CICY

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

"Producción de ácido betulínico en cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin"

Tesis que presenta

Carlos Alberto Sandoval Antúnez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS
(Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida Yucatán, México

2014

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN, A.C.
CICY

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CICY

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **"Producción de ácido betulínico en cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin"** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández** dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Junio de 2014.

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 regirán 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:

Carlos Alberto Sandoval Antúnez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y forma parte del proyecto titulado "**Producción de ácido betulínico en cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin**" bajo la dirección del **Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández.**

AGRADECIMIENTOS

"Y ya que todas las cosas han contribuido a tu avance, debes incluir todas las cosas en tu gratitud"

Ralph Waldo Emerson.

A CONACYT por la beca otorgada No. 271155.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. por permitirme la realización de mis estudios de Maestría y el uso de sus instalaciones dentro de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP).

Al Dr. Gregorio Godoy Hernández por darme una gran oportunidad, la de aceptarme dentro de su grupo de trabajo para desarrollar mi trabajo de tesis de Maestría, por todo el conocimiento compartido, sus consejos y observaciones siempre en pro de mi formación y crecimiento como profesional y personal.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por formar parte de mi comité tutoral además de permitirme desarrollar parte de mi trabajo de tesis dentro del laboratorio No. 2 de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología (UBT) del CICY, por todas sus aportaciones y crítica constructiva y objetiva para que este trabajo fuera llevado a cabo siempre de la mejor manera.

Al Dr. Angel Arturo Guevara García por ser parte de mi comité tutoral, por fomentar con cada consejo y observación puntual las ganas de enriquecer mi trabajo y el crecimiento de mi conocimiento.

A los Doctores Felipe A. Vázquez Flota y Luisa I. López Ochoa por todas sus valiosas observaciones y correcciones que permitieron mejorar sustancialmente mi trabajo de investigación.

Al Dr. Alejandro Yam Puc, por todo su apoyo en la etapa inicial de este trabajo, por ayudarme a entender las bases en el trabajo con raíces transformadas.

A la Maestra en Ciencias Elidé Avilés Berzunza, por todo su apoyo técnico y excelente calidad humana, siempre incondicional para poder desarrollar todo mi trabajo dentro del laboratorio No. 26.

A la Químico Biólogo Bromatólogo Karlina García Sosa por todo su apoyo técnico dentro del laboratorio No. 2 de Química Orgánica con el análisis por CCD y HPLC. Por su paciencia y amabilidad.

Agradezco la ayuda desinteresada de la Maestra en Ciencias Margarita Aguilar Espinosa por ayudarme con una metodología de extracción de ADN y con ello su paciencia y conocimiento. A la Ingeniero Bioquímico Reina Marilú Gómez Villa por su ayuda durante el proceso de transformación genética con *Agrobacterium rizhogenes.* Al Ingeniero Bioquímico Radamés Álvarez Zapata por toda su ayuda con la técnica de HPLC y familiarización con el laboratorio No. 2 de Química Orgánica. Al maestro en Ciencias Juan Canché y a la Ingeniero Bioquímico Martha Hernández por su apoyo en el aprendizaje de la extracción de ADN genómico, por su amistad y conocimiento compartido.

A mis amigos del Laboratorio No. 26 de la UBBMP: Yesseña, Jhony, David, Raimundo, Abi, Jareli, Norma, Miguel, Marilú, Dinora, Diana, Juan y Martha; por su apoyo, compañerismo y amistad que hicieron de este aprendizaje una experiencia amena para convivir y hacer amigos.

A la segunda familia, la del laboratorio No. 2 de Química Orgánica de la UBT: Fabiola, Landy, Radamés, Mickel, Gloria e Iván; por su amabilidad y ayuda al realizar mi trabajo dentro de su laboratorio.

A mis amigos de CICY Rosa Gómez y Leonardo Acosta, por su increíble amistad, por tantas historias y porque hicieron de esta aventura una inolvidable experiencia.

Finalmente, a todos aquellos de directa o indirectamente contribuyeron a mi formación, al desarrollo de este trabajo y con ello, la realización de un objetivo más en mi proyecto de vida, GRACIAS.

DEDICATORIAS

"¿Quién soy yo?

Yo soy las manos de mi abuela.
Soy las lágrimas y el cuidado de mis dos madres.
La fuerza de mi padre.
El apoyo incondicional de mi hermano y hermana, el abrazo de mis familiares.
Las bromas de mis amigos, el tiempo compartido, las inolvidables experiencias...
Soy el amor de quien me ha amado y la disciplina de mis maestros.

Soy la inspiración que muchos me han brindado para seguir adelante y de toda la gente que aplaudió mis éxitos
El consuelo y aliento de aquellos cuando mis tropiezos.
Soy los consejos de muchos que han creído en mí.

No soy sólo yo...

Soy la suma de todos.
El orgulloso resultado del trabajo de otros.
Aquellos que han repercutido en mi vida de tantas maneras...
Mucho de lo que soy, hoy te lo debo a ti.

Llegó el momento. Es tiempo de dar, tiempo de retribuir."

.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN **1**

CAPÍTULO I **3**

1. ANTECEDENTES 3

1.1. ÁCIDO BETULÍNICO 3

1.1.1. ISOPRENOIDES COMO PRODUCTOS NATURALES Y METABOLITOS SECUNDARIOS 5

1.1.2. TRITERPENOS PENTACÍCLICOS 8

1.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES 11

1.2.1. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA 13

1.2.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA CON *AGROBACTERIUM RIZHOGENES* 14

1.2.3. RAÍCES TRANSFORMADAS/ RAÍCES PILOSAS O "HAIRY ROOTS" COMO SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO 20

1.3. *PENTALINON ANDRIEUXII* 21

1.4. ELICITORES DEL METABOLISMO SECUNDARIO 24

1.4.1. ÁCIDO JASMÓNICO 27

1.4.2. SULFATO DE VANADILO HIDRATADO 30

JUSTIFICACIÓN 32

HIPÓTESIS 32

OBJETIVO GENERAL. 32

OBJETIVOS ESPECÍFICOS. 33

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 33

BIBLIOGRAFÍA 35

CAPÍTULO II 51

2. MATERIALES Y MÉTODOS 51

2.1. OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL: PROTOCOLO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *P. ANDRIEUXII* 51

2.1.1. ASEPSIA DE LAS SEMILLAS Y TRATAMINTO DE PRE-GERMINACIÓN 51

2.1.2. CONDICIONES DE GERMINACIÓN 51

2.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA 52

2.2.1. CEPA BACTERIANA 52

2.2.2. MANTENIMIENTO DE RAÍCES TRANSFORMADAS 53

2.3. GENOTIPIFICACIÓN DE RAÍCES TRANSFORMADAS POR PCR 53

2.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN VEGETAL. 53

2.3.2. AMPLIFICACIÓN DE GENES DEL ADN-T POR PCR 54

2.4. CURVAS DE CRECIMIENTO 56

2.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO MEDIANTE LA PREPARACIÓN DE FRACCIONES DE POLARIDAD MEDIA A PARTIR DE RAÍCES TRANSFORMADAS Y MEDIOS DE CULTIVO DE *P. ANDRIEUXII* 56

2.6. ANÁLISIS DE ÁCIDO BETULÍNICO POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) 57

2.7. USO DE ELICITORES PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO 58

BIBLIOGRAFÍA 59

CAPÍTULO III 61

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 61

3.1. OBTENICIÓN DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *P. ANDRIEUXII* 61

3.2. AMPLIFICACIÓN DE LOS TRANSGENES *ROL*A Y *ROL*C POR PCR 62

3.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *P. ANDRIEUXII* 66

3.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE *PENTALINON ANDRIEUXII* POR CCD 69

3.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ELICITORES: ÁCIDO JASMÓNICO Y SULFATO DE VANADILO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNÍCO 70

3.4. DISCUSIÓN 77

BIBLIOGRAFÍA 81

CAPÍTULO IV 85

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 85

4.1. CONCLUSIONES. 85

4.2. PERSPECTIVAS. 87

BIBLIOGRAFÍA 88

APÉNDICES 89

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura química del ácido betulínico 4

Figura 1.2. Biosíntesis de terpenoides en plantas. 6

Figura 1.3. Esquema de la biosíntesis de terpenos en las células vegetales 8

Figura 1.4. Estructuras de los tres principales esqueletos triterpénicos..... 8

Figura 1.5. Formación de triterpenos a partir de farnesil pirofosfato (FPP)..... 10

Figura 1.6. Presentación esquemática de las principales áreas en el cultivo de células y tejidos vegetales resaltando algunos de sus campos de aplicación 13

Figura 1.7. Proceso de infección de *Agrobacterium* en una célula vegetal..... 15

Figura 1.8. Esquema general del plásmido Ri *Agrobacterium rhizogenes*..... 17

Figura 1.9. Presentación esquemática del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* 17

Figura 1.10: Hojas y frutos típicos de *Pentalinon andrieuxii.* 22

Figura 1.11. Estructura química del ácido jasmónico 27

Figura 1.12. Esquema de la ruta biosintética del ácido jasmónico (JA), incluyendo las oxilipinas intermediarias..... 29

Figura 1.13. Estructura química del sulfato de vanadilo 30

Figura 1.14. Esquema de la estrategia experimental realizada. 34

Figura 3.1. Raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* a partir de hojas, tallos y raíces..... 62

Figura 3.2. Gel de electroforesis con las muestras de ADN genómico extraído de raíces transformadas de *P. andrieuxii.* 63

Figura 3.3. Gel de electroforesis con los productos de amplificación de los genes *rol*A y *rol*C a partir de ADN plasmídico de *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. 64

Figura 3.4. Gel de electroforesis con los productos de amplificación del gen *rol*A amplificado por PCR. 65

Figura 3.5. Gel de electroforesis con los productos de amplificación del gen *rol*C amplificado por PCR. 66

Figura 3.6. Esquema general de la curva de crecimiento establecida para cada línea de raíces transformadas de *P. andrieuxii*. 67

Figura 3.7. Gráfica del peso fresco, peso seco y conductividad del medio durante los diferentes días de cultivo (3-45 días) de las cuatro líneas de raíces de *P. andrieuxii*..... 68

Figura 3.8. Perfil cromatográfico por CCD de las fracciones de polaridad media de raíces y medios de la curva de crecimiento de la línea D. 69

Figura 3.9. Perfil cromatográfico por CCD de los extractos de polaridad media de raíces y medios de los días 33 y 36 de cultivo de las cuatro líneas bajo estudio. 70

Figura 3.10. Perfil cromatográfico por CCD de las fracciones de polaridad media pertenecientes al tratamiento con AJ de los medios de cultivo y raíces de la línea D. 71

Figura 3.11. Perfil cromatográfico por CCD de las fracciones de polaridad media pertenecientes al tratamiento con VOSO4 de los medios de cultivo y raíz de la línea D.. 72

Figura 3.12. Perfiles cromatográficos por CCD de las fracciones de polaridad media comparando los tratamientos con AJ y $VOSO_4$ en muestras de raíces de la línea D. 73

Figura 3.13. Perfil cromatográfico por HPLC del estándar de ácido betulínico (Sigma) a una concentración de 1mg/mL de disolvente. 74

Figura 3.14. Curva de calibración de ácido betulínico (AB). 74

Figura 3.15. Perfil cromatográfico por HPLC de extractos de raíces expuestas a 100µM

de $VOSO_4$ por 24h. 75

Figura 3.16. Perfil cromatográfico por HPLC de extractos de raíces expuestas a 200µM de AJ por 24h 75

Figura 3.17. Gráfica del resultado de la cuantificación por HPLC de AB para el tratamiento con AJ. 76

Figura 3.18. Gráfica del resultado de la cuantificación por HPLC de AB para el tratamiento con $VOSO_4$. 76

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Estructura química del ácido betulínico 9

Cuadro 1.2. Principales características de los genes rol contenidos en el ADN-T del plásmido Ri de *Agrobacterium rizhogenes* 19

Cuadro 1.3. Cultivos de raíces transformadas establecidos recientemente (2008 – 2010)* 20

Cuadro 1.4. Clasificación taxonómica del género *Pentalinon* 22

Cuadro 1.5. Ejemplos de producción de metabolitos aumentada a través del uso de elicitores 26

Cuadro 2.1. Condiciones de PCR para amplificación de los genes *rol*A y *rol*C 55

Cuadro 3.1. Transformación genética con *A. rizhogenes* en hojas, tallos y raíces de *P. andrieuxii* 61

Cuadro 3.2. Condiciones de PCR optimizadas para la amplificación de *rol*A y *rol*C 64

ABREVIATURAS

AACT	Acetoacetil-CoA tiolasa
Aas	alfa-amirina-sintasa
AB	Ácido betulínico
AJ	Ácido jasmónico
AOS	Áleno oxido sintasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-T	ADN de transferencia
ARN	Ácido ribonucleico
AtLUP1	*Arabidopsis thaliana* lupeol sintasa
Bas	beta-amirina sintasa
CCD	Cromatografía de capa delgada
CMK	4-difosfocitidil metileritritol cinasa
CMS	4-difosfocitidil metileritrol sintasa
CrAO	*Catharanthus roseus* amirina C-28 oxidasa
CrAS	*Catharanthus roseus* amirina sintasa
CRT	Cultivo de raíces transformadas
CYPs	Citocromo P450 mono-oxigenasas
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DOXP	1-deoxi-D-xylulosa 5-fosfato
DXS	1-Deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa
DXP	1-Deoxi-D-xilulosa 5-fosfato
ER	*Reticle endoplasmatic*
ESR	*Electron Spin Resonance*
EST	*Expressed Sequence Tag*
FPP	Farnesil pirofosfato
FPPS	FPP sintasa
GA3-P	Gliceraldehido-3-fosfato
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GGPPS	GGPP sintasa
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
HMGS	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa

HPLC	*High Liquid Performance Chromatography*
IDI	Isopentenil difosfato isomerasa
IPP	Isopentenil pirofosfato
LOXs	Lipooxigenasas
LUS	Lupeol- sintasa
MAMPs	*Microbe-Associated Molecular Patterns*
MDS	Metileritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa
MEP	2-*C*-metil-D-eritrol 4 fosfato
MVA	Mevalonato
MVK	Mevalonato cinasa
ORFs	*Open Reading Frames*
OSCs	*OxidoSqualene Cyclases*
PAMPs	*Pathogen-Associated Molecular Patterns*
PDC	*Pyruvate Dehydrogenase Complex*
PMD	*5-diphosphomevalonate Decarboxylase*
PMK	*5- Phosphomevalonate Kinase*
PSY	*Phytoene Synthase*
RolA	*root locus* A
RolB	*root locus* B
RolC	*root locus* C
RolD	*root locus* D
RI	*Root Inducing*
SAAT	Sonicación asistida por transformación mediada por *Agrobacterium*
SMs	*Secondary Metabolites*
SQE	*Squalene Epoxidase*
SQS	*Escualeno Synthase*
Ti	*tumor inducing*
TL-DNA	ADN-T borde izquierdo
TR-DNA	ADN-T borde derecho

RESUMEN

El desarrollo de cultivos de tejidos vegetales y de técnicas de elicitación de metabolitos secundarios constituye una alternativa biotecnológica al cultivo de plantas completas para la obtención de productos valiosos (fitoquímicos). Tres son los sistemas de cultivo de tejidos vegetales frecuentemente considerados para la producción de metabolitos secundarios: las suspensiones celulares, células inmovilizadas artificialmente y cultivo de raíces transformadas (CRT) o raíces pilosas ("Hairy-roots"), estas últimas son de interés particular debido a su capacidad de rápido crecimiento, de biosintetizar un amplio espectro de fitoquímicos, así como por su estabilidad genética y facilidad de mantenimiento. Dichas características hacen del CRT, un modelo que permite una reducción en el tiempo requerido para lograr una producción eficiente de diferentes fitoquímicos deseados, existiendo también existe la posibilidad de obtener productos nuevos que no son sintetizados por las plantas de forma natural.

Uno de estos valiosos fitoquímicos es el ácido betulínico (AB), un triterpeno pentacíclico tipo lupano que exhibe una gran variedad de propiedades biológicas (leishmanicida, antiinflamatorio, antiedémico, anticancerígeno, antibacteriano, antiviral). Recientemente se reportó el aislamiento de AB a partir de extractos de hoja de *Pentalinon andrieuxii*, una planta de la familia Apocynaceae que se encuentra distribuida a lo largo de la tierra caliente del este de México hasta Centroamérica.

En este trabajo se logró el establecimiento de cuatro líneas de cultivos de raíces transformadas de *P. andrieuxii* a partir de explantes de hojas infectados con *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. Los cultivos se caracterizaron en su crecimiento vs tiempo estableciendo el día 30 de cultivo como el punto de producción máxima de biomasa de las cuatro líneas. La presencia de AB en extractos o fracciones se detectó por CCD y HPLC y ambos métodos se utilizaron para evaluar y comparar el efecto de ácido jasmónico y sulfato de vanadilo (100, 200 y 400 µM) en la producción de AB, siguiendo un curso temporal de cosecha post-elicitación de 24, 48 y 72 h, cuantificando la producción de ácido betulínico en la línea D (línea de mayor producción de biomasa) de los cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii.*

Abstract

The development of plant tissue culture techniques and secondary metabolites elicitation provide a viable alternative for the production of useful phytochemicals. Three plant tissue culture systems are often considered for the production of secondary metabolites: cell suspensions, artificially immobilized cells and hairy root culture (HRC). Hairy roots culture highlights by its capacity for growth, genetic stability, easiness of maintenance and biosynthesis of a broad spectrum of phytochemicals. These characteristics make the HRT a model that allows a reduction in the required time for the efficient production of different desired phytochemicals; there also exist the possibility of new products that are not synthesized by plants naturally.

One of these useful phytochemicals is the betulinic acid (BA), a lupan type pentacyclic triterpene wich exhibits a variety of biological properties (leishmanicidal, anti-inflammatory, anti-edemic, anti-cancer, anti-bacterial, anti-viral). Recently, it was reported the isolation of BA from *Pentalinon andrieuxii* leaf extracts, a plant from the Apocynaceae family well distributed throughout the lowlands from eastern Mexico to Central America.

In this work, we established four hairy root culture lines from leaf explants of *P. andrieuxii* using infection with *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834). Characterizing the growth of these lines over time, the 30th day of growth was established as the coincidence point for a maximum biomass production among the four lines. The presence of betulinic acid was identified by Thin Layer Chromatography (TLC) and the effect over the BA production of two elicitors (jasmonic acid and vanadyl sulfate) at 100, 200 and 400 μM concentrations in a time course of 24, 48 and 72 h after elicitation, was evaluated in the higher biomass production line (D) line of *Pentalinon andrieuxii* hairy roots culture.

INTRODUCCIÓN

Las plantas sintetizan y acumulan un amplio rango de moléculas, de productos naturales involucrados en procesos fisiológicos y ecológicos fundamentales. Algunos de estos productos poseen potenciales terapéuticos los cuales han sido explorados por miles de años a través de la medicina tradicional. Con base en su estructura y origen biosintético, los productos naturales derivados de las plantas pueden ser clasificados como isoprenoides, alcaloides y compuestos fenólicos, principalmente. La demanda de estos compuestos está en continua expansión (Fowler, 2006; Raskin *et al.*, 2002). Ante esta demanda, el cultivo de células vegetales es una herramienta que además de ser considerada como una fuente de productos naturales, permite estudiar el metabolismo de las plantas, su fisiología y desarrollo.

Los tres sistemas de cultivo de células vegetales frecuentemente considerados para la producción de metabolitos son las suspensiones celulares, las células inmovilizadas y el cultivo de raíces transformadas o raíces pilosas ("Hairy-roots") y el cultivo de brotes. Con el fin de aumentar la producción de los metabolitos secundarios vegetales se han implementado estrategias como la selección de líneas celulares de alta producción de metabolitos, cultivos *in vitro*, selección y optimización del medio, uso de precursores y de elicitores, entre otras (Schlatmann *et al*, 1996).

Pentalinon andrieuxii es una planta trepadora encontrada en la península de Yucatán; de esta especie se ha reportado el aislamiento de ácido betulínico (AB) (Domínguez-Carmona *et al.*, 2010), un triterpeno pentacíclico tipo lupano que exhibe una gran variedad de propiedades biológicas. La especie ya ha sido sometida al proceso de transformación transitoria vía *Agrobacterium tumefaciens* (Yam Puc *et al.*, 2012b); por lo que en este trabajo se utilizó *A. rhizogenes* para la obtención de raíces transformadas con el objetivo de determinar su potencial en la producción de ácido betulínico a escala de matraz (250mL).

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1. ÁCIDO BETULÍNICO

El ácido betulínico (AB) **(ácido 3β-hidroxi-lup-20(29)-en-28 oico)** (**Figura 1.1**) es un triterpeno pentacíclico natural tipo lupano perteneciente a la familia de compuestos llamada isoprenoides (también llamados terpenos o terpenoides) (más detalles en sección 1.1.1). Es uno de los triterpenos vegetales más comúnes junto con los ácido ursólico y oleanólico (Frighetto *et al.,* 2005) encontrado especialmente en *Betula spp* (Betulaceae) y *Syzigium claviforum* (Myrtaceae). También se ha aislado de especies como *Ziziphus* spp. (Rhamnaceae), *Diospyros* spp. (Ebenaceae) y *Paeonia* spp. (Paeoniaceae) (Cichewicz y Kouzi, 2004).

Su identificación ha sido realizada por espectrometría (O´Connell *et al.*, 1998), su separación por HPLC (Zhao *et al.*, 2007; Ossipov *et al.,* 1996) y por espectroscopía infrarroja (Falamas *et al.*, 2011; Cântă Pânzaru *et al.*, 2002).

El AB posee propiedades medicinales contra la malaria, como antiinflamatorio, antitumoral (Fulda, 2008; Kvasnica *et al.*, 2005; Cichewicz y Kouzi, 2004) y contra el VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) retardando la progresión por infección con este virus que eventualmente conduce al SIDA, siendo su modo de acción la prevención de la formación de sincitios (célula multinucleada) (Crevelin *et al.,* 2006; Zuco *et al.*, 2002). En todos los casos el efecto del AB es limitado por su poca solubilidad.

Así bien, el AB puede ser obtenido mediante una reacción de dos pasos a partir de su precursor disponible, betulína **(3β -lup-20(29)-ene-3, 28 diol)** (**Figura 1.1**), uno de los primeros productos aislados en 1788 de la corteza del abedul blanco (*B. alba*) (Moghaddam *et al.*, 2012).

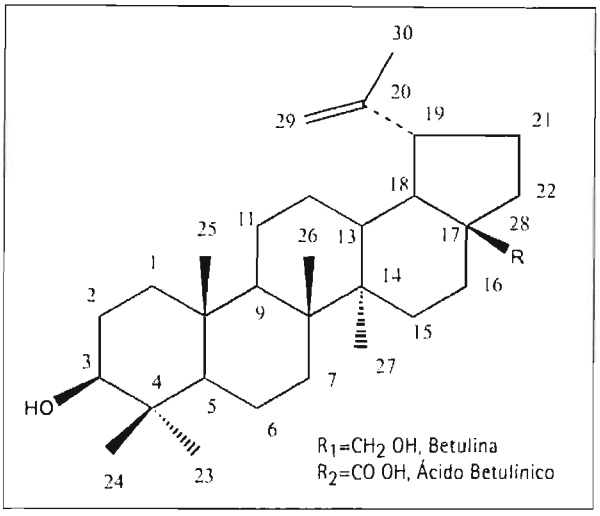


Figura 1.1. Estructura química del ácido betulínico (Tomado de Fusco *et al.*, 2004).

Por otra parte, la principal problemática en la comercialización de productos naturales de plantas es la baja acumulación que se presenta, obstaculizando su purificación a partir de la fuente natural. Cuando la extracción del compuesto a partir de su fuente natural no es suficiente, existen soluciones biotecnológicas para incrementar la producción de compuestos orgánicos, siendo las siguientes algunas de ellas:

- Fitomejoramiento tradicional y/o por ingeniería genética para generar cultivares transgénicos que acumulen niveles más altos de los compuestos deseados.
- Desarrollo de cultivos escalables, como las suspensiones celulares o raíces vegetales.
- La ingeniería de hospederos microbianos, para producir los compuestos de interés (Moses *et al.*, 2013).

Aunque poco se sabe del estatus de producción mundial de ácido betulínico, es conocido que la extracción es un proceso costoso que requiere considerables cantidades de la especie fuente. Por ello, el desarrollo de sistemas más eficientes de producción de AB utilizando modelos *in vitro* es una alternativa interesante de explorar para la producción de este compuesto.

1.1.1 ISOPRENOIDES COMO PRODUCTOS NATURALES Y METABOLITOS SECUNDARIOS

Los isoprenoides comprenden los compuestos estructuralmente más diversos. Son metabolitos derivados del isopentenil pirofosfato (IPP) y del Dimetilalil difosfato (DMAPP) que se originan por la polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno (o 2-metil-1,3-butadieno) y constituyen el mayor grupo de productos naturales de plantas, con más de 20,000 compuestos identificados (Phillips *et al.*, 2006). Esta familia de productos naturales incluye diferentes compuestos. Por ejemplo, reguladores de crecimiento como las giberelinas, ácido abscísico, estringolactonas y brasinoesteroides, así como los pigmentos carotenoides y fitoesteroles los cuales están involucrados en funciones básicas en plantas como fotosíntesis, permeabilidad y fluidez en la membrana (Vranová *et al.*, 2012; Bohlmann y Keeling, 2008) Además, la mayoría de los isoprenoides en plantas juegan un papel crucial en la interacción de la planta con el medio ambiente, como atrayentes de polinizadores, repelentes de herbívoros-insectos, como toxinas o antibióticos (Gershenzon y Dudareva, 2007).

A pesar de la diversidad estructural, los isoprenoides comparten un origen biosintético común con dos rutas que convergen para dar origen a la unidad C5 de isopreno (C_5H_8). La fusión repetida de la molécula de isopreno, da origen a moléculas de diferentes longitudes y el número de unidades determina la clasificación de estos compuestos. Como ya se indicó, en plantas superiores, la biosíntesis de los isoprenoides inicia con la formación de isopentenil pirofosfato (IPP), el principal precursor, a través de una de las dos siguientes rutas:

1. Del mevalonato (**MVA**)/ 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGR) que ocurre en el citosol y de donde se sintetizan citocininas, sesquiterpenos, esteroles y politerpenos.

2. De la 2-*C*-metil-D-eritrol 4 fosfato (**MEP**)/ 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) que se realiza en los plastidos, donde ocurre la biosíntesis de monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (Allinger *et al.*, 1986).

El IPP se isomeriza a dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Una condensación consecutiva de las unidades de IPP y DMAPP conduce a la formación de pirofosfatos prenilados,

precursores inmediatos de las diferentes clases de terpenoides (figura 1.2). Estas condensaciones son catalizadas por preniltransferasas específicas, nombradas de acuerdo a los productos que generan. Seguido a esto, terpeno-sintasas modifican estos compuestos a esqueletos isoprenoides (Chen et al., 2011) en los cuales ocurren subsecuentes modificaciones enzimáticas para generar la diversidad estructural y funcional de los diferentes compuestos.

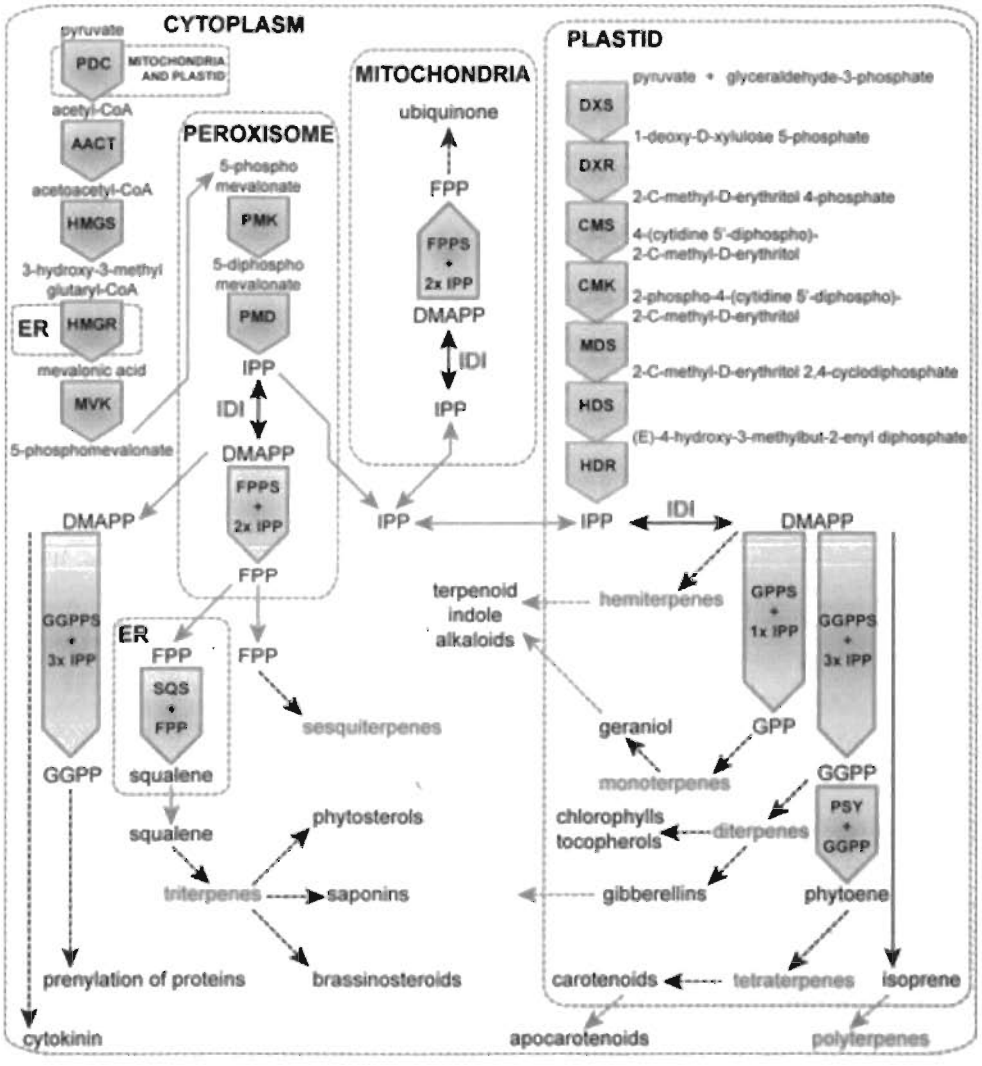


Figura 1.2. Biosíntesis de terpenoides en plantas. En plantas existen dos vías distintas para la biosíntesis de los precursores universales de los isoprenoides: IPP y DMAPP. La vía del mevalonato (MVA) (púrpura) que se presenta en el citoplasma, peroxisomas, las mitocondrias y retículo endoplasmático (ER) y la ruta (MEP) (azul), que se localiza en los plástidos. Las preniltransferasas (naranja) generan los precursores inmediatos de las diferentes clases de terpenoides (verde). Las flechas punteadas indican múltiples reacciones. Las cajas punteadas grises indican la localización subcelular de la vía. Flechas grises indican metabolitos que son

transportados entre los compartimentos subcelulares. AACT, acetoacetil-CoA tiolasa; CMK, 4-difosfocitidil metileritritol cinasa, CMS, 4-difosfocitidil- metileritrol sintasa; DMAPP, dimetilalil pirofosfáto; DXR, desoxixilulosa 5-fosfato reductoisomerasa; DXS, desoxixilulosa 5-fosfato sintasa; FPP, farnesil pirofosfato; FPPS, FPP sintasa; GGPP, geranilgeranil pirofosfato; GGPPS, GGPP sintasa; GPP, geranil pirofosfato, GPPS, GPP sintasa, HDR, hidroximetilbutenil 4-difosfatol reductasa; HDS, hidroximetilbutenil 4-difosfato sintasa; HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; HMGS, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa; IDI, isopentenil difosfato isomerasa; IPP, isopentenil pirofosfato; MDS, metileritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa; MVK, mevalonato cinasa; PDC, complejo piruvato deshidrogenasa; PMD, 5-difosfomevalonato decarboxilasa; PMK, 5-fosfomevalonato cinasa; PSY, fitoeno sintasa, SQS, escualeno sintasa (Tomado de Moses *et al.*, 2013).

En el esquema de la figura 1.3 se representa una cadena isoprenoide (5, 10, 15, etc. átomos de carbono), a la que se van adicionando unidades IPP alargando la cadena y formando los terpenos sucesivos. Si el IPP se une a una base nitrogenada como la adenina, de lugar a la formación de citocininas, que constituyen un tipo de fitorreguladores. En cambio, si se unen dos IPP se forma un monoterpeno (C10), el GPP (geranil pirofosfato) generando diferentes compuestos volátiles como geraniol, eucaliptol, gomenol, etc., que constituyen algunos de los aromas más conocidos en plantas. El agregado de otra unidad IPP al GPP forma el sesquiterpeno farnesil difosfato (FPP , C15), el que a través de la ciclización y oxidación genera, entre otros metabolitos, productos denominados fitoalexinas, que le sirven a la célula vegetal (y el organismo correspondiente) como "antiséptico". Así entonces, el agregado de unidades de IPP al FPP da lugar a la formación de diversos compuestos. Si otro IPP que se agrega al FPP dando lugar a la formación de geranil-geranil difosfato (GGPP, C20). Del GGPP se derivan diversos metabolitos, siendo los más conocidos las giberelinas, fitorreguladores que derivan de formas cíclicas de GGPP con sucesivas oxidaciones hasta la biosíntesis de sus formas activas (Pérez-Urria Carril, 2009).

El mecanismo de adición de isoprenos puede darse por adición de IPP pero también puede ocurrir por la unión de terpenos de cadenas más larga. Por ejemplo los triterpenos (C30) pueden surgir al unirse dos sesquiterpenos (dos FPP), los tetraterpenos (C40) al unirse dos unidades de diterpenos (GGPP) dando origen por ejemplo, a los carotenoides y xantofilas. Finalmente, la adición de un número indeterminado de unidades IPP genera polímeros de cadena larga que tienen propiedades elásticas notables. Este es el caso del caucho (o látex), compuesto segregado por la planta Hevea brasilensis (y otras especies laticíferas), con amplia utilización en procesos industriales (Pérez-Urria Carril, 2009).

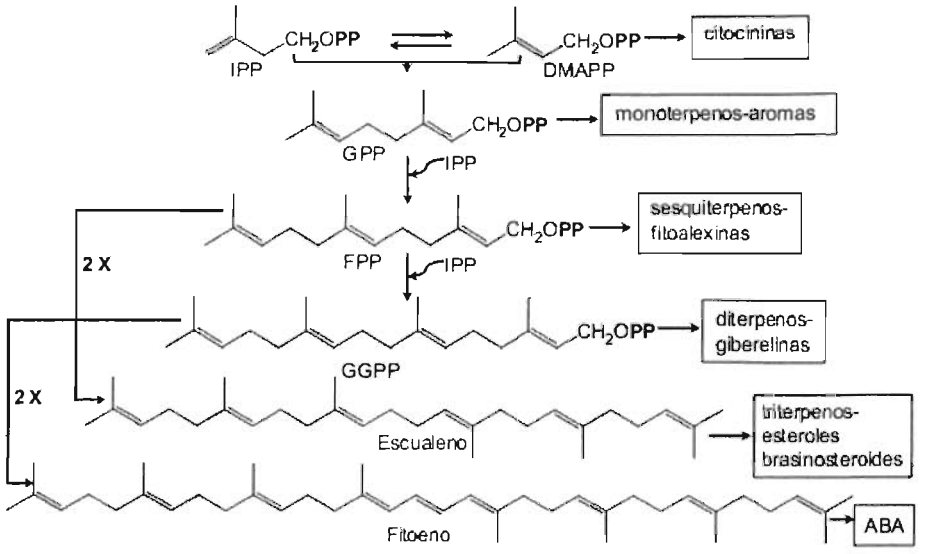


Figura 1.3. Esquema de la biosíntesis de terpenos en las células vegetales (Tomado de Allinger *et al.*, 1986).

1.1.2. TRITERPENOS PENTACÍCLICOS

Dentro de la biosíntesis de isoprenoides, si dos FPP se unen, formarán un triterpeno (C30). Los triterpenos (C30) constituyen el grupo más extenso de isoprenoides debido a su gran diversidad estructural y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en estado libre; organizados en tres clases de acuerdo a su estructura en el núcleo (lupano, oleanano o ursano) (**Figura 1.4**) y subclasificados de acuerdo a la presencia, posición y número de fracciones cetónicas e hidroxílicas (**Cuadro 1.1**) (Patocka, 2003; Connolly y Hill, 2000).

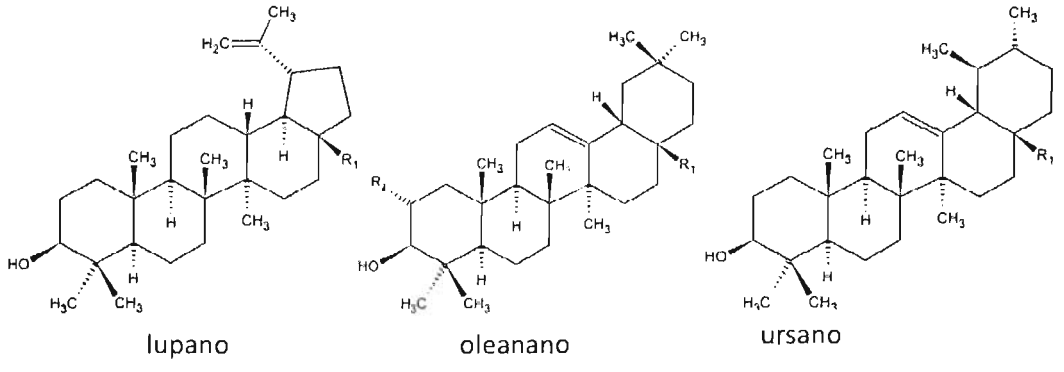


Figura 1.4. Estructuras de los tres principales esqueletos triterpénicos (Modificado de Jäger *et al.*, 2009).

Cuadro 1.1. Caracterización de los triterpenos (Tomado y modificado de Jäger *et al.*, 2009).

Núcleo triterpénico	Triterpeno	R1	R2	M (g/mol)	Abreviación
	Lupeol	CH_3		426.70	LU
Lupano	Betulina	CH_2OH		442.72	BE
	Ácido betulínico	COOH		456.71	BA
	β – amirina	CH_3	H	426.70	bAM
Oleanano	Eritrodiol	CH_2OH	H	442.72	ER
	Ácido oleanólico	COOH	H	456.71	OA
	Ácido maslínico	COOH	OH	472.70	MA
	α – amirina	CH_3		426.70	aAM
Ursano	Uvasol	CH_2OH		442.72	UV
	Ácido ursólico	COOH		456.71	UA

Todos los triterpenos en la naturaleza tienen su origen en el escualeno, formado por una condensación cola-cola del farnesol, aislado por primera vez del aceite de hígado de tiburón. El escualeno puede adoptar diferentes conformaciones, gracias a la flexibilidad de su cadena y de ellas depende el modo de ciclación y, como consecuencia, la formación de diferentes esqueletos, los cuales a su vez pueden modificarse por arreglos y migraciones de hidruros y metilos a partir de los ciclos formados inicialmente. Dos grandes grupos de estructuras policíclicas son originados en las primeras trasformaciones: los tetracíclicos, precursores de esteroides y conocidos por ello con el nombre de "esteroles" y los pentacíclicos, para los cuales se reserva el término "triterpenoides". La estereoquímica de los diferentes centros asimétricos depende del doblamiento inicial de la molécula de escualeno. (De Marcano y Hasegawa, 1991).

La condensación "cabeza–cola" de dos unidades de IPP con una de DMAPP produce la unidad C_{15} farnesil pirofosfato (FPP) **(1)**, cuya fusión subsecuente de dos unidades se fusiona "cabeza–cabeza" para originar el triterpeno precursor lineal C_{30}, escualeno **(2)**. Este compuesto es epoxidado a 2.3 –oxidoescualeno **(3)** (Augustín *et al.*, 2011), el cual a su vez es ciclado normalmente por oxidoescualeno ciclasas específicas (OSCs) hacía

estructuras tetra o pentacíclicas para formar damaranos, tirucalanos y fitoesteroles, o los oleananos, ursanos, lupanos y taraxasteranos, respectivamente **(4).** La ciclación de 2,3–oxidoescualeno forma el punto de ramificación de los triterpenos (Moses *et al.,* 2013) (**figura 1.5**).

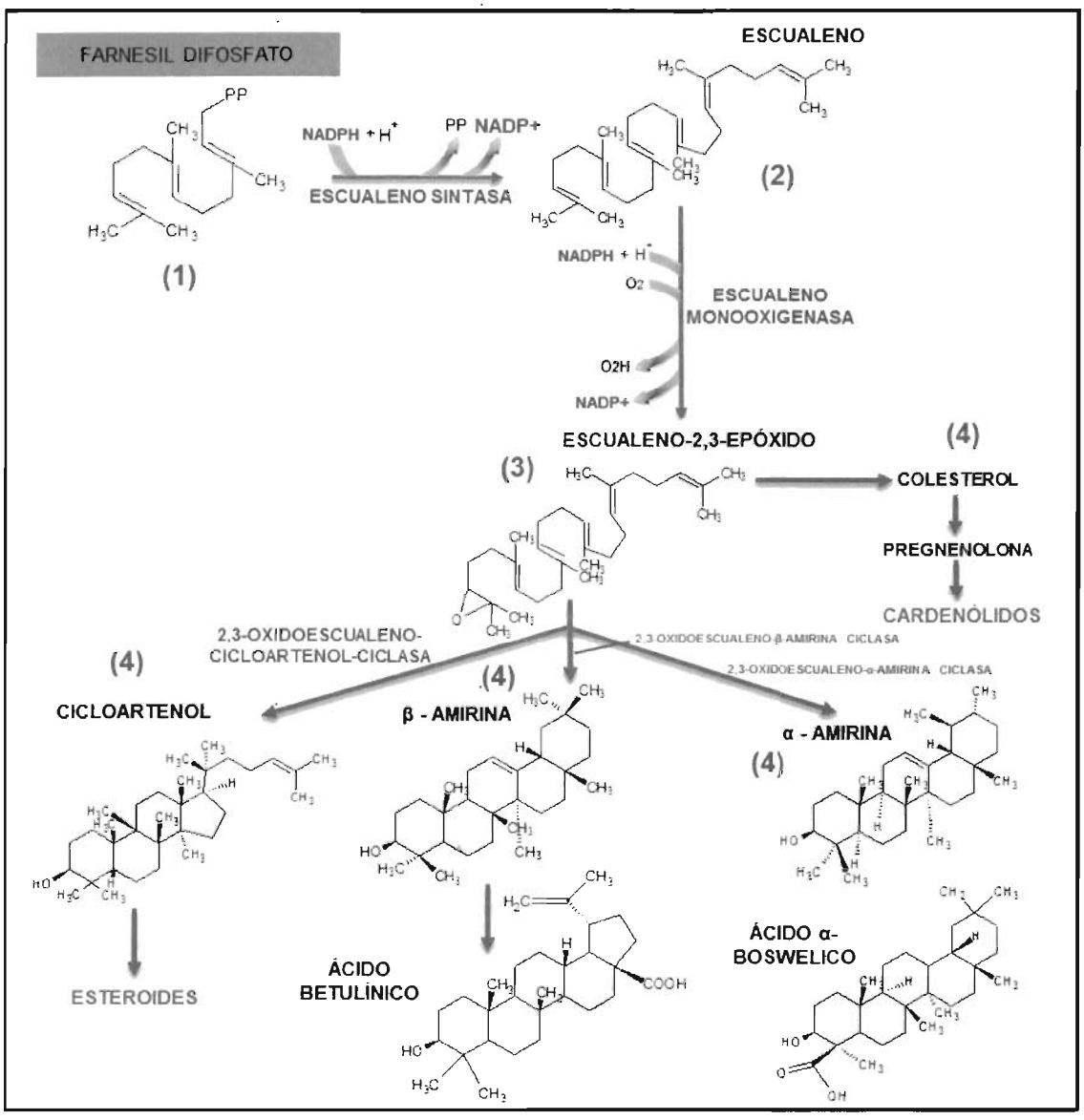


Figura 1.5. Formación de triterpenos a partir de farnesil pirofosfato (FPP). Por acción de la escualeno sintasa se forma el triterpeno precursor lineal C_{30}, el escualeno. Este compuesto es epoxidado a 2,3 –oxidoescualeno, el cual a su vez es ciclado normalmente por oxidoescualeno ciclasas específicas (OSCs) hacía estructuras treta o pentacíclicas (Modificado de Michal & Schomburg, 2012).

En el ámbito molecular, la caracterización de genes responsables en la producción de triterpenos pentacíclicos se ha realizado a partir de un enfoque integral que incluye datos de secuencias por análisis de EST (Expressed Sequence Tag), así como perfiles transcripcionales y metabólicos, además de la expresión heteróloga para evaluar la actividad enzimática (Marasco y Schmidt-Dannert, 2007). Este enfoque multidisciplinario fue utilizado con éxito para identificar varios genes de glucosiltransferasa involucrados en la biosíntesis de triterpenos en *Medicago truncatula* (Achnine *et al.* 2005). Dos trabajos sobresalen en la caracterización de genes de la familia CYP, responsables de la producción de triterpenos pentacíclicos, entre ellos, ácido betulínico.

- Fukushima *et al.,* (2011) quienes a través de ensayos *in vitro*, identificaron CYP716A12 caracterizándola como una enzima (oxidasa) multifuncional con actividades β-amirina 28-oxidasa, α-amirina-28-oxidasa y lupeol 28-oxidasa siendo capaz de generar ácido ursólico (a través de uvaol y posiblemente, ácido ursólico aldehído) y betulínico (a través de betulina).

- Huang *et al.*, (2012) quienes a partir de un análisis de EST de hojas de *C. roseus* aislaron un cDNA (CrAS) que codifica una 2,3-oxidoescualeno ciclasa (OSC) y un cDNA (OACR) que codifica para una amirina C-28 oxidasa. CrAS se caracterizó como una OSC multifuncional que produce α- y β-amirina, mientras que CrAO es una C-28-oxidasa multifuncional que convierte α-amirina, β-amirina y lupeol en ácidos ursólico, oleanólico y betulínico, respectivamente, a través de una oxidación sucesiva en la posición C-28 de los sustratos.

1.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Los sistemas experimentales basados en el cultivo de células y tejidos vegetales se caracterizan por el uso de partes aisladas de las plantas llamados "explantes", que se mantienen en un medio nutritivo adecuado normalmente bajo condiciones asépticas. Algunas excepciones a la condición de asepsia, son los experimentos relacionados a problemas de fitopatología, en los que la influencia de microorganismos sobre parámetros fisiológicos o bioquímicos de las células vegetales o tejido vegetal son investigados. Otros ejemplos son cocultivos de material celular en plantas superiores con *Rhizobia,* para estudiar simbiosis, o para mejorar la protección de las plántulas micropropagadas para

escapar de las tensiones transitorias post-trasplante (Waller *et al.,* 2005; Peiter *et al.,* 2003).

En comparación con el uso de plantas completas, la principal ventaja de estos sistemas es un control mayor de los factores químicos y físicos del medio, que se logra mantener constante a costos razonables. Sin embargo, algunas dificultades y limitaciones surgen al extrapolar los resultados basados en el cultivo de tejidos o células, a la interpretación de los fenómenos que ocurren en una planta completa durante su desarrollo, siempre hay que tener en cuenta que los cultivos de tejidos son sólo sistemas modelo, con todas las características positivas y negativas inherentes a este tipo de montajes experimentales. Para ser realistas, una duplicación directa de condiciones *in situ* en los sistemas de cultivo de tejidos todavía no es posible incluso en la actualidad. Sin embargo, la organización del sistema genético y de las estructuras celulares básicas son esencialmente las mismas, por lo tanto, los cultivos de tejidos de plantas superiores son sistemas modelo adecuados para investigaciones fisiológicas o bioquímicas (Neumann *et al.*, 2009).

En términos prácticos, se pueden distinguir básicamente cinco áreas de trabajo en el cultivo de tejidos celulares (**Figura 1.6**): 1) Cultivo de meristemos (con la subsecuente formación de raíces), 2) Formación de callos (tejido indiferenciado sobre el que puede inducirse, brotes y embriogénesis somática), 3) Suspensiones celulares (sobre los que puede inducirse embriogénesis y escalar el cultivo a biorreactores), 4) Cultivo de protoplastos (que pueden tratarse como cultivos celulares y 5) Cultivo de anteras/microsporas (para la generación de individuos haploides).

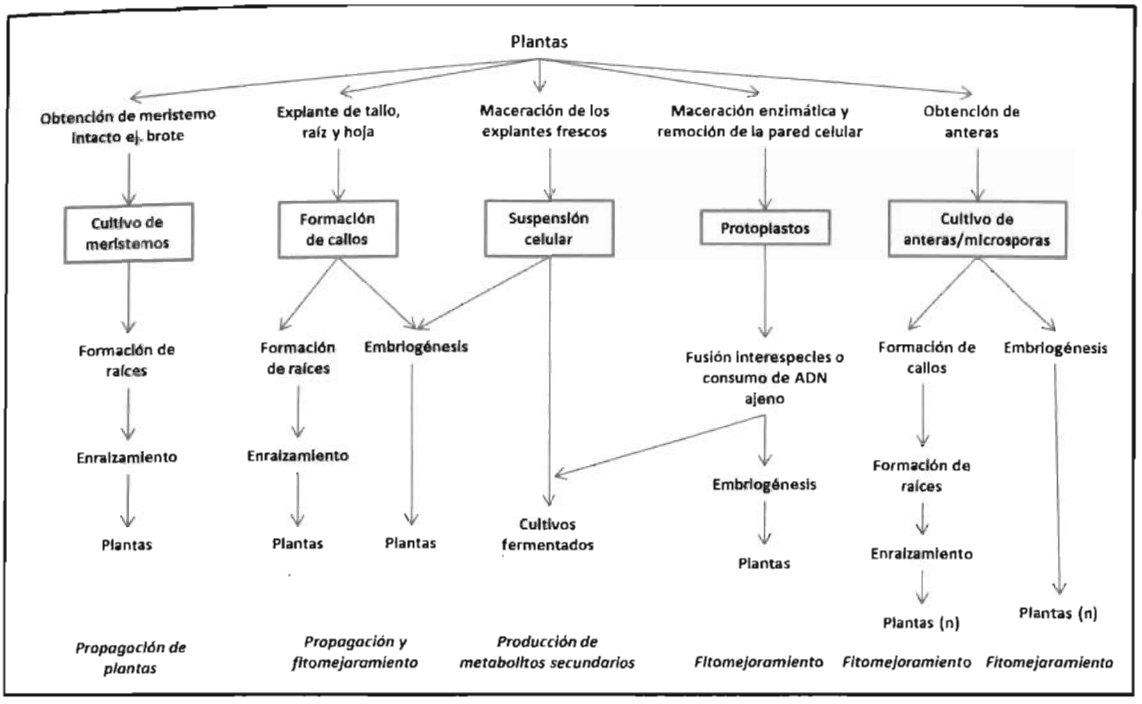


Figura 1.6. Presentación esquemática de las principales áreas en el cultivo de células y tejidos vegetales resaltando algunos de sus campos de aplicación (Modificado de Neumann *et al.*, 2009).

1.2.1. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

La transformación genética en plantas se refiere a la introducción e integración de ADN "foráneo" en las células de la planta con la subsecuente regeneración de organismos transgénicos o genéticamente modificados (Chandra, 2012).

Existen varias técnicas de transformación que se dividen en directas e indirectas. Las primeras funcionan induciendo la permeabilidad de la célula al ADN mediante electroporación, agentes químicos, microinyección, bombardeo, etc. Las técnicas indirectas están basadas en el uso de vectores que pueden ser biológicos como *Agrobacterium* y cierto virus o no biológicos como los liposomas. Las técnicas directas tiene la limitación de requerir un elevado grado de manipulación ya que la transformación se realiza sobre células individuales, lo que las convierte en un proceso que requiere alta especialización y largos periodos de trabajo (Sanford, 1990). Esto ha hecho que las técnicas indirectas, principalmente las que usan microorganismos fitopatógenos para la introducción del ADN en la célula vegetal, sean las más utilizadas.

Dentro de todas las técnicas previamente citadas, la de mayor versatilidad y más utilizada es la transformación mediada por bacterias pertenecientes al género *Agrobacterium,* que es capaz de introducir ADN en células vegetales. Además de ser relativamente fácil y económica, se aplica a un amplio rango de especies vegetales monocotiledóneas y dicotiledóneas (Van Wordragen & Dons, 1992; Porter, 1991), gimnospermas (Levee *et al.*, 1999; McAfee *et al.*, 1993), e incluso algunos hongos (Abuodeh *et al.*, 2000; De Groot *et al.,* 1998).

La transformación genética es una metodología que también ofrece posibilidades de introducir en plantas genes estructurales de rutas metabólicas para incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios. A través del proceso de transformación se han abierto nuevos caminos para la producción de alcaloides, polifenoles, terpenoides y algunos metabolitos nuevos que no son encontrados en plantas silvestres, ni en cultivos *in vitro* no transformados (Ortiz-Caltempa, 2008).

1.2.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA CON *Agrobacterium rizhogenes*

El género *Agrobacterium* pertenece a la familia *Rhizobiaceae*. Se trata de una bacteria del suelo, Gram negativa (Chriqui *et al.*, 1996), móvil mediante 2 a 3 flagelos y que alberga un plásmido de más de 200 kb llamado "Ri" (inductor de raíces) o "Ti" (inductor de tumores), según sea el caso de *A. rhizogenes* o *A. tumefaciens* respectivamente (Constantino *et al.*, 1981; Zaenen *et al.*, 1974). Las cepas de *Agrobacterium* se clasifican en función del tipo de opinas que producen. Las opinas son aminoácidos codificados por genes bacterianos y que son fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria, e incluyen a las agrocinopinas, manitil opinas, octopina, nopalina, succinamopina y (Dessaux *et al.*, 1992).

El proceso de transformación genética (**Figura 1.7**) se inicia con el reconocimiento y unión de *Agrobacterium* a la célula hospedera a través de receptores específicos. Posteriormente el sistema de dos componentes de *Agrobacterium* (vir A - vir G), perciben señales específicas, de tal modo que Vir G (un factor transcripcional) es activado para inducir la transcripción de la región de virulencia (vir) del plásmido Ti (para el caso de *A. tumefaciens*). Las proteínas codificadas por la región vir, generan la cadena sencilla del ADN-T, la cual forma un complejo con la proteína Vir D2, que es transportado a través del

pili formado por las proteínas VirB 2-11/D4. En el citoplasma de la célula vegetal, al complejo ADN-T /-VirD2 se le unen proteínas Vir -E2 que lo protegen de la degradación. Posteriormente, el complejo ADN-T /-VirD2/-VirE2 es importado hacia el núcleo, facilitado por proteínas del mismo hospedero, para su posterior integración en el genoma de la célula hospedera, por recombinación ilegítima (McCullen, 2006).

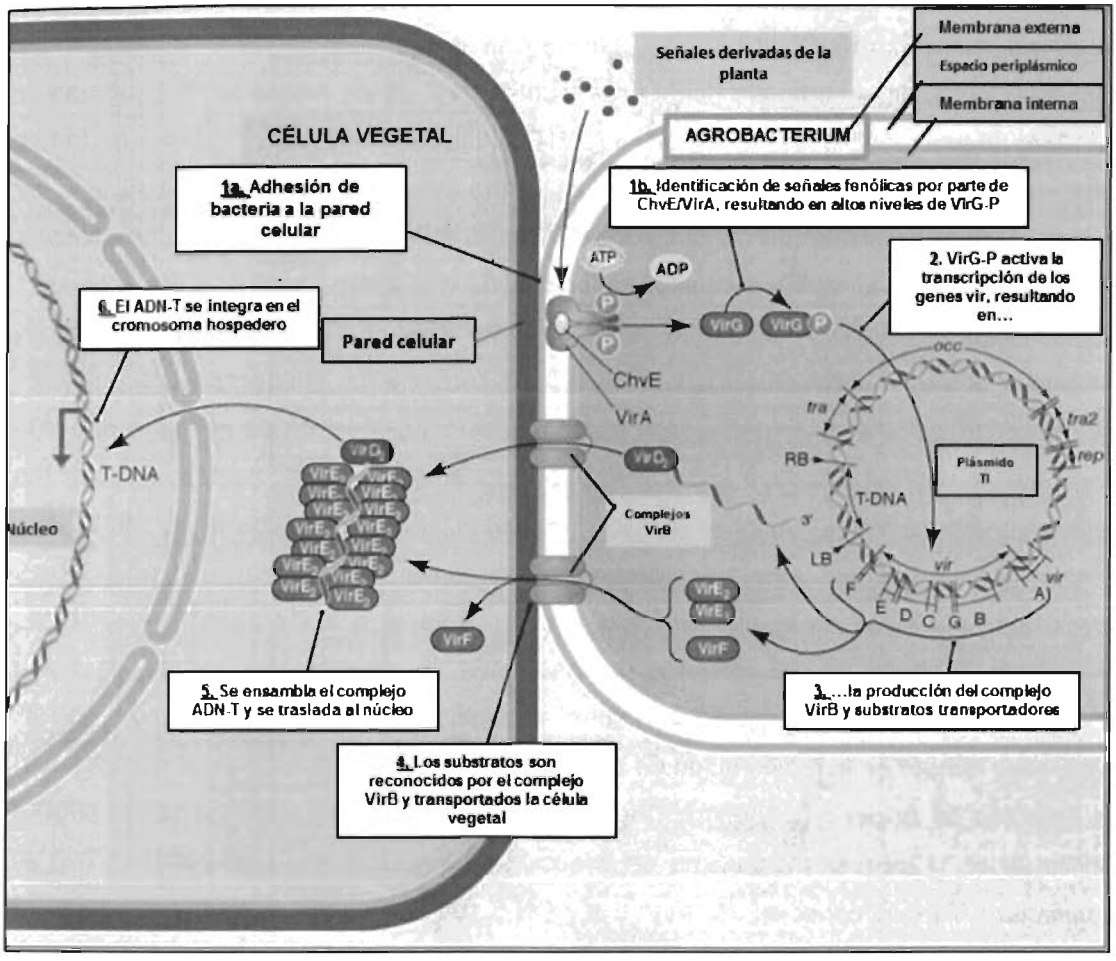


Figura 1.7. Proceso de infección de *Agrobacterium* en una célula vegetal (Modificado de McCullen, 2006).

El plásmido de *Agrobacterium* (sea el Ri o Ti) contiene una secuencia de ADN llamada ADN de transferencia, o simplemente ADN-T que es el único fragmento de ADN bacteriano que se transfiere a la célula vegetal durante el proceso de infección. El ADN-T es integrado en el genoma de la planta expresa enzimas que dirigen la producción de opinas, las cuales son sintetizadas y secretadas por las células transformadas y

consumidas por *Agrobacterium* como fuente de carbono y nitrógeno (Dessaux *et al.*, 1992). Los plásmidos Ri pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de opinas producidas. En plásmidos tipo nopalina (Ti) y manopina y cucumopina (Ri) se ha encontrado un solo ADN-T, mientras que en los octopina (pTi) y agropina (pRi) se han encontrado dos regiones (TL-DNA = ADN-$T_{Izquierdo}$ y TR-DNA = ADN-$T_{Derecho}$) (Trovato y Linhares, 1999). Los dos bordes ADN-T están separados por alrededor de 15kb de ADN no transferido. El fragmento derecho (TR-DNA = ADN-T_D) contiene genes homólogos a los genes de biosíntesis de auxinas como los *iaaM* y *iaaH* del ADN-T de los plásmidos Ti (Huffman *et al.*, 1984; Jouanin, 1984). Tanto ADN-T_I y ADN-T_D son transferidos e integrados de forma independiente en el genoma de la planta hospedera pero la transferencia de ADN-T_I es esencial para la inducción de "raíces pilosas" y la transferencia de ADN-T_D no provoca formación de raíces en cultivos transformados (Sevón y Oksman-Caldentey, 2002; Nilsson y Olsson, 1997). En otros casos el ADN-T fragmento único que muestra un alto grado de homología con el T_L-DNA (**Figura 1.8**). El ADN-T contiene los oncogenes responsables del desarrollo de la enfermedad en las plantas infectadas, y se ha demostrado que sus productos de expresión alteran los niveles y la percepción de los fitorreguladores por las células transformadas (Akiyoshi *et al.*, 1984; Inze *et al.*, 1984; Willmitzer *et al.*, 1982). Así, la integración del ADN-T en el genoma hospedero resulta en el crecimiento anárquico y neoplásico de células en el sitio de infección, dando lugar a tejidos transformados con crecimiento ilimitado. En la mayoría de los casos, *A. tumefaciens* induce un tejido desorganizado llamado "agalla de la corona" o tumor, mientras que la infección con *A. rhizogenes* resulta en la proliferación de raíces en el sitio de infección que se conocen con los nombres de raíces en cabellera, raíces transformadas, "hairy roots", o raíces pilosas (Shillito *et al.*, 1985). El mecanismo de infección es similar cuando se compara con *A. tumefaciens*. Ambas especies transfieren el ADN-T (en *A. rhizogenes* nombrado como Ri por "root inducing" / inductor de raíces) del plásmido de la bacteria a la célula huésped. El plásmido Ri (200kb aproximadamente) (**Figura. 1.9**) contiene genes que codifican proteínas con funciones para la conjugación del plásmido, la biosíntesis y el catabolismo de opinas, así como para la iniciación, transferencia e integración de ADN-T al genoma vegetal (Chandra, 2012).

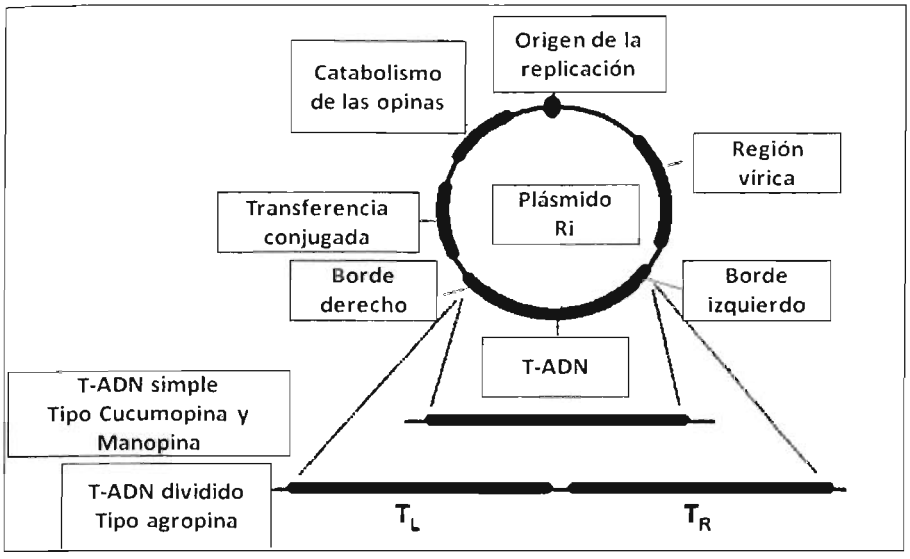


Figura 1.8. Esquema general del plásmido Ri *Agrobacterium rhizogenes* (Modificado de Veena y Taylor, 2007).

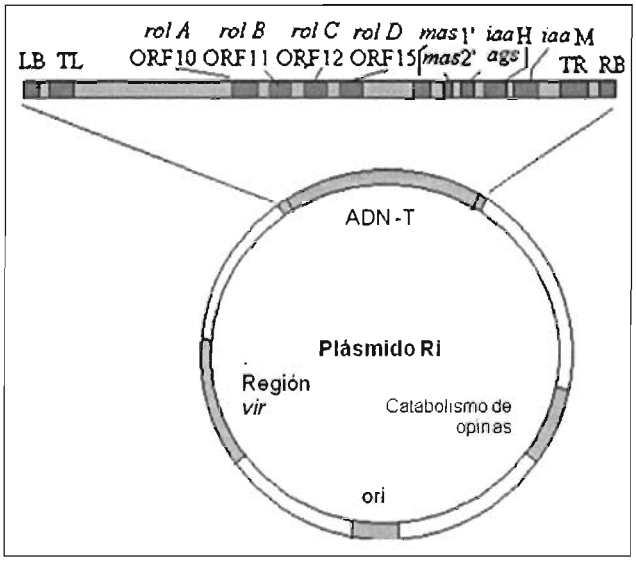


Figura 1.9. Presentación esquemática del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* (Modificado de Chandra, 2012).

Las regiones T de los plásmidos nativos Ti y Ri son de un tamaño aproximado de 10-30 kb definidas por secuencias borde de 24 pares de bases de longitud. Estos bordes flanquean la región T en una orientación repetida directa y son altamente homólogos en secuencia (Gelvin, 2003).

White *et al.* (1985) realizaron un análisis funcional de las regiones T de *Agrobacterium rizhogenes* - pRiA4 por inserción mutagénica e infecciones consecutivas en hojas y tallos de *Kalanchoe*, mostrando la inserción de sólo cuatro de los 18 *loci* potenciales del ADN-TL en las raíces pilosas que fueron producidas. Estos *loci* fueron asignados como "*root locus* A-D" (*rol*A-D), mismos en los que posteriormente, Slightom *et al*, 1986 analizando las secuencias del ADN-TL de pRiA4 identificaron 18 marcos de lectura abierta (ORFs = Open Reading Frames) asignados como: ORF10 (*rol*A), ORF11 (*rol*B), ORF12 (*rol*C) y ORF15 (*rol*D). Varios trabajos han mostrado que la acción sinérgica de los tres primeros genes *rol*A, *rol*B y *rol*C es esencial para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo de las raíces transformadas, siendo de mayor importancia el gen *rolB*, el cuál es crítico para la producción de raíces pilosas. Otros ORFs y los genes *aux* (cuya secuencia es similar a la de los genes *iaaM* e *iaaH* del plásmido Ti) parecen tener una función adicional en el establecimiento total de los síntomas de raíces pilosas y en la diversificación del rango de infección en el hospedero. Estos genes han sido expresados individualmente en plantas transgénicas y analizadas fenotípica y fisiológicamente, con el objetivo de elucidar como afectan los genes *rol* de manera individual el crecimiento y desarrollo de la planta. (Nilsson & Olsson, 1997). De este modo, el ADN-T del plásmido Ri, tiene un papel fundamental en la oncogénesis y son cuatro loci localizados en el ADN-TL (ADN-T izquierdo) que llevan a cabo la inducción de las raíces pilosas o raíces transformadas y por ello se llaman *rol* (*loci* generadores de raíces). Algunas de las características más sobresalientes de los genes *rol* se resumen en el **cuadro 1.2.**

Cuadro 1.2. Principales características de los genes *rol* contenidos en el ADN-T del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*.

Gen	Tamaño	Proteína codificada / función
*rol*A **(ORF10)**	300kb	• Proteína de 100 aminoácidos con una masa molecular de 11k Da Aunque no tiene similitud con ninguna proteína conocida, debido a su naturaleza básica, podría ser una proteína de unión de ácidos nucléicos (Levesque *et al.*, 1988).
*rol*B **(ORF11)**	777kb	• Codifica una proteína de 259 aminoácidos con una masa molecular de 30 kDa. Esta proteína está localizada en la membrana plasmática (Filippini *et al.*, 1996) y no tiene similitud con alguna proteína conocida fuera de *Agrobacterium*.
*rol*C **(ORF12)**	540kb	• Codifica una proteína de 180 aminoácidos con una masa molecular de 20 kDa. Con la ayuda de anticuerpos, se ha llevado a cabo la inmunolocalización de la proteína en el citosol (Estruch *et al.*, 1991c, Oono *et al.*, 1990). En plantas transformadas y cultivos de células vegetales el producto del gen *rolC* es capaz de estimular la producción de alcaloides tropánicos (Bonhomme *et al.*, 2000a), alcaloides piridínicos (Palazón *et al.*, 1998a), alcaloides indólicos (Palazón *et al.*, 1998b), ginsenósidos (Bulgakov *et al.*, 1998) y antraquinonas (Shkryl *et al.*, 2008; Bulgakov *et al.*, 2002, 2003;). De tal manera, se puede decir que el gen *rolC* provee una señal que activa los procesos del metabolismo secundario además de conferir un espectro de defensa mayor en adición a esta estimulación.
*rol*D **(ORF15)**	1032kb	• Codifica una proteína de 344 aminoácidos (*Mauro et al.*, 1996). Los efectos de *rol*D en el metabolismo secundario no han sido investigados, pero *rol*D es la única proteína cuya función bioquímica está claramente determinada, codifica para la biosíntesis ornitina ciclodesaminasa, una enzima que convierte la ornitina en prolina. Disminuyendo la poza de ornitina e incrementando la poza de prolina en las células transformadas es como se cree que contribuye *rol*D sobre los efectos morfológicos, como el mantenimiento en el crecimiento de las raíces pilosas y la abundante floración de las plantas transformadas (Trovato *et al.*, 2001).

1.2.3. RAÍCES TRANSFORMADAS/ RAÍCES PILOSAS O "HAIRY ROOTS" COMO SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO

Actualmente, una de las alternativas biotecnológicas para la producción de compuestos de origen vegetal (fitoquímicos), son los cultivos de raíces transformadas (CRT) o "hairy roots". El término "raíz pilosa" fue mencionado por primera vez por Stewart *et al.*, (1900) así como revisado por Hildebrandt (1934) para denominar al síntoma distintivo de una enfermedad que conducía a la formación anormal de un gran número de pequeñas raíces que sobresalen como finos pelos radiculares en respuesta a la infección de *A. rhizogenes*. Riker *et al* (1930) describieron y nombraron al organismo causante de las raíces pilosas: *Phytomonas rhizogenes*, el cual fue renombrado por el mismo grupo como *Agrobacterium rhizogenes* (Chandra, 2012).

Gracias las ventajas que poseen estos cultivos, destacando una alta estabilidad genética, tasa de crecimiento relativamente rápidas (en comparación al de raíces normales) y no requerir reguladores de crecimiento para su cultivo, el uso de CRT representa una excelente alternativa para la producción de un gran número de metabolitos secundarios sintetizados en las raíces de las plantas y luego acumulados en las partes aéreas (la naftoquinona, por ejemplo), así como para aquellos que se acumulan en cantidades muy bajas, ya sea raíces, en brotes o cultivos no diferenciados (Shanks y Morgan, 1999). El **cuadro 1.3** enlista algunos ejemplos de cultivos de raíces transformadas establecidos recientemente.

Cuadro 1.3. Cultivos de raíces transformadas establecidos recientemente (2008 – 2010)*

Especie vegetal	Cepa de *A. rhizogenes*	Propósito/objetivo	Referencia
Harpagophytum procumbens	A4	Producción fitoquímica (iridoides y glucósidos feniletanoides)	Grabkowska *et al.* 2010
Chenopodium rubrum	A4M70GUS	Regeneración de plantas recalcitrantes a transformadas	Dmitrovi ć *et al.* 2010
Amaranthus tricolor	LBA9402	Mejoramiento de cultivo	Swain *et al.*, 2010
Pereskia bleo	ATCC15834	Producción fitoquímica (con propiedades anticancerígenas)	Sidik *et al.*, 2010
Brugmansia candida	LBA9402	Producción fitoquímica (alcaloides tropánicos)	Cardillo *et al.*,. 2010
Hypericum tetrapterum	ATCC15834	Producción fitoquímica (aceites esenciales)	Komarovska *et al.* 2010
Taxus cuspidata	R1000	Producción fitoquímica (taxol)	Kim et al., 2009
Stephania	ATCC15834	Producción fitoquímica (dicentrina)	Putalun *et al.*, 2009

suberosa			
Pueraria candollei	ATCÇ15834	Producción fitoquímica (isoflavonoides)	Udomsuk *et al.*, 2009
Withania coagulans	C58C1	Producción fitoquímica (whitanólidos)	Mirjalili *et al.*, 2009
Ruta graveolens	LBA 9402	Producción fitoquímica (cumarinas y furanocumarinas)	Sidwa-Gorycka *et al.* 2009
Gossypium hirsutum	ATCC15834	Producción fitoquímica (gosipol y compuestos relacionados)	Triplett *et al.* ,2008
Gossypium barbadense	ATCC15834	Producción fitoquímica (gosipol y compuestos relacionados)	Triplett *et al.* ,2008
Mitragyna speciosa	ATCC15834	Producción fitoquímica (triterpenoides)	Phongprueksapattana *et al.* ,2008
Valeriana sisymbriifolium	ATCC15834	Identificación de compuestos potencialmente importantes en medicina	Rahimi *et al.* ,2008

***Información reunida a partir de las bases de datos de Agrícola, BIOSIS, CAB, PubMed y SCOPUS.**

1.3. *Pentalinon andrieuxii*

El reino vegetal representa una fuente de obtención de productos naturales con valor medicinal, o de precursores útiles en el diseño farmacéutico a nivel mundial (Macías *et al*, 2005). Una de las familias de plantas que se caracteriza por la producción de metabolitos secundarios de interés biológico es la familia Apocynaceae a la que pertenece *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin, Taxón 35: 168. 1986. *Urechites andrieuxii* Müll. Arg., Linnaea 30: 442. 1860 (Rzedowski y Calderón, 1998), cuya clasificación se muestra en el **cuadro 1.4.,** se encuentra distribuida a lo largo de la tierra caliente del este de México hasta Centroamérica. Es una planta trepadora leñosa o semi-leñosa de hasta 6 m de largo, caracterizándose por tener hojas ligeramente alargadas y anchas, sus flores son escasas, de color amarillo con una garganta que las hace parecer trompetas; mientras que sus frutos son alargados, semejantes a arcos con semillas numerosas, cafés, estrechas hasta de 10 mm de largo, en cuyo extremo se ubica un penacho de pelos hasta de 2.5 cm de largo, de color café claro (**Figura 1.10**) (Rzedowski y Calderón, 1998).

Cuadro 1.4. Clasificación Taxonómica del género *Pentalinon*.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Género	Pentalinon
Epíteto específico	• *andrieuxii* (Müll. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin • *luteum* (L.) B.F.Hansen & Wunderlin
Nombre científico	• *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin,1986 • *Pentalinon luteum* (L.) B.F.Hansen & Wunderlin
Autor del nombre	(Müll. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin, 1986
Nombres comunes	Bejuco de la víbora, bejuco guaco, contrayerba **(español),** ya'ax juux, xiiw kaan, tip'te' aak' **(maya)**, look' ts'aah **(lengua huasteca).**

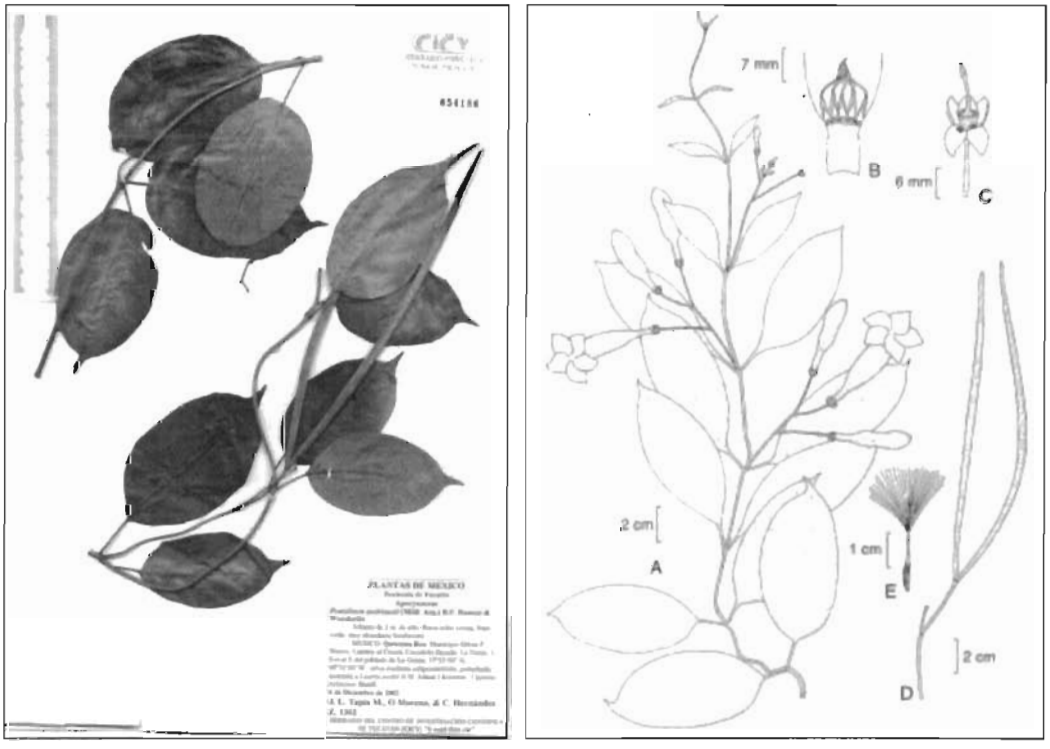


Figura 1.10: Hojas y frutos típicos de *Pentalinon andrieuxii*. **A**. rama con hojas e inflorescencias; **B**. aspecto del androceo adherido a la corola; **C**. cáliz; **D**. frutos (vainas); **E**. semilla.

En *P. andrieuxii* se ha reportado la producción de cardenólidos, alcaloides pirrolizidínicos (Tillequin *et al*, 1993). Un estudio fitoquímico del extracto de la raíz de esta especie reportó el aislamiento y la identificación de dos nuevos trinorsesquiterpenos, urechitol A y urechitol B, con un esqueleto derivado del guaianólido (Yam-Puc *et al.*, 2009). Otro estudio reciente, reportó el aislamiento de dos derivados esteroidales a partir del extracto de raíz de (Yam-Puc *et al.*, 2012) y más recientemente se publicó la actividad leishmanicida evaluada *in vitro* exhibida por compuestos aislados a partir de colesterol de particiones de n-hexano de extractos metanólicos de raíces de *P. andrieuxii* (Pan *et al* 2012). Estos tres últimos reportes corresponden al grupo del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez de CICY. También en CICY, en el grupo de trabajo del Dr. Gregorio Godoy Hernández en la UBBMP, (Martín-Acosta 2012) (Góngora-Sánchez 2012). Lográndose el establecimiento de un protocolo de regeneración de plantas *in vitro* a partir de explantes de hoja, tallo y raíz, utilizando thidiazurón (TDZ) como regulador de crecimiento para inducir brotes y ácido indolbutírico (AIB) para enraizarlos y posterior aclimatación en macetas. Así como estableciéndose un protocolo para el crecimiento de raíces a partir de la generación de raíces adventicias de hoja y tallo utilizando AIB y ácido naftalénacético (ANA) como reguladores de crecimiento.

Por otra parte, Domínguez - Carmona *et al* en 2010, aislaron ácido betulínico del extracto crudo de hojas de *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae) demostrando la actividad anti-protozoaria contra *Leishmania amazonensis* (LA), *Leishmania braziliensis* (M2903), *Trypanosoma cruzi talahuen* (TULA) y *Plasmodium falciparum* (F32). Un aumento en la efectividad del ácido betulínico al realizar modificaciones químicas en la estructura de la molécula también ha sido reportada (Ghaffari *et al.*, 2012). Con la finalidad de determinar la susceptibilidad de la especie *P. andrieuxii* a la infección con *Agrobacterium*, Yam Puc, *et al.*, 2012, realizaron la transformación transitoria de explantes de raíz, tallo y hoja usando el plásmido pCAMBIA2301 que contiene el gen *uid*A (gen reportero GUS).

Por las consideraciones anteriores, resulta factible que la transformación genética para la inducción de raíces transformadas (hairy roots de *P. andrieuxii* pueda usarse como un modelo de cultivo de tejidos *para la* producción de ácido betulínico permitiendo evaluar el uso de elicitores químicos sobre la producción de este a escala de matraz.

1.4. ELICITORES DEL METABOLISMO SECUNDARIO

La producción de metabolitos secundarios en plantas y cultivos celulares puede activarse, o inducirse, como respuesta a factores de estrés tales como el choque osmótico, iones de metales pesados, sales inorgánicas, homogeneizados microbianos o radiación UV. "*Elicitor*" es un término científicamente descrito para aquellos factores de estrés que disparan cambios de defensa en las plantas, dando como resultado la activación de una gama de mecanismos de protección. Estos mecanismos pueden incluir la inducción de la biosíntesis de productos químicos que funcionan en la adaptación de las plantas al ambiente estresante (Goel, *et al.,* 2011). De este modo, la elicitación es reconocida como una factible para aumentar la producción de compuestos secundarios a partir de células, órganos y sistemas en plantas (McAlpine *et al.,* 1999).

En general, los elicitores pueden ser categorizados con base en su naturaleza como bióticos o abiótico, y por su origen en endógenos o exógenos. Dentro de los bióticos, se incluyen todos aquellos compuestos de origen biológico, como polisacáridos originados a partir de paredes celulares vegetales (pectina, celulosa, etc.), microorganismos (quitina, glucanos, etc.) y proteínas G que se unen a los receptores y actúan por activación o inactivación de canales iónicos o enzimas. Los elicitores abióticos comprenden aquellos compuestos de origen no biológico como sales inorgánicas, iones metales y factores físicos como pH, temperatura, etc. (Goel, *et al.*, 2011). El **cuadro 1.5** muestra algunos trabajos en la elicitación de metabolitos secundarios distinguiendo entre elicitores bióticos y abióticos.

Dado el interés que se tiene en el grupo para aumentar la producción de AB en sistemas de raíces transformadas *de P. andrieuxii*, se decidió explorar los beneficios de la utilización de elicitores para este fin (McAlpine *et al.,* 1999).

Cuadro 1.5. Ejemplos de producción de metabolitos secundarios aumentada a través del uso de elicitores. (Modificado de Georgiev *et al.*, 2007)

Elicitor	Especie	Metabolito	Concentración elicitor	Aumento	Referencia
$CdCl_2$	*Brugmansia candida*	Hiosciamina	2 nM	1.35	Pitta-Alvarez *et al.* 2000
Ácido jasmónico	*Panax ginseng*	Ginsenósidos	5.0 mg/l	4.0	Sivakumar *et al.* 2005
Jasmonato de metilo	*P. ginseng*	Ginsenósidos	22.4 mg/l	4.0	Palazón *et al.* 2003
Sulfato de vanadilo	*Ambrosia artemisiiflora*	Tiarubrina A	50 mg/l	8.0	Bhagwath & Hjortsø 2000
Enterobacter sakazaki	*Ammi majus*	Umbeliferona	15-ml	1.2	Staniszewska *et al.*, 2003
Fusarium conglutinans	*Tagetes patula*	Tiofenos totales	0.12 mg	2.7	Mukundan & Hjortsø 1990
Phytopthora parasítica (medio filtrado)	*Cichoryum intybus*	Esculina y esculetina	0.1% (v/v)	4.1 y 3.7	Bais *et al.*, 2000
Staphylococus aureus	*Scopolia parviflora*	Escopolamina	133.3 ml	2.8	Jung *et al.* 2003
Elicitor de levadura	*Salvia miltiorrhiza*	Ácido rosmarinico	—	2.3	Chen *et al.* 2001
Extracto de levadura	*Brugmansia candida*	Escopolamina e hiosciamina	0.8 mg/ml	2.0	Pitta-Alvarez *et al.* 2000

La respuesta dinámica de las plantas a los elicitores requiere la detección de señales provistas por éste y su procesamiento. El sistema involucra la compleja interacción de componentes que transmiten la información de una fuente a otra, conduciendo a las diferentes respuestas. Algunos elicitores se preparan a partir de componentes celulares de microorganismos fitopatógenos (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) o microbios (MAMPs: microbe-associated molecular patterns). Entre las diferentes clases de receptores conocidos para elicitores, se tienen a las proteínas R y los receptores transmembranales con actividad de cinasas (RLKs). Las proteínas R son generalmente responsables de la identificación de elicitores específicos codificados por los genes *avr* (de avirulencia) que producen la respuesta hipersensible en plantas en contra de estrés por patógenos. Este tipo de respuesta es el resultado de la expresión de genes de resistencia (R) a enfermedades los cuales permiten a la planta detectar y resistir cepas

patogénicas que expresan los genes complementarios llamados genes *avr*. Un gene *avr* promueve la producción de una única molécula señal por patógenos la cual funciona como un elicitor específico. Solamente aquellas plantas que llevan el gen complementario de resistencia responden a este elicitor y muestran la respuesta hipersensible (Goel *et al.*, 2011).

Es por la razón anterior que no todas las plantas responden a todos los tipos de elicitores o presentan una especificidad por el elicitor. Esta característica sugiere que las plantas tienen la capacidad de percibir un cierto número de moléculas estructuralmente diferentes como señales utilizando receptores específicos para cada tipo de elicitor. En consecuencia pueden responder a ellos a través de cambios fisiológicos y bioquímicos; además que la especificidad del elicitor en conjunción con el tipo de tejido hospedero conducen a la producción de diferentes compuestos relacionados con el estrés (Goel, *et al.*, 2011).

La aplicación exitosa de la elicitación puede ser desafiante y requiere intensos procedimientos de ensayo y error, ya que no sólo aumenta la producción, sino que también puede resultar en la producción de nuevos compuestos. La elicitación también resulta en tasas aumentadas de acumulación, reduciendo así los tiempos totales de cultivo requeridos para obtener el producto, además de poder ser acoplada con otras técnicas de mejoramiento del rendimiento (Ahmed y Baig, 2014). Moreno *et al.*, (1993) reportan el empleo de un precursor junto con la elicitación para mejorar los rendimientos de alcaloides indólicos en *Catharanthus roseus*.

Otra ventaja de la elicitación es la habilidad para manipular la calidad del producto, es decir, para alterar los perfiles de producción de los diversos fitoquímicos, mediante el uso de mezclas de elicitores. En muchos sistemas de cultivo, la respuesta al elicitor también depende de la fase de crecimiento (exponencial o la estacionaria) y la edad del cultivo a la cual el elicitor es adicionado (Ahmed y Baig, 2014).

1.4.1. ÁCIDO JASMÓNICO

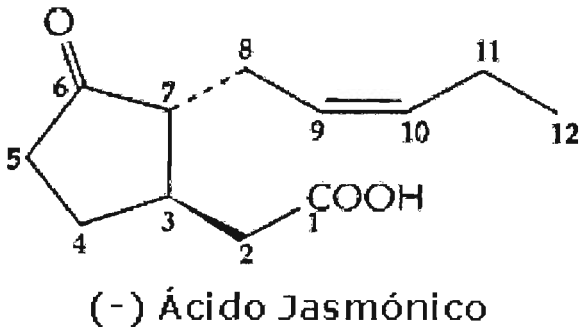


Figura 1.11. Estructura química del ácido jasmónico (Tomado de Creelman & Mullet, 1997).

El ácido jasmónico (AJ) y su metil éster jasmonato de metilo (MeJa) son fitohormonas lipídicas, involucradas en la defensa como respuesta al ataque de patógenos en las plantas. Estos compuestos también conocidos como oxilipinas (ácidos grasos oxigenados), se originan de ácido linoléico y son liberados desde la membrana del cloroplasto por enzimas lipasas y subsecuentemente oxigenados por lipooxigenasas (LOXs) hacia derivados de hidroperóxidos (Balbi y Devoto, 2008). Ambos actúan como moléculas señalizadoras de la respuesta de plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo. Entre las situaciones de estrés que regulan están las heridas (mecánicas o bióticas), la exposición a ozono, sequía y el ataque por patógenos y plagas. Entre los procesos de desarrollo en los que participan los jasmonatos están el crecimiento de la raíz, la tuberización, la maduración de frutos, senescencia, desarrollo del polen y enrollamiento de zarcillos. Identificado y aislado por primera vez de un cultivo del hongo *Lasiodiplodia theobromae,* el AJ es el miembro más conocido y mejor caracterizado de la familia de los jasmonatos y puede ser modificado de varias maneras, tales como la conjugación como diferentes aminoácidos o mediante hidroxilación, originando la formación de compuestos de extrema importancia que activan genes de defensa en las plantas (Avanci, 2010).

La elicitación o un estímulo de estrés conduce a una rápida liberación de ácido α -linoléico a partir de un grupo de lípidos de la membrana celular vegetal, la cual, a través de una cascada de señalización intracelular induce la producción de metabolitos secundarios importantes para la defensa de la planta (Memelink, 2001). El ácido α -linoléico es convertido por una lipooxigenasa, una aleno óxido sintasa (AOS) y una aleno óxido ciclasa (AOC), en el intermediario ácido 12-oxo-fitodienóico, que es convertido a AJ a

través de la acción de una reductasa y tres eventos de β-oxidación (Mueller, 1997; Menke *et al.*, 1999).

El ácido jasmónico y sus compuestos relacionados se han observado como transductores de señales para la producción de metabolitos secundarios de plantas (Farmer *et al.*, 2003) (**Figura 1.12**). Los elicitores son percibidos por receptores específicos localizados en la membrana plasmática (o en el citoplasma), que una vez activados pueden activar canales de iones y proteínas G, para así activar a las fosfolipasas (tales como la PLA2), a través de la señalización Ca^{2+} o por acoplamiento a la proteína G. Las fosfolipasas hidrolizan fosfolípidos, tales como PC (fosfatidil-Colina), en ácidos grasos y lisofosfatidilcolina (lysoPC), el primero puede ser un precursor de la biosíntesis de JA y oxilipinas relacionadas a través de la vía octadecanoide o puede ser epoxidado por especies reactivas de oxígeno para producir otra clase de oxilipinas pentacíclicas fitoprostanos. Todas estas oxilipinas pentacíclicas pueden activar la biosíntesis de metabolitos secundarios de plantas (Garcia-Brugger, *et al.*, 2006).

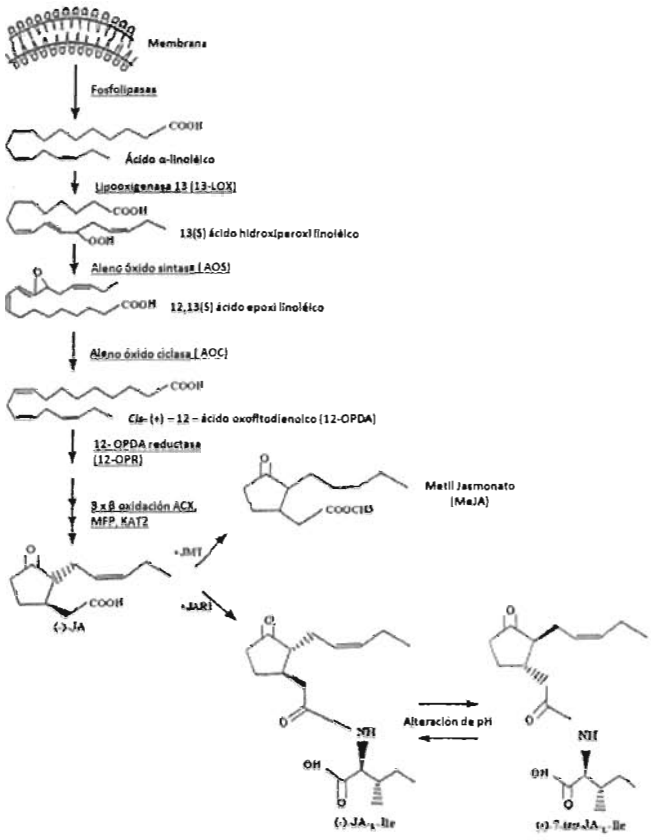


Figura 1.12. Esquema de la ruta biosintética del ácido jasmónico (JA), incluyendo las oxilipinas intermediarias. Las principales enzimas están en negrita y subrayadas. La síntesis comienza con el ácido α-linolénico liberado de las membranas de los cloroplastos, después de la acción de enzimas de las fosfolipasas. Al final, el ácido (12-OPDA) 12-oxophytodienoico se transloca a los peroxisomas, donde se somete a tres pasos de β-oxidación, dando lugar a la formación de JA. Este esquema de síntesis se basa en estudios de plantas de *Arabidopsis thaliana*. (Tomado de Avanci *et al.,* 2010).

La aplicación exógena del AJ y MJ, afectan procesos fisiológicos, morfológicos y reproductivos, entre ellos la maduración de frutos, la producción de polen, el crecimiento de las raíces, almacenamiento de proteínas, la fotosíntesis, el cierre de estomas y el ciclo celular (Suhita *et al.*, (2004). Asimismo inducen expresión de genes y actividades enzimáticas de monoterpeno sintasas y diterpeno sintasas (Fäldt *et al.*, 2003). Efectos que ponen en evidencia la actividad biológica del jasmónico sobre diferentes y diversos procesos vegetales (Abdala *et al.*, 2003).

1.4.2. SULFATO DE VANADILO HIDRATADO

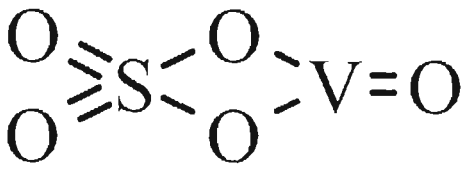


Figura 1.13. Estructura química del sulfato de vanadilo (Tomado de http://static.coleparmer.com/large_images/AGROS21484.jpg).

El vanadio (V) es un metal de transición del grupo V que se distribuye ampliamente en la naturaleza (Pyrzyńska y Wierzbicki 2004; Kaplan *et. al* 1990). Este elemento exhibe múltiples estados de oxidación, siendo los más frecuentes +2, +3, +4 y +5. Al igual que otros elementos (Cu, Cd, Ni, Pb, Cr, Zn) también pueden estar presentes en los suelos contaminados (Vwioko *et al.* 2006).

Aunque el vanadio ha sido identificado como un micronutriente esencial en algas verdes, concentraciones altas pueden alterar la fotosíntesis del fitoplancton de agua dulce (Nalewajko *et al.* 1995) y causar cambios ultraestructurales en los cloroplastos de *Chlorella fusca* (Meisch *et. al.,* 1980). Un aumento en la formación de clorofila en respuesta a V se relaciona con el aumento en la biosíntesis de porfirína, precursor del ácido δ- aminolevulínico (ALA), donde el elemento cataliza la transaminación dependiente de piridoxalfosfato de ácido 4,5–dioxivalérico (DOVA) en ALA. (Meisch y Bieling, 1980).

Muchos compuestos de vanadio presentan efectos biológicos tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro.* Se sabe que el vanadio promueve el transporte y el metabolismo de la glucosa, la biosíntesis de lípidos, ADN y proteínas y presenta efectos mitogénicos en diversos tipos de células. Asimismo, numerosos compuestos de vanadio muestran actividad farmacológica, en especial como antitumorales y osteogénicos. Sin embargo, en cantidades apreciables (del orden mM) puede llegar a ser tóxico para el ser humano y otros animales. Su mecanismo de acción toxicológica no ha sido bien esclarecido, pero hay reportes que relacionan este metal con muchos procesos metabólicos, actuando como un potente inhibidor de algunas enzimas, incluyendo ATPasas, fosfatasas, cinasas, deshidrogenasas y ribonucleasas (Montiel, 2011; Okeson, 2004).

Respecto a los estudios realizados en humanos, no hay ninguna evidencia definitiva de que la deficiencia de vanadio deteriora la función biológica. A pesar de que se ha señalado que el elemento es un agente tóxico y la precaución que debe ser tomada durante la suplementación. Sin embargo, el vanadio mostró algunos papeles positivos, sobre todo en el control del desarrollo de enfermedades como el cáncer y la diabetes, esto gracias a su intervención en la peroxidación de lípidos (Mukherjee, *et al.*, 2004).

Finalmente, otra línea de investigación interesante sobre la bioactividad del vanadio es la comprensión de sus mecanismos de acción. Este tema está estrechamente relacionado con la activación de diversas señales intracelulares, la generación de radicales libres, el estrés oxidativo y la alteración de las proteínas del citoesqueleto (Etcheverry, 2009). Los iones metálicos, en este caso los iones de vanadio pueden desempeñar un papel en la biología como contraiones (ion que acompaña una especie iónica y mantiene la neutralidad eléctrica) para una proteína, ADN, ARN, y diversos organelos. El papel estructural se manifiesta a menudo por el mantenimiento de diversas estructuras biológicas, mientras que un papel funcional es clave para lograr la reactividad a un centro de reacción de una proteína. Los iones de vanadio tienen muchas funciones estructurales reflejadas por su analogía estructural y electrónica con el fósforo. Además, el ion de vanadio es un cofactor enzimático y se encuentra en ciertos tunicados y posiblemente mamíferos (Crans *et al.*, 2004).

El sulfato de vanadilo ($VOSO_4$) es una forma catiónica del V (31% de vanadio) (Jellin *et al.*, 2006) que se ha estudiado como un posible elicitor de producción de metabolitos secundarios de algunas especies (Khosroushahi *et al.* 2006; Palazón *et al.* 2003,). Se ha reportado que sales de vanadio aumentan la acumulación de ácido rosmarínico en cultivos de células en suspensión de *Lavandula* en casi tres veces (Georgiev *et al.*, 2006a), mientras en células de *Vitis* sp., se indujo sólo el isómero *cis* de resveratrol (Tassoni *et al.*, 2005). Aun cuando los científicos han realizado un gran esfuerzo en ese sentido, resta una ardua tarea para elucidar por completo los mecanismos de acción del vanadio (Etcheverry, 2009). Usar la herramienta de CTV a través de la generación de raíces transformadas vía *A. rhizogenes* a partir de hoja de *P. andrieuxii*, permitirá establecer un modelo para la producción de AB *in vitro* en escala de matraz, y evaluar el uso de dos elicitores químicos seleccionados (ácido jasmónico y sulfato de vanadilo).

JUSTIFICACIÓN

Pentalinon andrieuxii es una especie de la familia Apocynaceae que se encuentra en la Península de Yucatán de la que se ha aislado ácido betulínico (ácido 3β-hidroxi-lup-20(29)-en-28 oico), un triterpeno pentacíclico natural tipo lupano, compuesto que exhibe una variedad de propiedades biológicas (leishmanicida, antiinflamatorio, antiedémico, anticancerígeno, antibacteriano, antiviral).

La obtención de raíces pilosas (hairy roots) utilizando el método de transformación genética vía *Agrobacterium rizhogenes* se propone como una estrategia para incrementar la acumulación de metabolitos secundarios, esto gracias a su estabilidad genética, producción de biomasa y capacidad biosintética comparable o superior a la raíz de la planta nativa. Por ello, este sistema se implementó como modelo para obtener cultivos de raíces transformadas de *P. andrieuxii* a partir de hoja de plántulas *in vitro* para confirmar la síntesis de ácido betulínico en este modelo experimental y evaluar el efecto de elicitores químicos (ácido jasmónico y sulfato de vanadilo) en su producción.

HIPÓTESIS

Los cultivos de raíces transformadas inducidas partir de hojas de plántulas cultivadas *in vitro* de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin que sean expuestos a elicitores químicos, aumentarán la producción de ácido betulínico.

OBJETIVO GENERAL.

Establecer cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii (*Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin a partir de hojas y evaluar en escala de matraz el efecto de elicitores químicos (ácido jasmónico y sulfato de vanadilo) sobre la producción de ácido betulínico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Obtener líneas de raíces de *P. andrieuxii* transformadas con *A. rhizogenes* con capacidad de producir ácido betulínico.
- Confirmar la trasformación genética de las líneas de raíces generadas, mediante la detección de los *rol*A y *rol*C en el ADN genómico.
- Determinar la cinética de crecimiento de las líneas de raíces transformadas.
- Ensayar el efecto de un elicitor biótico (ácido jasmónico) y uno abiótico (sulfato de vanadilo) sobre la producción de ácido betulínico.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se presenta en la **figura 1.14** consiste brevemente en:

Además de contar con líneas de raíces transformadas de *P. andrieuxii* previamente establecidas ("Estudio de la biosíntesis en terpenoides en *Pentalinon andrieuxii*", Yam Puc, 2013) se llevó a cabo la asepsia **(1)** y germinación **(2)** de un nuevo lote de semillas de *P. andrieuxii* para llevar a cabo el proceso de transformación genética con *A. rhizogenes* usando la cepa ATCC14834 **(3)**.

Como estrategia basal para continuar los experimentos, se llevó a cabo el mantenimiento de las líneas de raíces transformadas mediante resiembras periódicas (cada 20 días) y con ello asegurar la disponibilidad de material vegetal **(4)**. Con base en lo anterior, por un lado se confirmó la trasformación genética de las líneas generadas **(4a)**, mientras que por el otro, se caracterizaron estas mismas líneas mediante su cinética de crecimiento **(4b)**. En paralelo, se trabajó con las líneas de raíces transformadas como un modelo para producir ácido betulínico en escala de matraz **(5)** de la siguiente manera: De acuerdo al resultado de cinética de crecimiento, en la línea que produjera mayor cantidad de biomasa, se determinó la presencia de ácido betulínico cualitativamente por Cromatografía de Capa Delgada (CCD) **(5a)** y su cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) **(5b)** esto con la finalidad de determinar el punto en la curva de crecimiento que sería sometida para el ensayo con dos elicitores químicos (ácido jasmónico y sulfato de vanadilo) **(6)**, para finalmente, llevar a cabo la cuantificación de AB en las muestras de los tratamientos con los elicitores mencionados **(7)**.

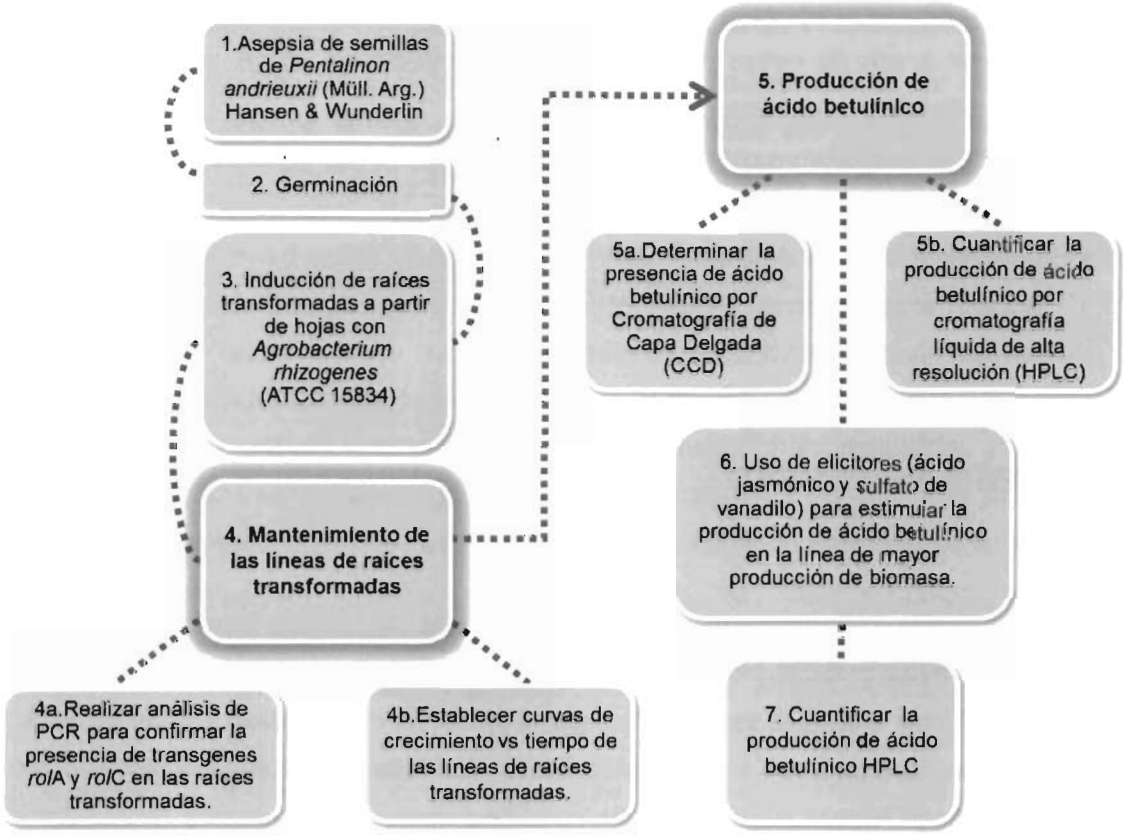


Figura 1.14. Esquema de la estrategia experimental realizada.

BIBLIOGRAFÍA

Abdala, G., O. Miersch, R. Kramell, A. Vigliocco, E. Agostini, G. Forchetti & S. Alemano (2003). Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. Plant Growth Regulation 40 (1), 21-27.

Abuodeh, R.O., M.J. Orbach, M.A. Mandel, A. Das & J.N. Galgiani (2000). Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Infectious Diseases 181 (6), 2106-2110.

Achnine, L., D.V. Huhman, M.A. Farag, L.W. Sumner, J.W. Blount & Dixon, R.A. (2005). Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. Plant J 41, 875–887.

Ahmed, S.A. & M.M.V. Baig (2014). Biotic Elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. Saudi. Journal of Biological Sciences (In Press).

Akiyoshi, D.E., H. Klee, R.M. Amasino, E.W. Nester & M.P. Gordon (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 81 (19), 5994-5998.

Augustin, J.M., V. Kuzina, S.B. Andersen & S. Bak (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. Phytochemistry 72 (6), 435-457.

Avanci, N.C., D.D. Luche, G.H. Goldman & M.H.S. Goldman (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. Genetics and Molecular Research 9 (1), 484-505.

Allinger, N., C. Jhonson y N. Lebel. (1986) Química Orgánica. Editorial Reverté S.A. 2ª Edición. España.

Balbi, V. & A. Devoto (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. New Phytologist 177 (2), 301-318.

Bais, H.P., S. Govindaswamy & G.A. Ravishankar (2000). Enhancement of growth and coumarins production in hairy root cultures of Witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. J Biosci Bioeng 90, 648 – 653.

Bhagwath, S.G. & M.A. Hjortsø (2000). Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. J Biotechnol 80, 159 – 16.

Bohlmann, J. & C.I. Keeling (2008). Terpenoid biomaterials. Plant J 54 (4), 656-669.

Bonhomme, V., D. Laurain Mattar & M.A. Fliniaux (2000a). Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. J Nat Prod 63, 1249–1252.

Bulgakov, V.P., M.V. Khodakovskaya, N.V. Labetskaya, G.K. Chernoded & Y.N. Zhuravlev (1998). The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. Phytochemistry 49, 1929–1934.

Bulgakov, V.P., G.K. Tchernoded, N.P. Mischenko, M.V. Khodakovskaya, V.P. Glazunov, S.V. Radchenko & Y.N. Zhuravlev (2002). Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rol*B and *rol*C genes. J Biotechnol 97 (3), 213-221.

Bulgakov, V.P., G.K. Tchernoded, N.P. Mischenko, N. Shkryl Yu, V.P. Glazunov, S.A. Fedoreyev & Y. N. Zhuravlev (2003). Increase in anthraquinone content in *Rubia cordifolia* cells transformed by *rol* genes does not involve activation of the NADPH oxidase signaling pathway. Biochemistry (Mosc) 68, 795–801.

Cântă Pânzaru, S., N. Leopold & W. Kiefer (2002). Vibrational spectroscopy of betulinic acid HIV inhibitor and of its birch bark natural source. Talanta 57, 625-631.

Cardillo, A.B., A. M. Otalvaro Álvarez, A. Calabro Lopez, M. E. Velásquez Lozano, J. Rodriguez Talou & A. M. Giulietti (2010). Anisodamine production from natural sources: seedlings and hairy root cultures of Argentinean and Colombia *Brugmansia candida* plants. Planta Med 76, 402–405.

Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. Biotechnology Letters 34 (3), 407-415.

Chen, H., F. Chen, F.C.K. Chiu & C.M.Y. Lo (2001). The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. Enzyme Microb Technol 28,100 – 105.

Chen, F., D. Tholl, J. Bohlmann & E. Pichersky (2011). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. Plant J 66 (1), 212-229.

Chriqui, D., A. Guivarc'h, W. Dewitte, E. Prinsen & H. van Onkelen (1996). Rol genes and root initiation and development. Plant and Soil 187 (1), 47-55.

Cichewicz, R.H. & S.A. Kouzi (2004). Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. Med Res Rev 24, 90-114.

Connolly, J.D. y R.A. Hill (2000).Triterpenoids. Natural Product Reports 17, 463–482.

Costantino, P., M.L. Mauro, G. Micheli, G. Risuelo, P.J.J. Hooykaas & R.A. Schilperoort (1981). Fingerprinting and sequence homology of plasmids from different virulent strains of *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmid 5, 170–182.

Crans, D.C., J.J. Smee, E. Gaidamauskas & L. Yang (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. Chemical Reviews 104 (2), 849-902.

Creelman, R.A., & J.E. Mullet, (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Biology 48 (1), 355-381.

Crevelin, E.J., I.C. Turatti, A.E. Crotti, R.C. Veneziani, J.L. Lopes, N.P. Lopes & W.R. Cunha (2006). Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from Miconia species using high-resolution gas chromatography. Biomed Chromatogr 20 (8), 827-830.

De Groot, M.J., P. Bundock, P.J. Hooykaas y A.G. Beijersbergen (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology 16, 839-842.

De Marcano, D., y M. Hasegawa (1991). Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Venezuela 451 pp.

Dessaux, Y., A. Petit & J. Tempe (1992). Opines in *Agrobacterium* biology. In: Verma DPS (ed) Molecular signals in plant-microbe communications. CRC Press, Boca Raton, pp 109–136.

Dmitrović, S., N. Mitić, S. Zdravković-Korać, B. Vinterhalter, S. Ninković & L. Culafić (2010). Hairy roots formation in recalcitrant-to-transform plant *Chenopodium rubrum.* Biol Plantarum 54, 566–570.

Domínguez-Carmona, D.B., F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, G. Ruiz-Pinell, D. Gutierrez-Yapu, M.J. Chan-Bacab, A. Giménez-Turba & L.M. Peña-Rodríguez (2010). Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. Phytomedicine 17, 379–382.

Estruch, J.J., A. Parets-Soler, T. Schmulling & A. Spena (1991c). Cytosolic localization in transgenic plants of the *rol*C peptide from *Agrobacterium rhizogenes*. - Plant Mol. Biol 17, 547-550.

Etcheverry, S.B., E.G. Ferrer, A.C. Gonzalez-Baró, B.S. Parajón-Costa & P.A.M. Williams (2009). Vanadischarms: from the mithology to the bioinorganic chemistry. J Arg Chem Soc 97, 127-150.

Falamas, A., S. Cinta Pinzaru & C.A. Dehelean (2011). Betulin and its natural resource as potential anticancer drug candidate seen by FT-Raman and FT-IR spectroscopy. J Raman Spectroscopy 42 (1), 97-107.

Fäldt, J., G.I. Arimura, J. Gershenzon, J. Takabayashi & J. Bohlmann (2003). Functional identification of AtTPS03 as (E)-β-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate-and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana.* Planta 216 (5), 745-751.

Farmer, E.E., E. Alméras & V. Krishnamurthy (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. Current Opinion in Plant Biology 6 (4), 372-378.

Fiiippini, F., F. Lo Schiavo, M. Terzi, P. Costantino & M. Trovalo (1994). The plant oncogene *rol*B alters binding of auxin to plant cell membranes. - Plant Cell Physiol 35, 767-771.

Fukushima, E.O., H. Seki, K. Ohyama, E. Ono, N. Umemoto, M. Mizutani, & T. Muranaka (2011). CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. Plant and Cell Physiology 52 (12), 2050-2061.

Fulda, S. (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. International Journal of Molecular Sciences 9 (6), 1096-1107.

Fusco, M. D. R., Petenatti, E., Inostroza, N., San-Martín, A., & Rivera, P. (2004). Principios activos de la *Ligaria cuneifolia*: una planta medicinal. Cienc Trab, 6 (12), 79-82.

Frighetto, N., R.M. Welendorf, A.M.P. Silva, M.J. Nakamura & A.C. Siani (2005). Purification of betulinic acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by high-speed counter-current chromatography, Phytochem Anal 16, 411-414.

Garcia-Brugger, A., O. Lamotte, E. Vandelle, S. Bourque, D. Lecourieux, B. Poinssot & A. Pugin (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Molecular Plant-Microbe Interactions 19 (7), 711-724.

Grabkowska, R., A. Królicka, W. Mielicki, M. Wielanek & H. Wysokinska (2010). Genetic transformation of Harpagophytum procumbens by Agrobacterium rhizogenes: iridoid and phenylethanoid glycoside accumulation in hairy root cultures, Acta Physiol Planta 32, 665–673.

Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiol Mol Biol Rev 67, 16–37.

Georgiev, M., M. Heinrich, G. Kerns, A. Pavlov & T. Bley (2006a). Production of iridoids and phenolics by transformed *Harpagophytum procumbens* root cultures. Eng Life Sci 6, 593–596.

Georgiev, M.I., A.I. Pavlov & T. Bley (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. Appl Microbial Biotechnol 74 (6), 1175-85.

Gershenzon, J. & N. Dudareva (2007). The function of terpene natural products in the natural world. Nature Chemical Biology 3 (7), 408-414.

Ghaffari, M.M., H.A.F. Bin & A. Samzadeh-Kermani (2012). Biological Activity of Betulinc Acid: A Review. Pharmacology & Pharmacy 6, 119-123.

Goel, M.K., S. Mehrotra, & A.K. Kukreja (2011). Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. Applied Biochemistry and Biotechnology 165 (5-6), 1342-1355.

Góngora-Sánchez D.B. (2012). Cultivo *in vitro* de raíces normales de la parte aérea (hoja e hipocótilo) de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

Hildebrandt, E.M. (1934) Life history of the hairy root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. J Agric Res 48, 857–885.

Huffman, G.A., F.F. White, M.P. Gordon & E.W. Nester (1984). Hairy-root-inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids. J Bacteriol 157, 269–276.

Inze, D., A. Follin, M. Van Lijsebettens, C. Simoens, C. Genetello, M. Van Montagu & J. Schell (1984). Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. Molecular and General Genetics 194 (1-2), 265-274.

Jäger, S., H. Trojan, T. Kopp, M.N. Laszczyk & A. Scheffler (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants–rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. Molecules 14 (6), 2016-2031.

Jellin, J.M., P. Gregory & F. Batz (2006). Pharmacists Letter/ Prescriber's Letter Natural Medicines Comprehensive Database. 8th ed. Stockton, CA: Therapeutic Research Faculty 1258-1260.

Jouanin, L. (1984). Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. Plasmid 12, 91–102.

Jung, H.Y., S.M. Kang, Y.M. Kang, D.J. Yun, J.D. Bahk, J.K. Yang & M.S. Choi (2003). Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. Enzyme Microb Technol 33, 987 – 990.

Kaplan, D.I., K.S. Sajwan, D.C. Adriano & S. Gettier (1990). Phytoavailability and toxicity of beryllium and vanadium. Water, Air, and Soil Pollution 53 (3-4), 203-212.

Khosroushahi, Y.A., M. Valizadeh, A. Ghasempour, M. Khosrowshahli, H. Naghdibadi, M.R. Dadpour & Y. Omidi (2006). Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biol Int 30, 262–269.

Kim, J., K. Baek, Y. Son, S. Son & H. Shin (2009). Hairy root cultures of *Taxus cuspidata* for enhanced production of paclitaxel. J Appl Biol Chem 52, 144–150.

Komarovska, H., A. Giovannini, J. Kosutha & E. Cellarovia (2009). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Hypericum tomentosum* L. and *Hypericum tetrapterum* Fries. Z Naturforsch C 64, 864–868.

Kvasnica, M., J. Sarek, E. Klinotova, P. Dzuba & M. Hajduch (2005). Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. Bioorgan Med Chem 13, 3447-3454.

Levee, V., E. Garin, K. Klimaszewska & A. Seguin (1999). Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobus* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens.* Molecular Breeding 5 (5), 429-440.

Levesque, H., P. Delepelaire, P. Rouzt, J. Slighlom & D. Tepfer (I988). Common evolutionary origin of the central portions of the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and the Ti-T-DNAs of *Agrobacterium tumefaciens.* Plant Mol Biol 11, 731-744.

Macías, P.M., J.A.C. Perea y U.H. Solis (2005). Posible actividad biológica del extracto de la raíz de *Pentalinon andrieuxii.* Episteme (3, Año 1).

Marasco, E.K. & C. Schmidt-Dannert (2007). Biosynthesis of plant natural products and characterization of plant biosynthetic pathways in recombinant microorganisms. In Applications of Plant Metabolic Engineering (pp. 1-43). Springer Netherlands.

Martín-Acosta J.C. (2012). Regeneración de plantas *in vitro* de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.).Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

Mauro, M.L., M. Trovato, A.D. Paolis, A. Gallelli, P. Costantino & M.M. Altamura (1996). The plant oncogene *rol*D stimulates flowering in transgenic tobacco plants. Dev Biol 180, 693-700.

McAfee, B.J., E.E. White, L.E. Pelcher & M.S. Lapp (1993). Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 (1), 53-62.

McAlpine, J.B., C. Pazoles & A. Stafford (1999). Bioassay methods in natural products research and drug development. In: Bohlin L & Bruhn JG (eds) Proceedings of the Phytochemical Society of Europe 43, 159–166.

McCullen, C.A. & A.N. Binns (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. Annu Rev Cell Dev Biol 22, 101-127.

Mehrotra, S., L.U. Rahman & A.K. Kukreja (2010). An extensive case study of hairy-root cultures for enhanced secondary-metabolite production through metabolic-pathway engineering. Biotechnology and Applied Biochemistry 56(4), 161-172.

Meisch, H.U., L.J.M. Becker & D. Schwab (1980). Ultrastructural changes in *Chlorella fusca* during iron deficiency and vanadium treatment. Protoplasma 103 (3), 273-280.

Meisch, H.U. & H.J. Bieling (1980). Chemistry and biochemistry of vanadium. Basic Research in Cardiology 75 (3), 413-417.

Memelink, J., R. Verpoorte & J.W. Kijne (2001). ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends in Plant Science 6 (5), 212-219.

Menke, F.L., A. Champion, J.W. Kijne & J. Memelink (1999). A novel jasmonate and elicitor responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate and elicitor inducible AP2 domain transcription factor, ORCA2. The EMBO Journal 18 (16), 4455-4463.

Michal, G. & D. Schomburg (2012). Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, 2nd Edition. 416 pages.

Mirjalili, H., S. Fakhr-Tabatabaei, M. Bonfill, H. Alizadeh, R. Cusido, A. Ghassempour & J. Palazón (2009). Morphology and withanolide production of *Withania coagulans* hairy root cultures. Eng Life Sci 9, 197–204.

Moghaddam, M.G., F. B. H. Ahmad & A. Samzadeh-Kermani (2012). Biological activity of betulinic acid: a review. Pharmacology & Pharmacy 3 (2), 119-123.

Montiel, X., I. Carruyo, Y. Fernández, L. Marcano y Z. Torrealba (2011). Valoración del efecto tóxico de pentóxido de vanadio en meristemos de cebolla (*Allium cepa* L.). Ciencia 15, (1).

Moreno, P.R.H., R. Van der Heijden & R. Verpoorte (1993). Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Reports 12 (12), 702-705.

Moses, T., J. Pollier, J. M. Thevelein & A. Goossens (2013). Bioengineering of plant (tri) terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo and in vitro*. New Phytologist 200, 27–43.

Mueller, M.J. (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. Physiol Plant 100 (3), 653-663.

Mukherjee, B., B. Patra, S. Mahapatra, P. Banerjee, A. Tiwari & M. Chatterjee (2004). Vanadium—an element of atypical biological significance. Toxicology Letters 150 (2), 135-143.

Mukundan, U. & M.A. Hjortsø (1990). Effect of fungal elicitor on thiophene production in hairy root cultures of *Tagetes patula*. Appl Microbiol Biotechnol 33, 145–147.

Nalewajko, C., K. Lee & T.R. Jack (1995). Effects of vanadium on freshwater phytoplankton photosynthesis. Water, Air, and Soil Pollution 81 (1-2), 93-105.

Neumann, K.H., A. Kumar & J. Imani (2009) Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application (Principles and Practice) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 1-3.

Nilsson, O. & O. Olsson (1997). Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol-genes in the formation of hairy roots. Physiol Plant 100, 463–473.

O'Connell, M., M. Bently, C. Campbell & B. Cole (1998). Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches. Phytochemistry 27, 2175-2176.

Okeson, C.D., M.R. Riley & E. Riley-Saxton (2004). *In vitro* alveolar cytotoxicity of soluble components of airborne particulate matter: effects of serum on toxicity of transition metals. Toxicology *in vitro* 18 (5), 673-680.

Ono, N.N. & L. Tian (2011). The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. Plant Science 180 (3), 439-446.

Oono, Y., K. Kanaya & H. Uchimiya (1990). Early flowering in transgenic tobacco plants possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid. Jpn J Genet 65, 7–16.

Ortiz-Caltempa, A. (2008). Establecimiento de un cultivo de células transformadas de *Galphimia glauca* en suspensión para la producción de triterpenos. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional. Centro de desarrollo de productos bióticos.

Ossipov, V., K. Nurmi, J. Loponen, E. Haukioja & K. Pihlaja (1996). High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. J Chromatography A 721, 59-68.

Palazón. J., R.M. Cusido, C. Roig & M.T. Pinol (1998a). Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants. Plant Cell Rep 17, 384–390.

Palazón, J., R.M. Cusido, J. Gonzalo, M. Bonfill, S. Morales & M.T. Pinol (1998b). Relation between the amount the *rolC* gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* transformed root cultures. J Plant Physiol 153, 712–718.

Palazón, J., R.M., M. Bonfill, A. Mallol, E. Moyano, C. Morales & M.T. Piñol (2003). Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. Plant Physiol Biochem 41, 1019–1025.

Palazón, J., R.M. Cusido, M. Bonfill, A. Mallol, E. Moyano, C. Morales & M.T. Pinol (2003b). Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. Plant Physiol Biochem 41, 1019 – 102.

Pan, L., M. Claudio & Lezama-Dávila (2012). Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. Phytochemistry 82, 128-135.

Patocka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. Journal of Applied Biomechanics 1, 7–12.

Peiter, E., J. Imani, F. Yan & S. Schubert (2003). A novel procedure for gentle isolation and separation of intact infected and uninfected protoplasts from the central tissue of *Vicia faba* L. root nodules. Plant Cell Environ 26, 1117–1126.

Pérez-Urria Carril, E., y A. Ávalos García, (2009) Metabolismo secundario de plantas. REDUCA 2 (3). pp. 119-145. ISSN 1989-3620.

Porter, J.R., & H. Flores (1991). Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. Critical Reviews in Plant Sciences 10 (4), 387-421.

Phillips, D.R., J.M. Rasbery, B. Bartel & S. Matsuda (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. Current Opinion in Plant Biology 9 (3), 305-314.

Phongprueksapattana, S., W. Putalun, N. Keawpradub & J. Wungsintaweekul (2008). *Mitragyna speciosa*: hairy root culture for triterpenoid production and high yield of mitragynine by regenerated plants. Z Naturforsch C 63, 691–698.

Pitta-Alvarez S.I., T.C. Spollansky & A.M. Guilietti (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of Brugmansia candida. Enzyme Microb Technol 26, 252 – 258.

Putalun, W., G. Yusakul & D. Patanasethanont (2009). Dicentrine production from a hairy roots culture of *Stephania suberosa*. Z. Naturforsch C 64, 692–696.

Pyrzyńska, K. & T. Wierzbicki (2004). Determination of vanadium species in environmental samples. Talanta 64 (4), 823-829.

Rahimi, K., K. Haghbeen, J. Marefatjo, F. Jazii & R. Sheikhani (2008). Successful production of hairy root of *Valeriana sisymbriifolium* by *Agrobacterium rhizogenes*. Biotechnology 7, 200–204.

Riker, A.J., W.M. Banfield, W.H. Wright & G.W. Keitt (1930). Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. J Agric Res 41, 507–540.

Rzedowski, J. y G. Calderón de R. (1998). Apocynaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 70. Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Michoacán: 64.

Sanford, J.C. (1990). Biolistic plant transformation. Physiol Plant 79, 206-9.

Sevon, N. & K.M. Oksman-Caldentey (2002). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. Planta Med 68, 859–868.

Shanks, J.V. & J. Morgan (1999). Plant "hairy root" culture. Curr Opin Biotechnol 10, 151–155.

Shillito, R. D., M. W. Saul, J. Paszkowski, M. Muller & I. Potrykus (1985). High efficiency direct gene transfer to plants. Bio/Technology 3, 1099-1104.

Shkryl, Y.N., G.N. Veremeichik y V.P. Bulgakov (2008). Individual and combined effects of the *rolA*, *B* and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. Biotechnol Bioeng 100, 118–125.

Sidik, N., M. Norihan & K. Shafii (2010). *In vitro* culture of *Pereskia bleo*. Acta Hortic 829, 99–104.

Sidwa-Gorycka, M., A. Krolicka, A. Orlita, E. Malinski, M. Golebiowski, J. Kumirska, A. Chromik, E. Biskup, P. Stepnowski & E. Lojkowska (2009). Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root cultures a promising approach for production of coumarins and furanocoumarins. Plant Cell Tissure Organ Cult 97, 59–69.

Sivakumar, G., K.W. Yu, E.J. Hahn & K.Y. Paek (2005). Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. Curr Sci 89, 641–649.

Slightom, J.L., M. Durand-Tardif, L. Jouanin & D. Tepfer (1986). Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. Journal of Biological Chemistry 261 (1), 108-121.

Staniszewska, I., A. Krolicka, E. Malinski, E. Lojkowska & J. Szafranek (2003). Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. Enzyme Microb Technol 33, 565– 568.

Stewart, F.C., F.M. Rolfs & F.H. Hall (1900). A fruit disease survey of western New York in 1900. New York Agric Exp Sta Bull 191, 291–331.

Suhita, D., A.S. Raghavendra, J.M. Kwak & A. Vavasseur (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate-and abscisic acid-induced stomatal closure. J Plant Physiology 134 (4), 1536-1545.

Swain, S., L. Sahu, D. Barik, P. Chand (2010). *Agrobacterium* × plant factors influencing transformation of 'Joseph's coat' (*Amaranthus tricolor* L.). Sci Hortic 125, 461–468.

Tassoni, A., S. Fornale, M. Franchescetti, F. Musiani, A.J. Michael & B. Perry (2005). Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. New Phytol 166, 895– 905.

Tillequin, F., S. Michael & I. Seguin (1993). "Pirrolizidine alkaloids" in alkaloids and sulphur compounds. Waterman, P.G. ed., Academic press, San Diego 8, pp. 175-181.

Triplett, B., S. Moss, J. Bland & M. Dowd (2008). Induction of hairy root cultures from Gossypium hirsutum and Gossypium barbadense to produce gossypol and related compounds. In Vitro Cell Dev Biol Plant 44, 508–517.

Trovato, M. & F. Linhares (1999). Recent advances on *rol* genes research: a tool to study plant differentiation. Curr Top Plant Biol 1, 51–62.

Trovato, M., B. Maras, F. Linhares, y P. Costantino (2001). The plant oncogene *rol*D encodes a functional ornithine cyclodeaminase. Proc Natl Acad Sci USA 98 (23), 13449-13453.

Udomsuk, L., K. Jarukamjorn, H. Tanaka & W. Putalun (2009). Isoflavonoid production in a hairy roots culture of *Pueraria candollei*. Z Naturforsch C 64, 687–691.

Van Wordragen, M.F. & H.J. Dons (1992). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. Plant Molecular Biology Reporter 10 (1), 12-36.

Veena, V. & C.G. Taylor (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 43 (5), 383-403.

Vranová, E., D. Coman & W. Gruissem (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. Molecular Plant 5 (2), 318-333.

Vwioko, D.E., G.O. Anoliefo & S.D. Fashemi (2006). Metal concentration in plant tissues of *Ricinus communis* L. (castor oil) grown in soil contaminated with spent lubricating oil. Journal of Applied Sciences and Environmental Management 10 (3), 127-134.

Waller. F., B. Aschatz, H. Baltruschat, J. Fodor, K. Becker, M. Fischer, T. Heier, R. Hückelhoven, C. Neumann, D. v. Wettstein, P. Franken & K.H. Kogel (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proc Natl Acad Sci USA 102, 13386–13391.

White, F.F., G.H. Taylor, G.A. Huffmann, M.P. Gordon & E.W. Nester (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. J Bacter 164, 33–44.

Yam-Puc, A., F. Escalante-Erosa, M. Pech-López, M.J. Chan-Bacab, A. Arunachalampillai, O.F. Wend, O. Sterner & L.M. Peña-Rodríguez (2009). Trinorsesquiterpenoids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. Journal of Natural Products 72, 745-748.

Yam-Puc, A., L. Chee-González, F. Escalante-Erosa, M.J. Chan-Bacab, A. Arunachalampillai, O.F. Wendt, O. Sterner, L.M. Peña-Rodríguez & G. Godoy-Hernández (2012a). Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii* Phytochemistry Letters 5, 45-48.

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

Willmitzer, L., J. Sanchez-Serrano, E. Buschfeld & J. Schell (1982). DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. Mol Gen Genet 186, 16–22.

Zaenen, I., N. Van Larebeke, H. Teuchy, M. Van Montagu & J. Schell (1974). Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. J Mol Biol 86, 109–127.

Zhao, G., W. Yan & D. Cao (2007). Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. J Pharmaceut Biomed 43, 959-962.

Zuco, V., R. Supino, S.C. Righetti, K. Clerics, E. Marchesi, C. Gambacorti-Passerini & F. Formelli (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines but not normal cells. Cancer Lett 175, 17-25.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL: PROTOCOLO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *P. andrieuxii*

2.1.1. Asepsia de las semillas y tratamiento de pre-germinación

Medios de cultivo

- Medio PC. Semi-sólido y líquido (Phillips y Collins, 1979) – para germinación de semillas, transformación y mantenimiento de raíces (Para ver la composición del medio PC y sus componentes, revisar anexo 1 sección de APÉNDICES).

Semillas secas y maduras de *P. andrieuxii* se lavaron con detergente extrán al 5% durante cinco minutos en agitación constante. Una vez decantada la solución de extrán y enjuagadas las semillas con agua estéril tres veces, se agregó etanol al 70% dejándolas en agitación constante durante cinco minutos. Posteriormente, se decantó la solución de etanol y las semillas se enjuagaron tres veces con agua estéril, para entonces colocarlas en una solución de cloro comercial al 50% durante 20 min en agitación constante. Finalmente las semillas se lavaron con agua estéril cinco veces.

Antes de colocarse en los medios de cultivo para su germinación las semillas se dejaron embebidas en agua estéril durante una hora.

2.1.2. Condiciones de germinación

Para la germinación de las semillas de se utilizaron frascos con 20 mL de medio PC semi-sólido libre de reguladores de crecimiento (Phillips y Collins, 1979) esterilizados en autoclave (20 min a 120°C) En cada frasco se colocaron seis (6) semillas y se mantuvieron en un cuarto a una temperatura de 25 °C, en oscuridad total, durante aproximadamente dos semanas.

Una vez germinadas las plántulas en estas condiciones (oscuridad) se pasaron a condiciones de luz continua hasta su utilización para los experimentos subsecuentes.

2.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

2.2.1. Cepa bacteriana

La cepa bacteriana de *A. rhizogenes* (ATCC 15834) utilizada para este trabajo fue donada por la Dra. Ma. Luisa Villareal Ortega del CEIB-UNAM Morelos. El protocolo de transformación consistió en:

Cultivo de la cepa en 20 mL de medio YM (K_2HPO_4 500mg/L, $MgSO_4.7H_2O$ 200mg/L, NaCl 100mg/L, manitol 1000mg/L, extracto de levadura 400mg/L a un pH de 7.2 y libre de antibiótico) por 49 horas en agitación constante de 200 rpm en un orbitador protegido de la luz. Posteriormente, se inocularon 10mL de medio YM con 200 µL del cultivo e incubó por 24 en las mismas condiciones descritas. Se llevó a una dilución 1:1 (V: V) de este último cultivo con medio YM y adicionaron 10 µL de una solución de acetosiringona 200 mM. Este cultivo se incubó por 5 horas en las mismas condiciones. Como explantes se utilizaron segmentos de tallo, raíz y hoja de plántulas de dos meses de edad germinadas *in vitro* los cuales fueron sumergidos en el cultivo bacteriano (D.O. = 0.1) descrito, adicionado con 25 µL de acetosiringona 200 mM y sometidos a vacío durante 20 minutos. Los diferentes explantes infiltrados se secaron con una toalla de papel, se sembraron en cajas de Petri con medio PC semisólido libre de reguladores de crecimiento y se mantuvieron durante 5 días en obscuridad. Los explantes cocultivados se pasaron a frascos con medio PC semisólido y adicionado con claforán (500 mg/L) y se mantuvieron en condiciones de luz continua para promover organogénesis. Alrededor de cuatro semanas posteriores al proceso de transformación, sobre algunos de los explantes infectados se pude ver la formación de raíces mismas que una vez alcanzado una longitud aproximadamente de 10 cm, se cortan para ser transferidas a medio PC líquido con claforán (500 mg/L) manteniéndose a 25°C bajo luz continua.

2.2.2. Mantenimiento de raíces transformadas

Las raíces se resembraron cada 20 días en medio PC líquido adicionado con Claforán (500mg/mL). Para la resiembra, las raíces se seccionaron en dos o más partes, dando preferencia para su conservación a las más jóvenes, que se distinguieron por presentar una coloración verde–claro, en comparación con las raíces viejas que presentan una coloración pardo-oscura. Cada línea celular se mantuvo en las condiciones de crecimiento descritas, realizándose las resiembras necesarias para que la disponibilidad de las material vegetal fuera suficiente.

2.3. GENOTIPIFICACIÓN DE RAÍCES TRANSFORMADAS POR PCR

2.3.1. Extracción de ADN Vegetal.

El método empleado para la extracción del ADN genómico fue el propuesto por Dellaporta *et al*, 1983.

Reactivos:

- Tris-HCl pH 8.0 (1 M)
- EDTA pH 8.0 (0.5 M)
- NaCl (0.5 M)
- Alcohol isopropílico
- Polivinilpirrolidona (PVP)

0.200 g de raíces frescas de la línea seleccionada fueron maceradas en nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino, al cual se homogenizó en 400µL de buffer de extracción (Tris-HCl 1M, EDTA 1M, NaCl 1M, Na_2S_2Os, PEG 8000 y SDS 20%). El homogenizado se transfirió a un tubo para incubarse 1 hr a 60° C. Posteriormente, se adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:25, V: V), se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 13,000 rpm por 6 min para separar las fases acuosa y orgánica. Este proceso de extracción se repitió nuevamente sobre la fase acuosa (superior). La fase acuosa recuperada de la segunda centrifugación, se trató con RNAasa 10mg/mL (5µL), incubándose a 37°C por 30 min. Se adicionó 0.7 vol. de Isopropanol y se dejó 30 min. a -20 °C antes de centrifugarse a 13,000 rpm por 15 min para obtener una pastilla a la que se le realizó un lavado con 400 µL de etanol al 80% compactándose nuevamente por centrifugación a 13,000 rpm por 15 min. Finalmente, la pastilla de ADN se resuspendió en agua destilada (20 µL). La integridad del ADN se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer (Tris base, ácido acético glacial y EDTA 0.5M) con bromuro de etidio (10mg/mL) a 85 volts, para ser observado con luz ultravioleta en un transiluminador y capturar la imagen en un fotodocumentador.

2.3.2. Amplificación de genes del ADN-T por PCR

PCR es el acrónimo del inglés *"Polymerase Chain Reaction"* (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La idea básica de la técnica es sintetizar repetidamente un fragmento de ADN limitado por dos iniciadores complementarios a cada una de las cadenas del ADN, utilizando una polimerasa termoestable proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de donde toma su nombre comercial de *"taq polimerase"*. En una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, ya que en un tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que queremos estudiar –donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar-, los oligonucleótidos que se utilizan como iniciadores ("primers", cebadores, etc.) de la polimerización, dinucleótidos (dNTPs), que se coloca en las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (Asuar, 2007).

Los PCR de este trabajo fueron dirigidos para identificar la presencia de los genes *rolA* y *rolC*, tanto en el ADN de las células bacterianas, como de las células de raíz de *P. andrieuxii* transformadas. Para las reacciones se utilizaron los pares de oligonucleótidos cuya secuencia se muestra a continuación, que son específicos para los genes referidos (Bonhomme *et al.*, 2000), usando las condiciones de amplificación previamente descritas por Náder *et al* (2005) que son mostradas en el **cuadro 2.1.**

- Oligonucleótidos *rol*A (número de acceso: X12579)

5´- TGTGACAAGCAGCGATGAGC -3´ (forward primer)

5´- GATTGCAAACTTGCACTCGC -3´ (reverse primer)

- Oligonucleótidos *rolC* (número de acceso: X64255)

5´- CGTTGTCGGAATGGCCCAGACC -3´ (forward primer)

5´- CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC -3´ (reverse primer)

Cuadro 2.1. Condiciones de PCR para amplificación de los genes *rol*A y *rolC* (Náder *et al*, 2005).

	Temperatura y Tiempo de la condición			
Gen	**Inicial**	**Desnaturalización***	**Alineamiento***	**Extensión***
*rol*A (248pb)	95°C x 5min	95° C x 1 min	50.2°C x 1 min	72°C x 1 min
rolC (490pb)	95°C x 5min	95° C x 1 min	54.8°C x 1 min	72°C x 1 min

*35 repeticiones (ciclos) consecutivas

2.4. CURVAS DE CRECIMIENTO

Las cuatro (4) líneas de raíces transformadas (B, C, D, M) a partir de hoja de *Pentalinon andrieuxii* utilizadas en este trabajo ("Estudio de la biosíntesis en terpenoides en *Pentalinon andrieuxii*", Yam Puc Jesús Alejandro, 2013. Tesis de doctorado), se caracterizaron en cuanto a crecimiento a través del tiempo (cada tercer día en un curso de 45 días). Esto se hizo generando curvas de crecimiento a partir de un inóculo inicial de 1gr de raíz y con tres (3) réplicas para cada punto de muestreo.

Para cada punto de muestreo se registró la biomasa, peso fresco y peso seco (a partir de muestras liofilizadas), así como la conductividad de los medios de cultivo, que fueron congelados para su posterior extracción.

2.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO MEDIANTE LA PREPARACIÓN DE FRACCIONES DE POLARIDAD MEDIA A PARTIR DE RAÍCES TRANSFORMADAS Y MEDIOS DE CULTIVO DE *P. andrieuxii*

Las raíces transformadas liofilizadas fueron extraídas por maceración en metanol por 24 horas tres veces. Después de cada extracción el disolvente fue removido por decantación y eliminado a presión reducida en un rotavapor, dando lugar a los extractos crudos metanólicos. Estos extractos metanólicos fueron extraídos por sonicación con cloruro de metilo (CH_2Cl_2) durante media hora y colocados en viales de vidrio previamente pesados y debidamente etiquetados.

Los medios de cultivo de cada punto de muestreo (100mL), se sometieron a una partición líquido-líquido con acetato de etilo (AcOEt) en proporción 2:1, con ayuda de un embudo de separación. Después de cada extracción el disolvente fue removido a presión reducida en un rotavapor dando lugar a los extractos de medio de cultivo.

2.6. ANÁLISIS DE ÁCIDO BETULÍNICO POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para determinar la presencia de ácido betulínico en los extractos de acetato de etilo (medios de cultivo) y metanólicos (raíces) de las diferentes líneas de raíces, fue utilizando una cromatoplaca con una cubierta de sílice empleándose un sistema de elución de **Hx/CH_2Cl_2/An (Hexano/ Diclorometano/ Acetona) 6:2:2.** La visualización de los compuestos se hizo a través de la reacción con el agente revelador ácido fosfomolíbdico y se realizó un calentamiento a 100° C para observar la presencia de ácido betulínico de un color violeta característico, con respecto a un estándar de Sigma (855057).

De acuerdo a los reportes de De Oliveira (2001), Zhao (2007) y Kumar (2010) respecto a la separación y cuantificación de ácido betulínico por HPLC, se empleó un sistema de acetonitrilo 100% (isocrático) por 10 min, con un flujo de 1 mL /min, utilizando una columna Waters 250*4.5 mm (5 micrometros), con una lectura de detección a 210 nm. La fase móvil (acetonitrilo 100%) fue elegida con el fin de minimizar el ruido de fondo y para mejorar el límite de detección dado que durante la detección UV de onda corta como en este caso, la absorción del acetonitrilo es más baja que la de metanol, haciendo al acetonitrilo apropiado para el análisis por HPLC (Bae, 1996).

Las muestras inyectadas fueron preparadas con metanol (grado HPLC) al 1%, haciendo tres (3) inyecciones de cada una (10 minutos cada inyección). La curva de calibración fue preparada con la referencia de ácido betulínico de Sigma.

Para el análisis y cuantificación por HPLC, sabemos que el pico cromatográfico representa una campana de Gauss, que es la distribución de las moléculas que eluyen a lo largo del tiempo. La cuantificación del pico conlleva la evaluación del número de moléculas de cada soluto (cada pico) y por tanto, la cantidad o concentración de la misma. El análisis cuantitativo se basó en la comparación de la altura o el área del pico del analito con la del estándar inyectado (AB-Sigma); esto con la ayuda de una curva de calibración lineal construida bajo las mismas condiciones cromatográficas y con ella, el cálculo de la ecuación de la recta, para sustituir el valor promedio de cada una de las tres repeticiones inyectadas por muestra del experimento de elicitación.

2.7. USO DE ELICITORES PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO

Debido a sus propiedades de crecimiento (ver resultados 3.3), se seleccionó la línea D de raíces para ensayar el efectos de los elicitores. Para ello, en el día 30 de crecimiento se aplicaron como elicitores ácido jasmónico (Sigma – J2500) o sulfato de vanadilo (Sigma – 233706) en dosis de 100, 200 y 400 µM siguiendo un curso temporal de 24, 48 y 72 horas (usando DMSO para diluir el AJ y agua estéril para sulfato de vanadilo, esterilizados por filtración) de cosecha posteriores a la elicitación, en relación con otro sin elicitor. Los tratamientos se aplicaron por triplicado y el análisis para evaluar el efecto de los elicitores sobre la producción de ácido betulínico en este sistema se determinó de manera cualitativa por CCD y cuantitativa por HPLC siguiendo la metodología previamente descrita.

BIBLIOGRAFÍA

Asuar, L. E. (2007) Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte, L., Souza, V & Aguirre, X. Ecología Molecular. SEMARNAT, México. Pp: 517- 540

Bae, K.H., S.M. Lee, E.S. Lee, J.S. Lee & J.S. Kang (1996). Isolation and quantitative analysis of betulinic acid and alphitolic acid from *Zizyphi fructus*. Yakhak Hoeji 40, 558-562.

Bonhomme, V., D. Laurain-Mattar, J. Lacoux, M.A. Fliniaux & A. Jacquin-Dubreuil (2000). Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol*A, B, C genes only. Journal of Biotechnology 81 (2), 151-158.

Dellaporta, S.L., J. Wood & J.B. Hicks (1983). A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1 (4), 19-21.

Kumar, D., S. Mallick, J. R. Vedasiromoni & B. C. Pal (2010). Anti-leukemic activity of *Dillenia indica* L. fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. Phytomedicine 17 (6), 431-435.

Náder, B.L., A.T.C. Taketa, G. Iturriaga, R. Pereda-Miranda y M.L. Villarreal (2005). Genetic transformation of *Galphimia glauca* by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of norfriedelanes. Planta Medica 70 (12), 1174-1179.

Oliveira, B. H. D., C. A. Santos & A. P. D. Espíndola (2002). Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. Phytochemical Analysis 13 (2), 95-98.

Zhao, G., W. Yan & D. Cao (2007). Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43 (3), 959-962.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OBTENICIÓN DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *P. andrieuxii*

Además de contar con cuatro (4) líneas (B.C, D y M) de raíces transformadas a partir de hoja que fueron establecidas previamente en el laboratorio (Yam Puc, 2013), se obtuvieron nuevas líneas de raíces transformadas a partir de explantes de hoja, raíz y tallo de plántulas germinadas *in vitro* de *Pentalinon andrieuxii* empleando la cepa ATCC15834 de *A. rhizogenes*. Los diferentes explantes formaron raíces en los sitios de infección alrededor de seis (6) semanas posteriores a los tratamientos con cefotaxima y su cultivo en medio PC semisólido (**Figura 3.1**). Una vez que las raíces alcanzaron una longitud de entre 2 y 5 cm aproximadamente, fueron cultivadas en matraces (250mL) con medio líquido PC libre de reguladores de crecimiento (con cefotaxima a 250 mg/L) y colocados en un orbitador a 95 rpm dentro del cuarto de cultivo con luz continua. En el **cuadro 3.1** se muestra el resultado obtenido a partir de este evento de transformación genética, así como las líneas obtenidas a partir de dicho experimento.

Cuadro 3.1. Transformación genética con *A. rhizogenes* en hojas, tallos y raíces de *P. andrieuxii*

Explante	Número de explantes infectados	Explantes cultivados en medio PC semisólido	Raíces cultivadas en medio PC líquido libre de reguladores de crecimiento	Líneas de raíces obtenidas
Hoja	100	100 %	14	6 (Líneas O, Q, S, T, U, V)
Tallo	100	100 %	10	2 (línea A y C)
Raíz	100	100 %	6	Ninguna

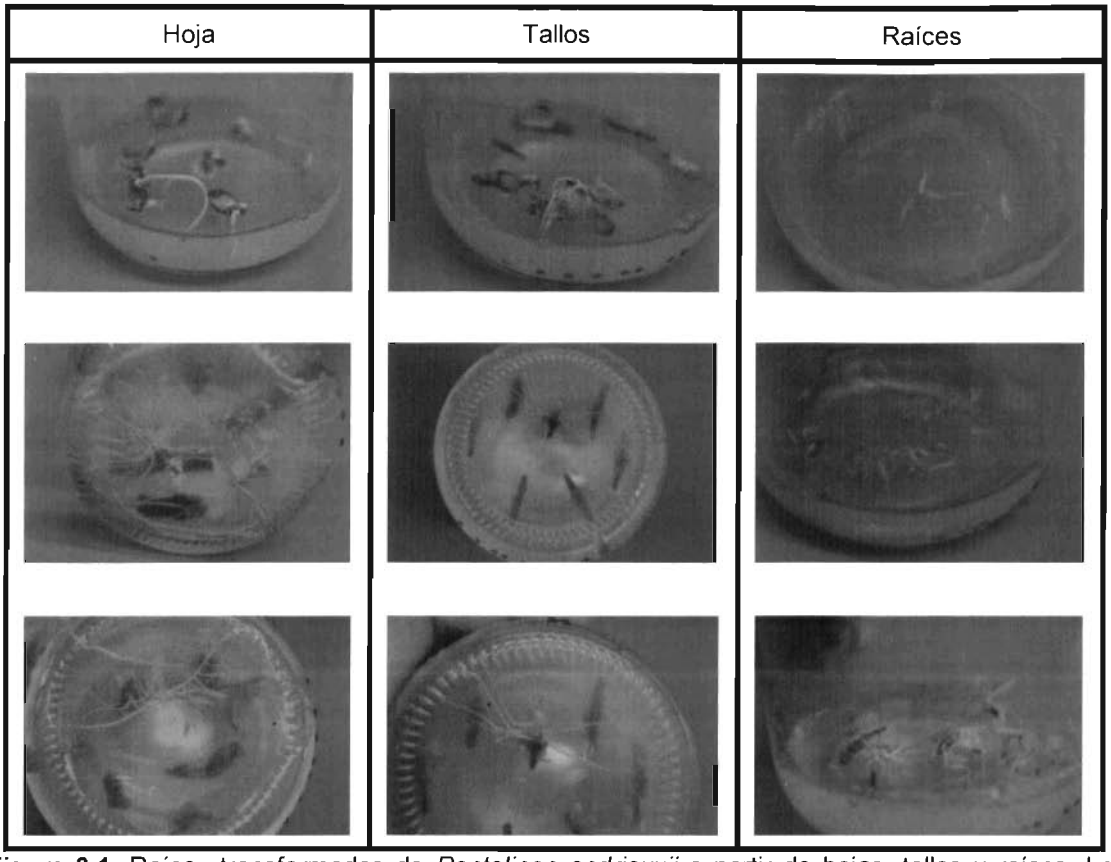


Figura 3.1. Raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* a partir de hojas, tallos y raíces. La figura muestra el crecimiento de raíces en los sitios de infección tras 6 semanas de cultivo en medio PC libre de reguladores de crecimiento en los tres explantes utilizados para el proceso.

Para el desarrollo de este trabajo, se inició la caracterización de los cultivos previamente establecidos (B, C, D, M), mientras que las raíces producto de un nuevo evento de transformación genética y usando los tres explantes, se siguieron cultivando con el fin de mantenerlos pero no fueron incluidos en la caracterización por motivos de tiempo para continuar desarrollando las metodologías planteadas.

3.2. AMPLIFICACIÓN DE LOS TRANSGENES *rol*A Y *rol*C POR PCR.

Para confirmar la transformación genética de las líneas de raíces empleadas en este trabajo (B, C, D y M), se amplificaron los genes de origen bacteriano *rol*A y *rol*C a partir de ADN extraído de los cultivos. La extracción de ADN genómico de las raíces transformadas se realizó con tres métodos diferentes (Khanuja *et al.*, 1999 y Dellaporta *et al.*, 1983 y Dellaporta + modificaciones) descritos en la metodología. Los tres métodos resultaron

eficientes para la extracción de ADN de alto peso molecular (**Figura 3.2**), pero como con el método de Dellaporta *et al.*, 1983 (**Figura 3.2: 2**) aparentemente se obtuvo un mayor rendimiento, este fue usado para las extracciones posteriores.

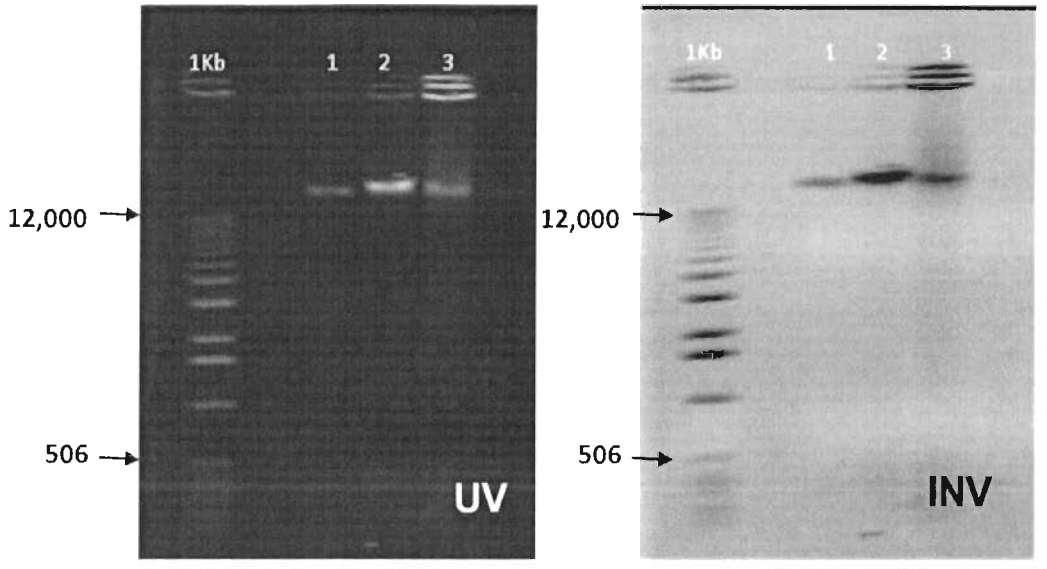


Figura 3.2. Gel de electroforesis con las muestras de ADN genómico extraído de raíces transformadas de *P. andrieuxii*. Se muestran imágenes de exposición a luz UV (UV) y exposición invertida (INV). Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio; 1Kb: Marcador; 1: Método Dellaporta *et al*, 1983 (modificado); 2: Método Dellaporta *et al*, 1983; 3: Método Khanuja *et al*, 1999.

Antes de amplificar los genes *rol* en el ADN genómico de raíces transformadas, se realizó la amplificación de genes *rol*A y *rol*C del plásmido Ri por PCR con iniciadores específicos para cada gen. Dado que las condiciones descritas por Nader *et al*, 2005 para el paso de alineamiento son diferentes a las Tm calculadas para los oligonucleótidos, inicialmente se hizo un PCR con gradientes de temperatura (**Cuadro 3.1**), que permitiera encontrar la temperatura de alineamiento óptima para cada par de iniciadores. Como se muestra en la **figura 3.3** para *rol*A (248 bp) la mejor temperatura de alineamiento fue de 50.2°C (**Figura 3.3, carril 2**), mientras que para *rol*C (490 bp) las tres temperaturas de alineamiento probadas permitieron su amplificación, por lo que para este gen en lo subsecuente se usaron las condiciones de alineamiento reportadas de 54.8°C (Nader *et al*, 2005) (**Figura 3.3 carril 6**).

Cuadro 3.2. Condiciones de PCR probadas para la amplificación de los genes *rol*A y *rol*C.

	Condición (Temperatura y Tiempo)			
Gen	**Inicial**	**Desnaturalización**	**Alineamiento (gradiente)**	**Extensión***
*rol*A (248pb)	95°C x 5min	95° C x 1 min	50.2°C 59.4°C X 1min 67.1°C	72°C x1 min
*rol*C (490pb)	95°C x 5min	95° C x 1 min	50.2°C 54.8°C X 1min 57.1°C	72°C x1 min

*Con 35 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión.

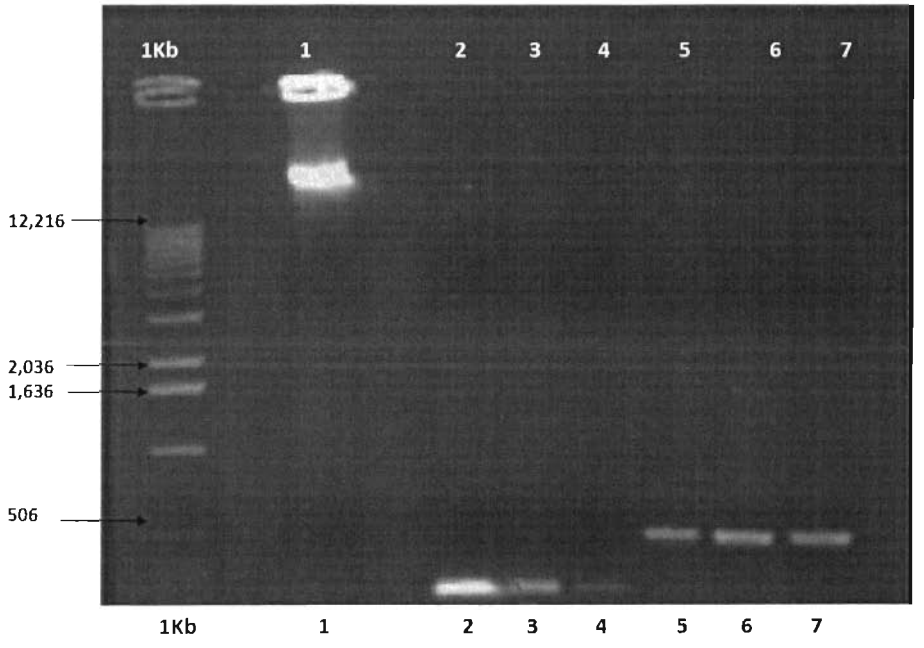


Figura 3.3. Gel de electroforesis con los productos de amplificación de los genes *rol*A **(carriles 2-4)** y *rol*C **(carriles 5-7)** a partir de ADN plasmídico de *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. Imagen de exposición a luz UV. Gel de agarosa al 1%.Teñido con Bromuro de Etidio. Marcador 1 Kb DNA Ladder. **1:** ADN plasmídico (ATCC 15834); **2:** *rol*A (50.2 °C); **3:** *rol*A (59.4 °C); **4:** *rol*A (67.1 °C); **5:** *rol*C (50.2 °C); **6:** *rol*C (54.8 °C); **7:** *rol*C (57.1 °C).

Con las condiciones establecidas, se amplificó por PCR el gen *rol*A (248 bp) a partir de ADN genómico (400 ng) de las cuatro líneas B, C, D y M de raíces transformadas a partir de hoja de *Pentalinon andrieuxii* (**Figura 3.4**).

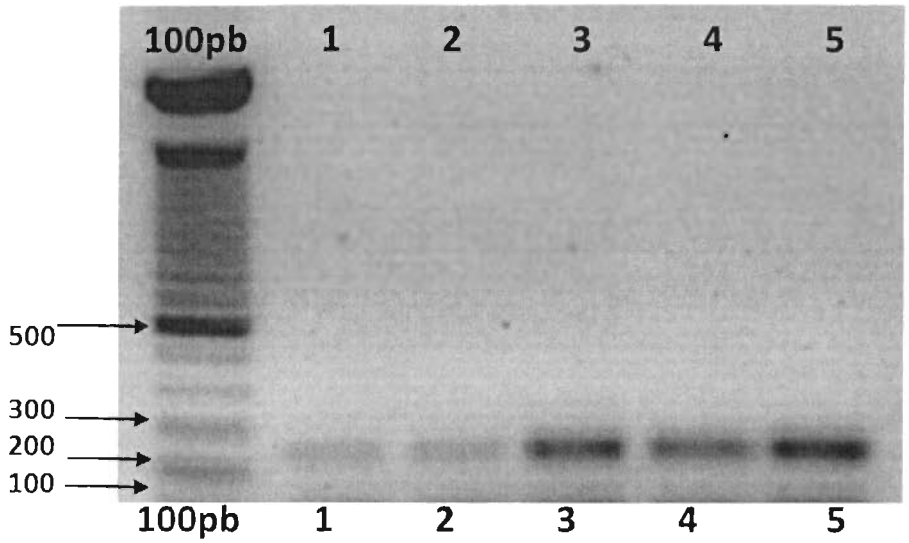


Figura 3.4. Gel de electroforesis con los productos de amplificación del gen *rol*A amplificado por PCR. Se muestran imágenes de exposición a luz UV e invertida de los productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de raíz transformadas. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Marcador 100 pb DNA Ladder. 1: ADN plasmídico; 2: línea B; 3: línea C; 4: línea D; 5: línea M.

Simultáneamente se intentó la amplificación del gen *rol*C en las líneas B y D, pero no fue posible obtener productos de PCR en ninguna de las condiciones previamente optimizadas para la amplificación de ADN plasmídico. Intentando resolver este problema, se probó un gradiente más amplio de temperaturas de alineamiento (46.9, 47.3, 48.4, 50.1, 52.2, 54.5, 57.0, 59.3, 61.5, 63.3 y 65.1°C) utilizando ADN genómico la línea B y D como templado. Sin embargo, en ninguna de las condiciones ensayadas fue posible amplificar el gen *rol*C a partir de ADN de las raíces (**Figura 3.5**). Este resultado podría sugerir que este gen no está insertado en el genoma de las líneas B y D, cuya naturaleza transgénica quedó confirmada con la amplificación de *rol*A. Como alternativas, queda por intentar demostrar la presencia de otros de los genes portados en el plásmido Ri (*rol*B y *rol*D), así como la amplificación de *rol*C en las otras líneas de raíces transformadas (C y M) utilizadas en este trabajo y no sometidas a la genotipificación de su ADN por motivos de tiempo.

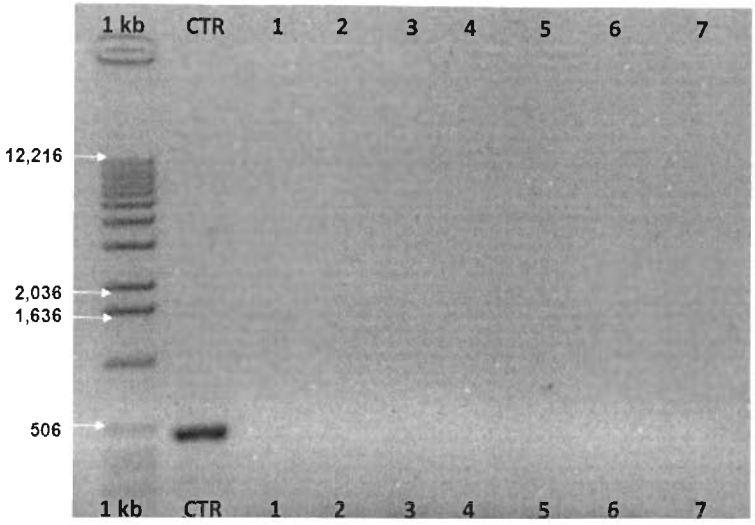


Figura 3.5. Gel de electroforesis con los productos de amplificación del gen *rolC* amplificado por PCR. Se muestra la imagen invertida de exposición a luz UV de un Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio, conteniendo los productos de PCR del gen *rolC* obtenidos sobre ADN plasmídico (CTR) y sobre ADN genómico de raíces transformadas de la línea B a diferentes temperaturas de alineamiento. 1: 46.9°C; 2: 47.3°C; 3: 48.4°C; 4: 50.1°C; 5: 52.2°C; 6: 54.5°C; 7: 57.0°C. Revelado por exposición a luz UV. 1kb representa el marcador de masa molecular.

3.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *P. andrieuxii*

Para la caracterización de los cultivos de raíces transformadas previamente establecidas utilizadas en este trabajo, se establecieron curvas de crecimiento de 45 días para las cuatro líneas de *P. andrieuxii* (B, C, D, M) considerando diferentes parámetros de crecimiento, incluyendo el peso fresco el peso seco y la conductividad del medio de cultivo para cada una, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos. La **figura 3.6** muestra un esquema general de una curva de crecimiento empleada para caracterizar cada una de las líneas con las que se trabajó.

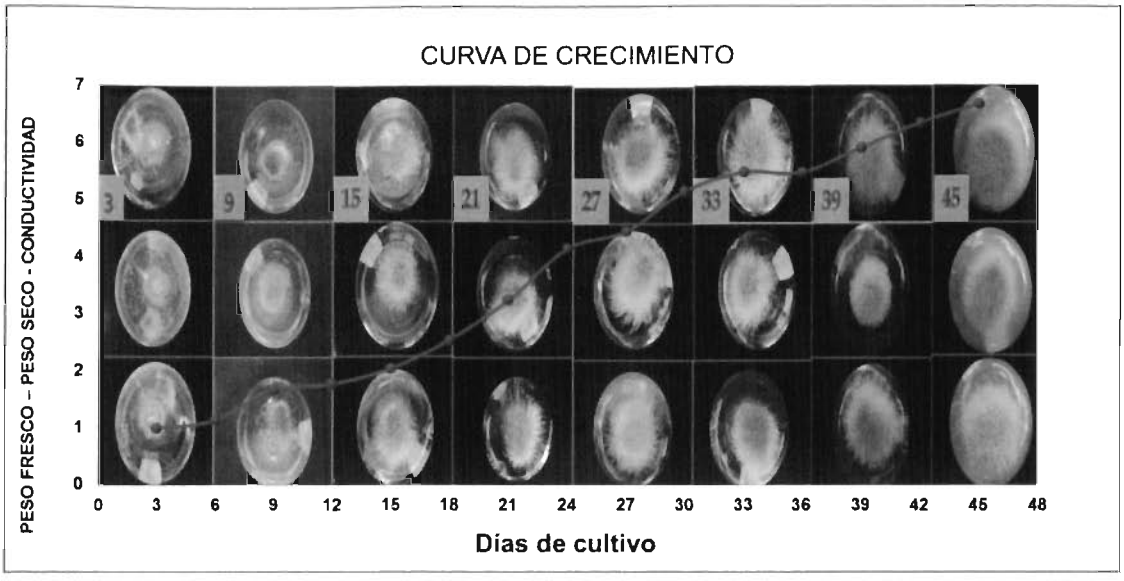


Figura 3.6. Esquema general de la curva de crecimiento establecida para cada línea de raíces transformadas de *P. andrieuxii*. Se indican los parámetros evaluados peso fresco, peso seco y conductividad (Eje de las Y) a través de los diferentes días de cultivo 0-45 días (eje de las X).

Se construyeron tablas correspondientes para cada uno de los parámetros medidos y para cada una de las líneas caracterizadas (ver sección apéndices). En la **figura 3.7** se muestran las gráficas correspondientes al peso fresco **(inciso A)**, peso seco **(inciso B)** y conductividad del medio de cultivo **(inciso C)**, para las diferentes líneas de raíces transformadas bajo estudio. Se puede observar que a partir del día 30, tres de las cuatro líneas caracterizadas (líneas B, C, M) alcanzaron su máximo crecimiento, mientras que la línea D alcanzó su fase estacionaria hasta el día 45. También se observa un punto de convergencia en la producción de biomasa entre las cuatro líneas a los días 33, 36 y 39.

Por su parte, la conductividad eléctrica del medio de cultivo es definida como la capacidad del agua para conducir la electricidad. Esta corriente eléctrica es transportada por los iones en solución y por lo tanto, el aumento de la concentración de iones provoca un aumento en la conductividad (Crites & Tchobanoglous, 2000). De tal manera, la disminución de la conductividad eléctrica a lo largo de los días de cultivo, representa el aprovechamiento de los iones disueltos en el medio (Phillips & Collins, 1979), lo cual, queda evidenciado en la gráfica de la **figura 3.7: inciso C** donde se puede ver la disminución de los valores de este parámetro en función del tiempo de cultivo de la curva de crecimiento.

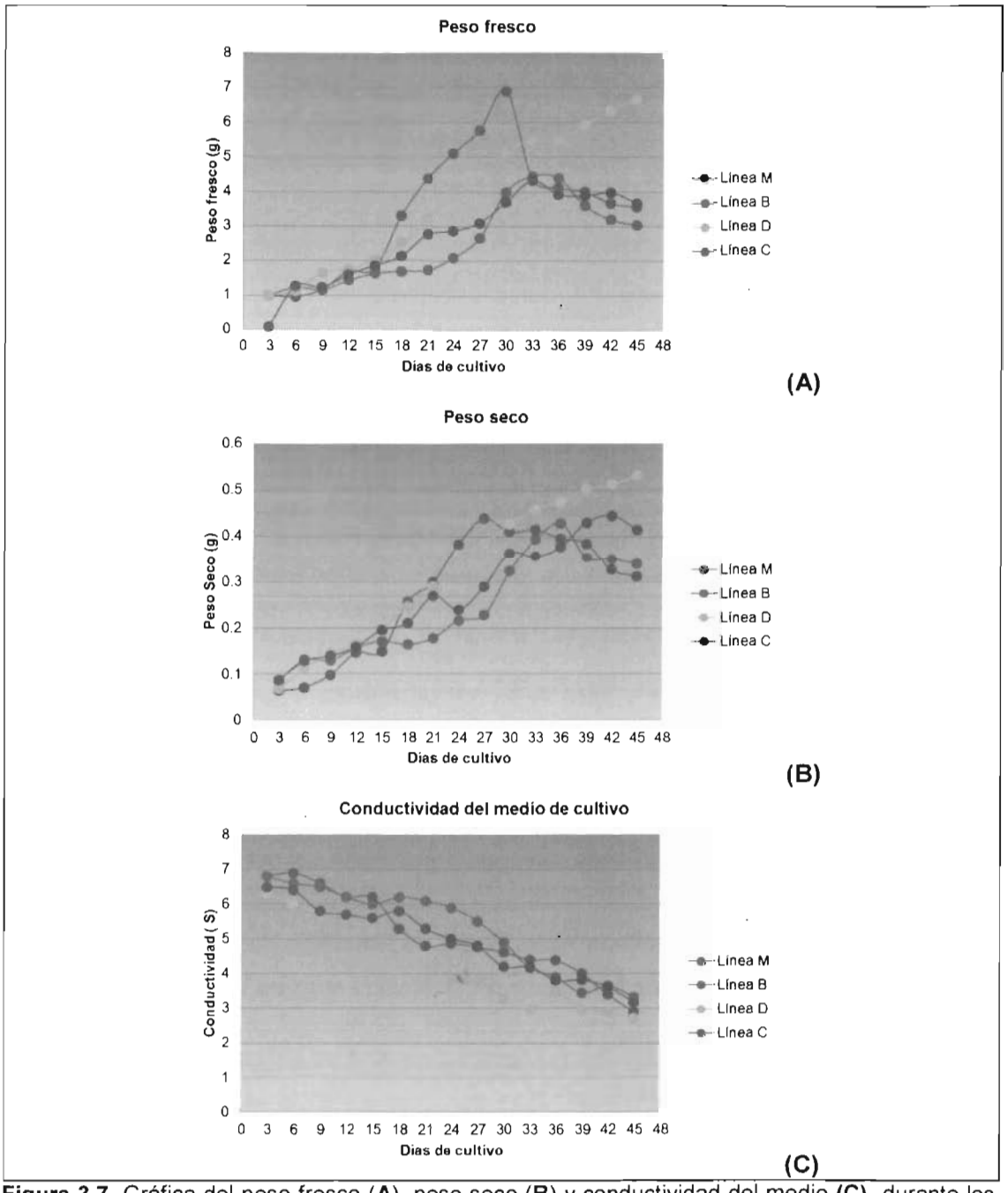


Figura 3.7. Gráfica del peso fresco (**A**), peso seco (**B**) y conductividad del medio **(C)** durante los diferentes días de cultivo (3-45 días) de las cuatro líneas de raíces de *P. andrieuxii* bajo estudio (B, C, D, M).

Con estas observaciones, la línea D, que presentó un crecimiento continuo durante los 45 días de cultivo y la mayor producción de biomasa con respecto a las otras líneas (índice de crecimiento: 5.66%) se seleccionó como candidato para la determinación cualitativa de

AB mediante análisis por CCD.

3.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Pentalinon andrieuxii* POR CCD

La presencia de AB se evaluó por CCD tanto para las muestras de raíces de la línea D, como para los medios de cultivo correspondientes, en relación a una referencia de 3µg (**Figura 3.8**). Como puede observarse en la **figura 3.8**, las raíces alcanzaron niveles comparables a la referencia a partir del día 30 de cultivo (muestra 10) las cuales revelaron la presencia de una banda con un valor de Rf de 0.55, que coincidió con la referencia de AB, mientras que el AB fue excretado al medio de cultivo en bajas cantidades. Se debe resaltar que entre los días 33 y 36, de acuerdo a la curva de crecimiento, se inicia una fase estacionaria de crecimiento.

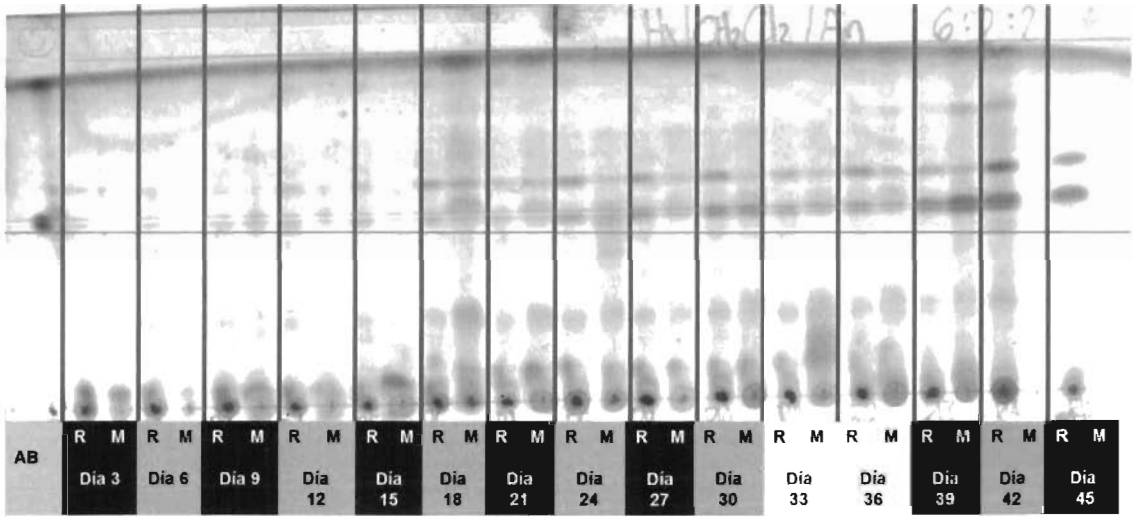


Figura 3.8. Perfil cromatográfico por CCD de las fracciones de polaridad media de raíces **(R)** y medios **(M)** de la curva de crecimiento de la línea D. Sistema de elución: Hx/CH_2Cl_2/An 6:2:2. Referencia: AB – sigma.

Considerando estas observaciones, para comparar la acumulación de AB en las cuatro líneas bajo estudio, se realizó CCD con muestras de los días 33 y 36 del ciclo de cultivo de las curvas de crecimiento correspondientes (**Figura 3.9**). La presencia de AB se detectó tanto en las raíces como en los medios de cultivo de las cuatro líneas. Con base en el resultado de este experimento, se estableció el día 30 de cultivo como un punto adecuado para evaluar el efecto de los elicitores en la biosíntesis de AB.

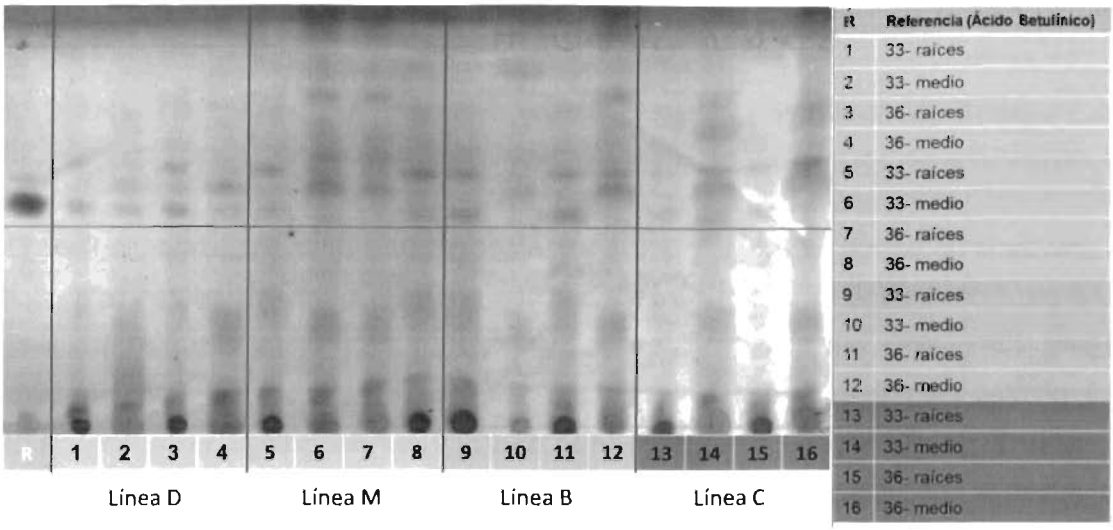


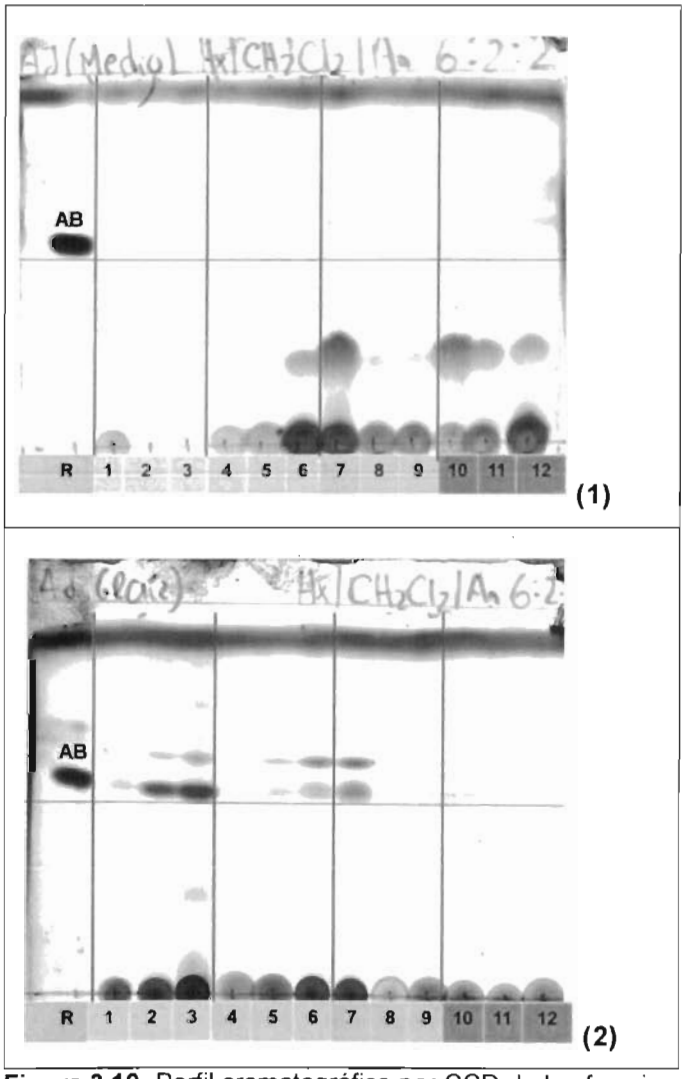
Figura 3.9. Perfil cromatográfico por CCD de los extractos de polaridad media de raíces y medios de los días 33 y 36 de cultivo de las cuatro líneas bajo estudio.R: referencia ácido betulínico; 1: día 33 – raíz; 2: día 33 – medio; 3: día 36 – raíz; 4: día 36 – medio; 5: día 33 – raíz; 6: día 33 – medio; 7: día 36 – raíz; 8: día 36 – medio; 9: día 33 – raíz; 10: día 33 – medio; 11: día 36 – raíz; 12: día 36 – medio; 13: día 33 – raíz; 14: día 33 – medio; 15: día 36 – raíz; 16: día 36 – medio. Sistema de elución: Hx/CH2Cl2/An 6:2:2. Referencia: AB – Sigma.

3.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ELICITORES: ÁCIDO JASMÓNICO Y SULFATO DE VANADILO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO

La elicitación de la síntesis de AB empleando ácido jasmónico (AJ) y sulfato de vanadilo ($VOSO_4$) se realizó siguiendo un curso temporal de 24h (día 31), 48h (día 32) y 72h (día 33) de cosecha post-elicitación, empleando como tratamientos concentraciones de 100, 200 y 400 µM de cada elicitor en la línea D. Cabe señalar, que fenotípicamente, la exposición de las raíces transformadas a los tratamientos con los elicitores utilizados se observó diferente al de las raíces testigo. El aspecto de las raíces elicitadas fue de un color oscuro, con tejido notablemente afectado especialmente en los tratamientos de mayor tiempo de exposición (72h) y con una dosis elevada (400mM). El tratamiento de extracción de AB fue llevado a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos.

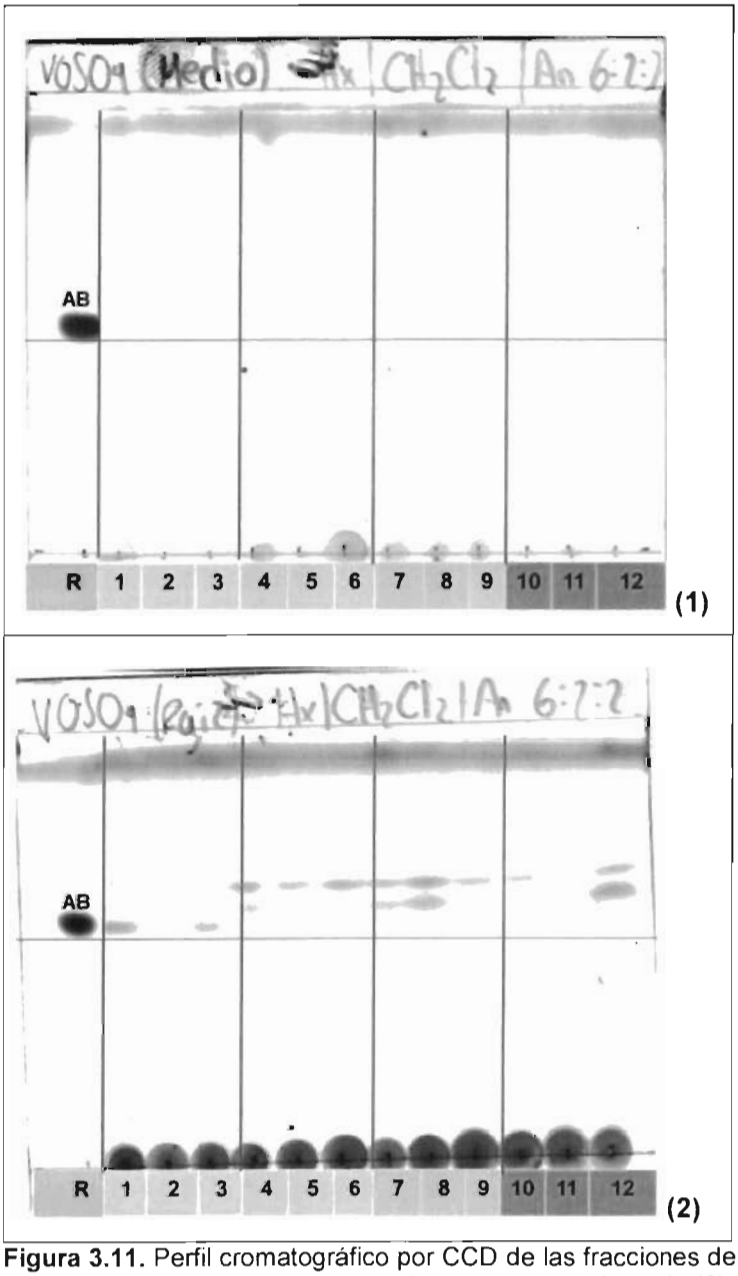
La CCD reveló que la acumulación de AB en este experimento de elicitación fue mayor en las muestras de raíz en respuesta a AJ (**Figura 3.10 inciso 2**), en todas las condiciones analizadas (concentración del elicitor y tiempo de cosecha); si bien la acumulación es claramente menor a la alcanzada en las condiciones control. En estas

condiciones, la presencia de AB tampoco fue detectada en las muestras de raíz en respuesta al $VOSO_4$ (**Figura 3.11 inciso 2**), ni en los medios de ambos tratamientos (**Figura 3.12 inciso 1**) y (**Figura 3.12 inciso 1**). Por otra parte, se observó la aparición de otro compuesto en el perfil cromatográfico en una Rf de 0.6 y ante esta situación, se planteó buscar un sistema de elución que permitiera una mejor separación de los compuestos de las muestras del ensayo de elicitación con la finalidad de comprobar la presencia de AB y con ello, no se confundiera con las bandas que aparecían en una Rf mayor al de la referencia.



R	Referencia (Ácido Betulínico)
1	AJ (24h) 0µM
2	AJ (48h) 0µM
3	AJ (72h) 0µM
4	AJ (24h) 100µM
5	AJ (48h) 100µM
6	AJ (72h) 100µM
7	AJ (24h) 200µM
8	AJ (48h) 200µM
9	AJ (72h) 200µM
10	AJ (24h) 400µM
11	AJ (48h) 400µM
12	AJ (72h) 400µM

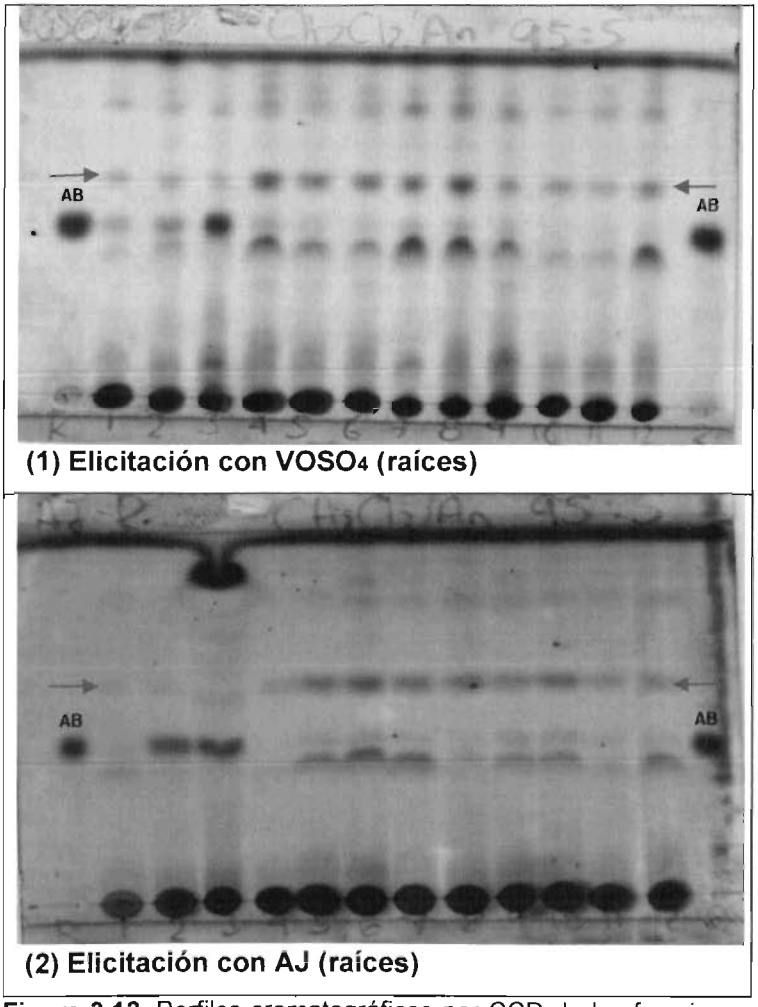
Figura 3.10. Perfil cromatográfico por CCD de las fracciones de polaridad media pertenecientes al tratamiento con AJ de los medios de cultivo **(1)** y raíces **(2)** de la línea D. Sistema de elución: $Hx/CH_2Cl_2/An$ 6:2:2. Referencia: AB – Sigma.



R	Referencia (Ácido Betulínico)
1	$VOSO_4$ (24h) 0µM
2	$VOSO_4$ (48h) 0µM
3	$VOSO_4$ (72h) 0µM
4	$VOSO_4$ (24h) 100µM
5	$VOSO_4$ (48h) 100µM
6	$VOSO_4$ (72h) 100µM
7	$VOSO_4$ (24h) 200µM
8	$VOSO_4$ (48h) 200µM
9	$VOSO_4$ (72h) 200µM
10	$VOSO_4$ (24h) 400µM
11	$VOSO_4$ (48h) 400µM
12	$VOSO_4$ (72h) 400µM

Figura 3.11. Perfil cromatográfico por CCD de las fracciones de polaridad media pertenecientes al tratamiento con $VOSO_4$ de los medios de cultivo **(1)** y raíz **(2)** de la línea D. Sistema de elución: Hx/CH2Cl2/An 6:2:2. Referencia: AB – Sigma.

Observado lo anterior, y con la finalidad de confirmar la presencia de AB antes de su cuantificación, se usó el sistema de elución CH_2Cl_2/An (Diclorometano / acetona 95:5) para las muestras de raíz con ambos tratamiento. Este sistema permitió una mejor separación de los compuestos y con ello una visualización del efecto en la biosíntesis de AB sobre los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las raíces transformadas. El resultado se muestra en la **figura 3.12,** en la que se puede observar una mayor presencia de AB en las muestras testigo con respecto a las muestras de los tratamientos para ambos elicitores. Un dato interesante fue reafirmar la aparición de bandas más intensas con una Rf de 0.82 (señalados en la figura con una flecha roja) en ambos tratamientos, que no se apreciaron de la misma forma en las muestras de los testigos.



R	Referencia (AB)
1	(24h) 0µM
2	(48h) 0µM
3	(72h) 0µM
4	(24h) 100µM
5	(48h) 100µM
6	(72h) 100µM
7	(24h) 200µM
8	(48h) 200µM
9	(72h) 200µM
10	(24h) 400µM
11	(48h) 400µM
12	(72h) 400µM
R	Referencia (AB)

Figura 3.12. Perfiles cromatográficos por CCD de las fracciones de polaridad media comparando los tratamientos con AJ **(1)** y $VOSO_4$ **(1)** en muestras de raíces de la línea D. Sistema de elución: Hx/CH_2Cl_2/An 95:5.

El análisis de HPLC de los extractos de raíces sometidas a los tratamientos de elicitación se realizó empleando un sistema isocrático de acetonitrilo 100% por 10 min con un flujo de 1 ml/min utilizando una columna Water 250*4.5 mm (5 micrometros). La detección se hizo por UV, fijando lectura de detección a 210 nm y como referencia se empleó una solución de 1mg/ml del estándar comercial de ácido betulínico (**Figura 3.13**). Este presentó un tiempo de retención de 6.77 min. A partir de esto se preparó una curva de calibración de AB cubriendo un rango entre 0.003 y 0.2 µg (**Figura 3.14**).

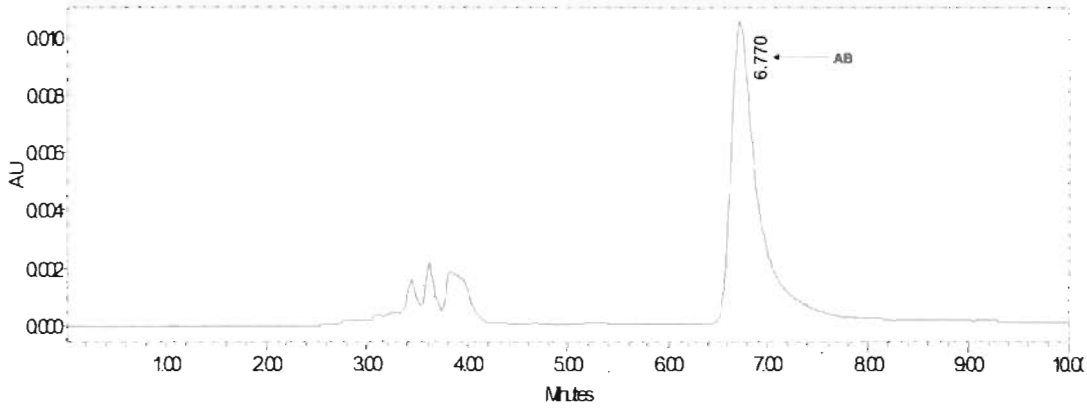


Figura 3.13. Perfil cromatográfico por HPLC del estándar de ácido betulínico (Sigma) a una concentración de 1mg/mL de disolvente.

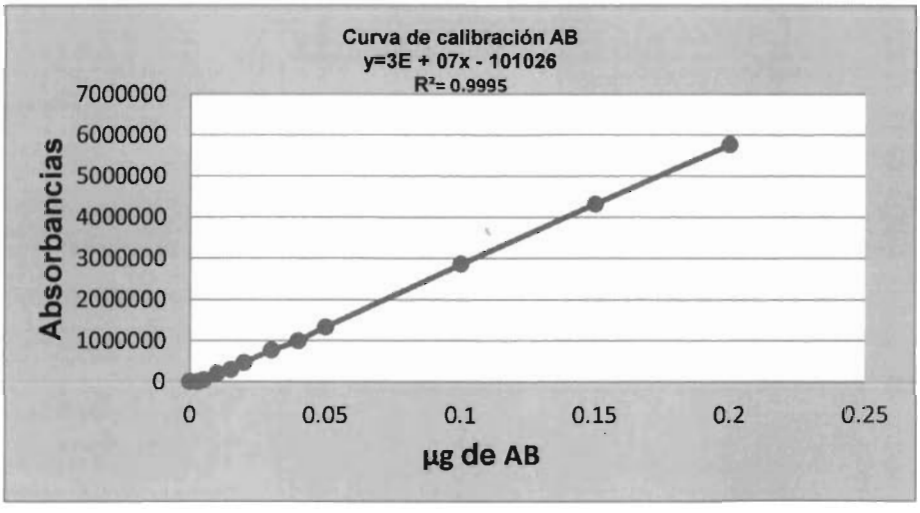


Figura 3.14. Curva de calibración de ácido betulínico (AB). Se muestran los datos de la ecuación de la recta correspondiente.

Los cromatogramas obtenidos de las muestras del experimento de elicitación con $VOSO_4$ y AJ mostraron picos a tiempos de 6.8 min que de acuerdo al cromatograma obtenido con el estándar comercial (Sigma - 855057), corresponden al AB. Además, se presentaron otros picos significativos cercanos al de AB, que muy probablemente revela la presencia de compuestos, también observados en los análisis por CCD. Las **figuras 3.15** y **3.16** muestran dos cromatogramas correspondientes a las muestras del experimento de elicitación con $VOSO_4$ y AJ, respectivamente.

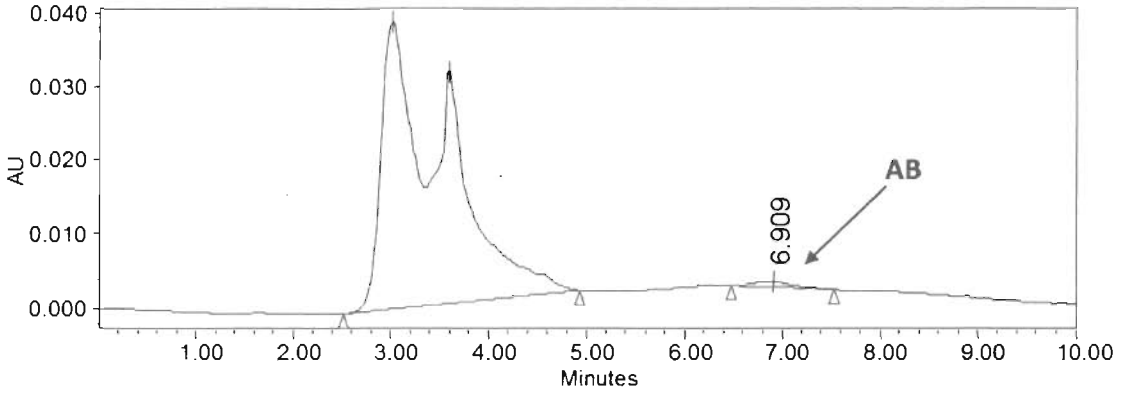


Figura 3.15. Perfil cromatográfico por HPLC de extractos de raíces expuestas a 100µM de $VOSO_4$ por 24h; a una concentración de 1mg/ml de muestra.

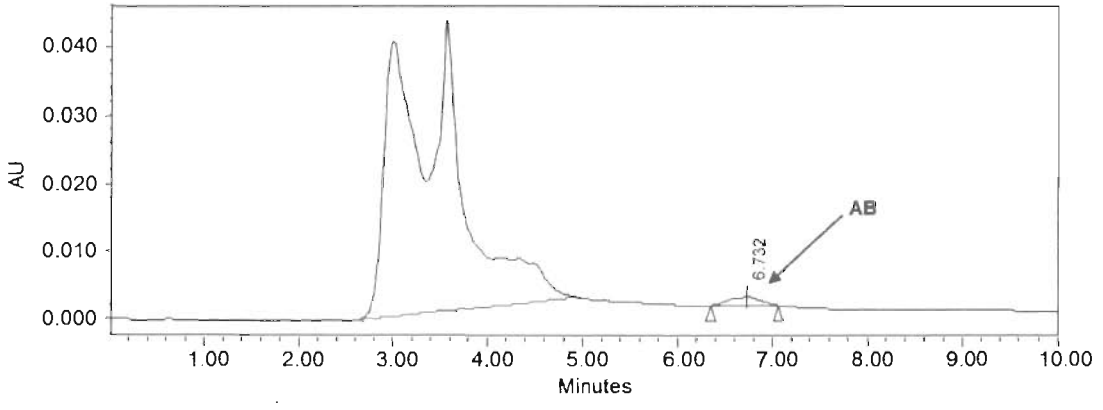


Figura 3.16. Perfil cromatográfico por HPLC de extractos de raíces expuestas a 200µM de AJ por 24h; a una concentración de 1mg/ml de muestra.

En las **figuras 3.17 y 3.18** presentan las gráficas del resultado de la cuantificación de AB; mostrando el tiempo de tratamiento (eje de las X) contra la concentración (eje de las Y) como resultado de la elicitación con AJ y $VOSO_4$, respectivamente. En ambos casos, se observa un aumento progresivo sólo para los tratamientos testigo (barras azules), sugiriendo que estos compuestos, o las condiciones de su aplicación, no tienen ningún efecto sobre la producción de AB en este sistema modelo.

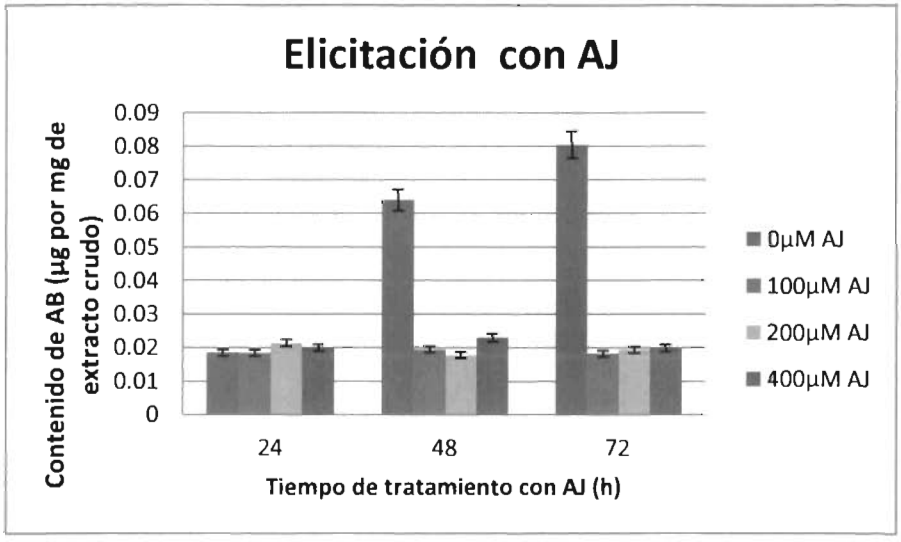
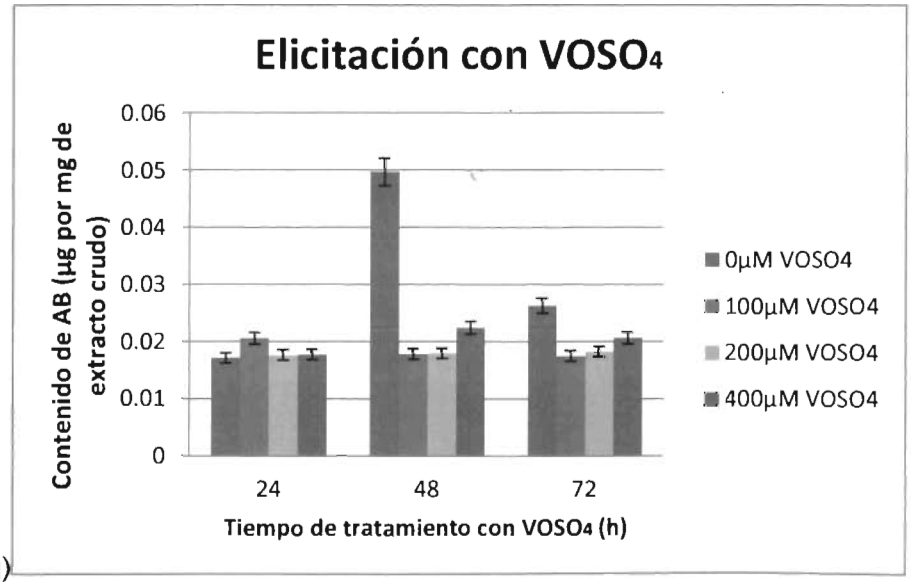


Figura 3.17. Gráfica del resultado de la cuantificación por HPLC de AB para el tratamiento con AJ.



g)

Figura 3.18. Gráfica del resultado de la cuantificación por HPLC de AB para el tratamiento con $VOSO_4$.

3.4. DISCUSIÓN

Dentro de los trabajos reportados respecto a la producción de ácido betulínico en modelos *in vitro*, se tienen el uso de biotransformación con hongos y bacterias (Chen *et al.*, 2009; Chatterjee *et al.*, 2000); la biotransformación fúngica a partir de 100g de corteza pulverizada de *Platanus orientalis* arrojó datos de cuantificación de 0.69 g de AB (Bastos *et al.*, 2007); por Zhang *et al.*, (2005) alcanzando 21% de AB a partir de 200mg de extracto crudo empleando biotransformación con *Nocarida sp.*; la determinación en extracto de corteza de abedul blanco (1.86% de 20g de extracto crudo) (Zhao *et al.*, 2007) y un método de síntesis (Csuk *et al.*, 2006). En cultivo de suspensiones celulares de *Lantana camara* L. se ha reportado la acumulación de triterpenos pentacíclicos (entre ellos AB) alcanzando valores de 3.1% de AB a partir de 50g de masa celular (Srivastava *et al.*, 2010); adicionalmente Fan *et al.*, (2013) evaluaron el efecto de elicitores fúngicos (*Phomopsis sp*) en cultivos de *Betula platyphylla* para la producción de triterpenos desde un enfoque molecular haciendo cuantificaciones por PCR cuantitativo.

Con sistemas similares, Hayashi *et al.*, (1988) realizaron un trabajo donde a partir de 73g de callos (provenientes de raíz, tallo y hoja) y suspensiones celulares de *Glycyrrhiza glabra* no encontraron cantidades detectables de glicirrina, el mayor triterpeno tipo oleanano en raíz encontrado en la especie; sin embargo, AB fue detectado en callos generados a partir de raíz, (0.01-0.1 mg); también Ikuta *et al.*, (1995) aislaron AB a partir de cultivo de callo de *Paeonia japonica*, *P. lactiflora* y *P. suffruticosa*.

Los trabajos publicados al respecto de la producción de AB en cultivos de raíces transformadas son escasos. En raíces transformadas de *Cassia obtusifolia* se identificaron siete antraquinonas, junto con ácido betulínico, estigmasterol y sitosterol (Guo *et al.*, 1998). La identificación de estos compuestos fue por métodos espectroscópicos y no se reportó su cuantificación.

De acuerdo al marco bibliográfico resumido, el cultivo de raíces transformadas de *P. andrieuxii* en sentido estricto representa el primer trabajo enfocado para la producción de ácido betulínico en este tipo de sistema, lográndose una acumulación en el rango 0.001-0.002 mg por seco. Ciertamente las raíces transformadas no respondieron a la elicitación con AJ y $VOSO_4$ para impactar la producción de AB, pero de acuerdo a los análisis por

CCD, si mostraron un patrón de producción de otros metabolitos (**Figura 3.12**) cuya naturaleza química actualmente se desconoce.

De acuerdo a la hipótesis planteada para este trabajo, está resultó rechazada de acuerdo a los resultados obtenidos derivados de los ensayos experimentales, pues el AB no aumentó en los cultivo de raíces transformadas de *P. andrieuxii.* tras haber sido sometidos a tratamientos con los elicitores AJ y sulfato de vanadilo.

Tratando de entender la limitada respuesta de los elicitores probados sobre la producción de AB en las raíces transformadas de *P. andrieuxii*, se puede mencionar que el efecto de un elicitor en el rendimiento de un metabolito secundario depende de la dosis, el tiempo de exposición y la edad del cultivo. Para elicitores de origen biótico, las dosis efectivas se encuentran en el rango de los 50 – 300 μg/mL, mientras que para compuestos e elicitores abióticos, las dosis adecuadas son normalmente expresadas en unidades molares, variando el rango de μM a mM (Wang, *et al.,* 2013). Sin embargo, en la mayoría de los estudios las dosis de elicitor aplicadas han sido escogidas de manera empírica o mediante ensayos prueba y error debido parcialmente a la naturaleza cruda y químicamente indefinida de la mayoría de las preparaciones de elicitores. En todo caso, los resultados del presente trabajo, indican que las concentraciones ensayadas (100, 200 y 400 μM), no fueron las adecuadas para estimular un aumento de AB en las raíces transformadas de *P. andrieuxii*, ya que no tuvieron el efecto esperado y claramente difieren de lo reportado por Sivakumar *et al.* 2005 (ácido jasmónico) y Bhagwath y Hjortsø, 1990 (sulfato de vanadilo), que obtuvieron incrementos de 4 y 8 veces, sobre la producción de ginsenósidos y tiarubrina A, respectivamente.

Otro factor importante de considerar para la producción de metabolitos en raíces transformadas es el tiempo o la edad del cultivo para la aplicación del tratamiento de elicitación (Ahmed y Baig, 2014). La elicitación en la fase exponencial, particularmente al final de esta e inicio de la estacionaria es generalmente más favorable, mientras que la elicitación demasiado temprana (fase de adaptación) parece detener el crecimiento de la biomasa y demasiado tardía (durante la fase estacionaria) no permite suficiente tiempo de contacto (Wang, *et al.,* 2013).

A este respecto, Condori *et al.* (2010) mostraron que la producción del resveratrol y sus análogos prenilados: araquidina-1 y araquidina-3 en un medio de cultivo de raíces transformadas de maní elicitadas con acetato de sodio fue altamente dependiente de la etapa de desarrollo, lográndose los rendimientos más altos con la aplicación del elicitor durante el crecimiento exponencial. Del mismo modo, la producción de artemisinina en cultivos de raíces pilosas de *A. annua* estimuladas por un elicitor fúngico fue más significativo en la fase exponencial que en la fase estacionaria (Wang *et al.,* 2001). En contraste, la producción más alta de un ginsenósido en cultivos de raíces transformadas de *P. ginseng* se obtuvo cuando se aplicó MeJA en la fase estacionaria (Palazón *et al.,* 2003). Con lo anterior se establece la posibilidad de que las células vegetales sean más propensas a activar las vías metabólicas asociadas con la producción y excreción de metabolitos en ciertas etapas de desarrollo (Shilpa *et al.,* 2010). Para el caso de las raíces de *P. andrieuxii,* el día 30 de cultivo establecido para los experimentos de elicitación realizados corresponde, de acuerdo a la curvas de crecimiento de las líneas empleadas, al inicio de la fase estacionaria. De tal manera, queda abierta la posibilidad de que aplicaciones de los elicitores durante la fase exponencial pueda mejorar su efecto en la producción de AB.

En plantas, el AJ y sus derivados son considerados para afectar una parte de la vía de transducción de señales que induce algunas enzimas que catalizan reacciones bioquímicas involucradas en la síntesis de compuestos de defensa de bajo peso molecular, como los polifenoles, alcaloides, quinonas, terpenos y polipéptidos (William *et al.,* 1996; Mizukami *et al.,* 1993).

Aunque hay varios reportes de éxito en inducir o mejorar la producción de metabolitos secundarios utilizando como elicitor miembros de la familia de los jasmonatos. En este trabajo, como ya se mencionó la utilización de este tipo de compuestos no impactó la producción de AB, de la manera esperada. Algunos ejemplos del uso exitoso de este acercamiento incluyen la producción de taxol por *Taxus baccata* (Khosrousshahi *et al.,* 2006), la de α-tocoferol en suspensiones celulares de *Helianthus annuus* L (Gala *et al.,* 2005) y la de ácido oleanólico en suspensiones celulares de *Caléndula officinalis* (Wiktorowska *et al.*, 2010), entre otros.

Interesantemente, también se ha reportado la inhibición de una ruta metabólica por la

aplicación de elicitores. Tal es el caso del empleo de extracto de levadura como elicitor de la síntesis de fenilpropanoides en cultivos celulares de *Vainilla planifolia* que no impactó la producción de estos metabolitos secundarios. Sin embargo, la aplicación de este mismo elicitor a cultivos de *Thalictrum rugosum* resultó excelente para aumentar la producción de alcaloides (Funk y Brodelius, 1990). De tal manera, es posible que el AJ particularmente haya reprimido la formación de ácido betulínico en los cultivos de raíces transformadas de *P. andrieuxii*.

El uso de sulfato de vanadilo ha resultado muy eficaz para mejorar la producción de paclitaxel (taxol), 10-desacetilbaccatina y de ácido rosmarínico, en diferentes cultivos de células vegetales de *Taxus x media var. Hicksii* Rehd (Georgiev *et al.*, 2006; Furmanowa *et al.*, 2000). En cultivos de raíces pilosas de *Ambrosia artemisiifolia*, con su aplicación (50 mg/L durante 72 h), se obtuvo un aumento de ocho veces en la producción de tiarubrina A (569 µg/g DW) en cultivos de 16 días (Bhagwath y Hjortsø, 2000). Por otro parte, también se sabe que el $VOSO_4$ tiene efectos tóxicos en altas concentraciones, así que este podría ser el caso del porque la elicitación a la que fueron sometidas las raíces transformadas en este trabajo, no tuvo efectos sobre la producción de AB.

En conclusión, indudablemente los elicitores son factores que pueden actuar como un interruptor para aumentar el rendimiento de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales, sin embargo, no hay forma confiable de predecir que un elicitor resulte efectivo para aumentar la acumulación de metabolitos en un sistema celular específico (Ahmed y Baig, 2014). De cualquier manera, al demostrar que el sistema de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* es útil para la producción de AB a escala de matraz, se abren perspectivas interesantes para intentar aumentar su producción, ya sea optimizando las condiciones para su cultivo *in vitro* o buscando otros elicitores y/o condiciones de aplicación que mejoren su producción.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, S.A. & M.M.V. Baig (2014). Biotic Elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. Saudi Journal of Biological Sciences (In Press).

Bastos, D.Z., I.C. de Jesús, D.A. Pimentel, & B.H. de Oliveira (2007). Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. Phytochemistry 68 (6), 834-839.

Bhagwath, S.G. & M.A. Hjortsø (2000). Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. J Biotechnol 80, 159 – 16.

Chatterjee, P., S.A. Kouzi, J.M. Pezzuto & M.T. Hamann (2000). Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. Applied and Environmental Microbiology 66 (9), 3850-3855.

Chen, Q.H., J. Liu, H.F. Zhang, G.Q. He & M.L. Fu (2009). The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi. Enzyme Microb Technol 45 (3), 175-180.

Condori, J., G. Sivakumar, J. Hubstenberger, M.C. Dolan, V.S. Sobolev & F. Medina-Bolívar (2010). Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: effects of culture medium and growth stage. Plant Physiol Biochem 48, 310–318.

Csuk, R., K. Schmuck & R. Schäfer (2006). A practical synthesis of betulinic acid. Tetrahedron Letters 47 (49), 8769-8770.

Fan, G., Q. Zhai, X. Li, & Y. Zhan (2013). Compounds of *Betula platyphylla* cell suspension cultures in response to fungal elicitor. Biotechnology & Biotechnological Equipment 27 (1), 3569-3572.

Furmanowa, M. & K. Syklowska-Baranek, (2000). Hairy root cultures of *Taxus x media var. Hicksii* Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III. Biotechnology Letters *22* (8), 683-686.

Georgiev, M.I., A.I. Pavlov & T. Bley (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. Appl Microbial Biotechnol 74 (6), 1175-85.

Guo, H., Z. Chang, R. Yang, D. Guo y J. Zheng (1998). Anthraquinones from hairy root cultures of *Cassia obtusifolia*. Phytochemistry 49 (6), 1623-1625.

Hayashi, H., H. Fukui & M. Tabata (1988). Examination of triterpenoids produced by callus and cell suspension cultures of *Glycyrrhiza glabra*. Plant Cell Reports 7 (7), 508-511.

Ikuta, A., K. Kamiya, T. Satake & Y. Saiki (1995). Triterpenoids from callus tissue cultures of *Paeonia* species. Phytochemistry 38 (5), 1203-1207.

Palazón J., R.M. Cusidó, M. Bonfill, A. Mallol, E. Moyano, C. Morales & M.T. Piñol (2003). Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. Plant Physiol Biochem 41, 1019–1025.

Shilpa K., K. Varun & B.S. Lakshmi (2010). An alternate method of natural drug production: eliciting plant secondary metabolite using plant cell culture. J Plant Sci 5, 222–247.

Srivastava, P., N. Kasoju, U. Bora & R. Chaturvedi (2010). Accumulation of betulinic, oleanolic, and ursolic acids in *in vitro* cell cultures of *Lantana camara* L. and their significant cytotoxic effects on HeLa cell lines. Biotechnology and Bioprocess Engineering 15 (6), 1038-1046.

Wang, J.W., Z. Zhang & R.X. Tan (2001). Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum sp.* Biotechnol Lett 23, 857–86.

Wang, J.W. & J.Y. Wu (2013). Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. In: Biotechnology of Hairy Root Systems. Springer Berlin Heidelberg. pp: 55-89.

Zhang, J., Z.H. Cheng, B.Y. Yu, G.A. Cordell & S.X. Qiu (2005). Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia sp.* NRRL 5646. Tetrahedron Letters 46 (13), 2337-2340.

Zhao, G., W. Yan & D. Cao (2007). Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43 (3), 959-962.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1. CONCLUSIONES.

Durante el desarrollo del presente trabajo se logró como objetivo general el establecer cultivos de raíces transformadas de *P. andrieuxii* a partir de hojas y con ellas, evaluar en escala de matraz el efecto de elicitores químicos (ácido jasmónico y sulfato de vanadilo) sobre la producción de ácido betulínico. Además de conseguir los siguientes objetivos:

- Se logró la inducción de raíces transformadas a partir de tres explantes (hoja, tallo y raíz) de plántulas germinadas *in vitro* de *Pentalinon andrieuxii* vía transformación con *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834). Derivado de este proceso, se cuenta con nuevas líneas de raíces transformadas a partir de hoja y tallo, mismas que aún faltan de ser caracterizadas.

- Se confirmó la naturaleza transgénica de las raíces referidas mediante la amplificación por PCR del gen *rol*A (248pb), a partir del ADN genómico de las cuatro líneas de raíces independientes (B, C, D, M) utilizadas en este trabajo extraído por el método de Dellaporta, 1983.

- Se evaluó el comportamiento de las líneas B, C, D y M de raíces transformadas obtenidas a partir de hojas estableciendo curvas de crecimiento en un periodo de 45 días con intervalos de muestreo de tres días, a través de la cuantificación de la producción de biomasa (peso fresco – peso seco) y conductividad del medio de cultivo. Las cuatro líneas bajo estudio a los 30 días en cultivo mostraron una producción de biomasa similar, siendo la línea D la más eficiente.

- Se realizó la determinación cualitativa y cuantitativa de AB por métodos Cromatográficos CCD y HPLC, respectivamente. Con respecto a una referencia comercial (Sigma). la CCD reveló la presencia de AB en todas las muestras de raíces y muestras de medios de cultivo, a través de la presencia de una banda con una Rf del mismo valor (0.55) que el estándar de referencia.

- Sobre la línea D al día 30 de crecimiento, se evaluó el efecto de dos elicitores químicos (ácido jasmónico y sulfato de vanadilo) en dosis de 100, 200 y 400µM en un

curso temporal de 72h post elicitación. Estos tratamientos no afectaron positivamente la producción de AB en las condiciones ensayadas. Aparentemente estarían funcionando como represores en su biosíntesis, o bien, elicitando otros compuestos cuya naturaleza se desconoce, que bien pudieran modificar la acumulación de AB.

Así, la conclusión general es que el modelo de raíces transformadas de *P. andrieuxii* es un sistema de cultivo *in vitro* eficiente para la producción de AB, abriendo un panorama tanto para evaluar la naturaleza de los otros metabolitos que se producen en las diferentes líneas utilizadas en este trabajo, como probar el efecto de otros elicitores sobre la producción de AB. Los elicitores fueron funcionales no para el caso de AB, pero si para aquellos compuestos observados en la CCD, que representaron una competencia para este.

La obtención de metabolitos secundarios mediante la utilización del cultivo de células constituye un área emergente y de gran potencial de crecimiento ya que representa una alternativa a los procesos extractivos a partir de la materia prima vegetal y de síntesis química convencional. En este sentido, el cultivo *in vitro* de células vegetales ha abierto nuevos caminos como fuente renovable de compuestos bioactivos de gran valor añadido (DiCosmo & Misawa, 1995), debido a las ventajas que presenta su utilización ya que estos cultivos son independientes de factores geográficos, estacionales y ambientales. Estos cultivos constituyen sistemas de producción estables ya que aseguran la obtención continua de compuestos con calidad y productividad uniformes y los requerimientos de espacio para el desarrollo de la producción son reducidos. Por lo tanto, la optimización de la producción a través del uso de diferentes estrategias que se han desarrollado durante años de investigación, aunado al cultivo de órganos en biorreactores y uso de elicitores y precursores, por mencionar algunas de las de mayor importancia, permitirá una reducción en el tiempo requerido para lograr una producción eficiente de diferentes productos con aplicación comercial a bajos costos existiendo también existe la posibilidad de obtener productos nuevos que no son sintetizados por las plantas de forma natural (Ramachandra & Ravishankar, 2002).

4.2. PERSPECTIVAS.

La experiencia obtenida durante el desarrollo del presente trabajo abre una gran perspectiva de investigación enfocada a optimizar producción de ácido betulínico a partir de cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* a escala de matraz.

Aunque los elicitores usados no afectaron positivamente la producción de ácido betulínico en las condiciones ensayadas, se pueden modificar algunas condiciones como por ejemplo: se sugiere reducir el tiempo de exposición de las raíces transformadas al uso de estos, así como probar etapas tempranas en la curva de crecimiento para su aplicación.

Determinar la naturaleza química de los metabolitos acumulados en respuesta a los tratamientos de elicitores en el sistema de raíces transformadas de *P. andrieuxii.* Alguno de ellos podría pertenecer a un grupo de importancia biológica dentro de los metabolitos secundarios o se tiene está relacionado biogénicamente con AB.

Llevar a cabo la cinética de crecimiento en las nuevas líneas de raíces transformadas a partir de hoja y tallo obtenidas de la transformación genética realizada en este trabajo, con el fin de enriquecer el catálogo de líneas bien establecidas disponibles para futuros ensayos.

Determinar la presencia de AB en estas raíces provenientes de raíz y tallo ya que su cuantificación posterior permitirá enmarcar la producción de AB en función de diferentes tejidos transformados. Aunado a esto, la cuantificación de AB en los mismos tejidos no transformados para tener una visión integral de la producción de AB en modelos *in vitro* de plántulas y en las raíces transformadas.

Optimizar la composición del medio de cultivo para el crecimiento y producción de raíces transformadas de *P. andrieuxii* para impactar favorablemente la producción de metabolitos secundarios. En este sentido, se sabe que el efecto negativo del tratamiento con elicitores sobre la producción de biomasa, puede ser resuelto mediante la suplementación de nutrientes al medio de cultivo (Wang y Wu, 2013).

Evaluar el efecto de otros elicitores bióticos o abióticos en diferentes esquemas de aplicación en cuanto a concentración y tiempo, para mejorar la producción de los

metabolitos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

DiCosmo, F., & M. Misawa (1995) Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. Biotechnol Adv 13, 425-453.

Ramachandra, R.S. & G.A. Ravishankar (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Adv 20, 101-153.

Wang, J.W. & J.Y. Wu (2013). Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. In: Biotechnology of Hairy Root Systems. Springer Berlin Heidelberg. pp: 55-89.

APÉNDICES

1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MEDIO PC

Solución	Macronutrientes	mM	mg/L	gr/500mL	mL
PC1	NH_4NO_3	12.5	1000	10	
	KNO_3	20.8	2100	21	
	KH_2PO_4	2.4	325	3.25	50 mL
	NaH_2PO_4	0.6	85	0.85	
PC1a	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.8	435	4.35	50 mL
PC1b	$CaCl \cdot 2H_2O$	4.1	600	6.00	50 mL
	Micronutrientes	mM	mg/L	gr/200 mL	mL
PC2a	KI	6.0	1	0.1	
	H_3BO_3	82	5	0.5	
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	90	15	1.5	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	17.5	5	0.5	
	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	1.7	0.4	0.04	2 mL
PC2b	$CuSO4 \cdot 5H2O$	0.4	0.1	0.01	
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.4	0.1	0.01	2 mL
	Solución Nitsch			gr/500 mL	
	Na2EDTA	100	37.3	3.73	5 mL
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	100	27.8	2.78	
PC3	Tiamina° HCl	6	2	0.4	0.5 mL
	Piridoxina° HCl	2.5	0.5	0.1	
PC4	Mio-inositol	1.4	250	10/250 mL	6.25 mL
	Sacarosa	7.8	25000	25 gr/L	
	Gelificante				
	Agar			10 gr/L	
	Gel Rite			2.3 gr/L	
	Ajustar pH 5.5				

2. CURVA DE CRECIMIENTO (peso fresco)

Día	Línea B(g)	Línea C(g)	Línea D(g)	Línea M (g)
3	1	0.96	1	1
6	1.23	1.26	1.13	0.96
9	1.16	1.23	1.66	1.16
12	1.43	1.60	1.76	1.70
15	1.63	1.86	2.03	1.76
18	1.70	2.13	2.53	3.30
21	1.73	2.76	3.23	4.36
24	2.10	2.86	4.13	5.10
27	2.66	3.10	4.43	5.76
30	4	3.70	5.13	6.90
33	4.46	4.32	5.46	4.36
36	4.40	3.92	5.46	4.10
39	3.60	3.88	5.90	4
42	3.20	3.98	6.33	3.66
45	3.03	3.67	6.66	3.56
Promedio	2.49	2.69	3.79	3.44
Varianza	1.473	1.60	3.96	3.26
Desv. Est.	1.21	1.26	1.99	1.80

3. CURVA DE CRECIMIENTO (peso seco)

Día	Línea B(g)	Línea C(g)	Línea D(g)	Línea M(g)
3	0.08	0.08	0.06	0.06
6	0.13	0.12	0.11	0.07
9	0.12	0.13	0.14	0.09
12	0.15	0.15	0.16	0.14
15	0.17	0.19	0.19	0.14
18	0.16	0.21	0.24	0.25
21	0.10	0.27	0.29	0.29
24	0.21	0.23	0.36	0.38
27	0.22	0.29	0.38	0.44
30	0.32	0.36	0.42	0.41
33	0.39	0.35	0.45	0.41
36	0.42	0.37	0.47	0.39
39	0.35	0.43	0.50	0.38
42	0.35	0.44	0.51	0.32
45	0.34	0.41	0.53	0.31
Promedio	0.24	0.27	0.32	0.27
Varianza	0.01	0.01	0.02	0.01
Desv. Est.	0.11	0.11	0.16	0.13

4. CURVA DE CRECIMIENTO (conductividad del medio de cultivo)

Día	Línea B(g)	Línea C(g)	Línea D(g)	Línea M(g)
3	6.8	6.5	6.3	6.8
6	6.6	6.4	6	6.9
9	6.5	5.8	5.77	6.6
12	6.2	5.7	5.62	6.2
15	6	5.6	5.2	6.2
18	6.2	5.8	4.76	5.3
21	6.1	5.3	4.28	4.8
24	5.9	5	3.81	4.87
27	5.5	4.8	3.84	4.76
30	4.9	4.2	3.27	4.62
33	4.17	4.2	2.98	4.4
36	3.9	3.8	3.46	4.38
39	3.44	3.82	2.96	4
42	3.64	3.62	2.91	3.4
45	3.32	3.17	2.71	2.9
Promedio	5.27	4.91	4.25	5.07
Varianza	1.57	1.12	1.57	1.51
Desv. Est.	1.25	1.05	1.25	1.23

5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO POR HPLC.

La tabla muestra los valores obtenidos a partir de la cuantificación de AB de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 2.7. (Capítulo II) para cada una de las muestras del experimento de elicitación con sus respectivos tratamientos.

Concentración (AJ)	Tiempo (h)	µg de AB por mg de muestra	Extracto total CRUDO (mg)	µg de AB por muestra de extracto CRUDO
0	24	0.018	71.1	1.317
0	48	0.064	33.3	2.132
0	72	0.080	16.7	1.344
100	24	0.018	67.4	1.245
100	48	0.019	41.1	0.799
100	72	0.018	63.8	1.165
200	24	0.021	64.6	1.382
200	48	0.017	54.9	0.978
200	72	0.019	89.6	1.741
400	24	0.020	54.6	1.095
400	48	0.023	88	2.032
400	72	0.019	78.7	1.566

Concentración (VOSO4)	Tiempo (h)	µg de AB por mg de muestra	Extracto total CRUDO (mg)	µg de AB por muestra de extracto CRUDO
0	24	0.017	86.5	1.486
0	48	0.049	40	1.988
0	72	0.026	34.8	0.916
100	24	0.020	63.4	1.309
100	48	0.017	42.1	0.752
100	72	0.017	46.9	0.822
200	24	0.017	75.8	1.341
200	48	0.017	52.6	0.945
200	72	0.018	45.8	0.836
400	24	0.017	74.7	1.328
400	48	0.022	87.5	1.965
400	72	0.020	66.4	1.374