



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“Transformación genética de *Pentalinon andrieuxii*
con el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis*
thaliana”**

Tesis que presenta

YESEÑA BEATRIZ BURGOS MAY

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2015



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Transformación genética de *Pentalinon andrieuxii* con el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis thaliana*" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Gregorio Godoy Hernández, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Abril de 2015

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:  _____

Nombre: IBQ. Yesenia Beatriz Burgos May

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Estudio del origen biosintético de terpenoides con esqueleto campechano producidos por *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae), No. 223404, bajo la dirección del Dr. Gregorio Godoy Hernández.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. por darme la oportunidad de realizar el posgrado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), por la facilidad de los recursos necesarios para la realización de este trabajo.

A CONACYT por la beca otorgada (280663)

Al Dr. Gregorio Godoy Hernández, por aceptarme dentro de su equipo de trabajo, por el aprendizaje, el apoyo y los consejos dados, que fueron de gran utilidad para mi formación académica y sobre todo para poder llevar a cabo la realización del presente proyecto.

Al Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, al Dr. José López Bucio y a la Dra. Renata Rivera Madrid que formaron parte de mi comité tutorial, por el tiempo invertido, por todos los comentarios, sugerencias y consejos dados, que fueron una guía durante mi estancia en este programa académico

Al Dr. Luis Peña Rodríguez, por ser parte del comité revisor, y sobre todo, por darme la facilidad de realizar una parte del proyecto dentro del Laboratorio 2 de Química Orgánica, de la Unidad de Biotecnología (UBT) del CICY.

A la M.C. Elide Avilés Berzunza, por el apoyo, por sus consejos y su amistad incondicional, que influyeron de manera positiva, haciendo más agradable el trabajo de laboratorio.

A la QBB. Fabiola Escalante Erosa, por su apoyo técnico en la realización del análisis de CCD, por su tiempo y paciencia.

A la IBQ. Martha Hernández, M.C. Carlos Sandoval y al M.C. Juan Canche, por todo su apoyo incondicional, sus asesorías y experiencia compartida en la realización de los experimentos más importantes de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 26: Jarely, Raymundo, Ofir, Johny, Norma, Patricia y Miguel. Por todos los momentos felices, por sus consejos y motivaciones y sobre todo por su amistad y compañerismo haciendo de esta etapa de mi vida, una muy grata experiencia.

Y finalmente agradezco a Dios, por darme la capacidad de aprendizaje, por darme a los mejores padres que pude desear, que son mi alegría y la motivación de seguir adelante cada día; y por darme al mejor compañero y amigo, José Arcadio, gracias por todo, por tu apoyo incondicional, por tus consejos y sobre todo por no dejar de motivarme para seguir hasta el final.

A todos y cada uno de ustedes...

Gracias!

La gratitud debería ser un acto constante de cada hora, de cada día, de toda la vida" Nancy Leigh DeMoss.

DEDICATORIAS

A mis padres...

A ti Mamá, por haberme dado la vida, por cuidarme y aconsejarme siempre, por estar conmigo y apoyándome en cada paso que he dado hasta ahora...

A ti Papá, por enseñarme a mirar siempre adelante y nunca desistir por más oscuro que sea el camino, por tu apoyo incondicional, y por estar siempre conmigo...

Siempre confiaron en lo que soñé, me cuidaron y me guiaron hasta aquí...

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
1. ANTECEDENTES	3
1.1. <i>PENTALINON ANDRIEUXII</i> , (MÜLL. ARG) B. F. HANSEN & WUNDERLIN	3
1.1.1 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA	4
1.1.2. CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS	4
1.1.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	6
1.1.4 USOS Y APLICACIONES	6
1.2 ISOPRENOIDES.....	8
1.2.1. BIOSÍNTESIS DE LOS ISOPRENOIDES: VÍA DEL MEVALONATO	9
1.2.2. LA ENZIMA 3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL CoA REDUCTASA (HMGR)	13
1.3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS.....	18
1.3.1. SISTEMAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.....	19
1.3.1.1 TRANSFORMACIÓN MEDIANTE BOMBARDEO DE MICROPROYECTILES O BIOBALÍSTICA.....	19
1.3.1.2. TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	20
1.3.2. <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	21
1.3.3. PROCESO DE TRANSFERENCIA DEL ADN-T DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> A LA CÉLULA VEGETAL.....	22
1.3.3.1. VARIABLES QUE FAVORECEN LA TRANSFORMACIÓN	25

1.3.4 MARCADORES GENÉTICOS	27
1.3.5. PLÁSMIDOS: pCAMBIA2301 PHTT203.....	28
1.4 JUSTIFICACIÓN	31
1.5. OBJETIVOS	31
1.5.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	32
BIBLIOGRAFÍA	34
CAPÍTULO II	41
2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	41
2.1.1 ASEPSIA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>PENTALINON ANDRIEUXII</i>	41
2.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>PENTALINON ANDRIEUXII</i> VÍA <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	41
2.2.1. SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL DE KANAMICINA	41
2.2.2. PROCESO DE TRANSFORMACIÓN MEDIANTE LA INFECCIÓN DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	42
2.2.3. PRUEBA HISTOQUÍMICA DE GUS	43
2.2.4. REGENERACIÓN DE BROTES, MANTENIMIENTO Y ENRAIZAMIENTO DE EXPLANTES TRANSFORMADOS CON EL GEN REPORTERO GUS.....	44
2.3. TRANSFORMACIÓN DE <i>PENTALINON ANDRIEUXII</i> CON EL GEN TRUNCADO DE <i>HMGR</i>	45
2.3.1 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO PHTT203:: Δ -354- <i>HMGR</i> Y TRANSFORMACIÓN DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	45

2.3.2. TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO DE BACTERIAS.....	46
2.3.3. PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO Y EXTRACCIÓN DE ADN (PLASMÍDICO Y GENÓMICO).....	46
2.3.4 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE INTERÉS POR PCR.....	48
2.3.5 DETECCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO	49
BIBLIOGRAFÍA	51
CAPÍTULO III	53
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1. OBTENCIÓN DE EXPLANTES DE <i>PENTALINON ANDRIEUXII</i>	53
3.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>PENTALINON ANDRIEUXII</i> VÍA <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	54
3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL DE KANAMICINA.....	54
3.2.2 PRUEBA HISTOQUÍMICA DE GUS.....	57
3.2.3. TRANSFORMACIÓN DE <i>PENTALINON ANDRIEUXII</i> CON EL GEN REPORTERO <i>GUS</i>	59
3.3. TRANSFORMACIÓN DE <i>PENTALINON ANDRIEUXII</i> CON EL GEN TRUNCADO DE <i>HMGR</i> . ..	67
3.3.1. TRANSFORMACIÓN DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> CON EL PLÁSMIDO PHTT203:: Δ -354- <i>HMGR</i>	70
3.3.2. TRANSFORMACIÓN DE LOS EXPLANTES HIPOCÓTILO Y RAÍZ DE <i>PENTALINON ANDRIEUXII</i> CON EL GEN TRUNCADO DE <i>HMGR</i>	75
3.3.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN TRUNCADO DE <i>HMGR</i> POR PCR.....	78
3.3.4 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO.....	79
3.4 DISCUSIÓN	81
BIBLIOGRAFÍA	85
CAPITULO IV	89

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	89
4.1 CONCLUSIONES.....	89
4.2. PERSPECTIVAS.....	90

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 <i>Pentalinon andrieuxii</i> , (Müll. Arg) B. F. Hansen & Wunderlin.....	3
Figura 1.2 Semillas y Folículo de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	5
Figura 1.3 Semillas de <i>Pentalinon andrieuxii</i> con penacho de pelos	5
Figura 1.4 Biosíntesis de isoprenoides.....	11
Figura 1.5 Vía del mevalonato, biosíntesis del IPP.....	12
Figura 1.6 La biosíntesis del mevalonato es catalizado por la HMGR.....	13
Figura 1.7 Topología de la HMGR en la membrana del retículo endoplásmico.....	14
Figura 1.8 Factores que regulan la actividad de las enzimas en las rutas metabólicas. .	15
Figura 1.9 Mecanismo de transferencia del ADN-T.....	25
Figura 1.10 Plásmido pCAMBIA 2301I.....	29
Figura 1.11 Plásmido pHTT 203:: Δ -354-HMGR.....	30
Figura 1.12 Esquema de la estrategia experimental	33
Figura 3.1. Porcentaje de semillas germinadas.....	54
Figura 3.2 Curva dosis respuesta a kanamicina para el tejido de raíz.....	56
Figura 3.3. Curva dosis/respuesta a kanamicina para hipocótilo.....	56
Figura 3.4. Prueba histoquímica de GUS a pH 6 a brotes no transformados de las 4 especies diferentes.	57
Figura 3.5. Prueba histoquímica de GUS a pH 7 a brotes no transformados de las 4 especies diferentes.	58
Figura 3.6. Prueba histoquímica de GUS a pH 8 a brotes no transformados de las 4	

especies diferentes. a	59
Figura 3.7. Prueba histoquímica de GUS.....	60
Figura 3.8. Prueba histoquímica de callos a partir de explantes transformados con el gen reportero <i>GUS</i> . (protocolo de transformación Yam-Puc, 2012).	61
Figura 3.9. Prueba histoquímica de GUS. protocolo Gómez, 2012	62
Figura 3.10. Prueba histoquímica de callos a partir de explantes transformados con el gen reportero <i>GUS</i> . (protocolo de transformación Gómez 2012).	63
Figura 3.11. Brotes de <i>P. andrieuxii</i> a partir de explantes transformados con gen reportero <i>GUS</i> (protocolo Gómez, 2012).....	64
Figura 3.12. Prueba histoquímica de GUS a brotes regenerados	64
Figura 3.13. PCR para <i>nptII</i> de las plantas transformadas.	66
Figura 3.14. Digestión del plásmido pHTT 203:: Δ -354- <i>HMGR</i> . 0).....	68
Figura 3.15. Minipreparación de ADN plasmídico.	69
Figura 3.16. Maxipreparación de ADN plasmídico	70
Figura 3.17. PCR de colonia para <i>NPTII</i>	71
Figura 3.18. PCR para <i>NPTII</i> de las muestras que se realizó minipreparaciones	72
Figura 3.19. PCR de las colonias en glicerol de diferentes colonias de la cepa PGV2260 transformadas con el pHTT203:: Δ -354- <i>HMGR</i>	74
Figura 3.20. Explantes de hipocótilo y raíz de <i>Pentalinon andrieuxii</i> en propagación, transformados con el gen truncado de la <i>HMGR</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
Figura 3.21 Formación de callos, brotes a partir de explantes de <i>Pentalinon andrieuxii</i> transformados con gen truncado de <i>HMGR</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	77

Figura 3.22 PCR para gen 35S-5' <i>HMGR</i> truncada.	78
Figura 3.23. Perfil cromatográfico por CCD de los extractos de polaridad media obtenidos a partir de plántulas <i>in vitro</i> transformadas con el gen truncado de <i>HMGR</i>	80

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Especies dicotiledóneas donde se han encontrado diferentes genes de <i>HMGR</i> (Hemmerlin, <i>et al.</i> 2012.Modificada)	16
Cuadro 2.1 Reactivos y concentraciones para el buffer X-Gluc	44
Cuadro 3.1 Lote de semillas de <i>P. andrieuxii</i> con fecha de 4 de febrero de 2014	53
Cuadro 3.2. Frecuencia de infección (protocolo Yam-Puc, 2012).....	60
Cuadro 3.3. Frecuencia de infección (protocolo Gómez, 2012).....	62
Cuadro 3.4. Resultados de la transformación estable con el protocolo Gómez.....	65
Cuadro 3.5. Diferencia entre los protocolos de transformación	67
Cuadro 3.6. Resultados de la transformación de <i>Pentalinon</i> con el gen truncado de <i>HMGR</i>	73

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µM	Micromolar
AC	Acetil CoA
AAC	Acetoacetil CoA
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIB	Ácido indolbutírico
ATP	Adenosin trifosfato
Cm	Centímetro
D.O.	Densidad óptica
Dhfr	Dihidrolato reductasa
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
FPP	Farnesil difosfato
FPS	Farnesil difosfato sintasa
G	Gramo
GPP	Geranil difosfato
GUS	β- glucuronidasa
H	Horas
HMG-CoA	Hidroxi metilglutaril CoA
HMGR	Hidroxi metilglutaril CoA reductasa
HMGS	Hidroxi metilglutaril CoA sintasa
IPP	Isopentenil difosfato
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
Mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MVA	Mevalonato
MVC	Mevalonato cinasa
NADPH	Nicotina mida adenina di nucleótido fosfato
NLS	Señales de localización nuclear
nptII	Neomicina fosfotransferasa
° C	Grado Celsius
Pb	Pares de base

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMVC	Fosfomevalonato cinasa
PMD	Difosfomevalonato descarboxilasa
PPMV	Difosfomevalonato
Rpm	Revoluciones por minuto
TDZ	Thidiazuron

RESUMEN

La transformación genética de plantas es una herramienta que se ha ido desarrollando en el transcurso de los últimos años, que permite realizar modificaciones en el genoma de las plantas que han sido utilizadas como modelo de estudio. Las modificaciones que adquieren son diversas, entre éstas están la resistencia al estrés por causas ambientales, la resistencia a patógenos o herbicidas, la producción de pigmentos que naturalmente no son sintetizados por la planta, y la sobreproducción de metabolitos secundarios, entre otros. Estas modificaciones pueden contribuir al mejoramiento genético de la especie en cuestión.

Un modelo susceptible a la transformación es *Pentalinon andrieuxii*, perteneciente a la familia de las *Apocynaceae*, una planta utilizada en la medicina tradicional debido a que posee propiedades biológicas. Estudios recientes demuestran que esta planta nativa produce derivados del ácido betulínico y esteroides derivados del colesterol, reconocidos por sus propiedades anticancerígena y leishmanicida, respectivamente, por lo que esta especie representa una fuente natural importante para extraer este tipo de metabolitos con potencial aplicación en la industria farmacéutica.

En este trabajo se estableció un protocolo de transformación genética estable para *Pentalinon andrieuxii* con el gen reportero *GUS* (pCAMBIA 2301), el cual se empleó para la transformación de la especie con el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis thaliana*, vía *Agrobacterium tumefaciens*. Se comprobó la transformación de 5 líneas mediante PCR amplificando un fragmento de 658 pb que representa el gen 35S-5'-*HMGR* truncada. A las líneas que dieron positivo a la prueba de PCR se detectó la presencia del ácido betulínico mediante CCD, donde se observó la presencia de ácido betulínico en las líneas transgénicas, al igual que otros compuestos.

ABSTRACT

The genetic transformation of plants is a tool developed in the last two decades, which allows modifications in the genome of plants. The modifications can be diverse, including resistance to abiotic stress, pathogens and/or herbicides, production of pigments that naturally are not synthesized by the plant, the overproduction of secondary metabolites, among others. These modifications can contribute to the genetic improvement of the species and add economic value.

A plant model susceptible of transformation is *Pentalinon andrieuxii*, belonging to the family of the Apocynaceae used in the traditional medicine due to the fact that it possesses biological properties. Recent studies show that this native plant produces derivatives of betulinic acid and sterol derivatives of cholesterol, known for their anticancer properties and Leishmanicidal respectively, so that this species represents an important natural source to extract this type of metabolites with potential application in industry pharmaceutical.

In this work, a protocol of genetic stable transformation for *Pentalinon andrieuxii* with the gene reporter GUS (pCAMBIA 2301) was established. We used this protocol for the transformation of the species with the gene truncated of the *HMGR* of *Arabidopsis thaliana*, via *Agrobacterium tumefaciens*. The transformation of five lines was verified by PCR amplifying a 658 bp fragment representing the 5'-35S truncated *HMGR* gene. The lines that were positive for PCR test for the presence of betulinic acid was detected by CCD, where the presence of betulinic acid in the transgenic lines was observed, as well as other compounds

INTRODUCCIÓN

Pentalinon andrieuxii, es una planta nativa que se puede encontrar en la Península de Yucatán. En ciertas comunidades se ha empleado las hojas y raíces de la planta para contrarrestar algunas enfermedades, entre la que destaca la llamada "úlceras del chiclero" causada por el protozoo de la familia *Leishmania sp.* Estas propiedades medicinales de la planta se deben a su síntesis de metabolitos secundarios con actividad biológica. Hasta ahora, de *P. andrieuxii* se han identificado esteroides, además de ácido betulínico y sus derivados; este último metabolito posee diversas actividades biológicas, incluyendo antiviral (herpes simple y VIH), antimalárica, antibacteriana, antiinflamatoria y anticancerígena.

Actualmente se han desarrollado técnicas para la producción masiva de metabolitos secundarios, una de estas técnicas es la transformación genética de plantas. Esta herramienta tiene el objetivo de incorporar ADN exógeno a una célula, con el fin de conferir una característica nueva.

En esta investigación se estableció un protocolo de transformación estable para *P. andrieuxii* con el plásmido pHTT203 vía *Agrobacterium tumefaciens*, el cual que contiene el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis thaliana* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La *HMGR* es una enzima clave en la biosíntesis de isoprenoides citoplásmicos.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1. *Pentalinon andrieuxii*, (Müll. Arg) B. F. Hansen & Wunderlin

La familia *Apocynaceae* cuenta con plantas anuales o perennes, principalmente hierbas erectas o trepadoras, algunos árboles y arbustos, la mayoría de los integrantes están provistos de lactíferos constituidos por células individuales o ramificadas que producen látex lechoso, rojizo o transparente, el cual contiene glucósidos y alcaloides. Dentro de la familia *Apocynaceae* se encuentra el género *Pentalinon*, el cual tiene dos especies: *P. luteum* y *P. andrieuxii* (Juárez *et al.*, 2007).

Pentalinon andrieuxii (Figura 1.1) es conocida comúnmente como bejuco de la víbora, bejuco guaco o contrayerba. Durante mucho tiempo se le conoció con el nombre de *Urechites andrieuxii*, pero recientemente se le cambió a *Pentalinon*, su nombre más antiguo (Morales, 2005; Rzedowski *et al.*, 1998).



Figura 1.1 *Pentalinon andrieuxii*, (Müll. Arg) B. F. Hansen & Wunderlin

1.1.1 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Subfamilia	Apocynoideae
Genero	<i>Pentalinon</i>
Especie	<i>Andrieuxii</i>

Herbario Nacional URN: catálogo: IBUNAM: MEXU: PA898750

1.1.2. CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS

Es una planta trepadora que llega a medir hasta 6 metros de largo (Melchor *et al.*, 2005), floreciendo de junio a septiembre (Rzedowski *et al.*, 1998). Tiene tallos pilosos-híspidos, hojas opuestas, peciolo de 8 a 20 mm, canalículado del lado adaxial, lámina elíptica de 5-10 cm de largo y de 2-6 cm de ancho, corta y acuminado en el ápice, verde oscuro en el haz y gris verdoso claro en el envés, tiene de 4 a 7 nervaduras secundarias que junto con las terciarias forma un retículo fino conspicuo en el envés; inflorescencia en forma de cima escorpioide arqueada, con algunas ramificaciones dicotómicas de hasta 25 cm de largo, las cuales pueden tener hasta 15 flores, pedúnculo de 6 cm, pedicelos de 4 cm con unas brácteas diminutas; segmento de cáliz es ovado a deltoides de 3 a 6 mm, glabros provistos en la base de pocas o numerosas escamitas; corola de color amarillo de 7 cm, tubo de 0.8 a 1.7 cm de largo y de 2 a 3 mm de ancho, garganta de 2.5 a 3.5 cm de largo y hasta 12 mm de ancho, lóbulos oblicuos ovados de 10 a 23 mm; folículos (Figura 1.2) de 20 a 28 cm de largo y de hasta 7 mm de ancho; semillas numerosas (Figura 1.2)

subfusiformes de aproximadamente 7 mm de largo y 1 mm de ancho color cafés, en el extremo se ubica un penacho de pelos de hasta 2.5 cm en color café claro (Figura 1.3) (Rzedowski *et al.*, 1998).

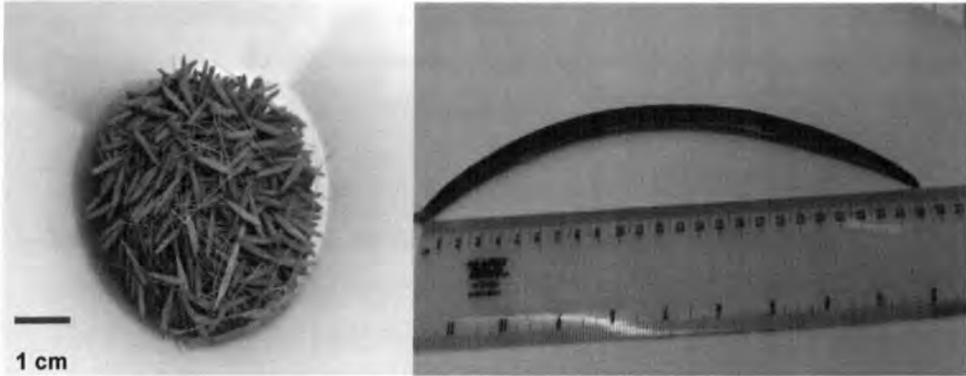


Figura 1.2 Semillas y Folículo de *Pentalinon andrieuxii*

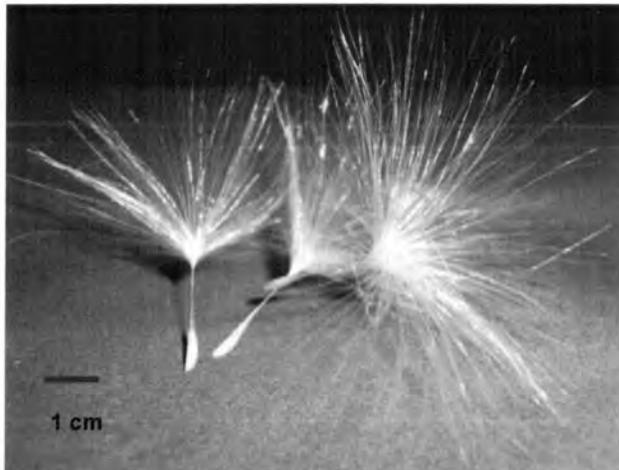


Figura 1.3 Semillas de *Pentalinon andrieuxii* con penacho de pelos

1.1.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Esta especie se encuentra distribuida en gran parte de la república mexicana, principalmente en los estados de Campeche, Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán. También se puede encontrar en Florida y la parte norte de Colombia (Juárez *et al.*, 2007).

1.1.4 USOS Y APLICACIONES

Pentalinon andrieuxii es usada en la medicina tradicional maya contra las mordeduras de serpientes; para esto se aplica directamente a la parte afectada un extracto que resulta de masticar la raíz o las hojas frescas. El látex es usado para aliviar los dolores de cabeza y los disturbios nerviosos (Pulido, 1993).

Estudios biológicos han demostrado que los extractos de esta planta tienen actividad antidepresiva, anti-inflamatoria y antiaterogénica (Lezama-Dávila *et al.*, 2007). Una de las aplicaciones importantes que tiene esta planta es para el tratamiento de la "úlceras del chiclero", la cual es una enfermedad cutánea que es provocada por un protozoo del género *Leishmania* sp. (Pan *et al.*, 2012).

La actividad biológica de los extractos de la raíz de *P. andrieuxii* se ha evaluado utilizando el ensayo de toxicidad al microcrustáceo *Artemia salina*, encontrándose una mayor actividad y rendimiento en el extracto etanólico (CL50 =165.95 µg/ mL y 20.43% de rendimiento) de la planta (CL50 =1202.26 µg/mL y 1.53% de rendimiento) (Melchor *et al.*, 2005).

Los extractos de la raíz de *P. andrieuxii* fueron evaluados también en cuanto a su efecto sobre el protozoo *Leishmania mexicana*. Los resultados indicaron que el extracto de hexano es muy eficaz para retrasar y detener la supervivencia del parásito (10 mg/ml del extracto hexánico es efectivo para matar 1 millón de promastigotes de *L. mexicana* cultivados *in vitro*) (Lezama *et al.*, 2007), confirmando la importancia de los extractos de esta planta para el tratamiento de la úlcera del chiclero.

Del extracto de hoja de *P. andrieuxii* se ha logrado extraer ácido betulínico, el cual es un

triterpeno pentacíclico de tipo lupano, que se ha reportado que tiene actividad antibacteriana, antifúngica, antiplasmódica, antiinflamatoria, antimalárica, anticancerígena, y antiviral (Moghaddam *et al.*, 2012). El ácido betulínico, junto con acetato de ácido betulínico, ácido betulínico, el ácido betulínico metil éster, y la betulina fueron evaluados por su actividad antiprotozoaria. Los resultados mostraron que la modificación de la posición C-3 aumenta la actividad leishmanicida mientras que la modificación de C-3 y C-28 disminuye la actividad (Dominguez-Carmona *et al.*, 2009).

En otras investigaciones realizadas con el extracto de la raíz de *P. andrieuxii* se logró aislar los trinorsesquiterpenoides, urechitol A y B. Las estructuras se identificaron mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos y la estereoquímica del urechitol A fue confirmada a través de un estudio de cristalografía de rayos X. Este es el primer informe sobre el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios con el esqueleto de trinorsesquiterpenoide (Yam-Puc *et al.*, 2009).

Los conocimientos fitoquímicos del género *Pentalinon* son limitados, con la existencia de una referencia de aislamiento e identificación de cardenólidos y alcaloides pirrolizidínicos que tienen actividad antitumoral y hepatotóxica (Yam-Puc *et al.*, 2011). También se ha reportado el aislamiento de dos pregnanos (esteroides) del extracto de la raíz de *P. andrieuxii*. Las estructuras de ambos metabolitos se establecieron utilizando métodos espectroscópicos y reacciones químicas de correlación (Yam-Puc *et al.*, 2011). Recientemente se reportó el aislamiento de dos pregnanos (pentalinonesterol y pentalinonsido), catorce esteroides, tres cumarinas y un triterpeno a partir del extracto metanólico de las raíces de *P. andrieuxii*. La identificación de la estructura de los pregnanos se realizó mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos. Todos los productos aislados fueron evaluados *in vitro* para observar su actividad antileishmanicida. El metabolito que resultó más efectivo frente a los promistigotes de *L. mexicana* fue el 6,7-dihidroneriedona. El análogo de colesterol, pentalinonesterol, junto con dos esteroides, el 24-metilcolest-4, 24(28)-dien-3-ona y el neridienona, también mostraron una actividad leishmanicida significativa. Los compuestos colest-4-en-3-ona y el colest-5, 20,24-trien-3 β -ol mostraron una fuerte actividad antileishmanicida contra amastigotes de *L. mexicana*, pero el colest-4-en-3-ona, resultó ser el más potente. Todos los compuestos aislados fueron evaluados por su citotoxicidad en los derivados no infectados de la

medula ósea de macrófagos, pero ninguno resultó activo hacia esta línea celular (Pan *et al.*, 2012).

Respecto a los cultivos *in vitro* de *P. andrieuxii*, recientemente se reportó la regeneración de plantas partiendo de la asepsia y germinación de las semillas para la obtención de raíces e hipocótilos, los cuales se utilizaron como explantes iniciales para la formación de brotes. En este trabajo se determinó que la concentración de 6.25 μM de TDZ es suficiente para la formación de dichos brotes en el explante de raíz, a la concentración de 13.5 μM de TDZ es la indicada para el explante de hipocótilo; los brotes que se formaron fueron enraizados con AIB a una concentración de 1 μM y la etapa de aclimatación fue mejor en el sustrato tierra-agrolita en una relación 1:1 sin esterilizar (Martin *et al.*, 2012).

Recientemente se publicó un protocolo de transformación genética transitoria de *P. andrieuxii*, en el cual se demostró que la especie es susceptible de transformarse en los explantes de raíz y hoja, los cuales presentaron el color azul característico debido a la actividad de la enzima β -glucuronidasa (gen reportero *GUS*) del tejido transformado (Yam-Puc *et al.*, 2012). Asimismo, se ha investigado la producción de ácido betulínico en cultivos de raíces transformadas de *P. andrieuxii* empleando elicitores (ácido jasmónico y sulfato de vanadilo) (Sandoval, 2014).

1.2 ISOPRENOIDES

Los isoprenoides (llamados también como terpenoides) constituyen uno de los grupos más diversos de productos naturales. En las plantas, los isoprenoides van desde metabolitos primarios esenciales y universales como los esteroides, carotenoides, quinonas y hormonas que pueden ser empleados como metabolitos secundarios que sirven de protección y comunicación en las plantas. Los isoprenoides son clasificados de acuerdo al número de carbonos que contienen: Los Monoterpenos (C10); Sesquiterpenos (C15); Diterpenos (C20); Triterpenos (C30); Tetraterpenos (C40), etc. Todos son sintetizados a partir del isopentil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), los cuales son producidos por 2 rutas: La ruta del Mevalonato y la ruta de 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXS) (Kirby *et al.*, 2009).

Se ha encontrado aplicaciones en la medicina y en la agricultura de muchos isoprenoides, algunos de estos productos se consideran de gran importancia para la bioingeniería debido a su alto valor en el mercado como productos comerciales y también en áreas como en la salud humana. Por ejemplo los carotenoides tienen muchas aplicaciones en los alimentos (β -caroteno), en la alimentación de los animales (astaxantinas) en cosméticos (tocoferoles), también son benéficos para la salud actuando como antioxidantes. Otro ejemplo es el sesquiterpeno artemisinina que posee actividad antimalarial, entre otros. (Kirby *et al.*, 2009).

El ácido betulínico (3 β -hidroxi-20(29)-lupaeno-28 ácido oico), es un triterpeno pentacíclico presente en varias especies de plantas. Tiene diversas actividades biológicas como antiretroviral, antibacterial, antimalarial, antiinflamatoria, anticancerígena y antioxidantes (Qian, *et al.*, 2011). Se ha estudiado también a los derivados del ácido betulínico y se demostró que algunos tienen actividad antiprotozoaria (Domínguez-Carmona *et al.*, 2009).

1.2.1. BIOSÍNTESIS DE LOS ISOPRENOIDES: VÍA DEL MEVALONATO

La biosíntesis de los isoprenoides comienza cuando una unidad de isopentenil difosfato (IPP) se condensa con una unidad de dimetilalil difosfato (DMAPP) para formar geranil difosfato (GPP), el cual es un intermediario que puede reaccionar con otra unidad de IPP para formar farnesil difosfato (FPP), que es precursor de los sesquiterpenos cíclicos o lineales. La unión de dos moléculas de FPP produce escualeno que es el precursor de los esteroides, esteroides y triterpenos (Kirby *et al.*, 2009, Hemmerlin *et al.*, 2012). La síntesis de IPP y el DMAPP, se da a través de dos vías: la vía del mevalonato, que se lleva a cabo en el citosol, y la vía de 1-deoxy-D-xilulosa-5-fosfato (DXP), que ocurre en los plástidos (Kirby, *et al.*, 2009), sin embargo recientemente se ha observado la presencia de isoprenoides en otros compartimentos dentro de la célula (Figura 1.4) como en la mitocondria y los peroxisomas.

La vía de mevalonato consiste en 6 pasos (Figura 1.5) que transforman a la acetil CoA a isopentenil difosfato (IPP) y el isómero dimetilalil difosfato (DMAPP). Esta vía comienza cuando la acetoacil CoA tiolasa une dos moléculas de acetil CoA (AC) para formar

acetoacetil CoA (AAC); enseguida, la 3-hidroxi-3-metilglutaril sintasa (HMGS) une el ACC con otra molécula de AC dando como resultado 3 hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA), que es reducida a Mevalonato (MV) por acción de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR). El MV es fosforilado 2 veces, primero por la mevalonato cinasa (MVC) y luego por la 5-fosfomevalonato cinasa (PMVC) para obtener el Difosfomevalonato (PMV) y finalmente el PMV es descarboxilado por la difosfomevalonato descarboxilasa (PPMD) a IPP, que es convertido a su isómero DMAPP por la IPP isomerasa. El DMAPP puede ser convertido a isopreno por acción de la isopreno sintasa o unirse a una molécula de IPP y comenzar con la biosíntesis de terpenos y sus derivados (Hemmerlin *et al.*, 2012).

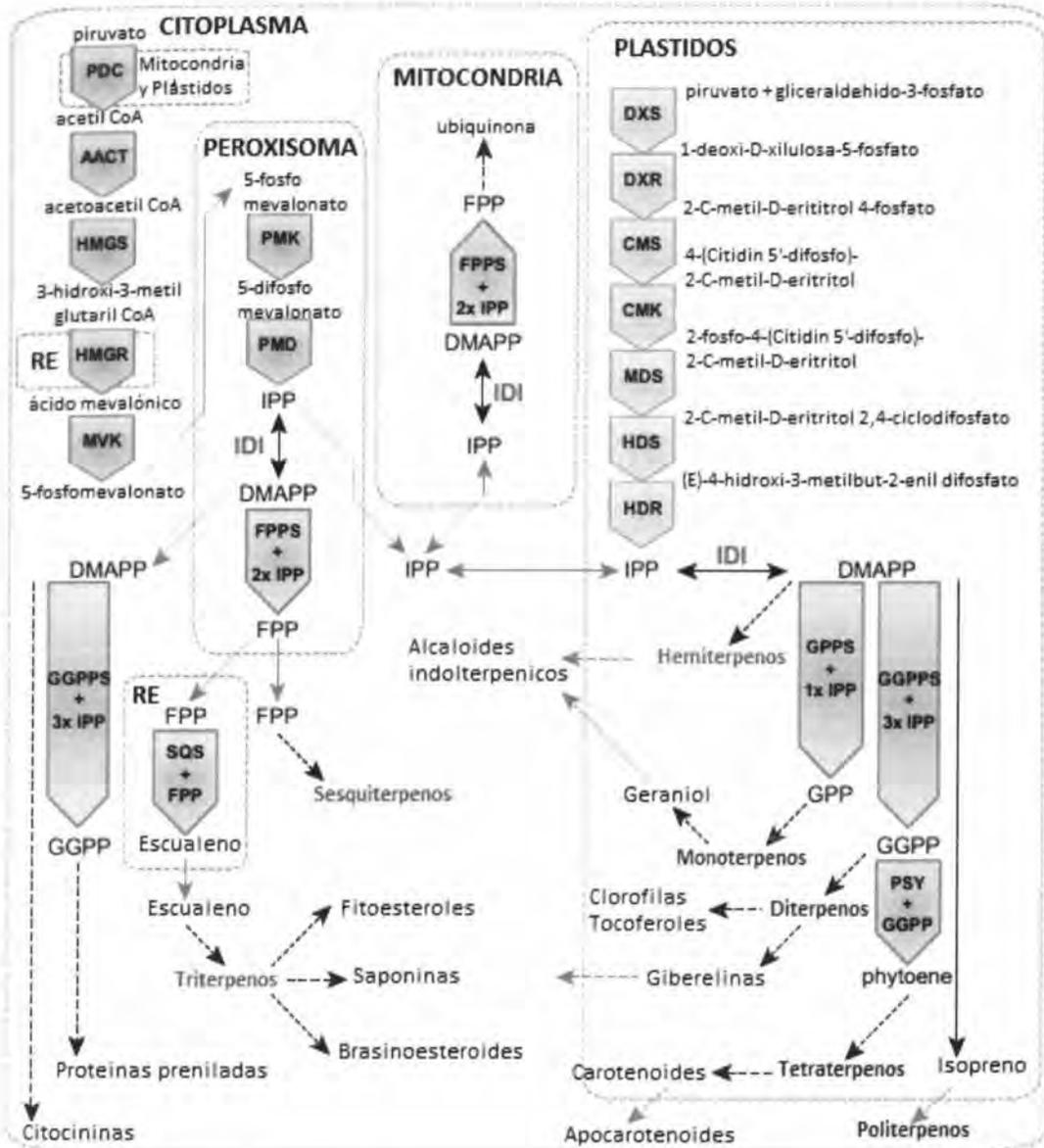


Figura 1.4 Biosíntesis de isoprenoides. Fuente: (modificada) Moses T. et al, 2013. Bioengineering of plant (tri) terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro*. New Phytologist. 2013, 27-43.

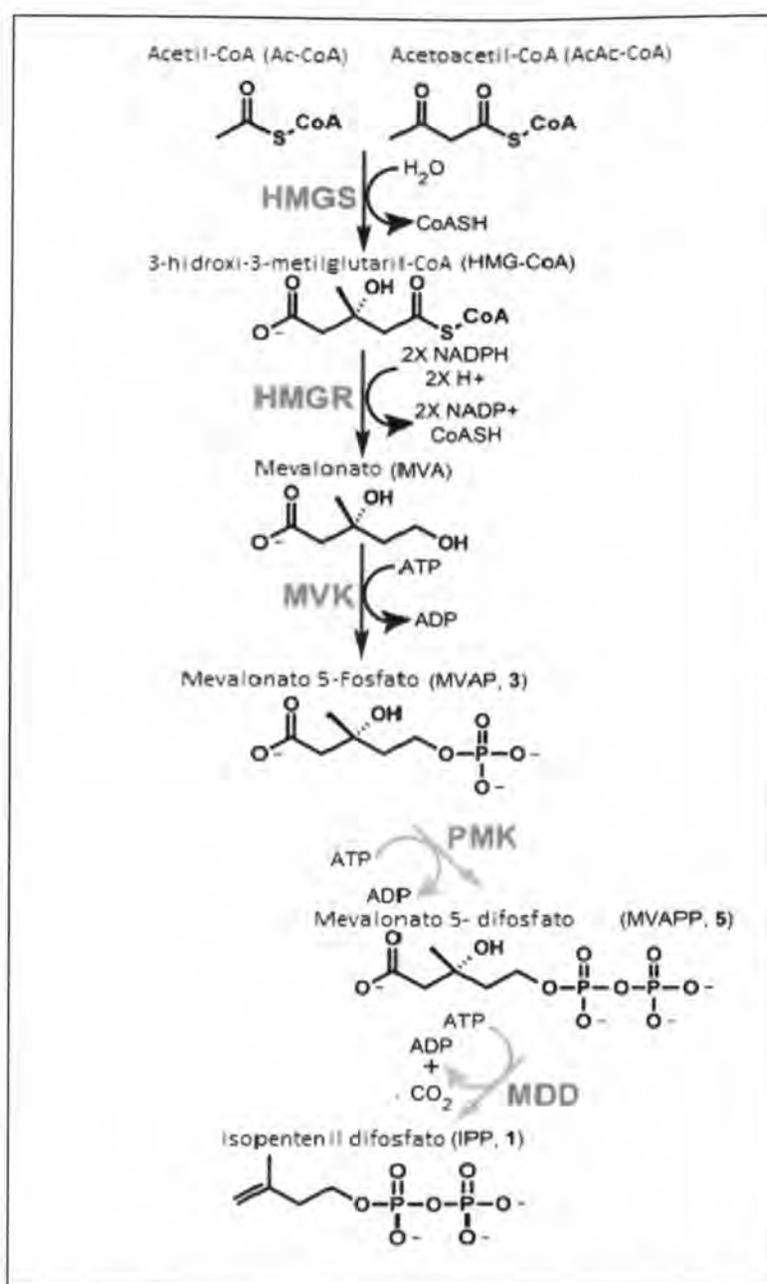


Figura 1.5 Vía del mevalonato, biosíntesis del IPP. Fuente: (modificada) Dellas, *et al.*/eLife 2013;2:e00672.

1.2.2. LA ENZIMA 3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL CoA REDUCTASA (HMGR)

La HMGR, es la enzima que cataliza la reducción de la HMG-CoA en Mevalonato, y utiliza como cofactor el NADPH (Figura 1.6).

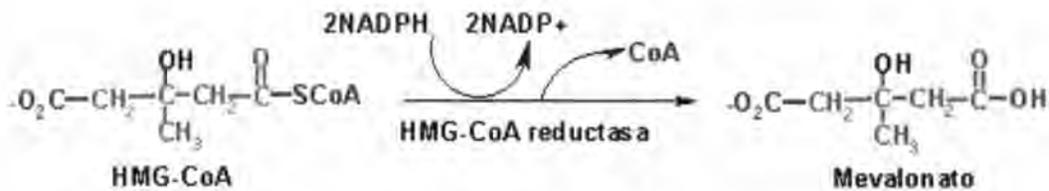


Figura 1.6 La biosíntesis del mevalonato es catalizado por la HMGR.

Esta enzima se encuentra unida a la membrana del retículo endoplasmático a través de un dominio transmembranal hidrofóbico amino terminal, en el caso de levaduras, animales y plantas. La HMGR es una pequeña molécula de 60 a 65 kDa que está constituida por dos segmentos que abarcan la membrana, adyacentes a la parte catalítica y vinculado por una secuencia de unión variable (Re *et al.*, 1997; Campos *et al.*, 1995.) (Figura 1.7). El dominio transmembranal no es indispensable para la actividad catalítica, esto es posible ya que la organización estructural de la enzima tiene una región exclusiva para la actividad catalítica (Hemmerlin *et al.*, 2012).

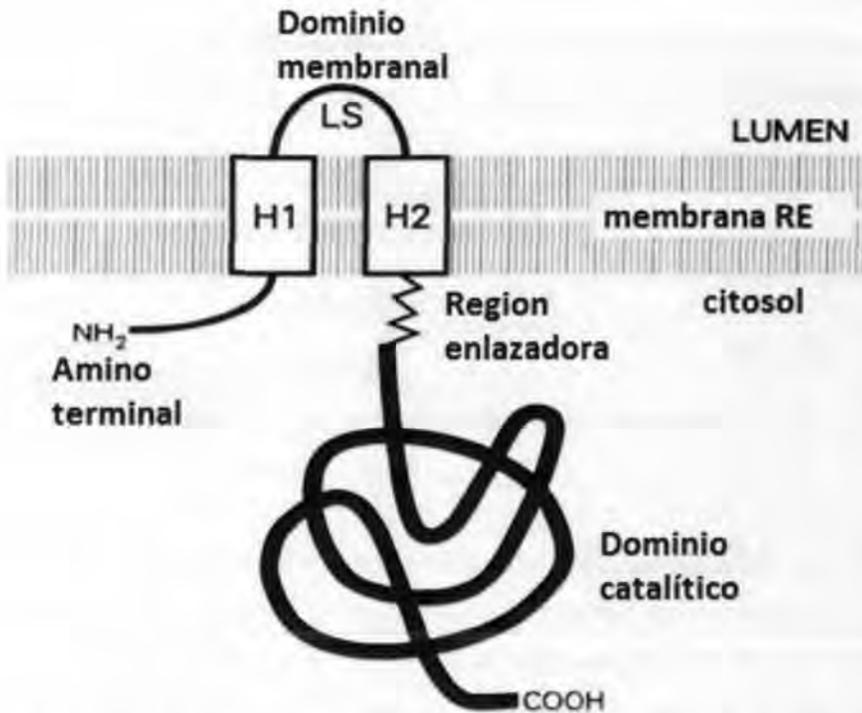


Figura 1.7 Topología de la HMGR en la membrana del retículo endoplásmico. Fuente: (modificada) Campos N., Boronat A. 1995. The Plant Cell. Vol 7 2163-2174.

La actividad enzimática de la HMGR está controlada por factores específicos que se pueden observar en la Figura 1.8, donde destacan los factores que activan la actividad catalítica como los metales pesados, la activación simbiótica, los factores abióticos, la regulación por retroalimentación; otros factores inhiben la actividad catalítica como la luz y también hay factores que inhiben y que también pueden activar la actividad de la enzima como la fosforilación, los factores bióticos y los factores endógenos. Estos factores de regulación pueden actuar desde el momento de la expresión génica (Hemmerlin *et al.*, 2012). En síntesis, la HMGR es la enzima clave en la vía del mevalonato, ya que su inhibición por varios factores internos o externos puede provocar que se apague la ruta metabólica y en consecuencia la biosíntesis de los productos finales.

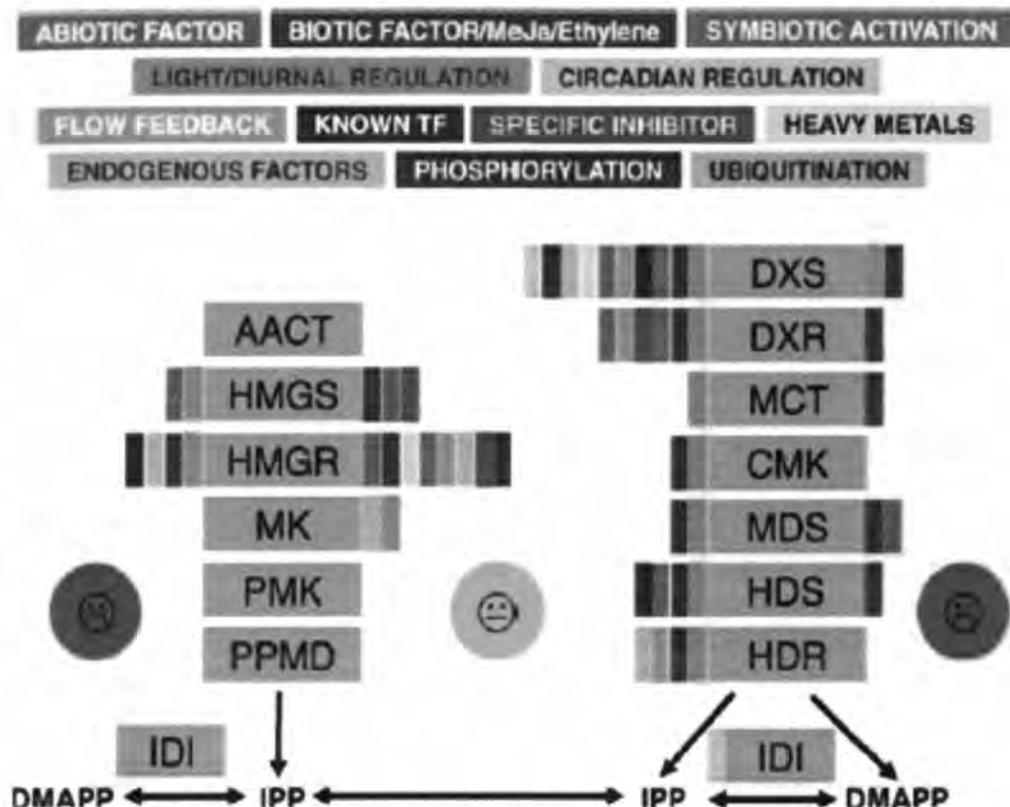


Figura 1.8 Factores que regulan la actividad de las enzimas en las rutas metabólicas. Donde las caritas rojas de los extremos representan regulación negativa y la carita verde representa la regulación positiva. Fuente: A. Hemmerlin et al. / Progress in Lipid Research 51 (2012) 95–148.

La *HMGR* está codificada por una familia de genes pequeños, cuya expresión está regulada a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona. En algunas plantas, pueden existir de una hasta cinco isoformas, cada una de ellas con una función específica exclusiva para cada planta. En el cuadro 1.1 se puede observar un resumen de algunas especies donde se han aislado genes que codifican para la *HMGR* (Hemmerlin et al., 2012).

Cuadro 1.1. Especies dicotiledóneas donde se han aislado diferentes genes de *HMGR* (Hemmerlin *et al.* 2012. Modificada)

Familia	Especie	Genes de <i>HMGR</i>
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>HMGR</i>
Astaraceae	<i>Artemisia annua</i>	<i>HMGR</i>
	<i>Tagetes erecta</i>	<i>HMGR</i>
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i>	<i>HMGR</i>
Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>HMGR1, HMGR2</i>
Euphorbiaceae	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>HMGR1, HMGR2, HMGR3, HMGR4, HMGR5</i>
Solanaceae	<i>Capsicum annum</i>	<i>HMGR1, HMGR2, HMGR3</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>HMGR1, HMGR2</i>
	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>HMGR1, HMGR2, HMGR3</i>
	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>HMGR1, HMGR2, HMGR3</i>
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	<i>HMGR1, HMGR2, HMGR3, HMGR4</i>

En la familia de las *Apocynaceae*, se ha publicado la existencia de un solo gen de la *HMGR* en *Catharanthus roseus* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1992). Por otro lado en *A. thaliana* se ha identificado dos isoformas de la *HMGR*, las cuales tienen funciones específicas. La *HMG1*, participa en la biosíntesis de esteroides y triterpenos, en la elongación celular y tiene alta regulación transcripcional; mientras que la *HMG2* participa

en la biosíntesis de esteroides y triterpenos, expresa bajos niveles en raíz e inflorescencias y presenta una represión transcripcional por inducción de heridas (Ohyama *et al.*, 2007).

Se ha sobreexpresado el gen de la *HMGR* en plantas para modificar la ruta biosintética de algunos metabolitos, pero se ha visto que la actividad de la enzima es variable, esto puede deberse a regulaciones post-transcripcionales. Otros trabajos han publicado que al sobreexpresar una isoforma soluble de la *HMGR*, aumenta los niveles de productos finales, por lo que se puede concluir que la regulación de esta enzima se debe al dominio hidrofóbico de unión a la membrana del retículo endoplasmático (Hemmerlin *et al.*, 2012).

Se ha realizado la transformación de *A. thaliana* con el gen completo de la *HMG1* de *A. thaliana* donde se observó un aumento en la expresión de los mensajeros en unas líneas transformadas, sin embargo al evaluar la actividad enzimática de las líneas que poseían un aumento de la expresión de la *HMGR*, se observó que esta no era tan elevada como se esperaba (Re *et al.*, 1995).

En *Artemisia annua* L, se sobreexpresó el gen de la *HMGR* completo (3 kb) de *Catharanthus roseus*, para aumentar la producción de artemisinina. Mediante los análisis realizados se comprobó que la actividad de la enzima fue mayor en las líneas transgénicas y por consiguiente la producción del metabolito aumentó (Nafis *et al.*, 2011)

Se ha observado que en *Lavandula latifolia* la sobreexpresión del gen de la *HMGR* truncado (sin el dominio N- terminal de unión a la membrana) de *A. thaliana*, aumentó de 2.1 y 1.8 veces en hojas y frutos, en comparación del control, aumentando la cantidad de esteroides como β -sitosterol y estigmasterol y no afectando la acumulación de carotenoides y clorofilas, como era de esperarse por ser la ruta de la DXP (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2007).

También se ha logrado modificar el contenido de fitoesteroides en las semillas de tabaco, con el gen de la *HMGR* truncado (carece del dominio de unión a la membrana) de *Hevea brasiliensis*. La actividad de la enzima aumentó 11 veces y el contenido total de esteroides aumentó 2.4 veces en comparación a las no transformadas. También se observó que la expresión de la actividad de la *HMGR* truncada generó nuevos fitoesteroides enriquecidos con materias primas que pueden proporcionar la base de nuevas oportunidades de

abastecimiento de esta clase de activos para reducir el colesterol (Harker *et al.*, 2003)

En *Digitalis minor*, se ha expresado el gen cDNA *HMG1* (At1G76490) de *A. thaliana* que codifica los aminoácidos 165 a 592 que incluye el dominio catalítico de la HMGR. La expresión constitutiva de este gen da lugar al aumento de esteroides y la producción de cardenólidos tanto en la producción de plántulas *in vitro*, como en las cultivadas en invernadero (Sales *et al.*, 2007).

Con los antecedentes antes mencionados se concluye que si un gen de una planta, se expresa en la misma planta, puede existir una co-supresión del gen nativo y por consiguiente afectar la ruta biosintética. Pero si se expresa el gen de una planta en otra, hay un cambio significativo, aumentando el contenido de isoprenoides en general, sin embargo al sobreexpresar un gen sin el dominio de unión a la membrana, hay mayor producción de compuestos finales como los esteroides, fitoesteroides, brasinoesteroides, entre otros, es decir, para tener mayor producción de compuestos finales, la mejor opción es que sea sin el dominio de unión y que pertenezca de una planta diferente.

1.3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

La transformación es una técnica de la ingeniería genética que ha abierto la posibilidad de mejorar genéticamente especies vegetales que son cultivadas por el hombre. La transformación genética de plantas consiste en introducir a su genoma, una información genética que confiera características sobresalientes (Pérez *et al.*, 1999).

Los sistemas de transformación para crear plantas transgénicas requieren procesos separados para la introducción de ADN clonado en células de plantas, para identificar o seleccionar las células transformadas y para la regeneración y la recuperación de plantas completamente desarrolladas y fértiles a partir de la célula transformada. Se han utilizado diferentes técnicas para introducir genes extraños en los genomas de plantas. Los más utilizados son: el sistema de *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* o *A. rhizogenes.*) y el bombardeo de microproyectiles cubiertos con ADN (Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

De acuerdo a Lombardi *et al.* (2005) los requisitos esenciales en un sistema de

transferencia de genes para la producción de plantas transgénicas son:

- La disponibilidad de un tejido incluya las células competentes para la regeneración de la planta.
- Un método para introducir ADN en las células regenerables.
- Un método de regeneración de las plantas transformadas con una frecuencia satisfactoria.

La recuperación de las plantas transformadas depende de la frecuencia de introducción de los nuevos genes a las células vegetales y de la capacidad de estas células para formar plantas completas bajo los sistemas de cultivo *in vitro*. La importancia de la transformación es que confiere a las plantas un mejor rendimiento agronómico, un contenido nutricional elevado, resistencia a enfermedades, y/o la producción de metabolitos secundarios de importancia industrial (Banta *et al.*, 2007).

1.3.1. SISTEMAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Entre los sistemas de transformación más comunes están los sistemas directos como el bombardeo de microproyectiles o biobalística, el cual consiste básicamente en disparar al tejido vegetal con micropartículas cubiertas con ADN (Altpeter *et al.*, 2005). La transformación mediada por el género *Agrobacterium* es un método indirecto, el cual ha permitido la modificación genética de varias especies de plantas, esta bacteria tiene la capacidad de transferir un segmento de ADN proveniente de un plásmido especializado (Lacroix *et al.*, 2010).

1.3.1.1 TRANSFORMACIÓN MEDIANTE BOMBARDEO DE MICROPROYECTILES O BIOBALÍSTICA

El bombardeo con micropartículas o biobalística es un método comúnmente usado para la transformación genética de plantas o de otros organismos. Millones de partículas metálicas recubiertas de ADN se disparan a la célula diana o tejidos utilizando un dispositivo biolístico o pistola de genes (Kikkert *et al.*, 2004).

El bombardeo de partículas emplea microproyectiles de alta velocidad para suministrar sustancias en las células de un tejido vegetal. Para la transformación genética, el ADN se recubre superficialmente sobre macropartículas de tungsteno o de oro por precipitación con cloruro de calcio y espermidina. Cuando el ADN entra a la célula del tejido vegetal se eluye de las micropartículas, si el ADN logra entrar al núcleo, es probable que ocurra la expresión transitoria y como consiguiente el transgén es incorporado de manera estable en los cromosomas del huésped (Kikkert *et al.*, 2004).

Una de las grandes ventajas de este método es que no tiene limitaciones biológicas, por lo que la mayoría de las especies vegetales se pueden transformar por este método; sin embargo, esta técnica tiende a generar grandes matrices que contienen transgenes reordenados, copias múltiples e incluso rotas. También hay poca evidencia de diferencias importantes en los niveles de inestabilidad del transgen y puede haber silenciamiento (Jackson *et al.*, 2012; Alpeter *et al.*, 2005).

1.3.1.2. TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación mediada por *Agrobacterium* sp. Ha revolucionado la investigación básica en biología molecular de plantas, al permitir la modificación genética de una variedad de especies vegetales. Los avances en diseño de vectores binarios y estrategias de selección, junto con mejoras en la tecnología de regeneración *in vitro* y de los mecanismos de administración de genes, han ampliado la gama de organismos, incluyendo granos, que se puede transformar (Banta *et al.*, 2007).

La transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*, implica la incubación de células o tejidos con la bacteria que conlleva una construcción de un gen extraño de interés. Este gen se integra en el genoma de la planta que es seleccionado y propagado a través del estado calloso que es inducido por las hormonas para la regeneración de una planta transgénica, en el cual cada célula es derivada de su progenitor modificado genéticamente (Banta *et al.*, 2007).

Agrobacterium tumefaciens infecta principalmente a plantas dicotiledóneas formando tumores, los cuales no requieren la presencia continua de la bacteria para incitar la

proliferación, demostrando que las células de las plantas han sido transformadas. La base molecular de esta transformación depende de plásmido Ti donde se encuentran los genes de virulencia. Una parte de este plásmido, el ADN-T que se transfiere al genoma de la planta, provoca la transcripción de genes que codifican para enzimas que catalizan la biosíntesis de reguladores de crecimiento responsables de la formación del tumor en la planta. Esta capacidad de transferencia que tiene *A. tumefaciens* ha sido útil para adoptarlo como una herramienta de transformación, ya que se ha desarrollado como un vector génico que se puede manipular para transferir genes de interés al genoma de la planta. Por otra parte los genes que provocan la formación de tumores, se eliminan asegurando que las células transformadas pueden regenerarse en plantas fértiles que transmiten el ADN modificado a toda la progenie (McCullen *et al.*, 2006).

1.3.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria fitopatógena aerobia Gram negativa que causa una enfermedad conocida como agalla de la corona que afecta a muchas especies dicotiledóneas. Esta enfermedad se caracteriza por la producción de tumores en el tejido vegetal atacado. De manera natural, el mecanismo de patogenicidad de esta bacteria se basa en la transferencia de información genética al genoma de la planta infectada (Gelvin, 2003).

Las especies de *Agrobacterium* tienen la capacidad de integrar de manera estable parte de su material genético dentro del genoma de la célula vegetal. Este proceso desencadena la formación de tumores en forma de respuesta (Tzfira *et al.*, 2000). La base molecular de esta transformación se deriva de las actividades de un gran inductor de tumores, el plásmido (Ti) de alrededor de 200 kb, en el cual residen las cepas de virulencia (McCullen *et al.*, 2006).

Una parte del plásmido Ti, el ADN-T (ADN de transferencia) que representa del 5 al 10 % del plásmido Ti, es transferido a la célula. La transferencia del ADN-T requiere tres elementos principales: a) las secuencias de repetición del borde de ADN-T (25 pb) que orientan y alinean la región que será procesada a partir del plásmido Ti; b) los genes *VIR* localizados dentro del plásmido Ti; y c) varios genes (cromosomas de virulencia [chv] y

otros genes) localizados en los cromosomas bacterianos (Lan-Ying *et al.*, 2008). Esta integración produce enzimas que catalizan la biosíntesis de reguladores de crecimiento, la formación de conjugados aminoácidos-azúcares denominados opinas. Las opinas sirven como fuentes de carbono y nitrógeno a la cepa bacteriana, sin embargo cada cepa bacteriana produce sus opinas específicas (McCullen *et al.*, 2006).

1.3.3. PROCESO DE TRANSFERENCIA DEL ADN-T DE *Agrobacterium tumefaciens* A LA CÉLULA VEGETAL

El proceso de transferencia de los genes de *A. tumefaciens* a las células implica varios procesos esenciales (Figura 1.9) (Gelvin, 2010; McCullen *et al.*, 2006):

- **El reconocimiento químico del huésped y la activación de la expresión de genes de virulencia.** La adherencia de la cepa bacteriana a la planta es necesaria para que se transfiera el ADN-T y las proteínas Vir. Para que se una la cepa bacteriana a la célula se necesita una señal, la cual es transmitida por los exudados que libera la célula, los cuales son recibidos por las moléculas que activan los genes de virulencia. Este proceso tiene dos pasos la activación de los genes de virulencia y la unión de la célula huésped. Para la activación de los genes *Vir* se requiere la presencia de los genes *VirA* y *VirG*, los cuales tienen una homología significativa con los genes que codifican dos componentes del sistema de regulación, en el que responde un sensor cinasa a la señal de entrada y mediante la activación de un regulador de respuesta controla el estado de fosforilación del sensor. El sensor cinasa que se une a la membrana *VirA* hace que un residuo de histidina se autofosforile y transfiera el grupo fosfato a un residuo de aspartato en *VirG*. Los componentes que activan las señales para la expresión de *VirG* son los fenoles, los monosacáridos (aldosas), bajos niveles pH y de grupos PO_4 (Gelvin, 2010; McCullen *et al.*, 2006).
- **El reconocimiento físico y la interacción entre la bacteria y el huésped.** *VirA* es un dímero unido a la membrana de proteínas y puede estar ahí en ausencia de señales. Tiene tres dominios: un dominio de percepción fenólica denominado enlazador, el dominio cinasa el cual tiene la histidina que es fosforilada y un sitio

de unión de ATP y por último un dominio de receptores que tiene una homología de secuencia y el aspartato de la región N-terminal de VirG. Las señales de azúcares están asociadas con las proteínas ChvE, la cual tiene una homología significativa con una amplia gama de proteínas de unión de azúcares. Para la percepción física de los fenoles está asociada al dominio enlazador. Los receptores de pH a bajos niveles se asocia con el dominio periplásmico y a ChvE, pero aún no se ha definido con claridad; sin embargo la interacción de repuesta entre ChvE y VirA puede ser afectada por el pH. Cuando las señales son detectadas por sus respectivos dominios (presencia de azúcares, pH bajo, interacción de ChvE) y en presencia de acetosiringona, la expresión de los genes *Vir* se da sin ningún problema en grandes cantidades. (McCullen *et al.*, 2006; Gelvin, 2010).

- **Producción de sustratos a transferir y la maquinaria de transferencia.** Después de la activación de los genes de virulencia, *A. tumefaciens* trasfiere varias moléculas durante la infección incluyendo el ADN y proteínas. Para que las moléculas atraviesen la membrana se forma un complejo de transporte que le permite al paso. Este transporte es un complejo de las proteínas VirB (T4SS), el cual está compuesto de 12 proteínas (11 VirB y VirD4). Este complejo permite el paso a las proteínas VirE2 y VirE3, VirF, VirD5, y la hebra ADN-T-VirD2 (Gelvin, 2010; McCullen *et al.*, 2006.).
- **Transferencia de sustratos hacia la célula huésped.** Cuando se ha creado el complejo VirB/D4, las proteínas VirE2 y VirE3, VirF, VirD5 cruzan hacia el citoplasma de la célula huésped a través del complejo VirB/D4. También cruza el complejo ADN-T-VirD2, el cual es formado cuando VirD2 corta una hebra del ADN-T y se une de manera covalente al borde 5'. La proteína VirD2 juega un papel principal dentro del hospedero debido a que en su extremo C- terminal posee una secuencia de señal de localización nuclear (NLS), que le permite transportar al núcleo el complejo (ADN-T-VirD2) (Gelvin, 2012; McCullen *et al.*, 2006).
- **Movimiento de sustratos en el núcleo.** Cuando el complejo ADN-T-VirD2 se encuentra en el interior de la célula huésped, se asocian las proteínas VirE. Las cuales sirven de chaperonas para evitar que el complejo sea degradado en su

transporte al núcleo de la célula vegetal, esta proteína y otras como las Vip1 y las importina α interactúan para que la hebra de ADN-T llegue hacia el núcleo (Gelvin, 2012; Gelvin, 2010).

- **La integración del ADN-T en el genoma de la célula huésped.** Una vez que el ADN-T-VirD2 entra a la célula se dirige hacia el núcleo para la integración del ADN-T. Para incorporar el ADN-T se emplea una cinasa que fosforila VirD2 y también la subunidad mayor de la ARN polimerasa II. Esto permite que se reconozca la caja de unión TATA y comience la transcripción. Las histonas juegan un papel potencial en la orientación del ADN-T hacia los sitios de integración de la cromatina (Gelvin, 2012; McCullen *et al.*, 2006).

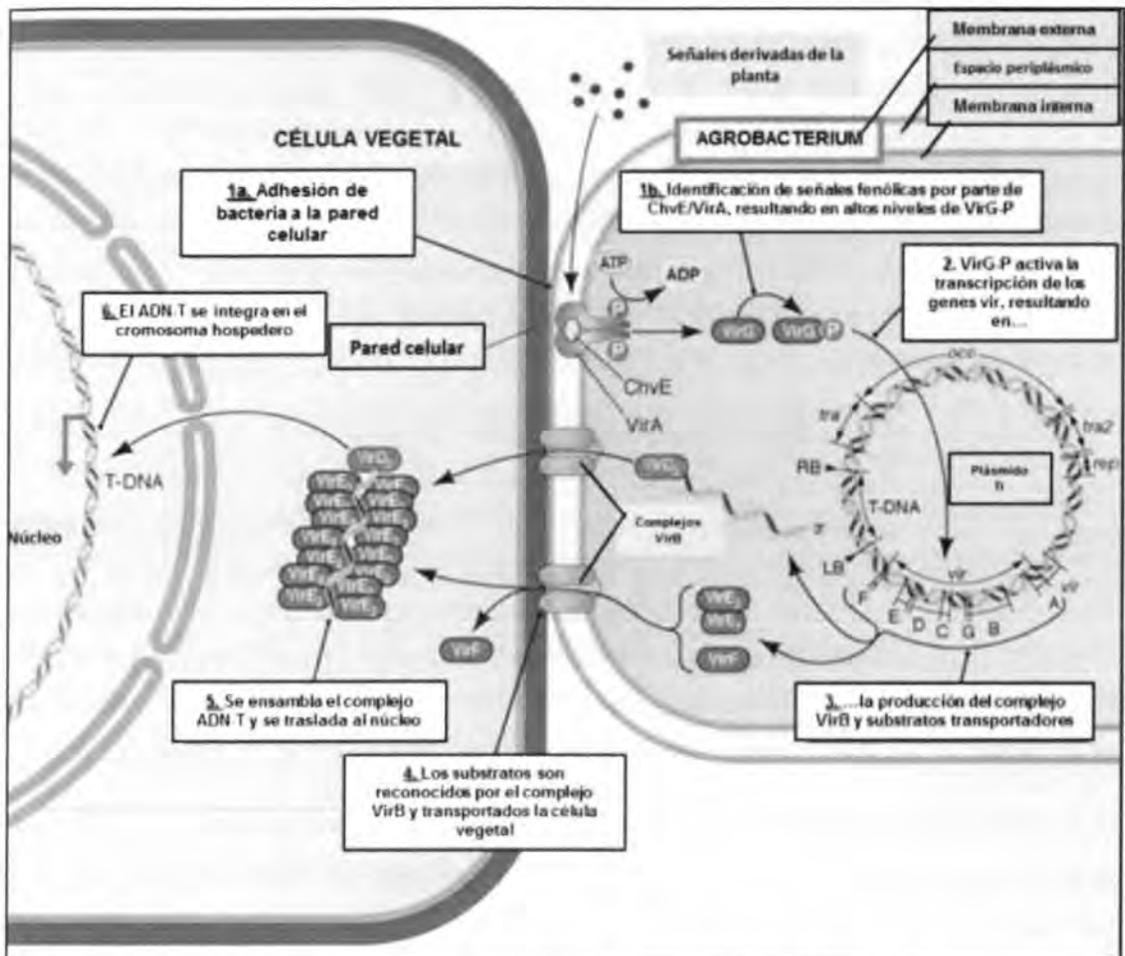


Figura 1.9 Mecanismo de transferencia del ADN-T hacia la célula. Fuente: (modificada) Colleen A. McCullen and Andre N. Binns/ Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2006. 22:101–27.

1.3.3.1. VARIABLES QUE FAVORECEN LA TRANSFORMACIÓN

La transferencia del ADN-T y la integración al genoma de la planta está influenciada por varios factores específicos de *A. tumefaciens* y del tejido de la planta. Entre los factores se pueden encontrar: las precondiciones, tiempo de inoculación, la densidad óptica (D.O), la temperatura, tiempo de cocultivo y medio de cocultivo (Opabode, 2006). Otras variables que pueden afectar la transformación es la cepa bacteriana (Kim, *et al*, 2009) y su crecimiento a diferentes concentraciones de acetosiringona (Pérez *et al.*, 2008).

Se han realizado varios experimentos para demostrar la eficiencia de la transformación por *A. tumefaciens*. En *A. thaliana* se ha demostrado que uno de los principales factores de la transformación es el tipo de la cepa bacteriana y la concentración, i.e. la D.O., y se ha observado que la cepa LBA4404 tiene una mejor actividad histoquímica del gen reportero *GUS* a una D.O de 0.6, en comparación con otras cepas y densidades (Kim *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2003).

Otra de las variables es la concentración de acetosiringona en el cocultivo. En *C. roseus*, se ha visto que puede ser óptima a una concentración de 100 μ M (Srivastava *et al.*, 2009).

Las condiciones de luz y oscuridad juegan un papel muy importante durante el cocultivo. En *A. thaliana* se mostró una respuesta óptima en condiciones de fotoperiodo (día corto 8h de luz y 16 h de oscuridad) (Kim *et al.*, 2009). También se ha observado una mejor respuesta en condiciones de oscuridad (Yam-Puc *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2008).

El tiempo de cocultivo se ha visto que en la mayoría de los casos es de tres días, como en *C. roseus* (Srivastava *et al.*, 2009), en *O. sativa* (Pérez *et al.*, 2008), y en *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2009).

En cuanto a la temperatura los casos varían; en *O. sativa* la referencia debe ir al final de la descripción del trabajo se concluyó que la temperatura de 20 °C permite el mayor porcentaje de transformación (Pérez *et al.*, 2008); en *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2009) los experimentos dieron resultado a una temperatura de 22 °C; los trabajos realizados en *C. roseus* (Srivastava *et al.*, 2009) fueron a 25 °C., lo cual demuestra que la temperatura es un factor que puede variar dependiendo de la especie e incluso la cepa de la bacteria.

Otras variables que favorecen la transformación son: el tipo de explante (Srivastava *et al.*, 2009), el efecto de los detergentes y la humedad (Kim, *et al.*, 2009), y el tratamiento osmótico y antinecrótico en el explante (Opabode, 2006).

El protocolo establecido por Gómez (2012) para *Tagetes erecta* utiliza una concentración de acetosiringona de 100 μ g/ml durante el crecimiento bacteriano, con un tiempo de cocultivo de 5 días, una temperatura de 25 °C en la oscuridad y a una concentración de 12 % de sacarosa.

1.3.4 MARCADORES GENÉTICOS

Los marcadores genéticos están agrupados en dos categorías: los marcadores de selección y los detectables.

Los genes marcadores de selección son genes que codifican un producto que permite a las células portadoras del gen de crecer en condiciones específicas, de manera que los transformantes pueden ser seleccionados. Los genes más utilizados son los que afrontan una resistencia a antibióticos. Las células o tejidos de plantas que contienen y expresan estos genes pueden sobrevivir en presencia de los respectivos antibióticos, e.g. las células de plantas que contiene el gen *NPTII* producirán la enzima neomicina fosfotransferasa (NPTII), haciendo las células resistentes a kanamicina. El gen *DHFR* que codifica la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) confiere resistencia a metotrexato a la célula huésped, en tanto que el gen *HTP* que codifica para la enzima higromicina fosfotransferasa (HPT), confiere resistencia a higromicina. También se encuentran los marcadores que confieren resistencia a herbicidas a la célula huésped, e.g. el gen *BAR*, que codifica para la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT), que confiere resistencia al herbicida bialafos (Wong, 2006).

Los genes marcadores detectables son genes que, como su nombre indica, codifican un producto que puede ser detectado rápidamente. En las células vegetales, la actividad transcripcional puede variar e interactuar con cambios ambientales, esto permite ejecutar pruebas rápidas para las funciones de regulación transcripcional de los promotores y potenciadores de la incorporación de un marcador genético que permite la detección histoquímica de la actividad enzimática de los tejidos vegetales. Estos genes son llamados indicadores, ya que pueden reportar la actividad bioquímica de ciertos elementos ubicados en las células, tejidos o plantas enteras. Estos genes pueden marcar las células transformadas con el propósito de investigar la expresión génica transitoria o para establecer la transformación y plantas transgénicas, e.g. el gen *GUS* de *E. coli* codifica la enzima β -glucuronidasa que se descompone en sustratos histoquímicos como el 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glucurónido, en un compuesto de color azul. Una fusión del gen *GUS* con el promotor permite la visualización espacial de la expresión génica y, por lo tanto, un análisis detallado de la expresión específica de la célula dirigida por las actividades de la transcripción de promotores individuales. Los genes de la luciferasa

(*LUC*) codifican una enzima que cataliza una reacción que produce luz en presencia de ATP, oxígeno y luciferina. Otras alternativas son el gen *Cat* bacteriano que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa (*CAT*) y el gen *LacZ* que codifica para la β -galactosidasa (Wong, 2006).

1.3.5. PLÁSMIDOS: pCAMBIA2301 pHTT203

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN de doble cadena que se encuentran naturalmente en varias especies de bacterias. Estos elementos genéticos extracromosomales se replican de manera independiente del cromosoma bacteriano y codifican para una gran variedad de enzimas que confieren resistencia a antibióticos y metales pesados, degradan complejos orgánicos y/o producen toxinas, etc. Los plásmidos han sido empleados como vectores o vehículos de clonación de moléculas de ADN foráneas que permiten el transporte y manipulación del mismo. La estructura modular de todo plásmido comprende básicamente de un origen de replicación autónomo que permite un alto número de copias; genes de resistencia a antibióticos; marcadores de selección y un sitio múltiple de clonación (Puerta *et al.*, 2005).

- pCAMBIA 2301

El plásmido pCAMBIA 2301 (Figura 1.10), de 11633 pb, tiene su sitio de origen, una región que le confiere resistencia a la kanamicina a la bacteria. Dentro de los bordes izquierdo y derecho, se encuentra la región del ADN-T que es la parte que se inserta en el genoma de la planta. En esta región está insertado el gen *GUS* (*UidA*) que codifica para la enzima β -glucuronidasa. El gen *GUS* posee el intrón de la catalasa, el cual permite la expresión de la β -glucuronidasa en células eucariotas, de tal forma que al momento de realizar la prueba histoquímica se asegura que no haya falsos positivos y realmente se esté observando un evento de transformación transitoria del tejido vegetal. También dentro del ADN-T se encuentra insertado el gen *NPTII*, el cual codifica a la enzima neomicina fosfotransferasa, que le confiere a la planta resistencia a la kanamicina. Ambos genes están bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

El gen *GusA* se ha clonado y secuenciado a partir de *E. coli* y codifica para la enzima β -

glucuronidasa, una enzima estable que tiene propiedades deseables para el análisis de los materiales transformados ya que se pueden hacer ensayos histoquímicos para localizar la actividad de *GusA* en las células y tejidos (Jefferson *et al.*, 1987).

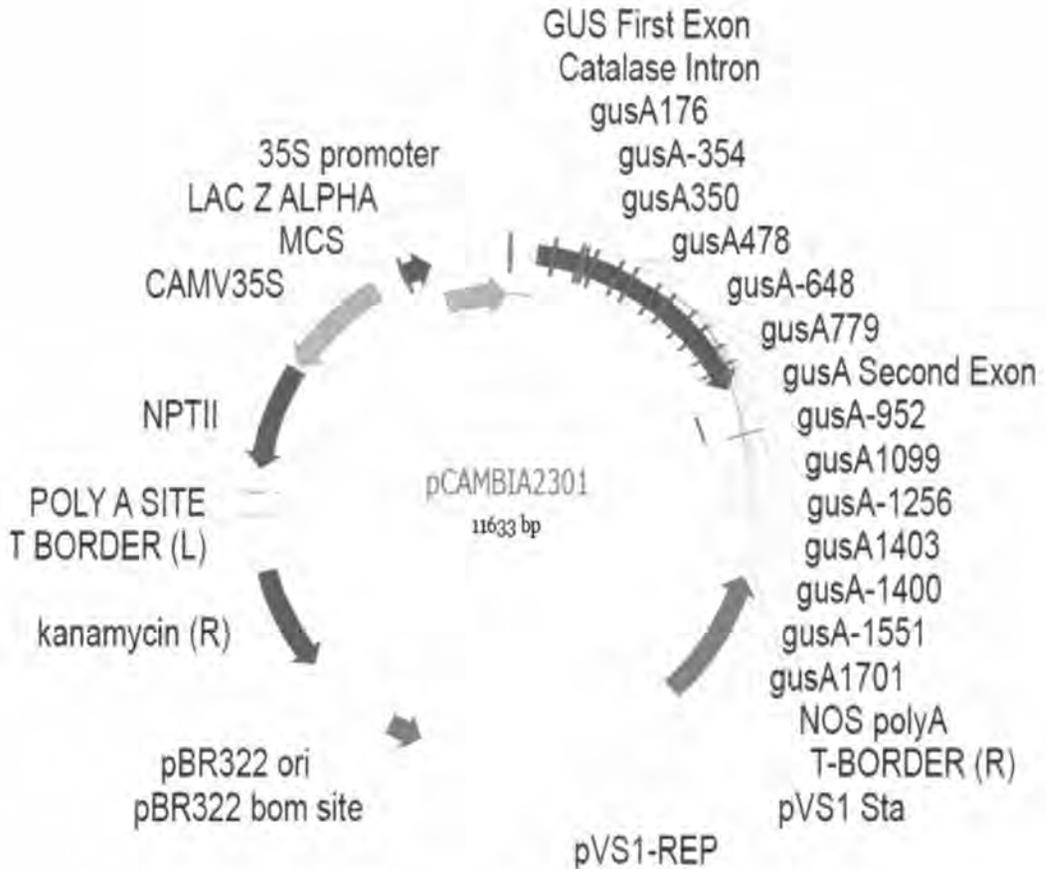


Figura 1.10 Plásmido pCambia 2301.
Fuente: www.cambia.org/daisy/cambia/2067.html

La enzima interactúa con un sustrato (en este caso el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónico, que es usado para la tinción histoquímica), para dar origen a una dimerización oxidativa, que produce un precipitado azul que se observa en las células transformadas. Otro sustrato que se puede utilizar es el 4-metil-unbeliferil- β -D-glucurónico, el cual forma un compuesto fluorescente al ser hidrolizado, esta respuesta puede ser medible por fluorimetría (Jefferson *et al.*, 1987).

- pHTT 203

El plásmido pHTT 203 (Figura 1.11) es un vector binario que está bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, finalizando con un solo sitio de BamHI que permite la subclonación de un gen estructural. El plásmido contiene el gen truncado Δ -354-*hmg 1* (sin el dominio N-terminal de unión a la membrana) de *A. thaliana* con las restricción BamHI en sus extremos. El gen que selecciona las planta transformadas es el *NPTII*, el cual codifica a la enzima neomicina fosfotransferasa, la cual confiere resistencia a kanamicina. Mientras que para la selección en bacterias, posee los genes que le confieren resistencia a la ampicilina, estreptomomicina o espectinomomicina.

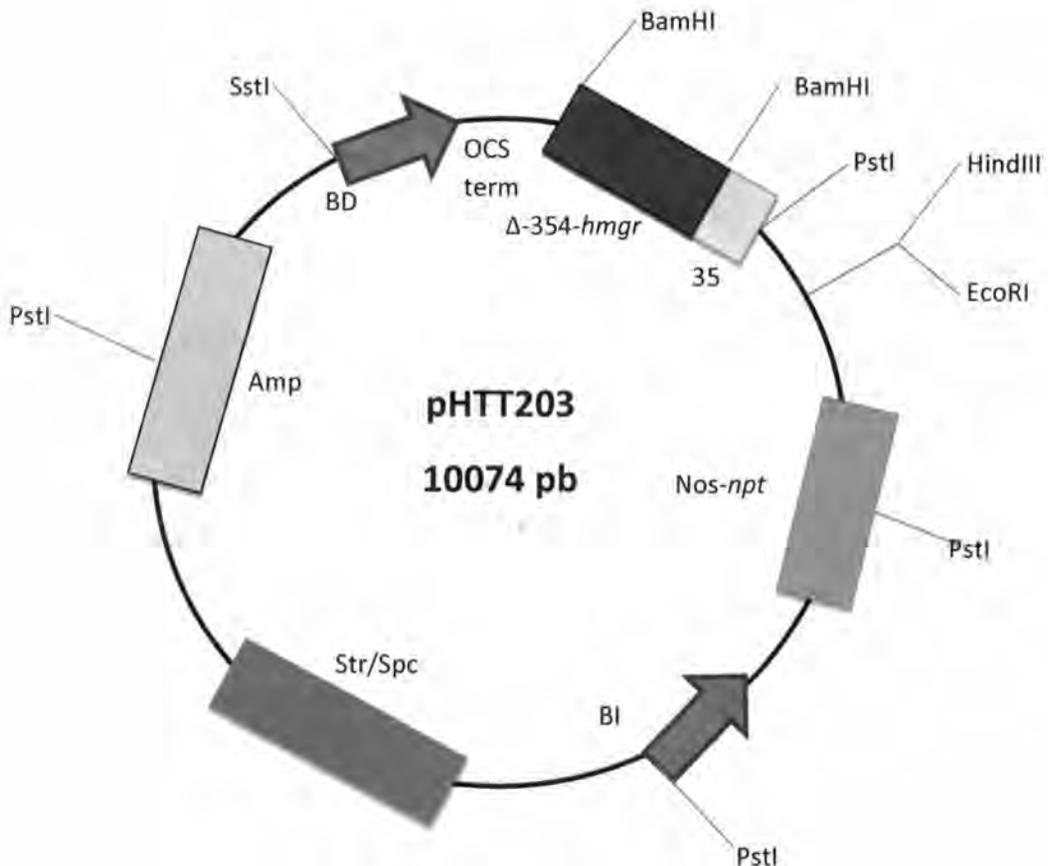


Figura 1.11 Plásmido pHTT 203:: Δ -354-HMGR. El gen truncado de la HMGR de *Arabidopsis thaliana* se encuentra clonado en el sitio de restricción BamHI en sus extremos.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Pentalinon andrieuxii, es una especie que se encuentra en la Península de Yucatán, donde se ha reportado el aislamiento de compuestos de origen isoprenoide, como el ácido Betulínico (ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28 oico), triterpeno pentacíclico tipo lupano, el cual tiene propiedades biológicas (antimalarial, antiviral, anticancerígenas, etc). También se ha reportado que esta especie es susceptible a la transformación vía *Agrobacterium*.

En este trabajo se pretende establecer las condiciones de transformación estable con el gen reportero *GUS* y sobreexpresar el gen truncado de la *HMGR* (sin el dominio de unión a la membrana del RE) de *A. thaliana* (Δ -354-*HMGR*) esperando observar modificaciones de la ruta biosintética de los isoprenoides y específicamente en el triterpeno ácido betulínico

1.5. OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Obtener plantas transformadas de *Pentalinon andrieuxii* con el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis thaliana*

1.5.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de transformación de explantes de hipocótilo y raíz de *P. andrieuxii* vía *A. tumefaciens*::pCAMBIA2301
- Verificar por medio de la prueba histoquímica de GUS, la obtención de brotes transgénicos
- Emplear las condiciones previamente establecidas con el gen reportero *GUS*, para

transformar los explantes de hipocótilo y raíz de *P. andrieuxii* vía *A. tumefaciens*::pHTT203:: Δ -354-*HMGR*

- Verificar mediante PCR la transformación de las plantas transformadas con el gen de la *HMGR* truncado.
- Detección y cuantificación de ácido betulínico en las plantas transgénicas.

1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se muestra en el esquema (1.12) en cual consiste en lo siguiente:

Primeramente se realizó la asepsia y germinación (1) de las semillas de *P. andrieuxii* para la obtención de los explantes de hipocótilo y raíz (2) y posteriormente se transformaron mediante la infección de *A. tumefaciens* (3) con la cepa LBA4404 que contiene al vector pCAMBIA 2301, que posee el gen reportero *GUS* y que permite el monitoreo de la transformación mediante la prueba histoquímica de *GUS* (4). De esta manera se seleccionaron las condiciones para establecer el protocolo de la transformación de los explantes de *P. andrieuxii*. Las condiciones previamente establecidas se emplearon para la transformación con el gen truncado de la *HMGR* (5). Siguiendo con el experimento se propagaron los explantes transformados de hipocótilo y raíz se incubaron en los medios selectivos, para obtener brotes de la especie, los cuales se propagaron (6) y se sometieron a un análisis de PCR (7) amplificando un fragmento del gen truncado de la *HMGR*, de esta forma se comprobó la transformación estable y finalmente se realizó la detección del ácido Betulínico (8) utilizando brotes transformados que resultaron positivos a la PCR.

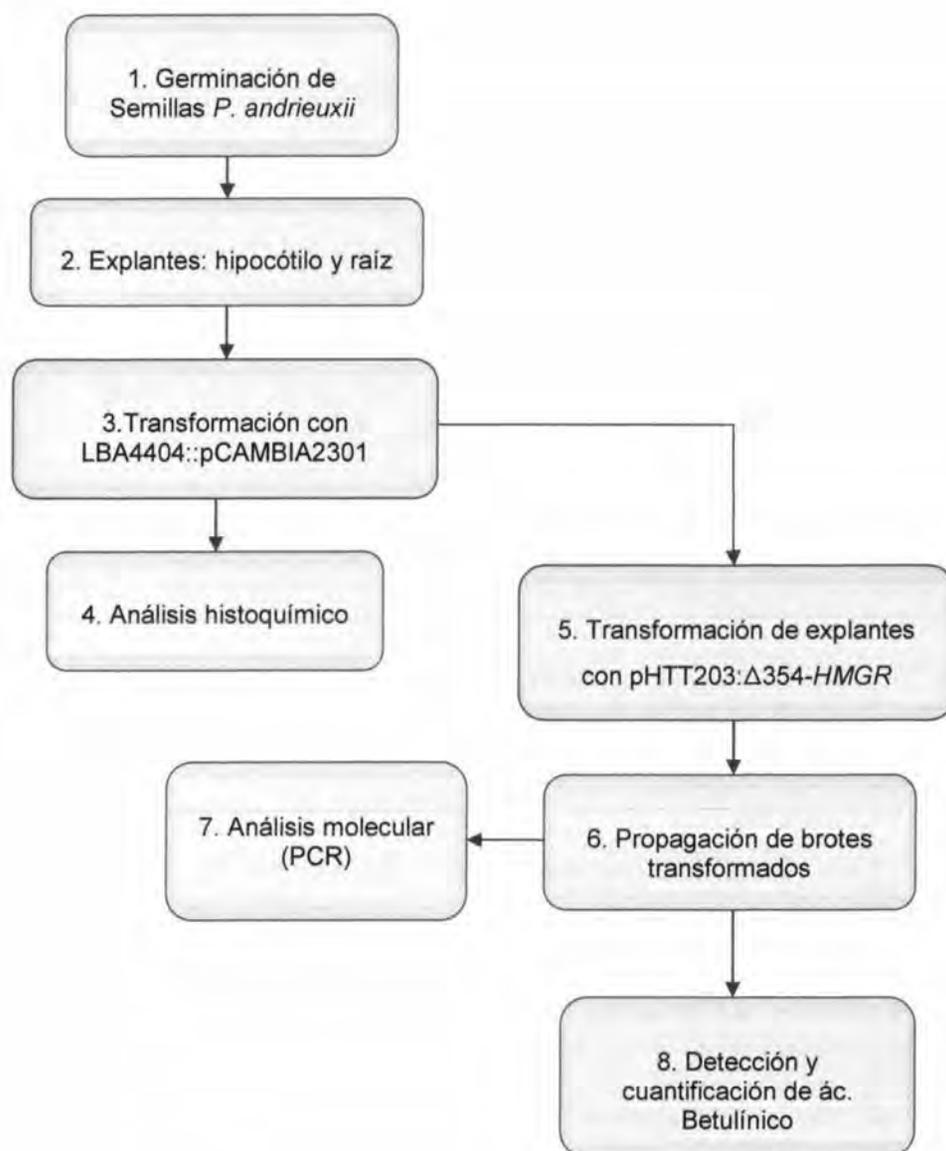


Figura 1.12 Esquema de la estrategia experimental

BIBLIOGRAFÍA

- Altpeter F., Baisakh N., Beachy R., Bock R., Capell T., Christou P., Daniell H., Datta K., Datta S., Dix P.J., Fauquet C., Huang N., Kohli A., Mooibroek H., Nicholson L., Nguyen T.T., Nugent G., Raemakers K., Romano A., Somers D.A., Stoger E., Taylor N., Visser R. (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding* 15 305-327.
- Banta L., Montenegro M. (2007). *Agrobacterium* and plant biotechnology. Chapter 3. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. Editorial Springer.
- Campos N., Boronat A. (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *The Plant Cell*. 7: 2163-2174.
- Dellas N., Thomas S., Manning G., Noel J. 2013. Discovery of a metabolic alternative to the classical mevalonate pathway. *eLife Biochemistry Genomics and evolutionary biology*. DOI: 10.7554/eLife.00672.
- Domínguez-Carmona D. B., Escalante-Erosa F., García-Sosa K., Ruiz-Pinell G., Gutiérrez-Yapu D., Chan-Bacab M. J., Giménez-Turba A., Peña-Rodríguez L. M. (2009). Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. *Phytomedicine* 17: 379-382.
- Gelvin S.B. (2012). Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome. *Frontiers in Plant Science*. 3 1-11.
- Gelvin S.B. (2010). Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Annual Review of Phytopathology*. 48: 45-68
- Gelvin S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (1): 16-37.

-
- Gómez Villa R. (2012). Transformación genética de *Tagetes erecta* L. con los vectores pCAMBIA 2301 y pBIN 19::CLA1 vía *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C
- Harker M., Holmberg N., Clayton J.C., Gibbard C.L., Wallace A.D., Rawlins S., Hellyer A.S., Lanot A., Safford R. (2003). Enhancement of seed phytosterol levels by expression of an N-terminal truncated *Hevea brasiliensis* (rubber tree) 3-hydroxy-2-methylglutaryl-CoA reductase. *Plant Biotechnology Journal*. 1:113–121.
- Hemmerlin A., Harwood J.L., Bach T.J. (2012). A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plants isoprenoids biosynthesis. *Progress in Lipid Research*. 51: 95-148.
- Jackson M., Anderson D., Birch R. (2013). Comparison of *Agrobacterium* and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants. *Transgenic Res*. 22:143–151
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* vol.6 no. 13 pp.3901 -3907,
- Juárez-Jaimes V., Alvarado-Cárdenas L., Villaseñor J. (2007). La familia Apocynaceae *sensu lato* en México: diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78: 459- 482.
- Kikkert J.R., Vidal J.R. Reisch B.I. (2004). Stable transformation of plant cell by particle bombardment/biolistics. *Transgenic plants: Methods and protocols*. Methods in Molecular Biology. Vol. 286. Edit. Humana Press Inc.
- Kim M.J., Baek K., Park C.M. (2009). Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*. 28: 1159-1167.

- Kirby J., Keasling J.D. (2009). Biosynthesis of plant isoprenoids: Perspectives for microbial engineering. *The Annual Review of Plants Biology*. 60: 335-355.
- Ko T.S., Lee S., Krasnyanski S., Korban S.S. (2003). Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivar: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical and Applied Genetics*.107: 439-447.
- Lacroix B., Zaltsman A., Citovsky V. (2010). Chapter I. Host factors involved in genetic transformation of plant cell by *Agrobacterium*. Blackwell Publishing Ltd. P. 3.
- Lan-Ying Lee and Stanton B. Gelvin. (2008). T-DNA Binary vectors and systems. *Plant Physiology* vol. 146. 2: 325-332.
- Lezama-Dávila C., Isaac-Márquez, A. P., Zamora-Cresencio, P., Uc-Encalada, M. R., Justiniano-Apolinar, S. Y., Ángel-Robles, R., Satoskar, A., Hernández-Rivero, L. (2007). Leishmanicidal activity of *Pentalinon andrieuxii*. *Fitoterapia*. 78, 255-257.
- Lombari, P., Ercolano, E., El Alaoui, H., Chiurazzi, M. (2005). Chapter 6.1 *Agrobacterium* mediated *in vitro* transformation. Editorial Springer. P. 251.
- Loyola-Vargas V., De la Peña C., Galaz-Ávalos R., Quiroz-Figueroa F. R. (2008). Plant tissue culture. Cap. 50, pag. 875. From: *Molecular Biomethods Handbook*, 2nd Edition. Edited by: J. M. Walker and R. Rapley. Humana Press, Totowa, NJ.
- Maldonado-Mendoza I., Burnett R., Nessler C. (1992). Nucleotide sequence of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*. 100:1613-1614.
- Martin Acosta, J.C. Avilés Berzunza, E. and Godoy Hernández, G. (2012). *In vitro* plant regeneration from explants of *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg). Hansen & Wunderlin. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C

- McCullen A.C. Binns A.N. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22:101-127.
- Melchor P., Carballo J., Hernández U. (2005). Posible actividad biológica del extracto de la raíz de *Pentalinon andrieuxii*. Universidad del Valle de México. Dirección General Académica. Episteme No.3. Dirección Institucional de Investigación e Innovación Tecnológica. UVM - Campus Chapultepec.
- Moghaddam M., Ahmad F., Samzadeh-Kermani A. (2012). Biological activity of betulinic acid: A review. *Pharmacology & Pharmacy*, 3, 119-123
- Moses T., Pollier J., Thevelein J., Goossens A. (2013). Bioengineering of plants (tri) terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro*. *New Phytologist* 27-43.
- Morales, J. F. (2005). Estudios en las Apocynaceae neotropicales XIV: Nuevas lectotipificaciones en los géneros *Hylaea* J.F. Morales y *Pentalinon* Voigt (Apocynoideae, Echiteae) *Lankesteriana* 5(2): 159-160.
- Muñoz-Bertomeu J., Sales E., Ros R., Arrillaga I., Segura J. (2007). Up-regulation of an N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase enhances production of essential oils and sterols in transgenic *Lavandula latifolia*. *Plant Biotechnology Journal* 5: 146-758.
- Nafis T., Akmal M., Ram M., Alam P., Ahlawat S., Mohd A., Abdin M.Z. (2011). Enhancement of artemisinin content by constitutive expression of the HMG-CoA reductase gene in high-yielding strain of *Artemisia annua* L. *Plant Biotechnol Rep.* 5: 53-60.
- Ohyama K., Suzuki M., Masuda K., Yoshida S., Muranaka T. (2007). Chemical

phenotypes of the *hmg1* and *hmg2* mutants of *Arabidopsis* demonstrate the *in-planta* role of HMG-CoA reductase in triterpene biosynthesis. *Chem. Pharm. Bull.* 55:1518-1521.

Opabode J.T. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review.* 1(1): 12-20.

Pan Li, Lezama-Dávila C. M., Isaac-Márquez A., Calomeni E. P., Fuchs J. R., Satoskar A. R., Kinghorn A. D.(2012). Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry* 82 128–135.

Pérez Molphe E., Ramírez R., Núñez Palenias H., Ochoa Alejo N. (1999). "Introducción al cultivo de tejidos vegetales". 1ª edición. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.

Pérez Bernal M., Coll Y., Pujol M., Armas R., Alfonso J., Hernández C., González A., Abreu D., Valdivia O., Delgado M. (2008). Las condiciones de cocultivo determinan la eficiencia de transformación de arroz (var. IACuba-28) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. *Revista Biotecnología.* 12 (3) 21-33

Puerta Bula, C.J., Urena Pinzón C.P. (2005). *Prácticas de biología molecular.* Edit. Pontificia Universidad Javeriana.

Pulido, M.T., Serralta, L. (1993), Lista anotada de las plantas medicinales de uso actual en el estado de Quintana Roo, México; Centro de investigaciones de Quintana Roo. Chetumal Quintana Roo. México, p. 105.

Qian K., Kim S.Y., Hung H.Y., Huang L., Chen C.H., Lee K.H. (2011). New betulonic acid derivatives as potent proteasome inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 21: 5944-5947.

Re EB., Brugger S., Learned M. (1997). Genetic and biochemical analysis of the transmembrane domain of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Journal of Cellular Biochemistry.* 65: 443–459.

-
- Re EB., Jones D., Learned RM. (1995). Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 7(5) 771-784
- Rzedowski J., Calderon G. (1998). Flora del bajo y regiones adyacentes. Fascículo 70, 27-28.
- Sales E., Muñoz-Bertomeu J., Arrillaga I., Segura J. (2007). Enhancement of cardenolide and phytosterol levels by expression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in transgenic *Digitalis minor*. *Planta Med* 73, 605-610.
- Sandoval Antúnez C. (2014). Producción de ácido betulinico en cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Srivastava T., Das S., Sopory S.K. Srivastava P.S. (2009). A reliable protocol for transformation of *Catharanthus roseus* through *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiology Molecular Biology Plants* 15 (1): 93-98.
- Tzfira T., Citovsky V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interactions. *Molecular Plant Pathology*. 1(4): 202-212.
- Wong S. Dominic W. (2006). Chapter 9. Cloning vectors for introducing genes into host cells. *The ABCs of Gene Cloning*, 2nd edition Edit. Springer.
- Yam-Puc A., Avilés Berzunza Elide., Chan Bacab M., Peña Rodríguez L., Godoy Hernández G. 2012. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Pentalinon andrieuxii* Müll. Arg. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3: 256-258.
- Yam-Puc A., Chee Gonzalez L. Escalante Erosa F., Athimoolam Arunachalampillai, Ola F.

Wendt, Olov Sterner, Godoy Hernández G., Peña Rodríguez L. M. (2011). Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry Letters*. 5: 45-48.

Yam-Puc A., Escalante Erosa F., Pech Lopez M., Chan Bacab J., Athimoolam Arunachalampillai, Ola F. Wendt, Olov Sterner, Peña Rodríguez L. M. (2009). Trinorsesquiterpenoids from the root extracts of *Pentalinon andrieuxii*. *Journal of Natural Products* 72: 745-748.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las semillas de *P. andrieuxii* fueron colectadas en Mérida en el año 2012; fueron extraídas de vainas secas de la planta de entre 22-27 cm, conteniendo entre 45-70 semillas cada una.

2.1.1 ASEPSIA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Pentalinon andrieuxii*

El protocolo de asepsia empleado fue el propuesto por Martin, 2012, con algunas modificaciones. Primeramente se pesaron 0.3 g de semillas (aproximadamente 55), se lavaron con Extrán al 5% durante 5 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de la espuma y seguidamente se lavaron con etanol al 70% por un tiempo de 5 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril 3 veces y seguidamente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial a una concentración de 60 % durante 20 minutos; las semillas se enjuagaron una vez con agua destilada estéril y se volvieron a lavar con hipoclorito de sodio comercial al 50% por 10 minutos. Se enjuagaron con agua destilada estéril hasta que esta se tornó transparente y se dejaron embeber durante 1 h con agua destilada estéril. Todo lo anterior, se realizó en la campana de flujo laminar.

Para la germinación se colocaron cinco semillas de *P. andrieuxii* en frascos de vidrio conteniendo 25 ml de medio PC (Phillips y Collins, 1979) al 50 % de su concentración de sales y a un pH de 5.5. Los frascos se incubaron durante 12 días en oscuridad a 25 °C y posteriormente se pasaron luz continua a 25°C.

2.2. TRANSFORMACIÓN DE *Pentalinon andrieuxii* VÍA *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.1. SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL DE KANAMICINA

Para seleccionar los explantes donde se regenerarían los brotes transformados fue necesario realizar una curva dosis respuesta de kanamicina para seleccionar la dosis

letal. Para esto se emplearon 10 concentraciones (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, y 50 $\mu\text{g/ml}$) de kanamicina (antibiótico de selección) y una concentración fija de 100 $\mu\text{g/ml}$ de cefotaxima (antibiótico para eliminación de la bacteria). Los explantes no transformados se colocaron en medio PC al 100% de sus sales adicionado con TDZ (6.25 μM para raíz y 13.5 μM para hipocótilo).

La concentración letal de kanamicina seleccionada (7.5 $\mu\text{g/ml}$ para raíz y 12.5 $\mu\text{g/ml}$ para hipocótilo) se incorporó al medio para la propagación de los explantes transformados.

2.2.2. PROCESO DE TRANSFORMACIÓN MEDIANTE LA INFECCIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens*

Protocolo establecido por Yam-Puc (2012) para *P. andrieuxii*.

Este consistió en picar con una palillo de dientes estéril una colonia de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* que contiene el vector pCAMBIA 2301 y utilizarlos para inocular 20 ml de medio YEB, conteniendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina y estreptomina y 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina; incubar el cultivo a 28°C en oscuridad total a 200 rpm durante 48 h; pasado el tiempo tomar una alícuota de 200 μl y diluir inoculándola a 10 ml de medio YEB con antibióticos; incubar en oscuridad total a 200 rpm durante 24 h a 28°C, aforar el cultivo a 20 ml de medio YEB con antibióticos y 200 μM de acetosiringona e incubar en oscuridad total a 200 rpm a 28°C por 5 horas, hasta alcanzar una D.O_{600} de 0.1 Abs. Los explantes se sumergieron en el cultivo bacteriano y se aplicó vacío durante 20 minutos (15 lb/pulg²), finalmente se eliminó el exceso de bacterias de los explantes y éstos se colocaron en medio de cocultivo [medio semisólido PC (Phillips y Collins, 1979) a 100% de su fuerza iónica adicionado con TDZ sin antibióticos]; los explantes se incubaron en el cuarto de cultivo por 3 días en oscuridad a 28 °C. Cuando concluyó el tiempo de cocultivo, los explantes fueron lavados con medio PC líquido con cefotaxima a 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 min, seguido de otro lavado sin antibiótico por 15 minutos y después se colocaron en medio de inducción (medio PC al 100 % de su fuerza iónica), adicionado con 6.25 μM de TDZ para raíz y 13.5 μM de TDZ para hipocótilo y 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina para hipocótilo y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina para raíz y 50 $\mu\text{g/ml}$ de cefotaxima para ambos.

Protocolo establecido por Gómez, 2012 para *Tagetes erecta*:

Este consistió en picar con una palillo de dientes estéril una colonia de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* que contiene el vector pCAMBIA 2301 y utilizarlos para inocular 20 ml de medio YEB, conteniendo 100 µg/ml de rifampicina y estreptomycinina y 50 µg/ml de kanamicina; incubar el cultivo a 28°C en oscuridad total a 200 rpm durante 48 h; pasado el tiempo tomar una alícuota de 500 µl y diluir inoculándola a 40 ml de medio YEB con antibióticos; incubar en oscuridad total a 200 rpm durante 24 h a 28°C, aforar el cultivo a 80 ml de medio YEB con antibióticos y 100 µM de acetosiringona e incubar en oscuridad total a 200 rpm a 28°C por 3 horas, hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0.6 Abs. Los explantes se sumergieron en el cultivo bacteriano y se aplicó vacío durante 15 minutos (15 lb/pulg²), finalmente se eliminó el exceso de bacterias de los explantes y éstos se colocaron en medio de cocultivo [medio semisólido PC (Phillips y Collins, 1979) a 100% de su fuerza iónica adicionado con TDZ sin antibióticos]; los explantes se incubaron en el cuarto de cultivo por 3 días en oscuridad a 28 °C. Cuando concluyó el tiempo de cocultivo, los explantes fueron lavados con medio PC líquido con cefotaxima a 100 µg/ml durante 30 min, seguido de otro lavado sin antibiótico por 15 minutos y después se colocaron en medio de inducción (medio PC al 100 % de su fuerza iónica), adicionado con 6,25 µM de TDZ para raíz y 13.5 µM de TDZ para hipocótilo y 12.5 µg/ml de kanamicina para hipocótilo y 7.5 µg/ml de kanamicina para raíz y 50 µg/ml de cefotaxima para ambos.

2.2.3. PRUEBA HISTOQUÍMICA DE GUS

La prueba histoquímica de GUS se realizó después de lavar los explantes transformados siguiendo el protocolo de Jefferson *et al.*, (1987):

Primero se preparó el buffer X-gluc, constituido por los compuestos descritos en el cuadro 2.1, y la solución se ajustó a pH 7 con NaOH 0.5 M. La solución de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-d-glucurónido) se preparó con DMSO a una concentración de 1 ml/ml. Los explantes se colocaron en estas soluciones y se les aplicó 15 minutos de vacío, luego se colocaron a 37 °C en oscuridad.

Cuadro 2.1 Reactivos y concentraciones para el buffer X-Gluc

Compuesto	Concentración
NaH ₂ PO ₄	100 mM
EDTA	10 mM
K ₃ Fe(CN) ₆	0.5 mM
K ₄ Fe(CN) ₆ · 3H ₂ O	0.5 mM
Triton X-100	0.2%

Al término de la incubación se decantó la solución de tinción y los explantes se lavaron con una mezcla de metanol y acetona (3:1), hasta que quedaron translúcidos o presentaron un tono menos intenso que los focos de transformación.

2.2.4. REGENERACIÓN DE BROTES, MANTENIMIENTO Y ENRAIZAMIENTO DE EXPLANTES TRANSFORMADOS CON EL GEN REPORTERO *GUS*

Para la regeneración de *P. andrieuxii* se utilizó la metodología propuesta por Martín, 2012, la cual consistió en inducir brotes a partir de los explantes de raíz e hipocótilo. Estos explantes se colocaron en medio PC al 100% de sus sales + TDZ (6.25 µM para raíz, 13.5 µM para hipocótilo) y a los transformados se les adicionó kanamicina (12.5 µg/ml para hipocótilo y 7.5 µg/ml para raíz) y cefotaxima (100 µg/ml) para eliminar la bacteria en ambos casos.

Los explantes se subcultivaron cada 30 días, i.e. los explantes se cambiaron medio fresco, con las mismas características que el anterior, hasta observar la proliferación de un callo, del cual emergieron los brotes.

Cuando se formaron los brotes, éstos se separaron para facilitar el proceso de elongación y se colocaron en medio PC al 100 % sin TDZ con 12.5 µg/ml para hipocótilo y 7.5 µg/ml para raíz de kanamicina y 50 µg/ml de cefotaxima, hasta que alcanzaron la altura ideal

para enraizar (3 cm). Las plántulas seleccionadas se aislaron y colocaron en medio PC a 100% de sales con cefotaxima 50 µg/ml adicionando AIB a una concentración de 1 µM.

2.3. TRANSFORMACIÓN DE *Pentalinon andrieuxii* CON EL GEN TRUNCADO DE *HMGR*

2.3.1 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO pHTT203:: Δ -354-*HMGR* Y TRANSFORMACIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens*

Para la purificación del plásmido pHTT203 donde se encuentra clonado el gen truncado de la *HMGR*, primero se realizó la preparación de células competentes de *E. coli* (DH5 α) y *A. tumefaciens* (PGV 2260) por el método de cloruro de calcio (CaCl_2). Un pre-inoculo de células de *E. coli* (DH5 α) se cultivó durante toda una noche en 3 ml de medio LB a 37 °C a 150 rpm. Se inoculó 1 ml del pre-inoculo en 100 ml de medio LB a 37 °C a 150 rpm hasta que alcanzó una D.O.₆₀₀ 0.5 de Abs; posteriormente se enfrió en hielo 10 minutos, se dividió en cuatro partes y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2.5 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1M en frío (1/10 del volumen inicial). Se dejó reposar en hielo por 20 minutos y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y la pastilla resuspendida en 0.25 ml (1/10 del volumen inicial) de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0.1 M: glicerol (85:15: v: v). Finalmente se distribuyó en alícuotas de 100 µL y se almaceno a 4 °C.

Por otra parte, para preparar células competentes de *A. tumefaciens* primero se realizó una estría cruzada en cajas Petri que contenían medio YEB adicionado con rifampicina y estreptomina (100 µg/mL) para seleccionar colonias aisladas de la bacteria. Se colocó en la incubadora a 28 °C en obscuridad por 48 horas.

De las colonias aisladas se tomó una colonia con un palillo de madera estéril y se realizó en pre-inoculo en 2 ml de medio YEB con antibióticos (rifampicina y estreptomina 100 µg/ml); el pre-inóculo se colocó en la incubadora a 200 rpm a 28 °C durante 18 horas. Transcurrido el tiempo 2 ml del pre-inóculo y se inocularon a 50 ml de medio YEB sin antibiótico y el cultivo se colocó en la incubadora a 200 rpm a 28 °C hasta que alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0.5 de Abs; posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, se

descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 mL de NaCl 0.15 M y se volvió a centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL de CaCl₂ 20 mM:10% glicerol. Finalmente se colocó en tubos eppendorf en alícuotas de 100 µL y se congeló con N₂ líquido y se almacenó a -80°C.

2.3.2. TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO DE BACTERIAS

Para la transformación de *E. coli* (DH5α) se tomó una alícuota de 100 µL de células competentes y se le adicionó 1 µg del plásmido pHTT203::Δ-354-HMGR, mezclando suavemente con la pipeta; la mezcla se incubó en hielo (4°C) durante 30 minutos, se incubó a 42 °C durante 3 minutos y se colocó nuevamente en hielo (4°C) durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó medio LB hasta un volumen de 1 mL y la mezcla se incubó a 37°C a 225 rpm por 1 h, se centrifugó a 5000 rpm durante 1 minuto y por último se resuspendió en 100 µL de medio LB y se plaqueó en cajas Petri con medio LB, adicionado con antibiótico de selección que es ampicilina a una concentración de 100µg/ml se incubaron por 24 horas.

Por otra parte también se realizó la transformación de *A. tumefaciens* PGV2260, la cual consistió en lo siguiente: se tomó una alícuota de 100 µL (previamente descongelada en hielo) de células competentes, se le agregó 1 µg del plásmido; la mezcla se colocó en hielo por 10 minutos, se congeló con N₂ líquido por 10 minutos y se incubó a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente se completó el volumen a 1 mL con medio YEB sin antibióticos y la mezcla se incubó a 28 °C a 200 rpm por 3 horas, se centrifugó a 6000 rpm durante 1 minuto y resuspendió la pastilla en 200 µL de medio YEB sin antibióticos; la pastilla resuspendida se plaqueó en cajas Petri con antibiótico de selección (ampicilina 100 µg/mL) y se incubó 28 °C por 48 horas.

2.3.3. PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO Y EXTRACCIÓN DE ADN (PLASMÍDICO Y GENÓMICO)

La purificación del plásmido se realizó utilizando el método de PEG 8000 el cual consistió en lo siguiente: una colonia de células se inoculó a 250 mL de medio LB y el cultivo se

incubó durante toda la noche a 37 °C y 200 rpm, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min y la pastilla se resuspendió en 5 mL de Birnboim 1 (Tris-HCl pH8 1M; EDTA 0.5 M; Glucosa H₂O 1 M), se agregaron 10 mL de solución Birnboim 2 (NaOH 4 N; SDS 10%) y la mezcla se agitó suavemente hasta que se observó una solución clara. Enseguida se agregaron 7.5 mL de solución Birnboim 3 (acetato de potasio 5 M; ácido acético glacial), se mezcló por inversión y posteriormente se incubó 30 minutos en hielo y centrifugó a 9000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se agregó isopropanol frío al sobrenadante (1:1), se incubó a - 20 °C por 1 hora y se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos a 4 °C; el sobrenadante se descartó y la pastilla se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 1.5 ml de buffer TE (10 mM Tris; 1 mM de EDTA pH 8), se adicionaron 1.5 ml de LiCl 5 M en frío, se mezcló en vortex y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo y se combinó con 1 volumen de isopropanol en frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 9000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente; la pastilla se secó a temperatura ambiente, se disolvió en 500 µL de buffer TE y se añadieron 20 µL de ARNasa (stock 10 mg/ml). La mezcla, se incubó a 37 °C por 30 minutos, posteriormente se agregaron 500 µL de NaCl 1.6 M con PEG 8000 al 13 % se mezcló y centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C. La pastilla se separó del sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente, se disolvió en 400 µL de buffer TE; la solución se combinó con 200 µL de Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó durante 2 minutos a 12000 rpm y se recuperó la fase acuosa (aprox. 400 µL). Se añadieron 40 µL de Birnboim 3 y 1 ml de Etanol absoluto, se mezcló e incubó una hora a - 20°C, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70 % (se centrifugó a 14000 por 10 minutos con cada lavada). Finalmente, se dejó secar la pastilla y resuspendió en 500 µL de buffer TE.

Las extracciones se realizaron para verificar de las transformaciones tanto de las bacterias como de las plantas.

Para la extracción de ADN plasmídico se realizó una Minipreparación de la siguiente manera: primero se tomó una colonia aislada con un palillo de dientes estéril y se inoculó en 3 ml de medio LB con el antibiótico de selección (ampicilina a una concentración de 100µg/ml); el cultivo se colocó en la incubadora a 200 rpm por un tiempo de 16 horas y

posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10 segundos todo el cultivo. La pastilla se resuspendió en 150 µL de buffer de resuspensión (EDTA 10 mM; Tris 50 mM ARNasa 1 µg/ml), se agregaron 150 µL de solución de lisis (NaOH 200mM; SDS 1%), se agitó hasta que la muestra se aclaró y enseguida se agregaron 150 µL de solución de neutralización (KOAc 3 M, pH 5.5). La mezcla se incubó 15 min en hielo, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 ml de Etanol absoluto en frío. La mezcla se incubó a -20 °C por 30 min, se centrifugó a 14000 rpm por 2 min y se lavó con etanol al 70 % dos veces (después de cada lavada se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos) y finalmente se resuspendió en 20 µL de agua para biología molecular.

En cuanto a la extracción de ADN genómico se utilizó la metodología descrita por Dellaporta (1983) con algunas modificaciones.

Se maceraron 200 mg de tejido fresco (hojas) en nitrógeno líquido hasta que se obtuvo un polvo fino, el cual se homogenizó en 1ml de buffer de extracción (Tris-HCl 1M, EDTA 1M, NaCl 1M, PEG 8000, Na₂S₂O₅ 0.5 %). Al homogeneizado se le adicionaron 100 µL de SDS al 20% y 200 µL de PVP al 5%, se incubó a 65°C por un tiempo de 20 min, se agregaron 500 µL de acetato de potasio 5 M y se incubó en hielo por 20 min; la mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 25 min y se colectó el sobrenadante al cual se le agregaron 10 µL de ARNasa, se incubó por 1 h a 37 °C, se agregaron 500 µL de alcohol isopropílico y la mezcla se incubó a -4° C por 1 h, se centrifugó a 12000 rpm por 20 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, se lavó la pastilla en 700 µL de buffer de redisolución (10 mM Tris; 1 mM de EDTA pH 8), se centrifugó a 12500 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 75µL de acetato de sodio 3 M y 500 µL de alcohol isopropílico; la mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70 . Finalmente la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua para biología molecular.

2.3.4 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE INTERÉS POR PCR

PCR, "Polymerase Chain Reaction" (Reacción en Cadena de la Polimerasa), es una técnica que tiene como objetivo sintetizar un fragmento de ADN. Esta prueba se realizó para amplificar un fragmento de 600 pb del gen *NPTII* de acuerdo con las condiciones

establecidas por Vanegas, *et al*, 2006. Las condiciones fueron: 94°C x 5 minutos para la desnaturalización, 30 ciclos de 94°C por minuto, 57°C x 45 seg y 72°C x 70 seg y una elongación final de 72 °C x 5 min, amplificando un fragmento de 600 pb. La reacción de PCR consta de los siguientes reactivos: buffer de PCR a 1X, 0.2 mM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 µM de los oligonucleótidos (forward y reverse) y dos unidades de la Taq polimerasa.

- Oligonucleótidos para *NPTII*

FORWARD 5'- TAT TCG GCA TTG ACT GGG CA-3'

REVERSE 5'- GCC AAC GCT ATG TCC TGA TA-3'

Para la amplificación del fragmento del gen truncado de la *HMGR* se diseñaron oligonucleótidos específicos donde se amplificara un fragmento del promotor 35S y del gen de la *HMGR* tal y como se encuentra clonado en el vector pHTT203, con el fin de que se diferencie del gen endógeno de *HMGR* que posee *Pentalinon*. Los oligonucleótidos amplificaron un fragmento de 658 pb del gen 35S-Δ-354-*HMGR* (181 pb del promotor 35S y 477 pb del gen truncado de *HMGR*).

- Oligonucleótidos para 35S-Δ-354-*HMGR*

FORWARD (35S) 5'- CCA ACC ACG TCT TCA AAG CAA G-3'

REVERSE (Δ-354-*HMGR*) 5'- CTT GCA GCC TCT GTT AGT GCT A -3'

Para encontrar la temperatura que amplificaría el fragmento se realizó un gradiente de temperatura 54, 55, 56, 57 y 58 °C y de acuerdo al tamaño esperado del fragmento, se utilizaron los mismos tiempos que se emplearon para amplificar el fragmento del gen *NPTII*.

2.3.5 DETECCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO

Para la detección del ácido betulínico se empleó el método de TLC (por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography) o CCD (cromatografía en capa delgada). Esta técnica

cualitativa permite determinar la presencia de compuestos, en este caso de ácido betulínico. Se utilizó la metodología empleada por Sandoval, 2014 con algunas modificaciones.

La parte aérea de las plántulas *in vitro* (39 a 119 mg) se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se colocó en viales previamente tarados y etiquetados. A cada vial se le adicionaron 1.5 ml de metanol (MeOH) y se dejaron por 24 horas. El contenido de cada vial se filtró y se desechó el material orgánico; el metanol se transfirió a un nuevo vial previamente tarado y etiquetado y se evaporó utilizando una corriente de nitrógeno gaseoso. EL extracto resultante se pesó y se disolvió al 1% con metanol.

Para el monitoreo en CCD, las muestras, incluyendo el estándar de sigma de ácido betulínico (855057), se aplicaron a una cromatoplaaca impregnada con gel de sílice (fase estacionaria), empleando un mezcla de Hexano/Diclorometano/Acetona (6:2:2.) como eluyente (fase móvil). Los componentes se visualizaron utilizando una reacción con ácido fosfomolibdico y calor, obteniéndose una separación de acuerdo a la polaridad de cada componente.

BIBLIOGRAFÍA

- Dellaporta S, Wood J, Hicks J. 1983. A plant minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Report 1:19-20
- Gómez Villa R. 2012. Transformación genética de *Tagetes erecta* L. con los vectores pCAMBIA 2301 y pBIN19::CLA1 vía *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de Licenciatura.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal vol.6 no. 13 pp.3901 -3907,
- Martin Acosta, J.C. Avilés Berzunza, E. and Godoy Hernández, G. (2012). *In vitro* plant regeneration from explants of *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg). Hansen & Wunderlin, Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C
- Phillips, G., y Collins G. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus culture of red clover. Crop Science. 19(1):59-64.
- Sandoval Antúnez C. (2014). Producción de ácido betulinico en cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Vanegas, P.E., Valdez-Morales M., Valverde M.E., Cruz-Hernández A., Paredes-López O. 2006. Particle bombardment, a method for gene transfer in marigold. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84 (3): 359-363.
- Yam-Puc A., Avilés Berzunza Elide., Chan Bacab M., Peña Rodríguez L., Godoy Hernández G. 2012. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of

Pentalinon andrieuxii Müll. Arg. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3: 256-258.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OBTENCIÓN DE EXPLANTES DE *Pentalinon andrieuxii*

Para la obtención de los explantes se realizó la asepsia y germinación de las semillas. Las semillas fueron colectadas el 4 de febrero de 2012 en la ciudad de Mérida (cuadro 3.1), este lote tuvo 13 folículos o vainas de entre 13 y 25 cm de largo con aproximadamente 50 semillas en cada uno de los folículos.

Cuadro 3.1 Lote de semillas de *Pentalinon andrieuxii* con fecha de 4 de febrero de 2014

# de folículo	Tamaño (cm)	# de Semillas
1	13.3	28
2	15.3	42
3	18.5	52
4	22.4	49
5	23	52
6	26.1	71
7	25.8	76
8	25.6	85
9	24.5	77
10	22	50
11	24.5	79
12	24.3	75
13	22.9	51

Total: 787 semillas

Una vez que se contabilizó el lote, se realizó la asepsia de las semillas de acuerdo al protocolo establecido por Martin (2012). Sin embargo, debido a problemas con contaminación, el protocolo se modificó cambiando la concentración del hipoclorito de sodio comercial al 60% y el tiempo de lavado a 20 min. Esta modificación resultó en un 80% de germinación; sin embargo, al combinar los lavados con hipoclorito de sodio comercial, i.e. lavar las semillas con cloro al 60% durante 20 minutos, enjuagar con agua destilada estéril y realizar un segundo lavado con cloro comercial al 50% durante 10 minutos eliminó los problemas de contaminación y permitió una germinación del 100% (Figura 3.1)

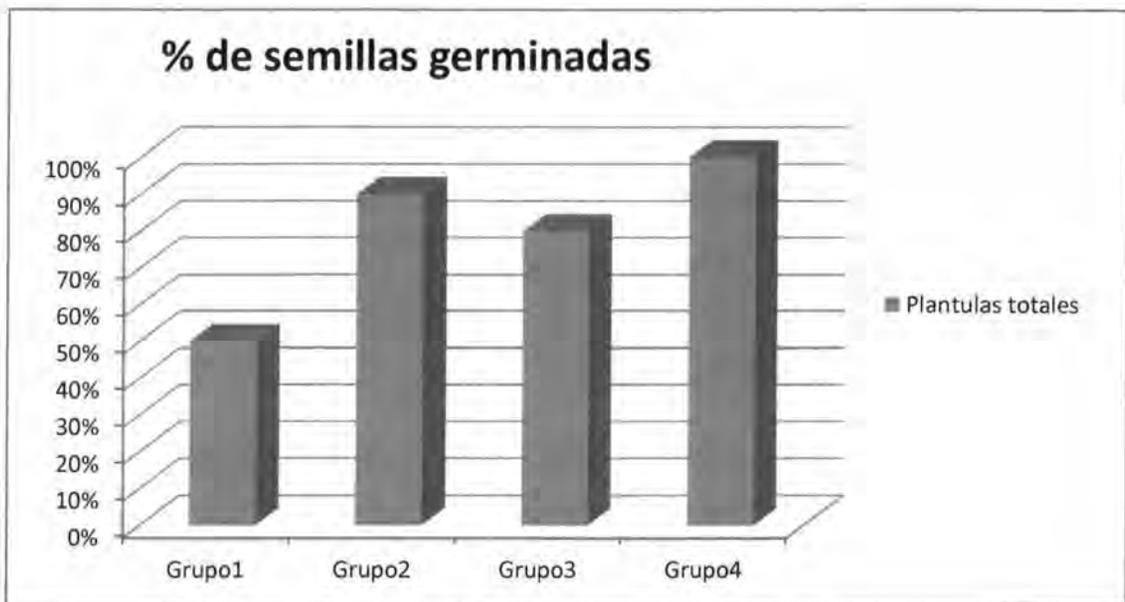


Figura 3.1. Porcentaje de semillas germinadas

3.2. TRANSFORMACIÓN DE *Pentalinon andrieuxii* VÍA *Agrobacterium tumefaciens*

3.2.1 Determinación de la concentración letal de kanamicina

Una vez obtenida la fuente de los explantes de *P. andrieuxii* (raíz e hipocótilo) se realizó la curva dosis respuesta de kanamicina para seleccionar la dosis letal a utilizar durante la

transformación de los explantes de hipocótilo y raíz. Al realizar la curva dosis respuesta de kanamicina con las concentraciones establecidas se obtuvo una respuesta que no fue la esperada ya que ni los explantes de raíz, ni los de hipocótilo, ni el testigo, no presentaron formación de callos-brotes a ninguna concentración de kanamicina. Se optó entonces por realizarla de nuevo, disminuyendo la concentración de cefotaxima a la mitad, i.e. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los resultados mostraron que los explantes en ambos tejidos (raíz e hipocótilo) formaron un callo de color verdoso desde el primer mes y a partir del tercer mes del experimento se observó la formación de brotes en el tejido de hipocótilo con una concentración letal de kanamicina es de 12.5 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3.2) en el tejido de raíz con una concentración letal de 7.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figura 3.3).

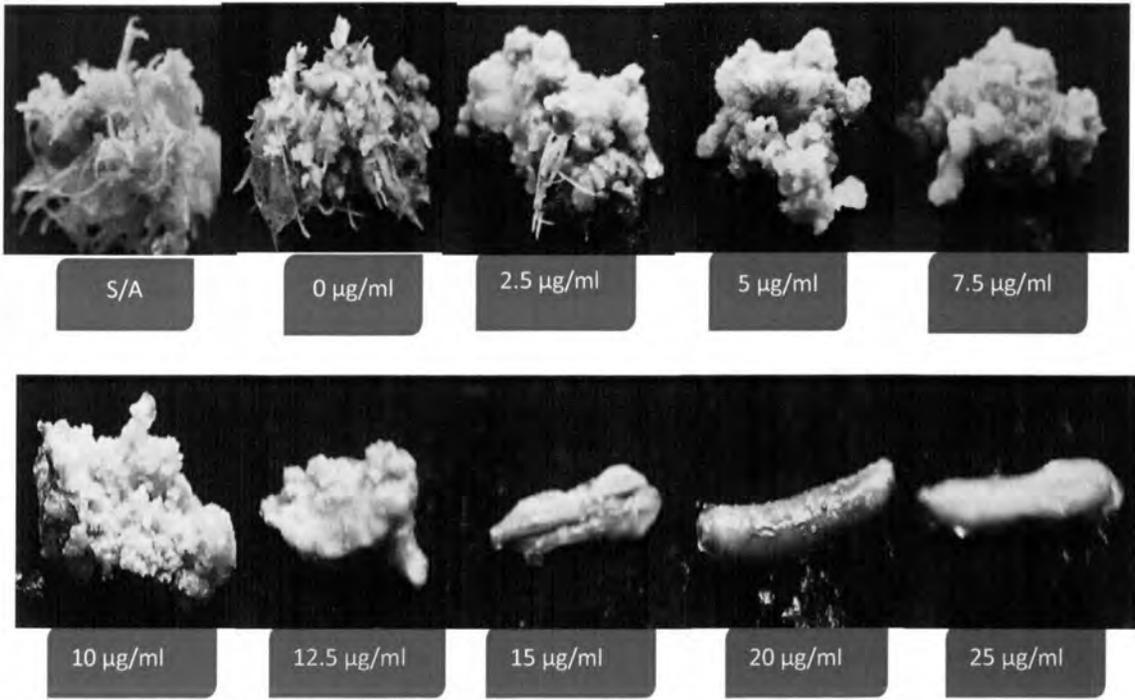


Figura 3.2. Curva dosis/respuesta a kanamicina para hipocótilo

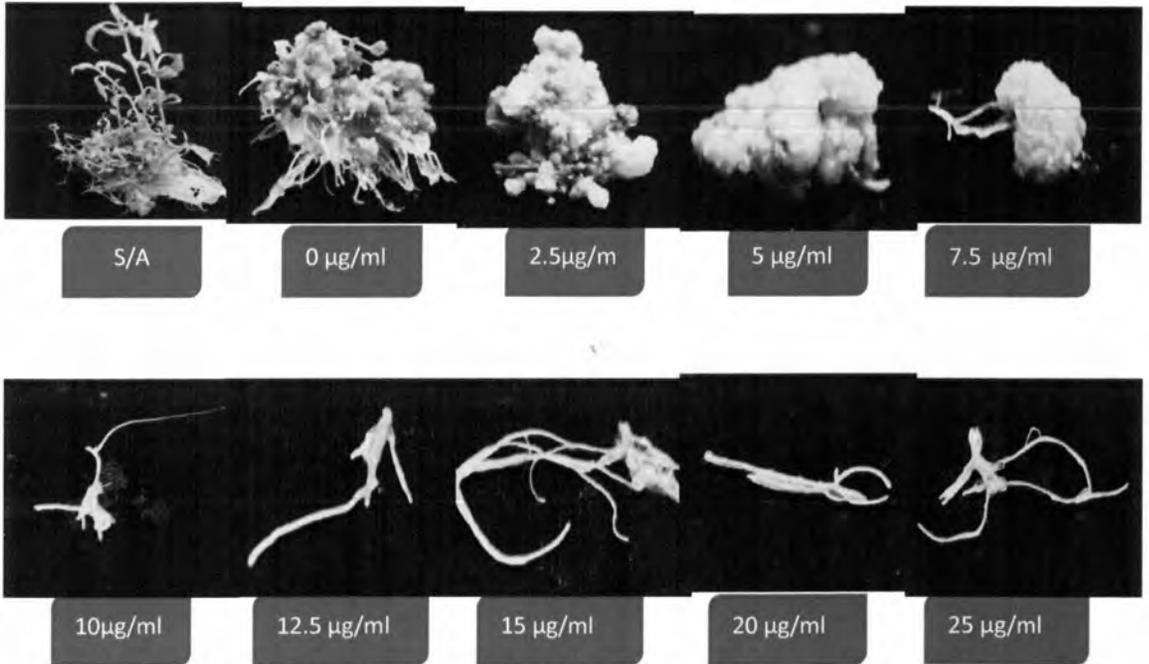


Figura 3.3 Curva dosis respuesta a kanamicina para el tejido de raíz

3.2.2 Prueba histoquímica de GUS

La prueba de GUS descrita en la metodología se utilizó para verificar la transformación transitoria de los explantes empleados. Los tejidos sin transformar, al someterse a esta prueba, no presentan actividad endógena (Solís-Ramos *et al.*, 2010).

Por lo anterior, se realizó la tinción a brotes no transformados de *P. andrieuxii*, al igual que de *Bixa orellana*, *Argemone mexicana* y *Tagetes erecta*, con el fin de verificar que no presentan actividad endógena de GUS. El valor de pH del buffer que se utiliza para la tinción es importante; debe ser pH 7, dado que si éste baja a 6, la tinción puede arrojar un falso positivo, i.e. que el tejido evaluado puede presentar la coloración azul como si estuviera transformado. Como se puede observar en la Figura 3.4, al realizar la tinción histoquímica a pH 6 sin vacío, únicamente *T. erecta* [Figura 3.4 (4)] no se tiñó de azul; sin embargo, al aplicar vacío se puede observar que todas las especies, incluyendo *P. andrieuxii*, se tornan azul. Lo anterior significa que la aplicación de vacío en los resultados de la prueba.

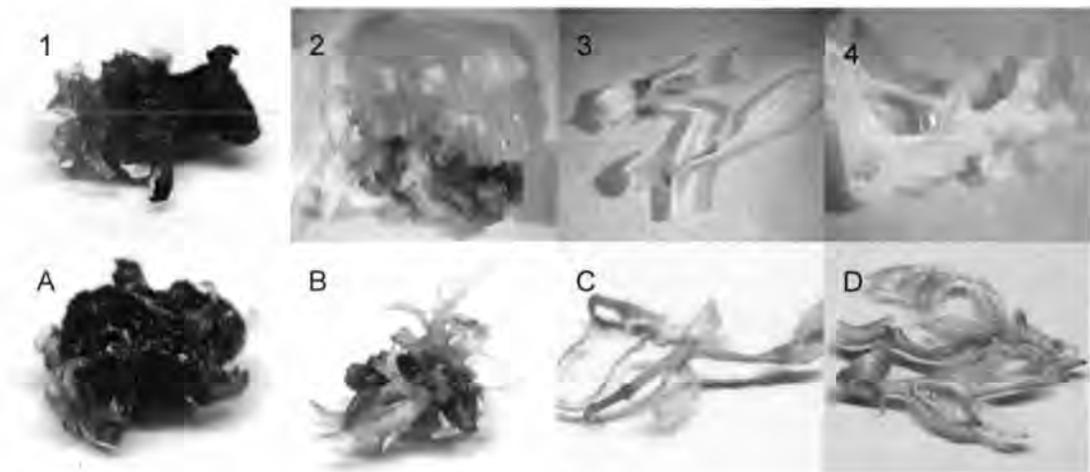


Figura 3.4. Prueba histoquímica de GUS a pH 6 a brotes no transformados de las 4 especies diferentes. Los números son sin vacío y las letras con vacío por 15 min. 1,A) *A. mexicana*; 2, B) *B. orellana*; 3, C) *P. andrieuxii*; 4, D) *T. erecta*

Por otra parte, al realizar la prueba histoquímica de los brotes no transformados de las cuatro especies a pH 7 no se detectó el color azul (Figura 3.5), confirmándose que el pH correcto para la evaluación 7.

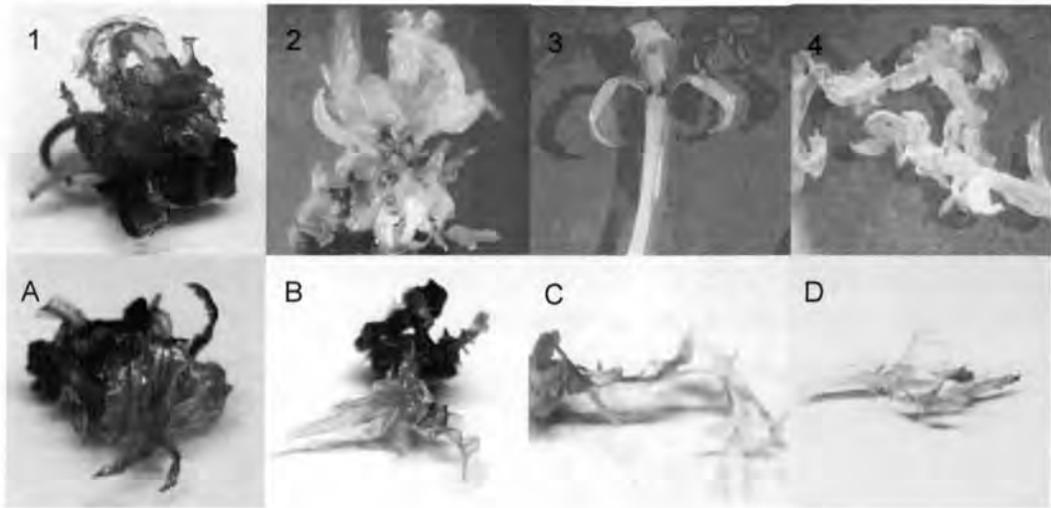


Figura 3.5. Prueba histoquímica de GUS a pH 7 a brotes no transformados de las 4 especies diferentes. Los números son sin vacío y las letras con vacío por 15 min. 1,A) *A. mexicana*; 2, B) *B. orellana*; 3, C) *P. andrieuxii*; 4, D) *T. erecta*.

Finalmente, al llevar a cabo la tinción a pH 8, que permite descartar actividad endógena en brotes, como los de *Capsicum chinense* (Solís-Ramos, *et al*, 2010), los brotes no presentaron la coloración azul (Figura 3.6).

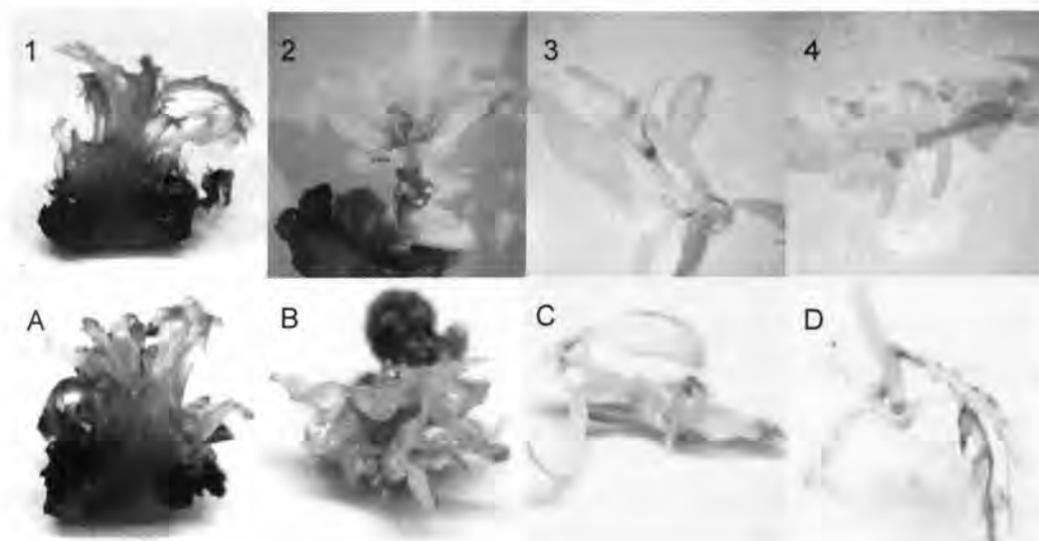


Figura 3.6. Prueba histoquímica de GUS a pH 8 a brotes no transformados de las 4 especies diferentes. Los números son sin vacío y las letras con vacío por 15 min. 1,A) *A. mexicana*; 2, B) *B. orellana*; 3, C) *P. andrieuxii*; 4, D) *T. erecta*

3.2.3. TRANSFORMACIÓN DE *Pentalinon andrieuxii* CON EL GEN REPORTERO *GUS*

En el laboratorio se cuenta con dos protocolos de transformación vía *A. tumefaciens*. Uno de transformación transitoria de *P. andrieuxii* establecido por Yam-Puc, *et al.* (2012) y otro para la transformación estable de *T. erecta* establecido por Gómez (2012).

Inicialmente se evaluó la transformación de los explantes siguiendo ambos protocolos, con el fin de compararlos y seleccionar el óptimo para la obtención de brotes de *P. andrieuxii* transformados en forma estable utilizando el plásmido pCAMBIA2301. Al evaluar los resultados se observó que los explantes transformados con el protocolo de Yam-Puc *et al.* (2012) fueron positivos a la prueba histoquímica, tanto la raíz como el hipocótilo (Figura 3.7).

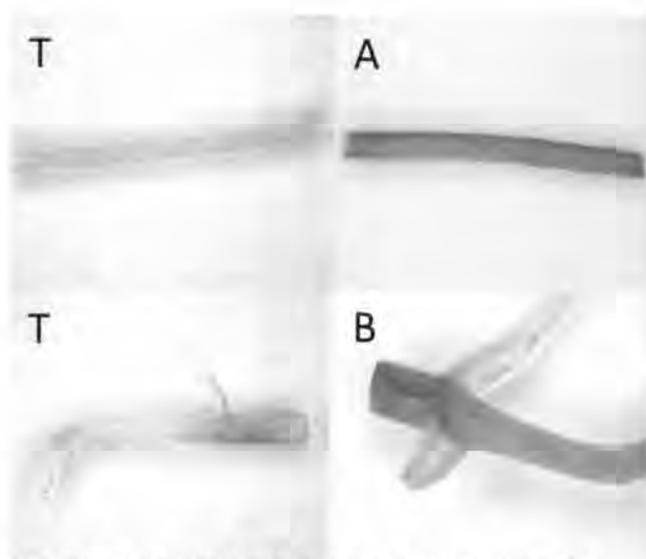


Figura 3.7. Prueba histoquímica de GUS. T: testigo; A) hipocótilo y B) raíz transformada con el protocolo Yam-Puc, 2012.

Asimismo, la frecuencia de infección resultó favorable con 75% para raíz y el 61% para hipocótilo (Cuadro 3.2). Estos datos se obtuvieron al extrapolar las muestras que se tomaron para realizar la prueba histoquímica.

Cuadro 3.2. Frecuencia de infección (protocolo Yam-Puc, 2012)

Explante	# de explantes	# de explantes Positivos GUS	% frecuencia de infección*
Raíz	68	51	75
Hipocótilo	68	42	61.76

*Frecuencia de infección (%): # de explantes (+) a la prueba gus/ # total de explantes infectados por 100

Los resultados obtenidos no coinciden con los reportados por Yam-Puc et al. (2012), quien reporta una frecuencia de infección menor (26 % para la raíz y 0% para el

hipocótilo). Probablemente debido a que en el trabajo anterior se utilizaron explantes de diferentes etapas de crecimiento de plántulas propagadas vegetativamente y en este trabajo los explantes se obtuvieron a partir de semillas germinadas y plántulas de 1.5 meses de edad. Los explantes transformados se mantuvieron en medio de selección PC+TDZ y antibióticos (cefotaxima y kanamicina); sin embargo no se observó formación de callo en ninguno de los explantes. Los explantes se resembraron y después de 30 días más únicamente se observó la formación de callos en el explante de hipocótilo. La prueba histoquímica de GUS realizada a este al callo de este explante fue positiva (Figura 3.8), confirmando la transformación. Sin embargo la cantidad de muestra que se obtuvo fue escasa y los callos que se mantuvieron en medio de selección no lograron formar brotes.

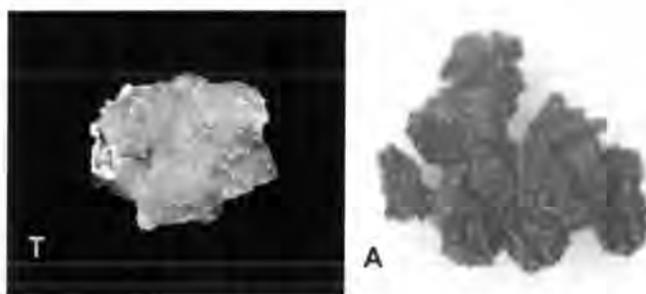


Figura 3.8. Prueba histoquímica de callos a partir de explantes transformados con el gen reportero *GUS*. T: testigo; A) callo de hipocótilo (protocolo de transformación Yam-Puc, 2012).

Aun cuando el callo evaluado se tornó de azul, confirmando su transformación, es posible que algunos de los otros callos estén transformados dado que la transformación es aleatoria y no se puede esperar que todos sean positivos. También pudo haber influido en que no se seleccionó correctamente, debido al inconveniente que se tuvo al realizar la curva dosis/respuesta a kanamicina, ya que no eran las concentraciones correctas de los antibióticos.

En la transformación de *P. andrieuxii* con el protocolo Gómez (2012), los resultados obtenidos fueron también positivos a la prueba histoquímica tanto en raíz como en hipocótilo (Figura 3.9).

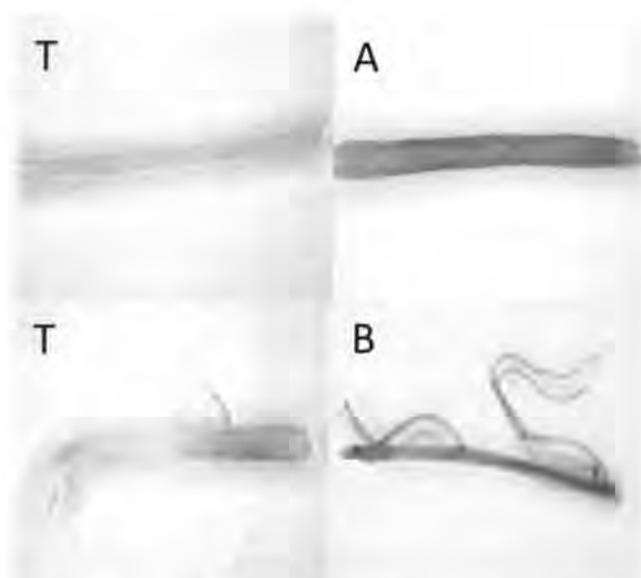


Figura 3.9. Prueba histoquímica de GUS. T: testigo; A) hipocótilo y B) raíz transformada con el protocolo Gómez, 2012

Sin embargo, la frecuencia de infección fue baja en comparación con los resultados obtenidos siguiendo el protocolo de Yam-Puc (2012) con plántulas de 1.5 meses de edad (Cuadro 3.3), pero superiores para el tejido de raíz (36.36 % vs 26%) y para el tejido de hipocótilo (54.16 % vs 0%).

Cuadro 3.3. Frecuencia de infección (protocolo Gómez, 2012)

Explante	# de explantes	# de explantes Positivos GUS	% frecuencia de infección
Raíz	185	8	36.36
Hipocótilo	185	13	54.16

*Frecuencia de infección (%): # de explantes (+) a la prueba gus/ # total de explantes infectados por 100.

Los explantes transformados se mantuvieron en medio de selección PC + TDZ y antibióticos (cefotaxima y kanamicina), bajo las mismas condiciones que los transformados con el protocolo de Yam-Puc et al. (2012) para la inducción de brotes. Los explantes transformados de raíz y de hipocótilo primero formaron callos y de éstos se seleccionaron muestras para realizarles la prueba histoquímica, obteniéndose resultados positivos (Figura 3.10).

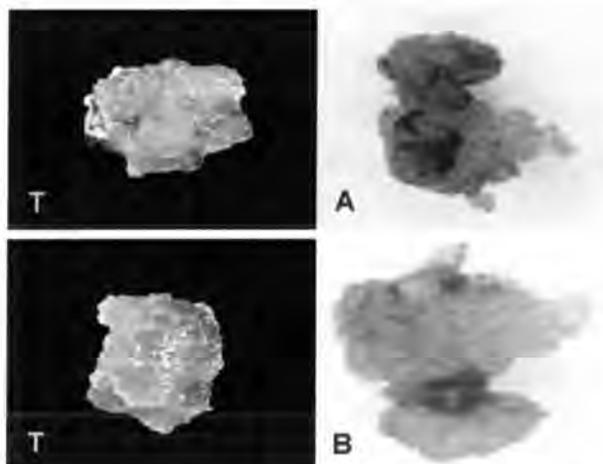


Figura 3.10. Prueba histoquímica de callos a partir de explantes transformados con el gen reportero *GUS*. T: testigo; A) callo obtenido de explante de raíz, B) callo de hipocótilo (protocolo de transformación Gómez 2012).

Los explantes que se mantuvieron en los medios selectivos iniciales presentaron un crecimiento lento, debido a que la concentración de antibióticos no era la adecuada (cefotaxima a 100 $\mu\text{g/ml}$ resultó inhibitoria para la inducción de brotes en ambos explantes). Al tener las condiciones de selección adecuadas de kanamicina con la dosis baja de cefotaxima (50 $\mu\text{g/ml}$), todos los explantes vivos se colocaron en el medio correcto y los explantes que lograron formar callo también formaron brotes tanto del hipocótilo como la raíz (Figura 3.11).

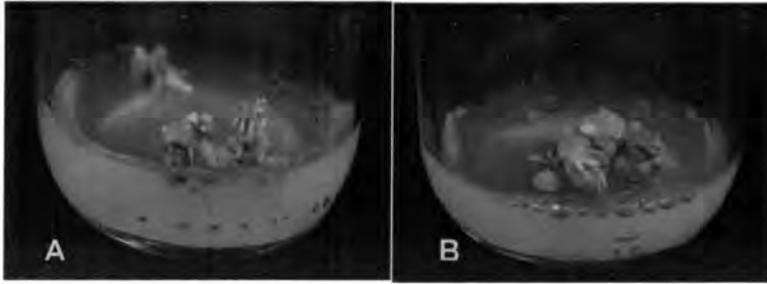


Figura 3.11. Brotes de *P. andrieuxii* a partir de explantes transformados con gen reportero *GUS* (protocolo Gómez, 2012). A) Raíz; B) Hipocótilo

Se esperó a que los brotes estuvieran más grandes para propagarlos y para realizar la prueba histoquímica de *GUS* y comprobar su transformación. Se realizó la prueba histoquímica de las plántulas, observándose resultados positivos en hojas, raíz e hipocótilo (Figura 3.12). Asimismo, se pudo observar que el callo de donde crecieron los brotes presentó la coloración azul característica de la transformación

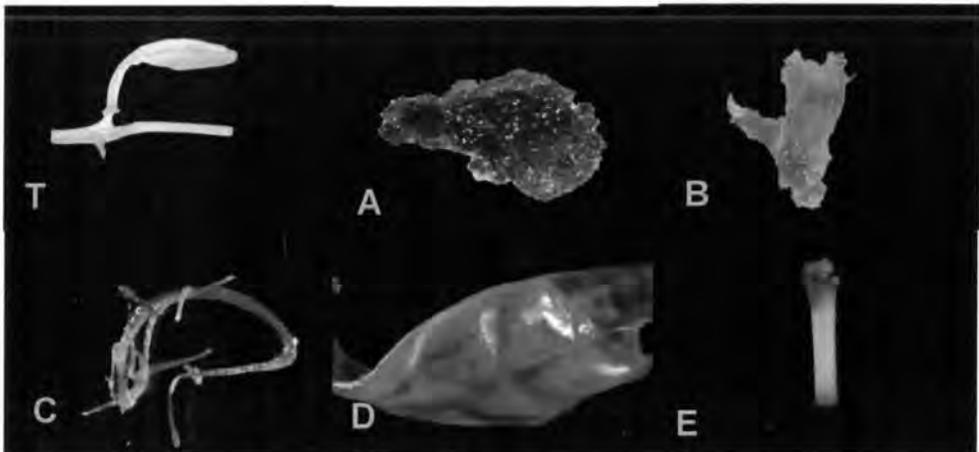


Figura 3.12. Prueba histoquímica de *GUS* a brotes regenerados. T) Testigo; A) callo donde se regeneraron los brotes; B) brote regenerado; C) raíz; D) hoja; E) hipocótilo

La frecuencia de transformación que se obtuvo fue del 28.66 % para raíz y 33.33 % para

el tejido de hipocótilo (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4. Resultados de la transformación estable con el protocolo Gómez (2012).

	# Explantes totales	# brotes totales	# brotes/ explantes	# brotes (+) a GUS	% Frecuencia de transformación*
Hipocótilo	94	93	1.01	31	33.33
Raíz	102	157	1.53	45	28.66

*Frecuencia de transformación (%): # de brotes (+) a la prueba *GUS*/ # de brotes totales por 100

Se obtuvieron ocho líneas transformadas, cuatro de raíz (A, B, F y Z) y cuatro de hipocótilo (C, E(a y b), G y H). De estas líneas se tomaron tres líneas al azar para realizar la extracción de ADN y amplificar el gen *NPTII*, con el fin de confirmar la transformación.

La extracción del ADN de las plántulas se realizó por el método de Dellaporta (1983) con algunas modificaciones. El análisis por PCR de las líneas seleccionadas [E.3 y H.2 (Hipocótilo); F.2 (Raíz)] y la posterior amplificación del gen *NPTII* mostró la esperada amplificación del fragmento de 600 pb del gen *NPTII*, confirmando la transformación de las tres líneas (Figura 3.13).

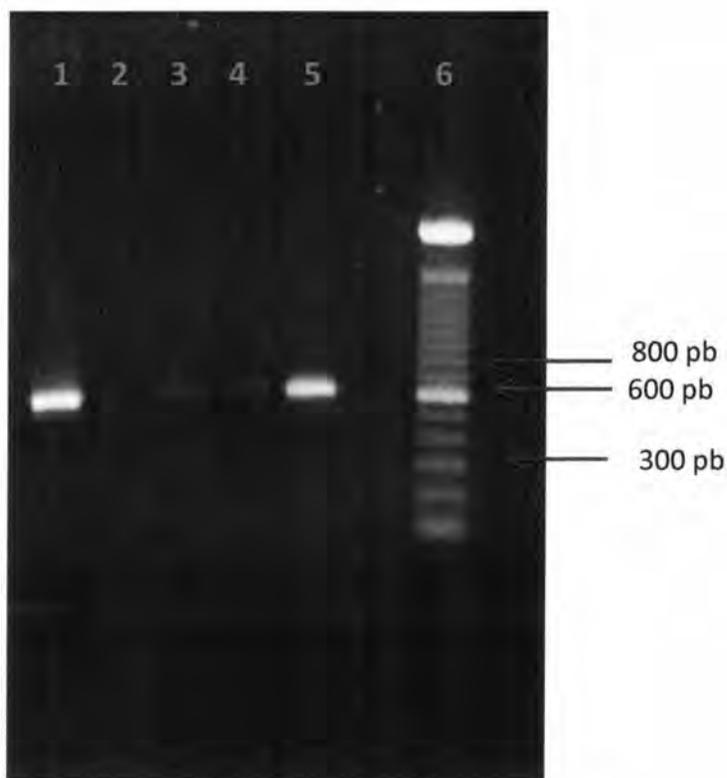


Figura 3.13. PCR para *nptII* de las plantas transformadas. 1) Testigo (+); 2) Testigo (-); 3) línea E.3; 4) línea F.2; Línea H.2; 6) escalera de ADN de 100 pb

Con base a los resultados obtenidos se puede afirmar que la transformación transitoria de *P. andrieuxii* fue mejor que la lograda con el protocolo de Yam-Puc (2012), aun cuando no se logró la generación de brotes; sin embargo el protocolo Gómez (2012), aunque bajo en la frecuencia de infección, resultó en explantes transformados que formaron plántulas, las cuales dieron un resultado positivo a la prueba histoquímica de GUS. Ambos protocolos tienen diferencias significativas, las cuales pueden aumentar o disminuir la frecuencia de infección, donde el valor más significativo es la D.O. con cinco puntos de diferencia (Protocolo Yam-Puc 0.1 y protocolo Gómez 0.6) que puede jugar un papel importante al momento de la transformación. En el cuadro 3.5 se muestran las diferencias de los protocolos utilizados, donde se observa varias diferencias como la concentración de

acetosiringona, la temperatura y el tiempo de cocultivo.

Cuadro 3.5. Diferencia entre los protocolos de transformación

Variables	Protocolo Yam-Puc, 2012	Protocolo Gómez, 2012
Tiempo de cocultivo (días)	3	5
Temperatura (C)	28	25
Condiciones de luz	obscuridad	obscuridad
[μ M] acetosiringona	200	100
D.O. ₆₀₀	0.1	0.6

3.3. TRANSFORMACIÓN DE *Pentalinon andrieuxii* CON EL GEN TRUNCADO DE *HMGR*

Para la transformación de *Pentalinon* con el gen truncado de la *HMGR* de *A. thaliana*, primero utilizó una restricción enzimática para comprobar que el gen de la *HMGR* estuviera clonado en el vector pHTT203.

Como se observa en la figura 1.11, que representa un esquema del vector, la enzima Bam HI libera el fragmento que representa al gen de la *HMGR*. La restricción de la enzima Bam HI, siguiendo las indicaciones del fabricante, permitió observar un resultado positivo (Figura 3.14), al detectarse la banda de 10,000 pb correspondiente al vector y la banda de 1400 pb correspondiente al gen truncado de la *HMGR*.

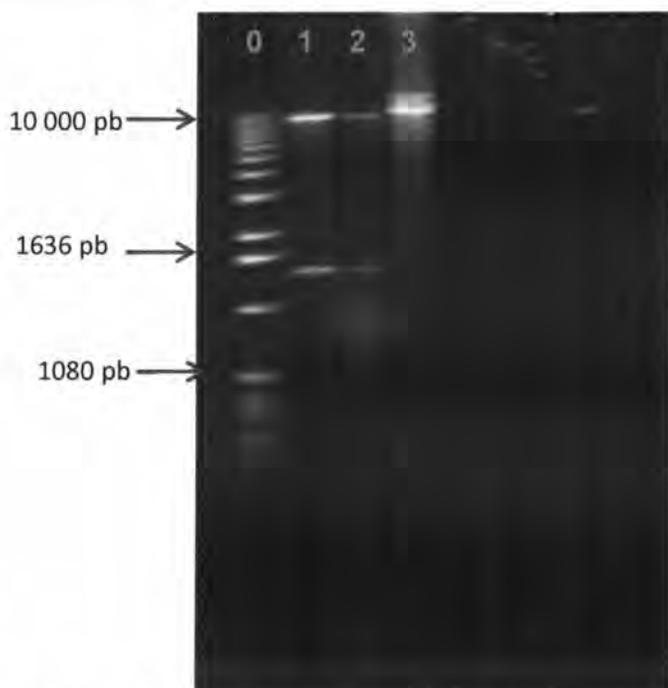


Figura 3.14. Digestión del plásmido pHTT 203:: Δ -354-*HMGR*. 0) Marcado de peso molecular; 1) muestra digerida con enzima Bam HI. 2) muestra digerida con Bam HI. 3) muestra sin digerir (testigo).

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1%, la reacción fue con una unidad de enzima y la concentración del plásmido fue de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se colocaron las muestras a 37°C durante una hora y posteriormente se corrió el gel a 85 v durante 1 hora.

Después de comprobar que el gen truncado de la *HMGR* estaba clonado en el plásmido, se procedió a la purificación del plásmido, haciendo las células competentes de *E. coli* (DH5 α), utilizando el método de cloruro de calcio.

Una vez obtenidas las células competentes de *E. coli* (DH5 α) se continuó con la transformación con el plásmido pHTT203:: Δ -354-*HMGR* por el método de choque térmico. Para determinar si las colonias aisladas en el medio LB selectivo obtenidas en la transformación eran positivas, se realizó una minipreparación de ADN plasmídico y finalmente se realizó la restricción con la enzima Bam HI de acuerdo al instructivo; los

resultados mostraron la banda de 1400 pb del gen truncado de *HMGR* en las muestras 1, 2, 4, 5 y 6(Figura 3.15).

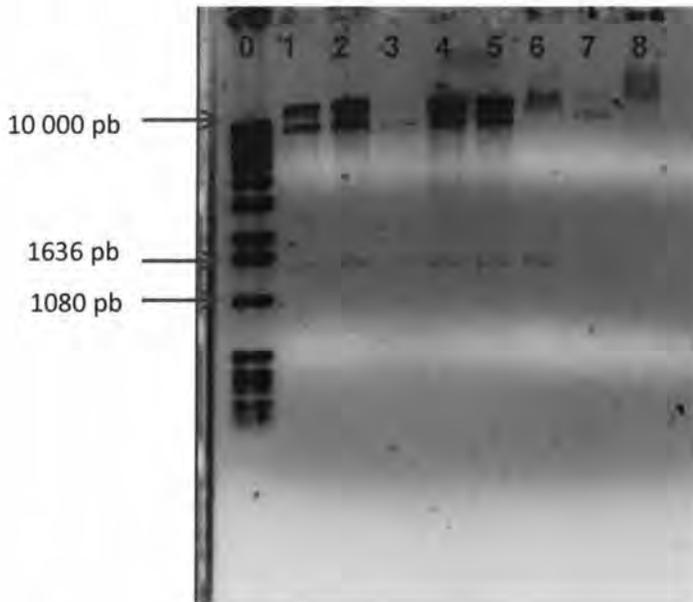


Figura 3.15. Minipreparación de ADN plasmídico. 0) Marcado de peso molecular; (1-8) diferentes muestras digerida con Bam H1. Teñidas con bromuro de etidio

Una vez obtenidas las células de *E coli* transformada con el plásmido, se realizó la purificación del plásmido para tener un mayor volumen (Maxipreparaciones) y posteriormente utilizarlo para la transformación de *A. tumefaciens*.

Una vez obtenidas las muestras se realizó la restricción con la enzima Bam H1 de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Invitrogen), como se puede observar en la figura 3.16 se obtuvo la purificación positiva de tres muestras.

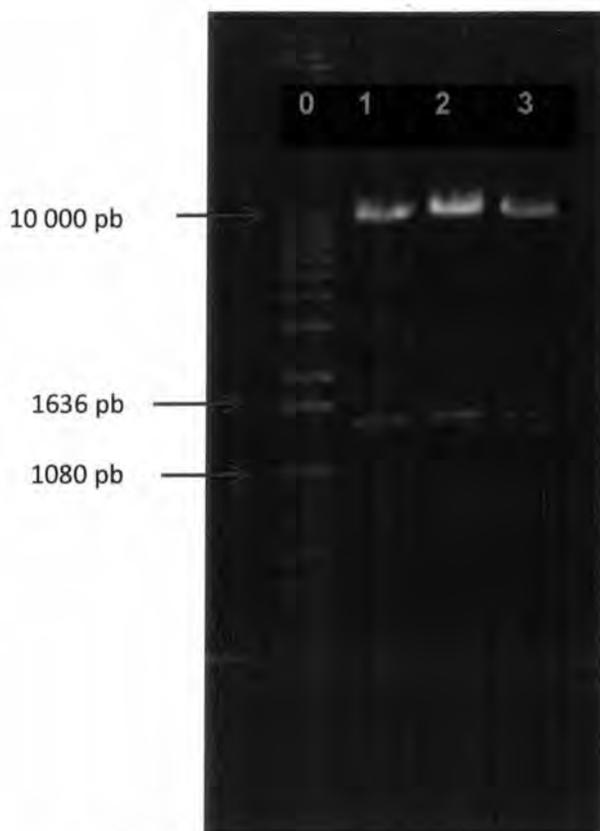


Figura 3.16. Maxipreparación de ADN plasmídico. 0) Marcado de peso molecular; 1-3) diferentes muestras digerida con Bam H1. Teñidas con bromuro de etídio

3.3.1. TRANSFORMACIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens* CON EL PLÁSMIDO pHTT203:: Δ -354-HMGR

Después de purificar el plásmido pHTT203:: Δ -354-HMGR, se realizó la transformación de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*.

Se prepararon células competentes de la cepa PGV2260 de *A. tumefaciens*, posteriormente se transformaron por choque térmico y para comprobar la transformación de la cepa bacteriana se realizó una PCR de colonia. El análisis por PCR de las colonias aisladas mostró la amplificación del fragmento de 600 pb del gen *NPTII*, confirmando la transformación (Figura 3.17) de colonia,.

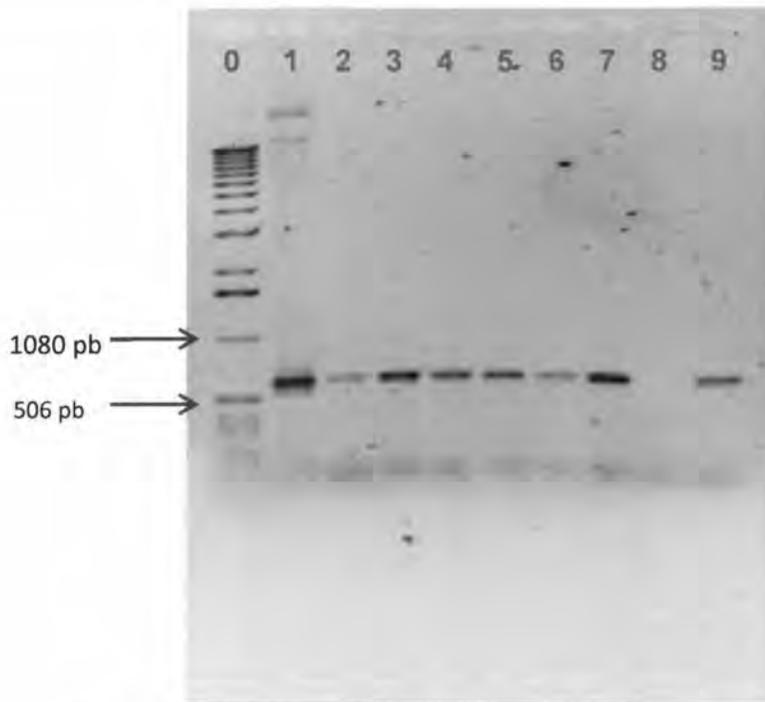


Figura 3.17. PCR de colonia para *NPTII*. 0) marcador 1Kb; 1) testigo positivo; 2-9) diferentes colonias

Las condiciones que se utilizaron para amplificar el fragmento de ADN fueron las utilizadas por Vanegas *et al.*, (2006). Las colonias que amplificaron el fragmento, se seleccionaron y se realizó la minipreparación de ADN plasmídico para realizar la restricción con Bam HI y liberar el fragmento que representa a la *HMGR* truncada; sin embargo el resultado no fue el esperado ya que no se pudo liberar el fragmento. Debido a este resultado, se realizó de nuevo la PCR para amplificar el fragmento de *NPTII* en las muestras (Figura 3.18).

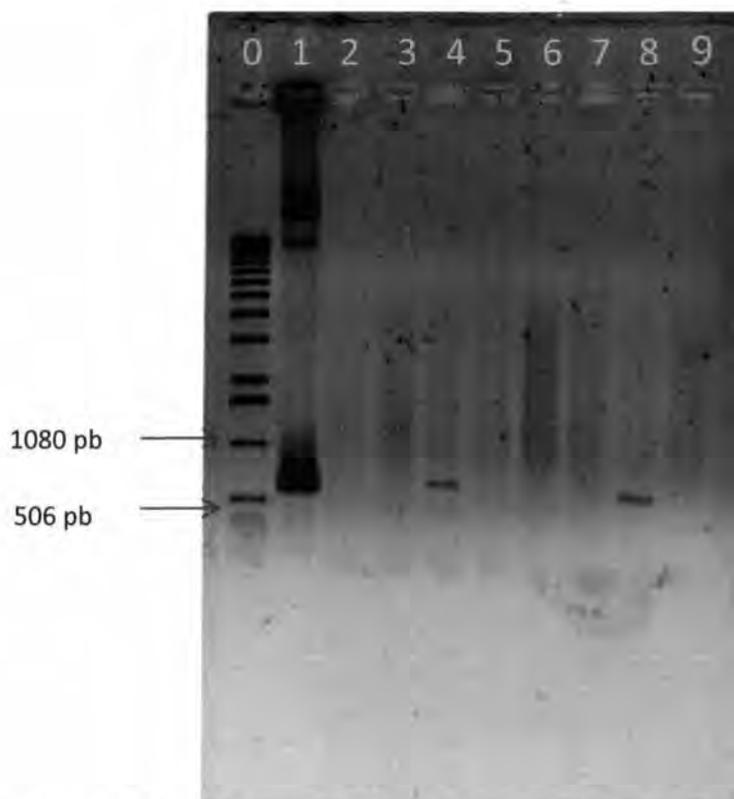


Figura 3.18. PCR para *NPTII* de las muestras que se realizó minipreparaciones. 0) marcador 1Kb; 1) testigo positivo; 2-9) diferentes muestras obtenidas de la minipreparación de ADN plasmídico

De estas tres muestras se tomaron alícuotas para almacenar en glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y también se tomó una colonia más de las que originalmente habían amplificado el *NPTII*, siendo así cuatro colonias posiblemente transformadas, para guardarlas y posteriormente realizar un PCR para la amplificación del gen de la *HMGR* a partir de las colonias positivas a *NPTII*.

Para amplificar el gen truncado de la *HMGR* se diseñaron oligonucleótidos específicos con el fin de distinguir el gen truncado de la *HMGR* de *A. thaliana*, del gen endógeno de la *HMGR* que posee *P. andrieuxii*, y de detectar plantas transgénicas al gen truncado de la *HMGR* de *A thaliana* en la especie de estudio. Para ello, se tomó la secuencia del

promotor 35S y la secuencia del gen truncado de la *HMGR* de *A. thaliana* tal y como esta clonado en el vector pHTT203.

```

GGAATTCCCCGATCCTATCTGTCACTTTCATCAAAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGG
TGGCACTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGC
CTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGT
GGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAT
ATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCAGTATCCTTCGCAAGACC
CTTCCTCTATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGACACGCTGAAATCAC
CAGTCTCTCTACAAGATCTCTAGACGATCGTTTCGCAATTCATTTATCTCACG
TGCCTCTGGTGATGCTTGGGATCTCGCCGATACGATCGATGATGATGACCAC
CGCCTTGTCACGTGCTCTCCACCGACTCCGATCGTTTCCGTTGCTAAATTACC
TAATCCGGAACCTATTGTTACCGAATCGCTTCTGAGGAAGACGAGGAGATTG
TGAAATCGGTTATCGACGGAGTTATTCCATCGTACTCGCTTGAATCTCGTCTC
GGTGATTGCAAAGAGCGGCGTCGATTTCGTCTGAGGCGTTGCAGAGAGTC
ACCGGGAGATCGATTGAAGGGTTACCGTTGGATGGATTTGATTATGAATCGAT
TTTGGGGCAATGCTGTGAGATGCCTGTTGGATACATTCAGATTCTGTTGGGA
TTGCTGGTCCATTGTTGCTTGATGGTTATGAGTACTCTGTTCCATGGCTACAA
CCGAAGGTTGTTGGTTGCTAGCACTAACAGAGGCTGCAAGGCTATGTTTATC
TCTGGTGGCGCCACCAGTACCGTTCTTAAGGACGGTATGACCCGAGCACCT
GTTGTTCGTTTCGCTTCGGCGAGACGAGCTTCGGAGCTTAAGTTTTTCTTGG
AGAATCCAGAGAACTTTGATACTTTGGCAGTAGTCTTCAACAGGTCGAGTAGA
TTTGAAGACTGCAAAGTGTTAAATGCACAATCGCGGGGAAGAATGCTTATGT
AAGGTTCTGTTGTAGTACTGGTGATGCTATGGGGATGAATATGGTTTCTAAAG
GTGTGCAGAATGTTCTTGAGTATCTTACCGATGATTTCCCTGACATGGATGTG
ATTGGAATCTCTGGTAACTTCTGTTTCGGACAAGAAACCTGCTGCTGTGAACTG
GATTGAGGGACGTGGTAAATCAGTTGTTTGCAGAGGCTGTAATCAGAGGAGAG
ATCGTGAACAAGGTCTTGAAAACGAGCGTGGCTGCTTTAGTCGAGCTCAACA
TGCTCAAGAACCTAGCTGGCTCTGCTGTTGCAGGCTCTTAGGTGGATTCAA
CGCTCATGCCAGTAACATAGTGTCTGCTGTATTCATAGCTACTGGCCAAGATC
CAGCTCAAACGTGGAGAGTTCTCAATGCATCACCATGATGGAAGCTATTAAT
GACGGCAAAGATATCCATATCTCAGTCACTATGCCATCTATCGAGGTGGGGAC
AGTGGGAGGAGGAACACAGCTTGCATCTCAATCAGCGTGTAAACCTGCTC
GGAGTTAAAGGAGCAAGCACAGAGTCGCCGGGAATGAACGCAAGGAGGCTA
GCGACGATCGTAGCCGGAGCAGTTTTAGCTGGAGAGTTATCTTTAATGTCAG
CAATTGCAGCTGGACAGCTTGTGAGAAGTCACATGAAATACAATAGATCCAGC
CGAGACATCTCTGGAGCAACGACAACGACAACAACAACATGA

```

La parte sombreada en color rosa pertenece al promotor 35S y la parte sombreada en color amarillo indica el inicio del gen truncado de la *HMGR* de *A. thaliana* que es el codón que codifica para el aminoácido serina. Las secuencias que se utilizarán para amplificar

son las sombreadas en verde y turquesa. Forward 35S: 5' CCAACCACGTCTTCAAAGCAAG-3' Reverse *HMGR* truncada: 5' CTTGCAGCCTCTGTTAGTGCTA-3'; donde se obtendrá un fragmento esperado de 658 pb (181 pb del promotor 35s y 477 pb del gen truncado de la *HMGR*).

Basándose en la temperatura de fábrica de los oligonucleótidos de 57 °C es la que se tomó para realizar la PCR de las cuatro colonias que se tienen en glicerol; para esto se tomó 1 µL de la colonia en glicerol y se diluyó en 5 µL de agua para biología molecular (se realizó para cada una de las cuatro muestras); de esta mezcla se tomó 1 µL y se le adicionó 9 µL de un mix de PCR previamente preparado. Las condiciones de PCR fueron 94 °C por 3 minutos, para la desnaturalización seguido de 30 ciclos de 94°C X 1 min; 57 °C X45 segundos; 72 °C por 70 segundos y finalmente 72 °C X 5 minutos. Se pudo observar que las cuatro muestras amplifican un fragmento del gen 35S-5'*HMGR* truncada (Figura 3.19), de esta manera se demuestra que las cuatro muestras de las colonias de la cepa PGV2260 de *A. tumefaciens* están transformadas.

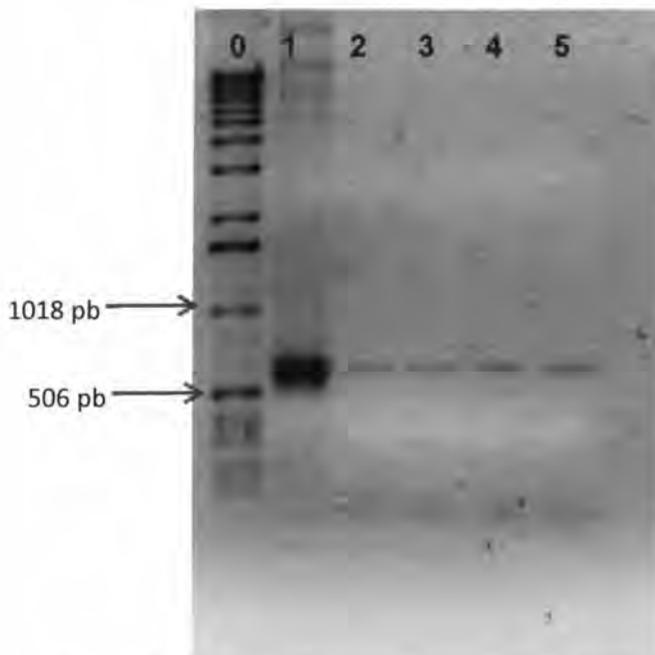


Figura 3.19. PCR de las colonias en glicerol. 0: marcador 1Kb; 1: testigo positivo; 2-5 diferentes colonias de la cepa PGV2260 transformadas con el pHTT203::Δ-354-*HMGR*.

3.3.2. TRANSFORMACIÓN DE LOS EXPLANTES HIPOCÓTILO Y RAÍZ DE *Pentalinon andrieuxii* CON EL GEN TRUNCADO DE *HMGR*

Ya que se establecieron las condiciones para la transformación estable de *P. andrieuxii* con el gen reportero *GUS*, y que se verificaron que las colonias de *A. tumefaciens* contienen el gen truncado de *HMGR*, se continuó con la transformación de los explantes.

Las condiciones que se emplearon para la transformación fueron las del protocolo de transformación optimizado por Gómez, 2012, sin embargo el tiempo de cocultivo fue de tres días, ya que la bacteria creció más de lo esperado. Esta fue la única modificación que se realizó durante la transformación.

Los explantes transformados se incubaron en medio de inducción de brotes (Figura 3. 20).



Figura 3.20. Explantes de hipocótilo y raíz de *Pentalinon andrieuxii* en propagación, transformados con el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis thaliana*

Se realizó la transformación del primer lote de explantes de *P. andrieuxii* con el gen truncado de *HMGR*, pero se observó que la bacteria permanecía en los explantes, por lo que se lavó con antibiótico (cefotaxima a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cada cinco días, sin embargo la bacteria no se pudo eliminar. Se realizó una segunda transformación, con una modificación que consistió en aumentar la concentración del cefotaxima de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, al momento de lavar los explantes después del tiempo de cocultivo, el tiempo de lavado fue el mismo (30 minutos). Posteriormente se realizó otro lavado a la misma

concentración de antibiótico (500 µg/mL) durante 15 minutos y finalmente se dio un último lavado con el medio PC.

Con esta modificación, se controló el crecimiento excesivo de la bacteria en los explantes al momento de la propagación y se logró la formación de callos en los explantes tanto de raíz como de hipocótilo, hasta la formación de pequeños brotes en los explantes ((Cuadro 3.6). Los resultados de la transformación de *P. andrieuxii* con el gen truncado de *HMGR* mostraron que el explante de raíz es el que mejor responde a la formación de brotes después del proceso de transformación vía *A. tumefaciens* (Figura 3.21).

Cuadro 3.6 Resultados de la transformación de *Pentalinon andrieuxii* con el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis thaliana*

	# Explantos infectados	% de contaminación	# explantos vivos	# explantos c/callos	# brotes totales	# Brotes/ explante
Hipocótilo	75	16	63	9	5	0.079
Raíz	66	25.5	49	20	33	0.673

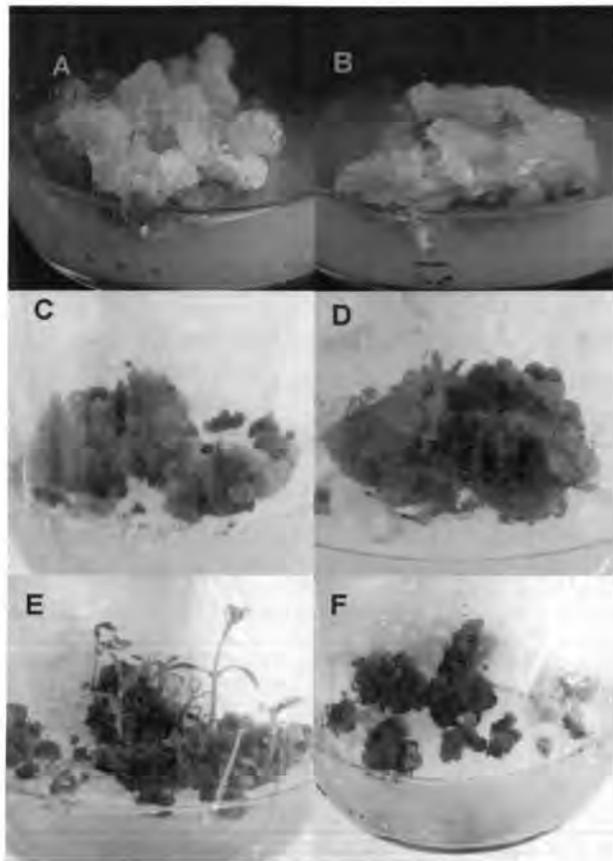


Figura 3.21 Formación de callos, brotes a partir de explantes de *Pentalinon andrieuxii* transformados con gen truncado de *HMGR* de *Arabidopsis thaliana*. A) Callo de raíz; B) Callo de hipocótilo; C) Formación de callos-brotes a partir de raíz; D) Formación de callos brotes a partir de hipocótilo; E) Formación de plántulas a partir de raíz; F) Formación de callos-brotes a partir de hipocótilo.

Los brotes que se generaron a partir de los explantes transformados, fueron separados y colocados en un medio PC semisólido adicionado con los antibióticos correspondientes (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para hipocótilo y 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para raíz) y sin regulador de crecimiento. Se obtuvieron cinco líneas de plántulas a partir del explante de raíz (α , β , δ , ϵ y ζ) y solo se regeneró una línea a partir del explante de hipocótilo (a).

3.3.3 Amplificación del gen truncado de *HMGR* por PCR

Los brotes obtenidos se propagaron vegetativamente para obtener material suficiente para realizar la extracción de ADN genómico (descrita en el capítulo 2) y verificar la presencia del gen truncado de la *HMGR*.

Se realizó la extracción de ADN genómico de las líneas obtenidas a partir de raíz, que se propagaron con mayor rapidez ($\alpha.1$; $\alpha.2$; $\alpha.15$; $\beta.1$ y $\delta.1$), posteriormente se llevó a cabo una PCR a las muestras de acuerdo a las condiciones ya establecidas (descritas en el capítulo 2). En la figura 3.22, se puede observar un gel que representa la amplificación de un fragmento de 658 pb del gen 35S-5'*HMGR* truncada. Los carriles del 3 al 7 representan las muestras de las líneas transformadas y se observa que en 4 de ellas (4-7) se visualiza una banda definida, a la misma distancia que el testigo positivo (carril 1), en el carril 3 no se aprecia una banda bien definida, sin embargo si amplifica el fragmento esperado.

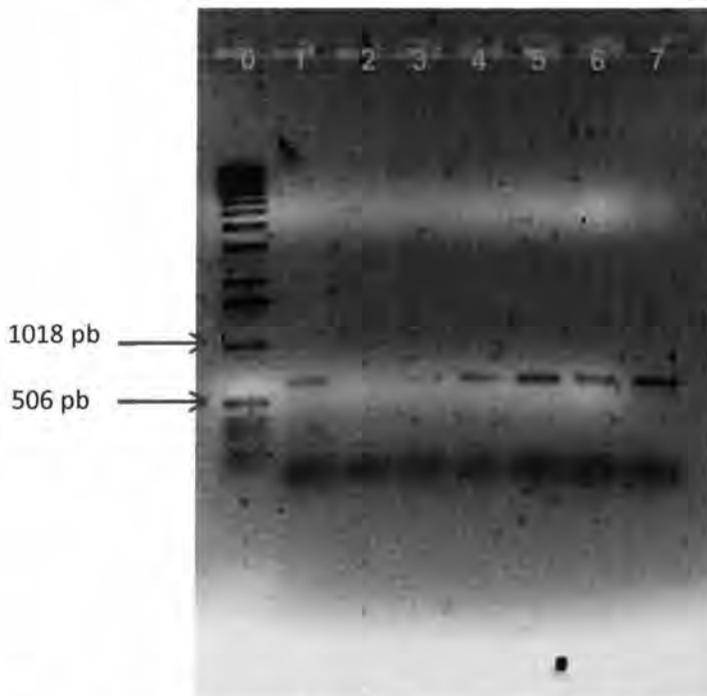


Figura 13.22 PCR para gen 35S-5'*HMGR* truncada. Carril 0) marcador 1Kb; 1) Testigo positivo; 2) Testigo negativo; 3) $\alpha.1$; 4) $\alpha.2$; 5) $\alpha.15$; 6) $\beta.1$; 7) $\delta.1$.

3.3.4 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO

Las líneas de plántulas *in vitro* de *Pentalinon andrieuxii* que dieron positivas al PCR del fragmento de 658 pb del gen de la *HMGR* truncada se propagaron vegetativamente para la obtención del material biológico. El extracto del material vegetal se utilizó para detectar la presencia de ácido betulínico por cromatografía en capa delgada (CCD) y comparar los resultados con los obtenidos a partir de una plántula no transformada.

Para el análisis cromatográfico se tomó la parte aérea de las plántulas *in vitro* de aproximadamente 2.5 cm de alto. Las líneas que se utilizaron fueron las mismas que se realizó la PCR a excepción de la $\beta.1$, debido a que presentó un crecimiento lento y no había suficiente material vegetal.

El perfil cromatográfico de los diferentes extractos mostró la presencia del ácido betulínico tanto en las líneas transformadas como en las líneas testigo (no transformadas) (Figura 3.23). De manera cualitativa, el perfil cromatográfico de los extractos de las plántulas transgénicas es muy similar al del testigo; sin embargo, es importante resaltar que este método es cualitativo y no se puede concluir si las plantas transgénicas producen mayor o menor cantidad de ácido betulínico.

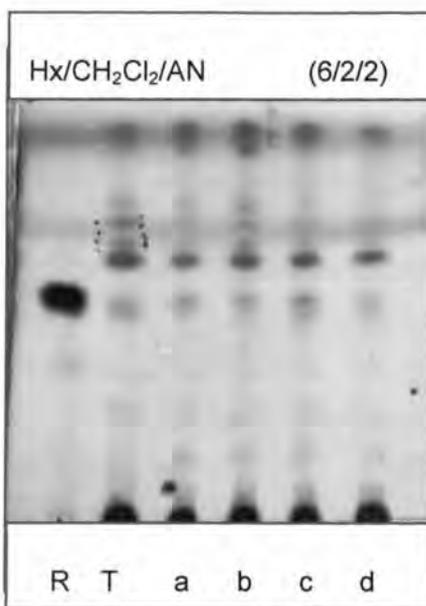


Figura 14. Perfil cromatográfico por CCD de los extractos de polaridad media obtenidos a partir de plántulas *in vitro* transformadas con el gen truncado de *HMGR*. R: ácido betulínico sigma; T: testigo (no transformado); a: línea $\alpha.1$; b: línea $\alpha.2$; c: línea $\alpha.15$; d: línea $\delta.1$. Sistema de elución Hx/CH₂Cl₂/AN (6/2/2)

3.4 DISCUSIÓN

Los estudios de transformación estable en diversas especies han permitido determinar que algunas variables juegan un papel importante para la eficiencia de la transformación genética. Las variables que destacan son la densidad óptica, la concentración de acetosiringona en el cultivo bacteriano, el tiempo y la temperatura del cocultivo. Cada especie es diferente, de tal manera que las variables que las afectan no son las mismas. Para *C. roseus*, especie de la familia de las Apocynaceae, la D.O. es de 0.7, 100 μM de acetosiringona y tres días de cocultivo a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, resulta en un porcentaje de transformación del 90 % confirmada mediante la prueba histoquímica de GUS (Srivastava *et al.*, 2009). Por otra parte, para *Malus micromalus* con algunas condiciones como la concentración de acetosiringona, la temperatura y el tiempo de cocultivo similares, pero una densidad óptica menor (0.5), el 11.7% de explantes resistieron el medio de selección (Dai *et al.*, 2013).

Con base a lo anterior se puede afirmar que para algunas especies las condiciones pueden ser benéficas, pero para otras resulta poco eficiente. En el caso de *Pentalinon andrieuxii*, se utilizó una D.O. de 0.6, una concentración de 100 μM de acetosiringona en el crecimiento bacteriano, un tiempo de cocultivo de 5 días y una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, obteniéndose una eficiencia de transformación de 28 % para hipocótilo y el 33 % para raíz.

Para la transformación con el gen de la *HMGR* se han reportado varios trabajos donde, principalmente, se ha realizado la sobreexpresión del gen completo y en otros el gen truncado se ha utilizado para la producción en cantidades más elevadas de isoprenoides citoplásmicos. Las diferencias al emplear el gen completo o truncado están dadas por las variaciones en la producción de metabolitos secundarios dejando en claro que sobreexpresar el gen en su variación truncada (sin el dominio de unión a la membrana) se obtienen resultados más favorables. En general los resultados han sido positivos para ambos casos, ya que se logró producir mayor cantidades de metabolitos en comparación a las plantas no transformadas.

Uno de los primeros trabajos realizados para la modificación del metabolismo secundario fue realizado por Re *et al.* (1995), donde se sobreexpresó el gen completo de la *HMGR* de

Arabidopsis en *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que el nivel de transcritos aumentó considerablemente en las líneas transgénicas, sin embargo la actividad enzimática no fue tan alta como se esperaba y la concentración de metabolitos como las clorofilas y los carotenoides que se evaluaron no aumentó en forma significativa como se esperaba. En otro estudio, realizado por Godoy-Hernández *et al.*, (1998), se sobreexpresó el gen completo y truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis thaliana* en las formas de sentido y antisentido en el genoma de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi); ambos genes fueron fusionados a la secuencia codificante para el péptido de tránsito de la unidad pequeña de la RUBISCO, para dirigir a la *HMGR* a los cloroplastos. Cuando se evaluaron los metabolitos finales en las líneas regeneradas tanto del gen completo y truncado en sentido y antisentido, se observó que el contenido de clorofilas y carotenoides no aumentaron significativamente en ninguna de las líneas transgénicas, sin embargo cuando se evaluó el contenido de esteroides (colesterol, campesterol, estigmasterol y β -sitosterol) se encontró que su concentración disminuyó hasta en un 50% únicamente en las líneas que expresaban el gen en antisentido. En ese momento aún no se conocía la ruta alterna (MEP) presente en los plástidos, por lo que los metabolitos finales que se evaluaban eran carotenoides y clorofilas, ya que se pensaba que la ruta del mevalonato producía todos los compuestos isoprenoides en plantas.

En *Artemisia annua* L. se ha sobreexpresado el gen de la *HMGR* de *Catharanthus roseus* para aumentar la producción de artemisinina. En este trabajo se generaron líneas transgénicas que produjeron hasta un 22.5% más de artemisinina en comparación al testigo (Aquil *et al.*, 2009). Posteriormente, Nafis *et al.*, (2011) realizaron un trabajo similar cambiando la D.O a 0.5 al momento de la transformación, donde insertaron el gen completo de la *HMGR* de *Catharanthus roseus* para elevar el contenido de artemisinina, encontrándose que las líneas transgénicas produjeron de un 3 a un 38 % más que en la línea no transformada.

Sin embargo los estudios de transformación genética donde se ha insertado el gen truncado de la *HMGR* han sido mejores que los del gen completo. En tabaco se insertó el gen truncado de la *HMGR* de *Hevea brasiliensis*, con el fin de aumentar el contenido de esteroides en las semillas. Al realizar la medición de esteroides totales en una de las líneas transformadas se observó un aumento de 2.4 veces en comparación al control (Harker *et*

al., 2003). En *Digitalis minor* (Sales et al., 2007) se ha sobreexpresado el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis* con el fin de afectar el metabolismo de isoprenoides y producir cardenólidos. En este caso se obtuvieron siete líneas transgénicas, de las cuales tres líneas tuvieron una producción mayor de cardenólidos totales, hasta dos veces más que la línea no transformada (condiciones *in vitro*). En otro trabajo realizado por Muñoz-Bertomeu et al., (2007), *Lavándula latifolia* se transformó con el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis thaliana*, logrando el incremento de monoterpenos (dos veces en comparación al no transformado), sesquiterpenos (hasta tres veces en comparación al testigo) y la producción de fitoesteroles (hasta tres veces en comparación al testigo), sin afectar la acumulación de carotenoides.

En otro trabajo realizado en *Artemisia annua* para el aumento de la artemisinina, se llevó a cabo una cotransformación de los genes *HMGR* y *FPS* (farnesil difosfato sintasa, enzima que cataliza la condensación de IPP y DMAPP en GPP) de *A. annua*. Observándose un aumento de hasta 1.8 veces con respecto al control, lo que sugiere que la coexpresión de ambos genes aumenta el contenido de artemisinina (Wang et al., 2011).

En *Parthenium argentatum* se sobreexpresó el gen truncado de la *HMGR* de *Aspergillus nidulans* (con 456 aminoácidos pertenecientes al dominio catalítico de la enzima). Los resultados que se obtuvieron no fueron los favorables ya que de las líneas que se obtuvieron, solo una línea aumento su contenido de resina o caucho natural en un 65% bajo condiciones de laboratorio, pero la planta presentó un fenotipo enano (Dong et al., 2013).

En el caso de *P. andrieuxii*, que fue transformada vía *A. tumefaciens* con la finalidad de sobreexpresar al gen truncado de *HMGR*, se obtuvieron cinco líneas a partir de raíz, las cuales fueron positivas en un PCR amplificando un fragmento de 658 pb que representa al gen truncado de *HMGR*; a estas líneas se les detectó la presencia del ácido betulínico, mediante una CCD, el cual no parece tener un gran aumento como se esperaría en comparación al no transgénico.

Sin embargo por este método no se puede concluir si realmente hay un aumento o no, ya que solo es un método cualitativo, pero lo que sí se puede decir que puede haber varios compuestos que se están produciendo y que con otro método más eficiente como

cuantificación por HPLC o cromatografía de gases masas podrían ser detectados y cuantificados.

BIBLIOGRAFÍA

- Aquil S, Husaini AM, Abdin MZ, Rather GM(2009) Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants. *Planta Med* 75:1453–8
- Dai H., Li W., Mao W., Zhang L., Han G., Zhao K., Liu Y., Zhang Z. 2013. Development of an efficient regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation system in crab Apple (*Malus micromalus*) using cotyledons as explants. *In Vitro Cell. Dev.Biol. Plant* (2014) 50: 1-8.
- Dellaporta S, Wood J, Hicks J. 1983. A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1:19-20
- Dong N., Ponciano G., McMahan C.M., Coffelt T.A., Johnson L., Creelman R., Whalen M.C., Cornish K. (2013). Overexpression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Parthenium argentatum* (guayule). *Industrial Crops and Products*. 46 15-24.
- Godoy-Hernández G., Chappell J., Devarenne T., García-Pineda E., Guevara-García A., Lozoya-Gloria. (1998) Antisense expression of hmg1 from *Arabidopsis thaliana* encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, reduces isoprenoid production in transgenic tobacco plants. *J Plant Physiol* 153 415–24
- Gómez-Villa R. 2012. Transformación genética de *Tagetes erecta* L. con los vectores pCAMBIA 2301 y pBIN19::CLA1 vía *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C
- Harker M., Holmberg N., Clayton JC., Gibbard CL., Wallace AD., Rawlins S., Hellyer AS., Lanot A., Safford R. 2003. Enhancement of seed phytosterol levels by expression

of an N-terminal truncated *Hevea brasiliensis* (rubber tree) 3-hydroxy-2-methylglutaryl-CoA reductase. *Plant Biotechnology Journal*. 1:113–121.

Martin Acosta, J.C. Avilés Berzunza, E. and Godoy Hernández, G. (2012). *In vitro* plant regeneration from explants of *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg). Hansen & Wunderlin. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C

Muñoz Bertomeu J., Sales E., Ros R., Arrillaga I., Segura J. 2007. Up-regulation of an N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase enhances production of essential oils and sterols in transgenic *Lavandula latifolia*. *Plant Biotechnology Journal* 5: 146-758.

Nafis T., Akmal M., Ram M., Alam P., Ahlawat S., Mohd A., Abdin M.Z. (2011). Enhancement of artemisinin content by constitutive expression of the HMG-CoA reductase gene in high-yielding strain of *Artemisia annua* L. *Plant Biotechnol Rep*. 5: 53-60.

Re EB., Jones D., Learned RM. (1997). Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 7(5) 771-784

Sales E., Muñoz-Bertomeu J., Arrillaga I., Segura J. 2007. Enhancement of cardenolide and phytosterol levels by expression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in transgenic *Digitalis minor*. *Planta Med* 73, 605-610.

Solis-Ramos, L.Y., Gonzales-Estrada, T., Andrade-Torres A., Godoy-Hernández G., Castaño de la Serna E. 2010. Endogenous GUS-like activity in *Capsicum chinense* Jacq. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13 (4).

Srivastava T., Das S., Sopory S.K. Srivastava P.S. 2009. A reliable protocol for transformation of *Catharanthus roseus* through *Agrobacterium tumefaciens*.

Physiology Molecular Biology Plants 15 (1): 93-98.

Wang Y., Jing F., Yu S., Chen Y., Wang T., Liu P., Wang G., Sun X., Tang K. (2011) Co-overexpression of the HMGR and FPS genes enhances artemisinin content in *Artemisia annua* L. Journal of Medicinal Plants Research 5 (15) 3396-3403

Yam-Puc A., Avilés Berzunza Elide., Chan Bacab M., Peña Rodríguez L., Godoy Hernández G. 2012. *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Pentalinon andrieuxii* Müll. Arg. Advances in Bioscience and Biotechnology 3: 256-258.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

Este trabajo tuvo como objetivo general obtener plantas de *Pentalimon andrieuxii* transformadas con el gen truncado de la *HMGR*.

Para ello, se estableció por vez primera, un protocolo de transformación estable de *P. andrieuxii* con el gen reportero *GUS*, vía *A. tumefaciens*, que nos sirvió como control positivo de la transformación respecto al gen de la *HMGR*

Se observó que al realizar la prueba histoquímica de *GUS* es necesario verificar si el tejido posee actividad endógena, en caso particular de *P. andrieuxii*, tiene esta actividad a pH 6 (tejido no transformado), pero el mismo tejido a pH 7 no presenta esta actividad de tal manera que al transformarlo el pH del buffer tiene que ser de 7 para no tener falsos positivos.

Utilizando el protocolo previamente establecido con el gen reportero *GUS*, se transformaron explantes de hipocótilos y raíces de *P. andrieuxii* con el gen truncado de la *HMGR*. Los brotes obtenidos se propagaron vegetativamente para la obtención de líneas transgénicas a las cuales se realizó la prueba de PCR, lográndose amplificar un fragmento de 658 pb del gen 35S-5'*HMGR* truncada, comprobando la transformación de la especie con dicho gen, siendo este el primer trabajo donde se obtiene la transformación estable de *P. andrieuxii* con un gen de interés vía *A. tumefaciens*.

4.2. PERSPECTIVAS

Se dispone de un protocolo de transformación estable para *Pentalinon andrieuxii*, establecido con el gen reportero *GUS* vía *Agrobacterium tumefaciens* que puede ser utilizado para estudios posteriores de transformación con otros genes de interés, ya que es una herramienta que facilitará los estudios químicos, bioquímicos, genéticos en esta especie, en las áreas de los isoprenoides, flavonoides y alcaloides.

Para continuar con el estudio de esta especie es necesario la adaptación a macetas de las plantas transformadas que se regeneraron, y de ahí hacer estudios como la detección y cuantificación de los compuestos finales de la ruta del mevalonato mediante técnicas como el HPLC o cromatografía de gases masas, de tal manera que se pueda identificar cuál de los metabolitos finales está siendo producido en mayor cantidad por efecto de la sobreexpresión del gen truncado de *HMGR*, comparándolo con una planta no transformada, de esta manera se dejaría en claro la eficiencia de la metodología propuesta para la producción de dichos compuestos.

Y para un aporte más a este estudio se podría realizar un Southern blot para determinar el número de copias del gen truncado de la *HMGR* que se inserten en las líneas transformadas de *Pentalinon* y determinar si existe una relación entre el número de copias y la producción de ácido betulínico. Otro estudio que podría realizarse sería medir la actividad enzimática de la *HMGR* y compararla con la de las plantas no transgénicas.