta los siguientes datos: A) los tejidos en los que sólo se acumuló berberina fueron en pétalo (planta adulta) y radical (estadio II), en estos tejidos los genes que obtuvieron una mayor expresión relativa fueron *NCSAm1*, *BBEAm1* y *SOMT* y B) los tejidos en donde se acumuló sanguinarina fueron raíz (planta adulta) y aérea (estadio I), en estos tejidos los genes que obtuvieron una mayor expresión relativa fueron *NCSAm2*, *BBEAm2* y *CheSyn*, se propone un modelo en el que se plantean las posibles vías que puede tomar la ruta para sintetizar berberina y sanguinarina, donde se muestra la participación de copias específicas de los genes, por ejemplo en la biosíntesis de berberina participaría *NCSAm1* y *BBEAm1* y en la biosíntesis de sanguinarina participaría *NCSAm2* y *BBEAm2* (Fig. 4.1).

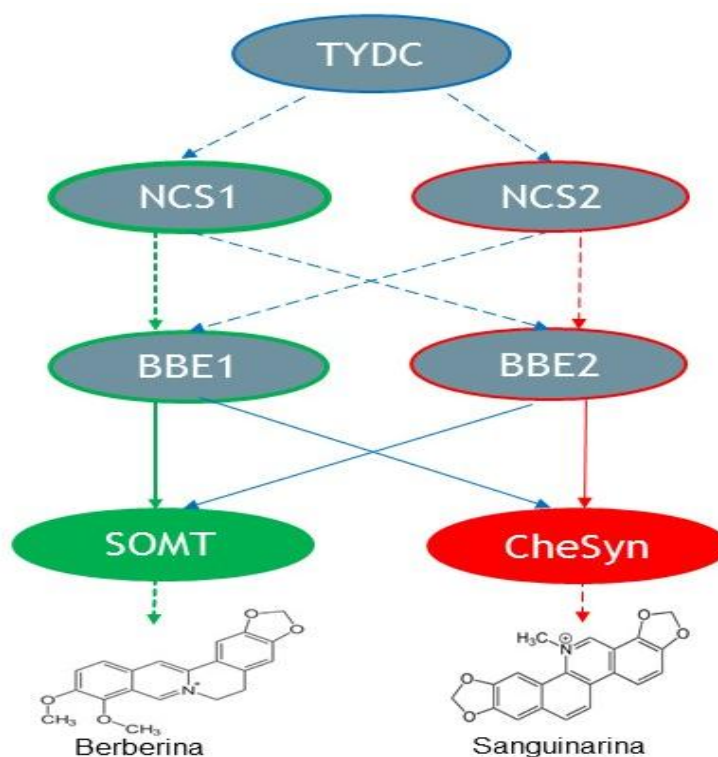


Figura 4.1 Representación de la sinergia entre las copias redundantes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1* y *BBEAm2*. Esquema sintetizado que representa la ruta de biosíntesis de berberina y sanguinarina en donde se muestran las enzimas participantes en varias de las reacciones, como la tirosina/dopa descarboxilasa (*TYDC*), que es la enzima que desvía a la tirosina para iniciar la síntesis de los ABIs, la norcoclorina sintasa (*NCS*), tiene dos copias las cuales pueden combinarse para participar en las reacciones posteriores tal como lo muestran las líneas, lo mismo ocurre con las copias de la enzima del puente de berberina (*BBE*), hasta llegar a las reacciones específicas para la síntesis de berberina, en donde la primera enzima que participa es (*S*)-coulerina-9-O-methyltransferasa (*SOMT*). Para la síntesis de sanguinarina la primera enzima que participa es quelantifolina sintasa (*CheSyn*). Las líneas consecutivas representan una reacción, las líneas punteadas representan dos o más reacciones, las líneas azules representan las combinaciones posibles de las reacciones comunes para ambos alcaloides, las líneas verdes representan una posible vía para berberina y las líneas rojas representan una posible vía para sanguinarina.

4.3 PERSPECTIVAS

La existencia de familias génicas que codifican para enzimas que participan en la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *A. mexicana* (*NCS* y *BBE*) está asociada a la etapa de desarrollo, tejido y condición de inducción en *A. mexicana* por lo que la identificación detallada de las familias de los genes *NCS* y *BBE* en un modelo establecido de *A. mexicana* permitiría conocer cuales copias están jugando un papel central en la contribución y regulación de la síntesis de berberina y sanguinarina.

El estudio de la localización y cuantificación de las enzimas de las reacciones finales de la síntesis de la berberina y sanguinarina permitirá conocer la reacción directa con la cantidad de alcaloides en los diferentes tejidos de *A. mexicana*.

Por último, para profundizar el estudio de los mecanismos que dirigen el transporte, distribución y acumulación espacial de los alcaloides en tejidos específicos de *A. mexicana* se necesita investigar la localización celular y subcelular biosintética de las enzimas que participen tanto en reacciones iniciales como finales, esto puede ser posible mediante técnicas de inmunolocalización con anticuerpos específicos para las enzimas de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Adolfo Ávalos G. (2009), Metabolismo secundario de plantas, Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal, 2, 119-145.
- Ahmad, N., S. Gupta, M.M. Husain, K. M. Heiskanen, H. Mukhtar, (2000). Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarina for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research*, 6, 1524-1528.
- Arakawa, H., Clark, W.G., Psenak. M. and Coscia, C.J. (1992). Purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from elicited *Sanguinaria canadensis* cell cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 299, 1-7.
- Badri DV, Loyola-Vargas VM, Broeckling CD, De-la-Peña C, Jasinski M, Santelia D, Martinoia E, Lloyd W, Sumner LW, Banta LM, Stermitz F, Vivanco JM. (2008). Altered Profile of Secondary Metabolites in the Root Exudates of *Arabidopsis* ATP-Binding Cassette Transporter Mutants. *Plant Physiology*, 146, 762-771.
- Bauer, W. and Zenk, M.H. (1991). Two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P-450 dependent enzymes are involved in (S)-stylopine biosynthesis. *Phytochemistry*, 30, 2953-2961.
- Bhardwaj, D. K., M. Bisht, J.K. Jain and M. Munjal (1982). Phenolics from the seeds of *Argemone Mexicana*. *Phytochemistry*, 21, 2154-2156.
- Block R, O'Leary DS, Hichwa RD, Augustinack JC, Boles Ponto LL, Ghoneim MM, Arndt S, Hurtig RR, Watkins GL, Hall JA, Nathan PE, Andreasen NC. (2002). Effects of frequent marijuana use on memory-related regional cerebral blood flow. *Pharmacol Biochem Behav*, 72, 237-250.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci. Plant Science*, 161, 839-851.
- Bruneton, J. (2001) *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes medicinales*. 5 ed. París. Ed. Tec& Doc. 986p.

- Campos-Tamayo F.D. (2002), Efectos de los procesos de diferenciación celular sobre la síntesis de alcaloides en cultivos in vitro de *Argemone mexicana* y *Catharanthus roseus*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad Autónoma De Yucatán, Mérida yucatán México.
- Capasso, A., Aquino R., Tommasi N., piacente S, Rastrelli L., pizza, C. (2002). Neuropharmacology activity of alkaloids from South American Medicinal Plants. *Current Medicinal Chemical -Central Nervous Systems Agents*, 1, 1-15.
- Carrillo-Pech, M.R. (2006). Regulación de la síntesis de alcaloides en cultivos in vitro de *Argemone mexicana*. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán México pp. 35.
- Chan-Canto (2015). Establecimiento de un sistema de inducción en cultivos *in-vitro* de *Argemone mexicana*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida Yucatán, México.
- Cheng, M. (2005). Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 5915-5920.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. eds Buchanan B, Griseb W, Jones R (American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD), pp 1250–1318.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 22, 10881-10890.
- Dean E. J., Davis J.C., Davis R.W., Petrov D. A., (2008). Pervasive and persistent redundancy among duplicated genes in yeast. *PLoS Genet*, 4, 100-113.
- Deluna A, Vetsigian K, Shores N, Hegreness M, Colon-Gonzalez M, Chao S, Kishony R. (2008). Exposing the fitness contribution of duplicated genes. *Nat Genet*, 40, 676-81.
- Díaz Chávez ML, Rolf M, Gesell A, Kutchan TM. (2011). Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid

- formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 507, 186-193.
- Dixon A. L., Malcolm Prior, Yasmene Banu, Peter Gordon Morris, Andrew Young, Michael, Joseph. (2001). Effect of Dopamine D1 Agonist and Antagonist on the Rat Brain as determined using BOLD fMRI. Proc. Intl. Soc. Mag., 7, 57-64.
- Facchini PJ, Bird DA. (1998). Developmental regulation of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in *opium poppy* plants and tissue cultures. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 34, 69-79.
- Facchini PJ. De Luca V. 1995. Phloem-specific expression of Tyrosine/Dopa Decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in *opium poppy*. Plant Cell, 7, 1811-1821.
- Facchini, P.J., S.U. Park, D.A. Bird and N. Samanani (2003). Toward the metabolic engineering of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in *opium poppy* and related species. Recent Research Developments in Phytochemistry, 4, 31-47.
- Facchini PJ. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology, 52, 29–66
- Facchini PJ, MJillian M, Hagel JL, Liscombe DK, Loukanina N, B.J. MacLeod BJ, Samanani N, Zulak KG. 2007. *Opium poppy*: blueprint for an alkaloid factory. Phytochemistry Reviews, 6, 97-124.
- Frenzel, T., Zenk, M.H. (1990). S-Adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine 4'-O-methyltransferase, a regio- and stereoselective enzyme of the (S)-reticuline pathway. Phytochemistry, 29, 3505-3511.
- Fucile G., Falconer S., Christendat D., (2008) Evolutionary diversification of plant shikimate kinase gene duplicates PLoS Genet, 4, e1000292
- Funes, F. (1997). "Experiencias cubanas en agroecología." Revista Agricultura Orgánica, 4, 10-18.

- Gershenzon J. Dudareva N., (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol*, 3, 408-14.
- Guízar-González C., Trijullo-Villanueva, Karen, Monforte-González Miriam, Vázquez-Flota Felipe., (2012). Sanguinarine and Dihydrosanguinarine Accumulation in *Argemone mexicana* (L) Cell Suspensión Cultures Exposed to Yeast Extract. *Journal Mexican Chemical Society*, 56, 19-22.
- Harbone, J. B. and C. A. Williams (1999). Flavonoids in the seeds of *Argemone Mexicana*: a reappraisal. *Phytochemistry*, 22, 1520-1983.
- Harvey, A. (2000) "Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products." *Drug Discovery Today*, 5, 294-300.
- Hussain, S. F., S. Nakkady, L Khan and M. Shamma (1983). Oxihydrastinine, and isoquinoline alkaloid from the papaveraceae. *Phytochemistry*, 22, 319- 327.
- Jansen, O. (2005) Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum A. Juss.* For their cytotoxic properties. *Journal of Ethopharmacology*, 15, 241-245.
- Kafri Ran, Orna Dahan, Jonathan Levy, Yitzhak Pilpel, (2008). Preferential protection of protein interaction network hubs in yeast: evolved functionality of genetic redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 12-43.
- Kafri R., Springer L., Pipel Y., (2009). Genetic Redundancy: New Tricks for Old Genes. *Cell*, 136, 389-392.
- Kim D.S., Hwang B.K., (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of experimental botanic*, 65, 2295-306.
- Kousuke Hanada, Yuji Sawada, Takashi Kuromori, Romy Klausnitzer, Kazuki Saito, Tetsuro Toyoda, Kazuo Shinozaki, Wen-Hsiung Li and Masami Yokota Hirai., (2011). Functional Compensation of Primary and Secondary Metabolites by Duplicate Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol.* 28: 377–382.

- Kutchan TM, Rush M, Coscia CJ. (1986). Subcellular localization of alkaloids and dopamine in different vacuolar compartments of *Papaver bracteatum*. Plant Physiology, 81, 161-166.
- Kutchan, T.M. and Dittrich, H. (1995) Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in higher plants. J. Biol. Chem., 270, 24475-24481.
- Lacoste N, Utlely RT, Hunter JM, Poirier GG, Cote J. (2002). Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. J Biol Chem, 277, 30421-30430.
- Lee EJ, Facchini P. (2010). Norcoclaurine Synthase Is a Member of the Pathogenesis-Related 10/Bet v1 Protein Family. The Plant Cell, 22, 3489-3503.
- Liscombe DK, MacLeod BP, Loukanina N, Nandi OI, Facchini PJ. (2005). Evidence for the monophyletic evolution of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. Phytochemistry, 66,2501-2520.
- Litter, M. (1998) Compendio de farmacología. 14 ed. Buenos Aires. El ateneo, 932 p.
- Loeffler, S., Deus-Neumann, B. and Zenk, M.H. (1995). S-Adenosyl-L-methionine: (S)-coclaurine-N-methyltransferase from *Tinospora cordifolia*. Phytochemistry, 38, 1387-1395.
- Lores, J. (1996). Farmacoquímica: síntesis, estructura y propiedades de medicamentos orgánicos. 6 ed. Buenos Aires. Eudeba. 1589p.
- Lozoya, X. and M. Lozoya (1982). Flora medicinal de México. Plantas indígenas. Primera parte. Instituto Mexicano del Seguro Social. Pp. 148-173.
- Lunn JE. (2007). Compartmentation in plant metabolism. Journal of Experimental Botany, 58, 35-47.
- Lynch M. Corney JS. 2000 The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. Science, 3, 35-44.

- Martínez, M., (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Martínez, M. (1933) Las Plantas Medicinales de México, Ed Sexta edición (reimpresión) 1994. Botas, México, D. F.
- Martínez, O. E., 1982. Papaveraceae. En: Sosa, V. (ed.). Flora de Veracruz. Fascículo 22. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México.
- Mendelsohn, R. (1995).The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests.Economic Botany, 49, 223–228.
- Minami H, Dubouzet E, Iwasa K, Sato F. (2007). Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. J Biol Chem., 2, 6274-6282.
- Mónforte-Gonzales, Guizar-González, Rubio-Piña, Carrillo-Pech y Vazquez-Flota (2012). Berberine and Sanguinarine quantitation in *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) tissues by TLC-in situ fluorography. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 25, 358-360.
- Muemmler, S., Rueffer, M., Nagakura, N., Zenk, M.H. (1985). S-Adenosyl-L-methionine:(S)-scoulerine 9-O-methyltransferase, a highly stereo- and regiospecific enzyme in tetrahydroberberine biosynthesis. Plant Cell Reports, 4, 36-39.
- Musso G., Constanzo M., Huangfu M., Smith A. M., Paw J., Bryan-Joseph San Luis, Charles Boone, Guri Giaever, Corey Nislow, Andrew Emili, y Zhaolei Zhang. (2008). The extensive and condition-dependent nature of epistasis among whole-genome duplicates in yeast. Genome res. Genome Res., 18, 1092–1099.
- Núñez M. Sánchez E. Bela A. Aguado M. (2008) Determinación de metabolitos secundarios en *Lippia alba* Mill. y *Lippia turbinata* GRISEB. Comunicaciones científicas y tecnológicas.
- Ochoa-Alejo N., Salgado-Garciglia R. (1992). Phenylalanine ammonia-lyase activity and capsaicin-precursor compounds in *P*-flourophenylalanine-resistand and sensitive

- variant cells of chili pepper (*Capsicum annum*), *Physiolgia plantarum*, 85, 173-179.
- Okada, N., Shinmyo, A., Okada, H. and Yamada, Y. (1988). Purification and characterization of (S)-tetrahydroberberine oxidase from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, 27, 979-982.
- Otani M, Nobukazu S, Kyoko S, Enrico M, Fumihiko S, Kazufumi Y. (2005). Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology*, 138, 1939-1946.
- Pauli H.H., Kutchan T.M. (1998). Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, *Plant J.*, 13, 793-801.
- Pino, N. y H. Valois. (2004) Ethnobotanical of four black communities of municipality of quibda. Choco. Colombia. LyonaJ. Ecol.Application.
- Pitty, A. y R. Muñoz. 1993. Guía práctica para el manejo de la maleza. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras.
- Randrianarivelosia, M. (2003) Plants traditionally prescribed to treat tazo (malaria) in theeastern region of Madagascar. *Malaria Journal* 2, 25.
- Roberts, M. F. y M. Wink (1988). Alkaloids biochemistry, ecology and medicinal applications, Plenum Press New York., 3, 452-456.
- Rong-Cheng L., Zai-Song D., Liang-Bi L., Ting-Kuang (2001). A rapid and Efficient DNA Minipreparation Suitable for screening Transgenic Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 379- 384.
- Roytrakul S, Verpoorte R. (2007). Role of vacuolar transporter proteins in plant secondary metabolism: *Catharanthus roseus* cell culture. *Phytochemistry Reviews.*, 6, 383-396.

- RozeL V, Anindya C, John EL. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetic Biology*, 48, 35-48.
- Rubio-Piña, J.A. (2009) Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Rubio-Piña, J.A., Vázquez Flota F. (2013) Pharmaceutical applications of the Benzylisoquinoline Alkaloids From *Argemone Mexicana* L. *Curr Topics in Med Chem.*, 13, 1-8.
- Rueffer, M., Zumstein, G., Zenk, M.H. (1990). Partial purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine:(S)-tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase from suspension-cultured cells of *Eschscholtzia* and *Corydalis*. *Phytochemistry*, 29, 3727-3733.
- Rueffer, M. and Zenk, M.H. (1994) Canadine synthase from *Thalictrum tuberosum* cell cultures catalyses the formation of the methylenedioxy bridge in berberine synthesis. *Phytochemistry*, 36, 1219-1223.
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.) 1991. Flora fanerogámica del valle de México. Instituto de ecología A. C. Xalapa, Veracruz, Mexico pp. 62.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samanani N, Yeung EC, Facchini PJ. (2002). Cell type specific protoberberine alkaloid accumulation in *Thalictrum flavum*. *Journal Plant Physiology*, 139, 1189-1196.
- Samanani N, Park SU, Facchini PJ. (2005). Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell*, 17, 915-926.

- Santizo, I. (2004) Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Siddiqui, A., I. Sayeed, K.S. Zafar and F. Islam. (2002) *Argemone* oil augmented oxidative stress in discrete areas of rat brain. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 69, 734-740.
- Standley, P.C. (1926) *Trees and Shrubs of Mexico*. Contributions from the United States Herbarium. Vol. 23, Washington D.C. pp. 1-5.
- Tamayo-Ordóñez Y. J., Narváez-Zapata J. A., Sánchez-Teyer L. F. (2016). Comparative Characterization of Ribosomal DNA Regions in Different Agave Accessions with Economical Importance. *Plant Molecular Biologi Reporter*, 33, 2014–2029.
- Thomas D, Barbey R, Surdin-Kerjan Y. (1993). Evolutionary relationships between yeast and bacterial homoserine dehydrogenases. *FEBS Lett*, 323, 289-93.
- Trujillo-Villanueva K. Rubio-Piña J., Monforte-González M., Vázquez-Flota F. (2010), *Fusarium oxysporum* homogenates and jasmonate induce limited sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures, *Biotechnology Letters*, 32, 1005-1009.
- Valencia, O. (1995) *Fundamentos de fitoquímica*. Trillas. México. 235 pp.
- Verpoorte, R., R. Van der Heijden, H.J.G TenHoopen and J. Memelink (2002). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of line chemicals. *Biotechnology Letters*, 21, 467-479.
- Villar, A. (1999) *Farmacognosia General*. 5 ed. Madrid. Síntesis. 1254p.
- Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G. (1998). *Catálogo de malezas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

- Wight, R., (1840) Illustrations of Indian botany, or figures illustrative of each of the natural orders of Indian plants, vol. 1
- Xool-Tamayo J, Monforte-González M, Serrano-Gamboa G, Mirón-López G, Vázquez-Flota F (2014) Synthesis of alkaloids in developing seedlings. In: ASPB 2014 Plant Biology Meeting, Portland: Abstracts, P. 39026-B.
- Yazaki K. (2005) Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion Plant Biology*, 8, 301-307.
- Yazaki K, Sugiyama A, Morita M, Shitan N. (2008). Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochemistry Review*, 7, 513-524.
- Zenk MH, Juenger M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68, 2757–2772.
- Ziegler J, Facchini PJ. (2008). Alkaloid Biosynthesis: metabolism and trafficking”. *Annual Review, Plant Biology*, 59, 735–769.

DATOS COMPLEMENTARIOS

En esta sección se muestran los datos complementarios de los resultados (capítulo III). Como primera instancia se muestran imágenes de los perfiles cromatográficos de tejidos de planta adulta y plántulas en desarrollo, en los cuales se cuantificaron berberina y sanguinarina (Figs. S1-S4); la medida de las placas es de 20 × 6, las muestras se cargaron a un centímetro de distancia entre ellas, así como su respectivo control. Se cargó la misma cantidad de muestra en todos los tejidos (0.15 µg PS) para que la imagen sea semi-cuantitativa; estos datos son complemento de las gráficas de las Figs. 3.1 y 3.2.

Las imágenes suplementarias S5-S9 son referentes a los resultados de los análisis de expresión de los genes *NCSAm1*, *NCSAm1*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *SOMT* y *CheSyn* correspondientes a los cultivos *in vitro* sometidos a inducción individual con ácido salicílico, inducción simultánea e inducción secuencial, así mismo se agregó a los datos complementarios en ANEXO 1 en el cual hay una explicación detallada de estos experimentos de inducción.

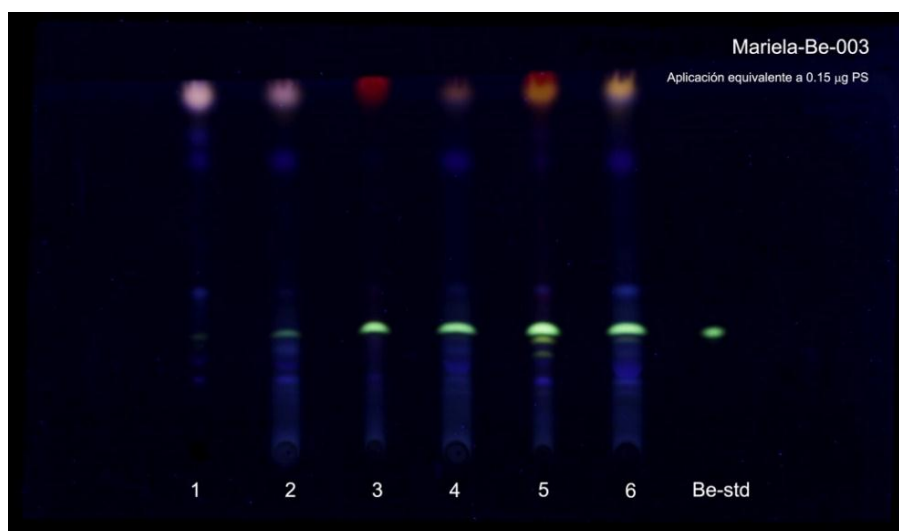


Figura S. 1 Perfil cromatográfico en capa delgada de plántulas en estados de desarrollo iniciales empleando el sistema de elución para berberina n-butanol:agua:hidróxido de amonio (8:1:1), aplicación equivalente a 0.15 µg PS. 1: aérea estadio I, 2: radical estadio I, 3: aérea estadio II, 4: radical estadio II, 5: aérea estadio III, 6: radical estadio III con su respectivo estándar de berberina.

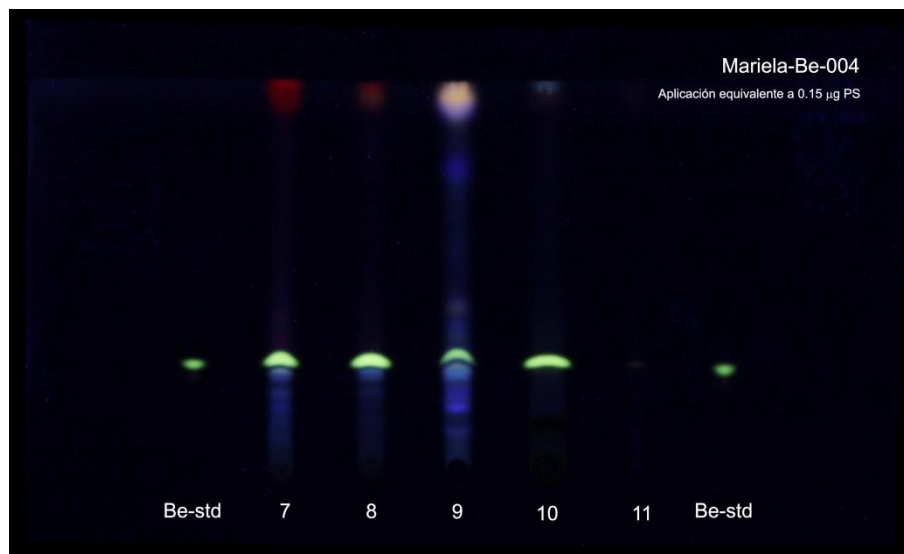


Figura S. 2 Perfil cromatográfico en capa delgada de tejidos de planta adulta, empleando el sistema de elución para berberina n-butanol:agua:hidróxido de amonio (8:1:1), aplicación equivalente a 0.15 µg PS. 7: hoja, 8: tallo, 9: raíz, 10: pétalo, 11: semilla inmadura y por último su respectivo estándar de berberina.

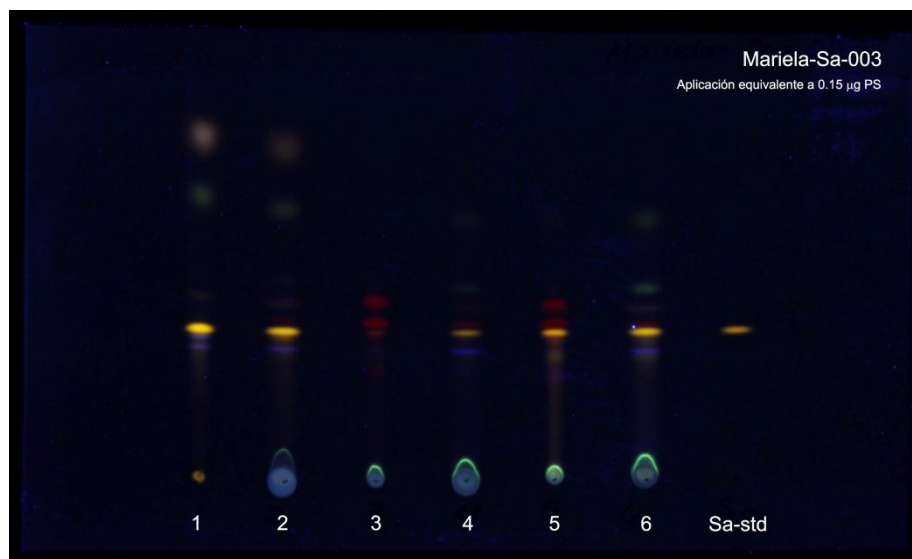


Figura S. 3 Perfil cromatográfico en capa delgada de plántulas en estados de desarrollo iniciales empleando el sistema de elución para sanguinarina benceno:etanol (94:6), aplicación equivalente a 0.15 µg PS. 1: aérea estadio I, 2: radical estadio I, 3: aérea estadio II, 4: radical estadio II, 5: aérea estadio III, 6: radical estadio III con su respectivo estándar de sanguinarina.

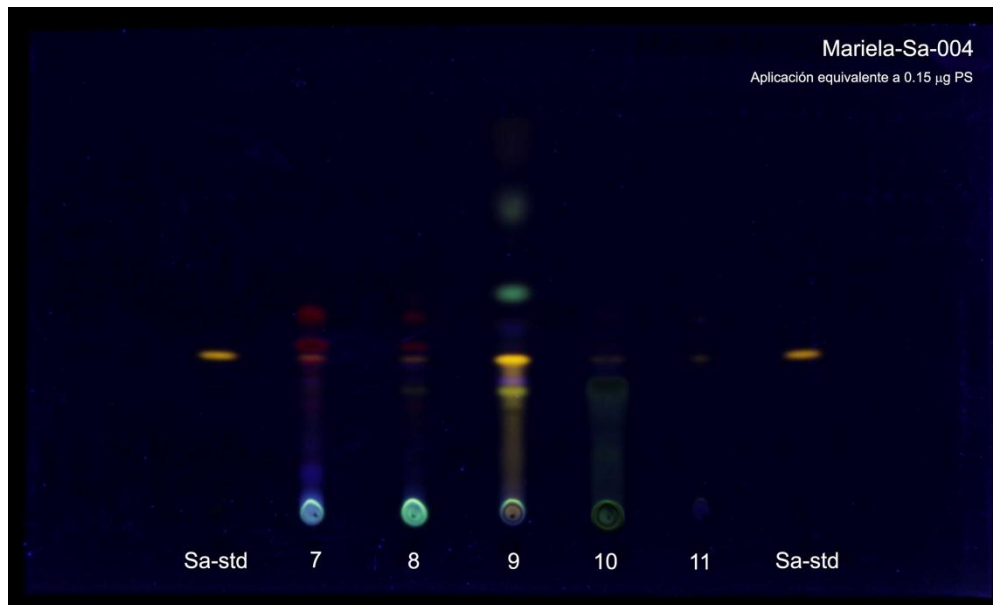


Figura S.4 Perfil cromatográfico en capa delgada de tejidos de planta adulta, empleando el sistema de elución para sanguinarina benceno:etanol (94:6) aplicación equivalente a 0.15 µg PS. 7: hoja, 8: tallo, 9: raíz, 10: pétalo, 11: semilla inmadura y por último su respectivo estándar de sanguinarina.

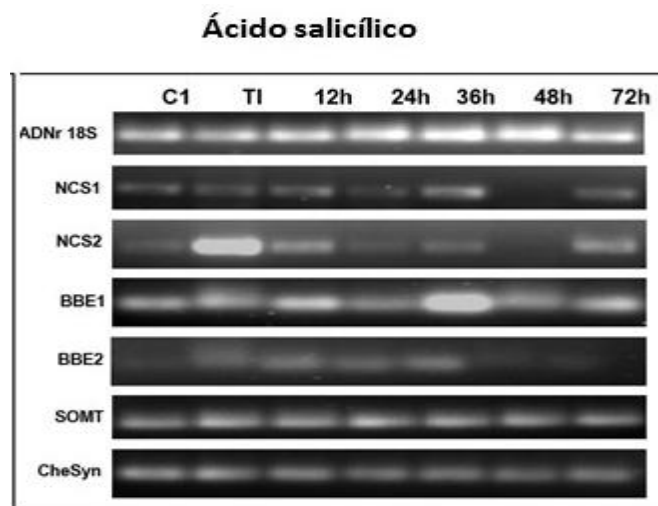


Figura S.5 Análisis de los transcritos de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BEEAm1*, *BBEAm2*, *SOMT* y *CheSyn* de *A. mexicana*. Inducción con ácido salicílico, Curso temporal de inducción tiempo inicial, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de inducción. Gen de referencia ADNr 18S.

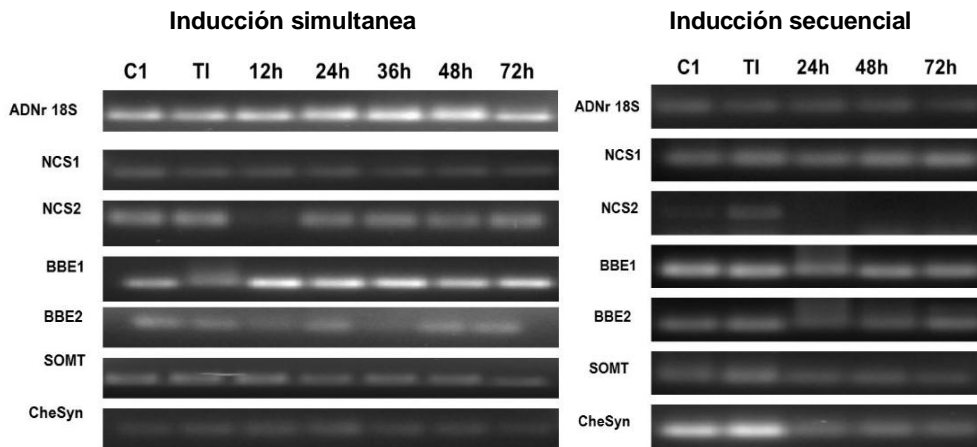


Figura S. 6 Análisis de los transcritos de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BEEAm1*, *BBEAm2*, *SOMT* y *CheSyn* de *A. mexicana*. En inducción simultánea y secuencial, curso temporal de inducción tiempo inicial 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de inducción. Gen de referencia ADNr 18S.

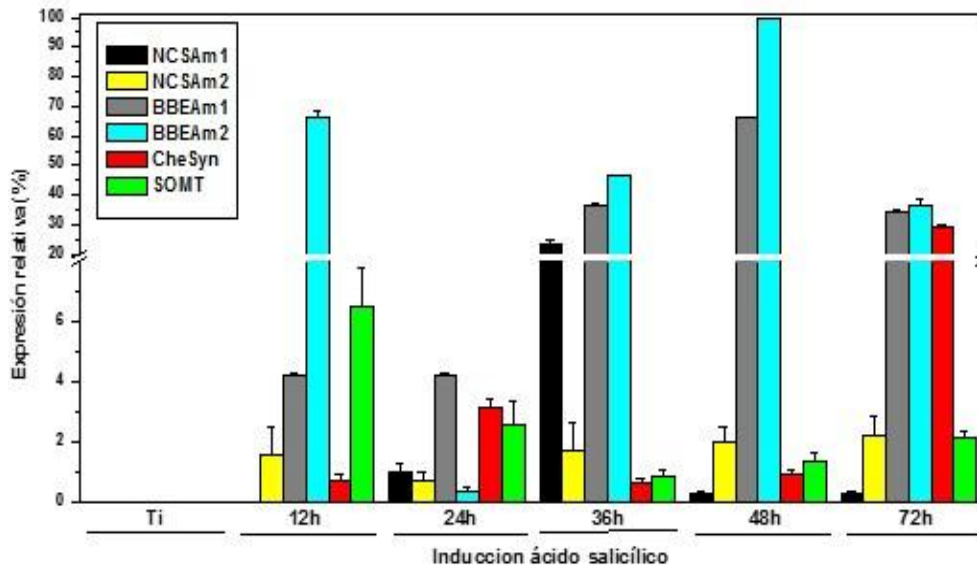


Figura S. 7 Expresión relativa de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *CheSyn* y *SOMT* durante la inducción de callos de *A. mexicana* con ácido salicílico. En la determinación de expresión relativa se empleó como gen de referencia ADNr 18S y como calibrador el tiempo inicial de inducción. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

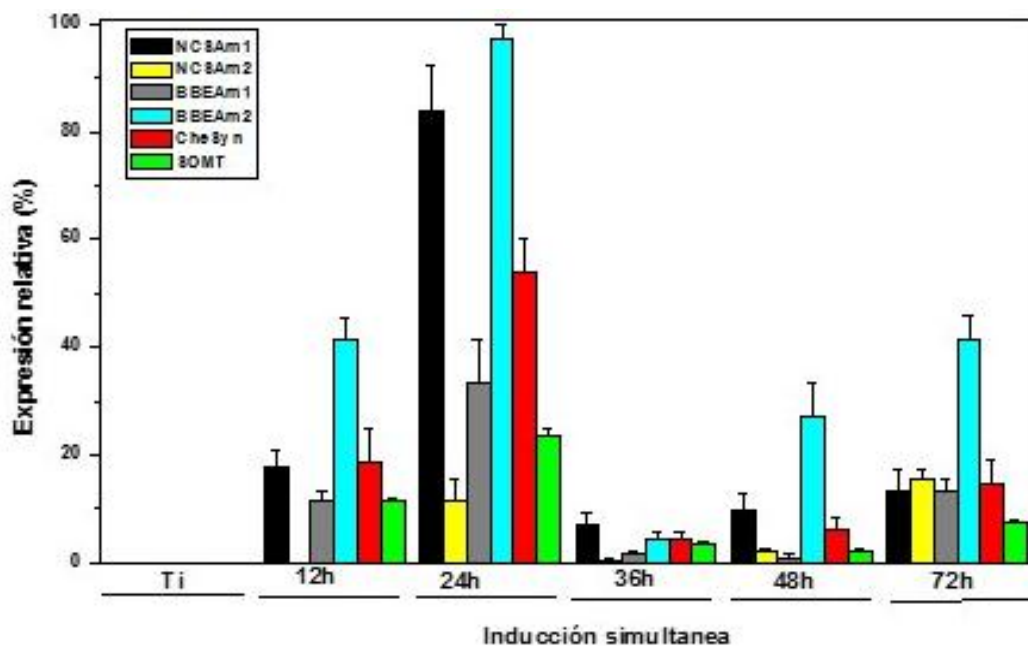


Figura S. 8 Expresión relativa de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *CheSyn* y *SOMT* en cultivos de callos de *A. mexicana* durante la inducción simultánea. Para la determinación de expresión relativa se empleó como gen de referencia *ADNr 18S* y como calibrador el tiempo inicial de inducción. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

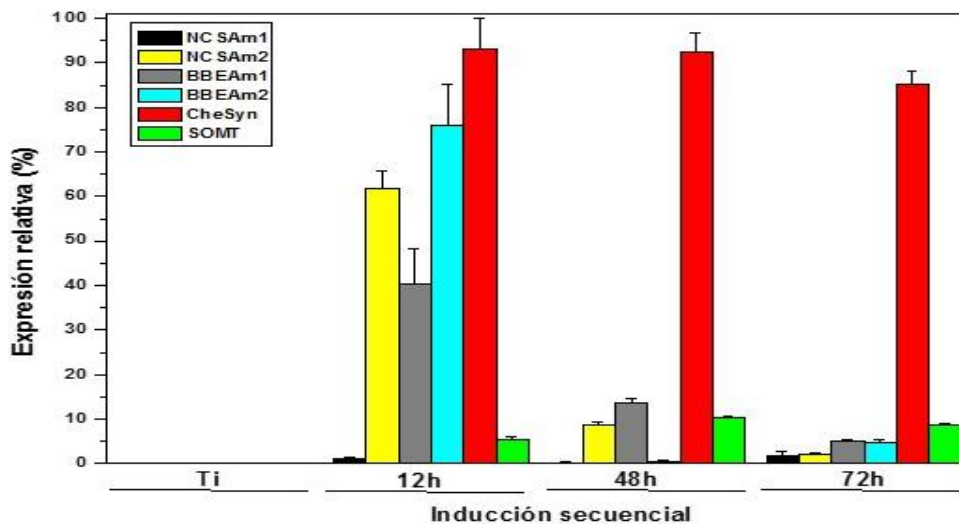


Figura S. 9 Expresión relativa de los genes *NCSAm1*, *NCSAm2*, *BBEAm1*, *BBEAm2*, *CheSyn* y *SOMT* en cultivos de callos de *A. mexicana* durante la inducción secuencial. Para la determinación de expresión relativa se empleó como gen de referencia *ADNr 18S* y como calibrador el tiempo inicial de inducción. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

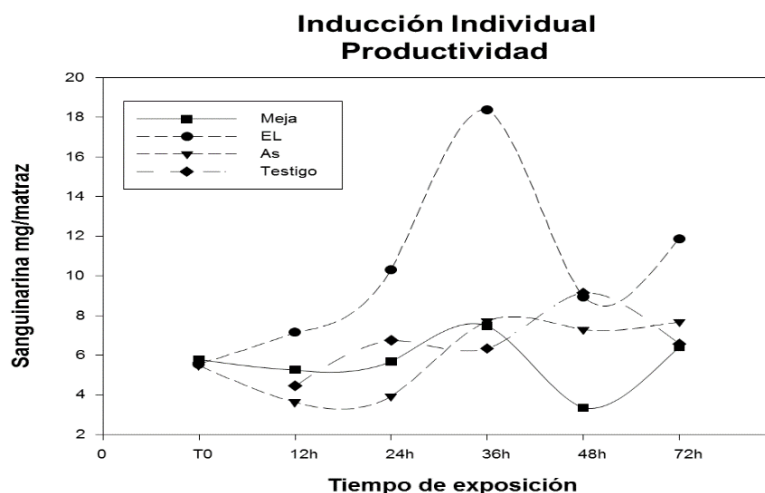
ANEXOS

Anexo1.- Inducción de la línea de callos de *A. mexicana* (am) con diferentes tratamientos

Chan-Canto, Monforte-Gonzales (2015).

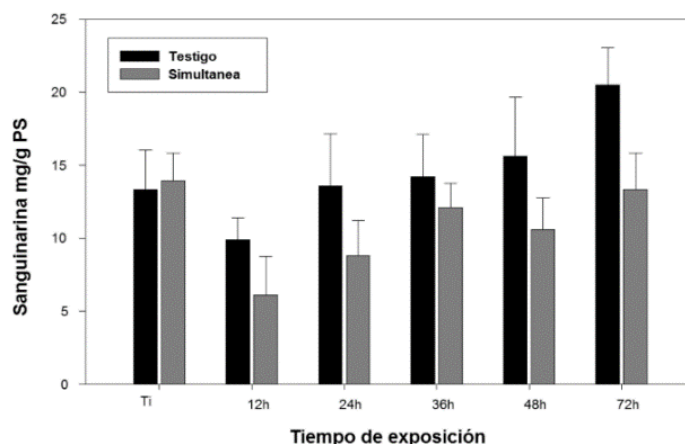
Para la inducción de los alcaloides sanguinarina y berberina en la línea de callos de *A. mexicana* (Am) se utilizaron los siguientes inductores: extracto de levadura (0.2 g/L), jasmonato de metilo (100 µM) y ácido salicílico (100 µM). La inducción se llevó a cabo mediante tres ensayos denominados como inducción individual, inducción secuencial e inducción simultánea durante un curso temporal de 72 h. Para cada ensayo se utilizaron como testigo callos en medio de cultivo sin inductores.

Inducción individual: se adicionó por separado cada uno de los tres inductores, las muestras se colectaron por triplicado a las 12, 24, 36, 48 y 72 h después de la inducción. El tejido vegetal se separó del medio de cultivo por medio de una bomba de vacío. Se tomó 1 g de tejido vegetal para la extracción del ARN total y el resto del material vegetal así como el medio de cultivo y se congelaron a -20 °C para la extracción de los alcaloides.



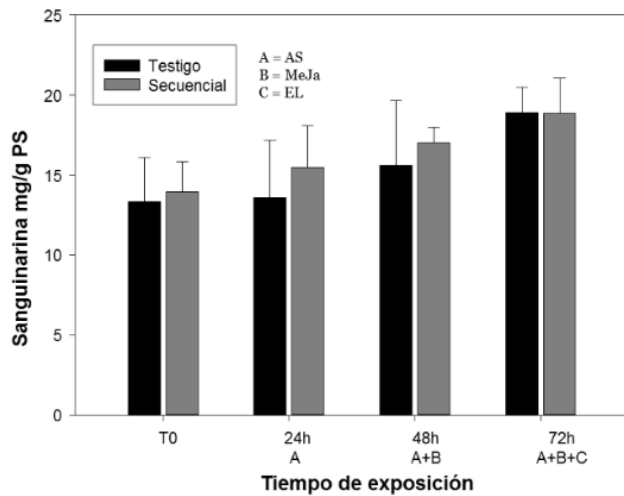
ANEXO 1. 1 Respuesta a diferentes inductores mediante Inducción individual. Promedio de 3 réplicas con su desviación estándar, con sus respectivos testigos. Inducción con extracto de levadura (círculo), Inducción con jasmonato de metilo (cuadrado), Inducción con ácido salicílico (triángulo) y testigo (rombo).

Inducción simultánea: se adicionaron los tres inductores a la línea de callos Am (Fig. 2) Las muestras se colectaron por triplicado a las 12, 24, 36, 48 y 72 h después de la inducción. El tejido vegetal se separó del medio de cultivo por medio de una bomba de vacío. Se tomó 1 g de tejido vegetal para la extracción del ARN total y el resto del material vegetal así como el medio de cultivo se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la extracción de los alcaloides.



ANEXO 1. 2 Respuesta defensiva de la línea de callos Am de *A. mexicana* a diferentes inductores mediante Inducción simultánea, en mg/g de peso seco (PS). Promedio de 3 réplicas con su desviación estándar, barras negras testigos (callos sin inducir) barras grises (callos inducidos).

Inducción secuencial: que consistió en la adición de los inductores en diferentes tiempos (Fig. 3). Primero, el ácido salicílico se adicionó a cada matraz, después de 24 h se colectó uno de los matraces y a los restantes se les adicionó jasmonato de metilo. Cumplidas las 48 h de exposición, se recolectó el material vegetal de uno de los matraces y a los restantes se les adicionaron el extracto de levadura. Después de 72 h de exposición a los tres inductores se recolectó el material vegetal y se almacenó en refrigeración para los análisis posteriores. Por cada tiempo se colectaron tres réplicas.



ANEXO 1. 3 Respuesta defensiva de la línea de callos Am de *A. mexicana* en inducción secuencial mg/g de peso seco (PS), a diferentes inductores. Promedio de 3 réplicas con su desviación estándar, con sus respectivos testigos, barras negras testigos (callos sin inducir) barras grises (callos inducidos) (Chan-Canto, en proceso).