



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
BETULÍNICO EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE
Pentalinon andrieuxii (Müll. Arg.) Hansen &
Wunderlin**

Tesis que presenta

JOSÉ ESTEBAN DE LOS SANTOS CASTILLO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México
2019

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



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **José Esteban De Los Santos Castillo** titulado “**Evaluación de la producción de ácido betulinico en raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin**” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en los laboratorios 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.



Dra. Celia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 9 de agosto de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____



Nombre: José Esteban De Los Santos Castillo

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 (**Análisis del transcriptoma relacionado con la biosíntesis de isoprenoides en *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae).** Proyecto CONACYT: **257915** bajo la dirección del Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada No. 619068.

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. Felipe Vázquez Flota por formar parte de mi comité tutorial, por todas sus aportaciones, 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 tutorial, por fomentar con cada consejo y observación puntual las ganas de enriquecer mi trabajo y el crecimiento de mi conocimiento.

A mi comité revisor (Dra. Renata Rivera Madrid, Dr. Santy Peraza Echeverria) por dedicarle parte de su tiempo en la revisión final del escrito.

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 de Química Orgánica con el primer análisis HPLC. Por su paciencia y amabilidad.

Agradezco el apoyo incondicional de la Maestra en Ciencias Margarita Aguilar Espinosa por ayudarme a desarrollar una metodología de análisis de ácido betulínico en HPLC y con ello su paciencia y conocimiento.

A mis amigos del Laboratorio No. 26 de la UBBMP: Karina, Cecilia, Marcos, Samuel, por su apoyo, compañerismo y amistad que hicieron de este aprendizaje una experiencia amena para convivir y hacer amigos.

A mis amigos del CICY, por su amistad, por tantas historias y porque hicieron de esta aventura una inolvidable experiencia.

Finalmente, a todos aquellos que manera 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.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme la oportunidad, paciencia, sabiduría y entendimiento para culminar satisfactoriamente esta etapa de mi vida profesional, gracias por poner en mi camino a personas tan valiosas que fueron parte fundamental de mi desarrollo académico.

A mis padres: José de los Santos Mateo y Guadalupe Castillo Capitán, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, siendo mi apoyo en todo momento a lo largo de mi formación personal y profesional. Gracias a ustedes estoy aquí.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	5
1. Antecedentes	6
1.1. <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin.....	6
1.1.1 Descripción botánica	6
1.1.2. Distribución geográfica.....	7
1.1.3. Usos.....	8
1.1.4. Investigaciones químicas recientes.	9
1.1.5. Investigaciones bioquímicas y moleculares recientes	9
1.2. Isoprenoides.....	11
1.2.1. La regla de isopreno	12
1.2.2. Biosíntesis.....	13
1.3. Rutas biosintéticas	14
1.3.1. Vía mevalónica	14
1.3.2. Vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato (Vía MEP).....	15
1.3.3. Triterpenos pentacíclicos.....	16
1.3.3.1 Ácido betulínico.....	19
1.4. Cultivo de tejidos vegetales.....	22
1.5. Cultivo de raíces	24
1.5.1. Raíces normales.....	24
1.5.2. Raíces transformadas o pilosa	25
1.6. Transformación genética de plantas	25
1.6.1. Transformación genética vía <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	26
1.6.2 El 'efecto de los genes <i>rol</i> ' en la producción de metabolitos secundarios	29
1.7. Elicitores.....	32
1.7.1. Modo de acción de los elicitores	38
Justificación.....	41

Hipótesis	41
Objetivo general.....	41
Objetivos específicos.....	41
Estrategia experimental.	43
CAPÍTULO II	45
Materiales y métodos	46
Material vegetal	46
Protocolo de germinación de semillas.....	46
Transformación genética.....	47
Mantenimiento de raíces transformadas	48
Extracción de DNA.....	48
Protocolo DNeasy Plant Mini KIT (QIAGEN) (a partir de tejido foliar joven).....	48
Comprobación de transformación genética por PCR	48
Amplificación del gen <i>rolC</i>	48
Caracterización del crecimiento y la producción de ácido betulínico de las líneas de raíces transformadas.	49
Curvas de crecimiento.....	49
Índice de crecimiento:.....	50
Tiempo de duplicación:	50
Preparación de elicitores.....	51
Extracción de ácido betulínico mediante las preparaciones de fracciones de polaridad media.....	51
Detección de ácido betulínico por HPLC.....	52
CAPÍTULO III	53
Resultados.....	54
Establecimiento de cultivos de raíces transformadas de <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin	54
Obtención de explantes de <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin.....	54
Proceso de infección con <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	54
Demostración de transformación genética por amplificación del gen <i>rolC</i>).....	57
Determinación de la presencia de ácido betulínico en las raíces transformadas a partir de raíz, en tres condiciones de cultivo (luz, fotoperiodo y oscuridad).....	59
Caracterización del crecimiento y la producción de ácido betulínico de las tres líneas de raíces transformadas (hoja, raíz, hipocótilo).	61

Producción de ácido betulínico	65
Efecto del uso de elicitores sobre la producción de ácido betulínico	68
CAPÍTULO IV	71
Discusión general	72
CAPÍTULO V	77
Conclusiones	78
Perspectivas	79
Referencias.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los terpenos en función del número de unidades de isopreno en su estructura.	12
Tabla 2. Plantas donde se ha identificado el ácido betulínico..	21
Tabla 3. Contenido de ácido betulínico..	22
Tabla 4. Principales características de los genes <i>Rol</i>	28
Tabla 5. Elicitores bióticos y abióticos y sus metabolitos secundarios en cultivos de raíces peludas..	34
Tabla 6. Ejemplos de producción de metabolitos secundarios (terpenoides) aumentada a través del uso de elicitores.....	36
Tabla 7. Componentes de la técnica de PCR	48
Tabla 8. Lotes de semillas germinadas de <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin.....	54
Tabla 9. Frecuencias de transformación (FT) con <i>A. rhizogenes</i> en explante de hipocótilo, hoja y raíz de <i>P. andrieuxii</i>	56
Tabla 10. Contenido de ácido betulínico en raíz transformada a partir de raíz en diferentes condiciones de cultivo	60
Tabla 11. Registro de peso fresco, en tres líneas de raíces transformadas de <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin.....	62
Tabla 12. Registro de peso seco, en tres líneas de raíces transformadas de <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin.....	63
Tabla 13 Índice de crecimiento, tasa de crecimiento específico y tiempo de duplicación de las líneas de raíces en peso fresco.....	64
Tabla 14. Índice de crecimiento, tasa de crecimiento específico y tiempo de duplicación de las líneas de raíces transformadas: LA1H, LCT y LCR en peso seco.	65
Tabla 15. Comparación de la concentración de ácido betulínico en la LCR con lo reportado por Hiebert-Giesbrecht, 2015.....	65
Tabla 16. Contenido de ácido betulínico en la planta <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin.....	66

Tabla 17. Concentración en mg de ácido betulínico/g de peso seco, en tres líneas de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin 67

Tabla 18. Promedios de producción de ácido betulínico en tres líneas de raíces transformadas a partir de hoja de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin post-elicitación (mg de ácido betulínico/g de peso seco) 70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin, cultivadas en los terrenos del CICY.....	7
Figura 2. Distribución geográfica en México de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	8
Figura 3. Formación del esqueleto monoterpeneo.....	13
Figura 4. Ruta biosintética mevalónica.....	15
Figura 5. Ruta biosintética MEP o Vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato.....	16
Figura 6. Producción de triterpenos pentacíclicos a partir de 2,3 oxidoescualeno.....	18
Figura 7. Estructura del ácido betulínico.....	20
Figura 8. Presentación esquemática de las principales áreas en el cultivo de células y tejidos vegetales resaltando algunos de sus campos de aplicación.....	23
Figura 9. Proceso de infección de <i>Agrobacterium</i> en una célula vegetal.....	27
Figura 10. Presentación esquemática del plásmido <i>Ri</i>	28
Figura 11. Ilustración esquemática de la vía de transducción de señal inducida por el inductor para la producción de metabolitos secundarios de plantas.....	40
Figura 12. Diseño experimental utilizado en este trabajo.....	43
Figura 13. Proceso de transformación de <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin mediado por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	55
Figura 14. Raíces transformadas obtenidas de raíces.....	57
Figura 15. Raíces transformadas obtenidas de hojas.....	57
Figura 16. Amplificación del gen <i>rolC</i> por PCR.....	58
Figura 17. Perfil cromatógrafo de estándar de ácido betulínico.....	59
Figura 18. Perfiles cromatográficos de muestras de raíces transformadas a partir de raíz de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	60
Figura 19. Crecimiento de las raíces transformadas.....	61
Figura 20. Gráfica del peso fresco durante los diferentes días de cultivo (0-36 días).....	62
Figura 21. Gráfica del peso seco durante los diferentes días de cultivo (0-36 días).....	63
Figura 22. Conductividad del medio durante los diferentes días de cultivo (3-36 días)....	64

Figura 23. Producción de ácido betulínico de 3 líneas de raíces transformadas.	67
Figura 24. Producción de ácido betulínico de la línea LA1H (día 33 de cultivo).....	68
Figura 25. Producción de ácido betulínico de la línea LA1H (día 36 de cultivo).....	69
Figura 26. Producción de ácido betulínico de la línea LA1H (día 39 de cultivo).....	69

ABREVIATURAS

AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
ASA	Ácido salicílico
AtCAS1	<i>A. thaliana</i> cicloartenol sintasa
BAS	B-amirina sintasa
CMK	4-difosfocitidil-2c-metil-D-eritritol 4 fosfato cinasa
CMS	4-difosfocitidil-2c-metil-D-eritritol
DMAPP	Dimetil-alil difosfato
DXP	1 desoxi-D- xilulosa 5- fosfato
DXR	1 desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa
DXS	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa
FPP	Farnesil pirofosfato
FRS	Fridelin sintasa
GA3-P	Gliceraldehido 3 fosfato
GGPP	Geranilgeranilo pirofosfato
GPP	Pirofosfato de geranilo
GUS	Glucuronidasa
HDS	2c- metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa
HMBPP	1 hidroxil-2 metil-2-(E) butenil 4 difosfato
HMGR	3 hidroxil-3 metil glutaril CoA reductasa
IPP	Isopentenil difosfato
JA	Ácido jasmónico
LA1H	Línea de hoja
LAS	Sinesina lanosterol
LCR	Línea de raíz
LCT	Línea de hipocótilo
LUP	Lupeol sintasa
MCS	2c-metil-D-eritritol 2-4 difosfato sintasa
MeJA	Jasmonato de metilo
MEP	2c- metil-D-eritritol 4 fosfato
MOSC	Multifuncional oxidoescualeno ciclasa
MVA	Vía mevalonato
OSC	Oxidoescualeno ciclasas
PC	Medio Philips y Collins
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFP	Proteína fluorescente roja
rol	root-inducing locus
SHC	Escualeno hopane ciclasa
SSL	Escualeno sintasa
TDZ	Thidiazurón
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
V-MEP	Vía 2c-metil-D-eritrol 4 fosfato

RESUMEN

Las plantas producen metabolitos secundarios que tienen un gran potencial para la industria farmacéutica y alimentaria. Por ello se han dirigido muchos esfuerzos a la extracción de metabolitos secundario, así como a la elucidación de estructuras y a la determinación de su actividad biológica. La identificación de metabolitos secundarios está en constante expansión y se les han encontrado diversas aplicaciones. Particularmente, el cultivo de raíces transformadas resulta muy interesante debido a sus características de rápido crecimiento, biosíntesis de un amplio espectro de fitoquímicos, así como por su estabilidad genética y facilidad de mantenimiento, que ha permitido su uso para la producción de metabolitos secundarios con aplicaciones farmacológicas y de alto valor económico. En la presente investigación, los resultados conseguidos en el cultivo de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin, obtenidas a partir de hoja, indican que a partir del día 30 del cultivo se produce 0.432 mg de ácido betulínico/g peso seco, en la condición de fotoperiodo, condición idónea para la incorporación de elicitores. Con la adición del elicitor jasmonato de metilo a una concentración de 200 μ M en el día 36 de cultivo, las raíces transformadas a partir de hoja producen 0.804 mg de ácido betulínico/g peso seco, con el elicitor ácido salicílico a la misma concentración, se producen 0.358 mg de ácido betulínico/g peso seco; comparando los resultados con los obtenidos en el cultivo control (0.579 mg de ácido betulínico/g peso seco) existe una diferencia de +38.8% utilizando jasmonato de metilo y de -38.1% utilizando ácido salicílico. El mejor tratamiento durante la elicitación de raíces transformadas a partir de hoja de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin fue el jasmonato de metilo a una concentración de 200 μ M.

ABSTRACT

The plants produce secondary metabolites that have great potential for the pharmaceutical and food industry. For this reason, many efforts have been directed to the extraction of secondary metabolites, as well as to the elucidation of structures and the determination of their biological activity. The identification of secondary metabolites is constantly expanding and several applications have been found. Particularly, the cultivation of transformed roots is very interesting due to its fast growing characteristics, biosynthesis of a broad spectrum of phytochemicals, as well as its genetic stability and ease of maintenance, which has allowed its use for the production of secondary metabolites with applications pharmacological and of high economic value. In the present investigation, the obtained results in the cultivation of transformed roots of *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin, obtained from leaf, indicate that from day 30 of the culture, is produced 0.432 mg of betulinic acid / g dry weight in the condition of photoperiod, ideal condition for the incorporation of elicitors. With the addition of elicitor methyl jasmonate at a concentration of 200 μ M on day 36 of culture, the roots transformed from the leaf yield 0.804 mg of betulinic acid / g dry weight, with the elicitor salicylic acid at the same concentration, they produce 0.358 mg of betulinic acid / g dry weight; comparing the results with those obtained in the control culture (0.579 mg of betulinic acid / g dry weight) there is a difference of + 38.8% using methyl jasmonate and - 38.1% using salicylic acid. The best treatment during the elicitation of roots transformed from the leaf of *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin was the methyl jasmonate at a concentration of 200 μ M.

INTRODUCCIÓN

La naturaleza presenta más de 250,000 especies de plantas que son depósito de probablemente cientos de miles de compuestos de bajo peso molecular llamados metabolitos secundarios, los cuales son el producto de reacciones químicas a través de las que se obtienen los elementos necesarios para el desarrollo e interacciones de la planta con su ambiente. Algunas plantas producen metabolitos secundarios que tienen potencial aplicación para la industria farmacéutica y alimentaria. Por lo tanto, en las últimas décadas se han dirigido muchos esfuerzos a la extracción de estos metabolitos, a la elucidación de sus estructuras y a la determinación de su actividad biológica. La riqueza de los metabolitos secundarios está en constante expansión y encuentran diversas aplicaciones en varios dominios. En la actualidad existen diversos estudios sobre la planta *Pentalinon andrieuxii* de la que se están aislando metabolitos secundarios de interés farmacológico. De los extractos crudos de hojas de *P. andrieuxii* se han aislado el ácido betulínico, el acetato de ácido betulínico, el éster metílico de ácido betulínico y la betulina, mismos que fueron evaluados por su actividad antiprotozoaria contra *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*. El ácido betulínico es un triterpenopentacíclico de tipo Lupano que se sintetiza a partir de la ruta del mevalonato y se encuentra presente en muchas especies de plantas; se reporta que posee propiedades medicinales contra la malaria y presenta actividad anti-VIH, antibacteriana, antifúngica, antiplasmodial y anti-inflamatoria. También se ha reportado que el ácido betulínico inhibe el crecimiento de células cancerígenas, sin afectar a las células normales (Domínguez-Carmona *et al.*, 2010; Moghaddam *et al.*, 2012). En los últimos años, existe un gran interés en realizar cultivos de raíces transformadas, con la finalidad de emplearlos para la producción de metabolitos secundarios con aplicaciones farmacológicas y de alto valor económico. El desarrollo de cultivo de tejidos vegetales, en conjunto con el uso de técnicas de elicitación de metabolitos secundarios, constituye una alternativa biotecnológica al cultivo de plantas completas para la obtención de productos valiosos (fitoquímicos). Entre los sistemas de cultivo de tejidos vegetales frecuentemente considerados para la producción de metabolitos secundarios se tienen: suspensiones celulares,

células inmovilizadas artificialmente y cultivo de raíces transformadas o raíces pilosas (“Hairy-roots”), este último sistema es de interés particular debido a sus propiedades de rápido crecimiento, de biosintetizar un amplio espectro de fitoquímicos, así como por su estabilidad genética y facilidad de mantenimiento. Utilizando como modelo de estudio raíces de *Pentalinon andrieuxii* transformadas con la cepa bacteriana ATCC15834 de *A. rhizogenes*, el objetivo de este proyecto es evaluar una condición de crecimiento (fotoperiodo) y la adición de elicitores químicos, sobre la producción de ácido betulínico.

CAPÍTULO I

1. Antecedentes

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

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

La clasificación botánica de la especie es:

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Subfamilia	Apocynoideae
Género	<i>Pentalinon</i>
Epíteto específico	<i>andrieuxii</i>
Autor de nombre	(Müll. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin, 1986
Nombre científico	<i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin, 1986

Fuente: Herbario Nacional URN: catalog: IBUNAM: MEXU: PA898750

1.1.1 Descripción botánica

Hierba trepadora de hasta 7 m de largo con látex lechoso; tallos subcilíndricos, glabros, glabrescentes o diminutamente puberulentos. Hojas opuestas, membranáceas elípticas a ovado-elípticas, de hasta 10 cm de largo y hasta 6 cm de ancho, ápice acuminado, base redondeada, glabras o glabrescentes en el haz con las nervaduras primarias y secundarias apenas visibles, envés glabro a áspero-

pubérulo, con característico aspecto ampollado-reticulado, eglandulares con las nervaduras primarias y secundarias conspicuas. Inflorescencias glabras o glabrescentes; pedicelos de 1.6 a 4.1 cm; brácteas diminutas de hasta 1.5 mm de largo. Flores con los sépalos lanceolados, de hasta 6 mm de largo, con el ápice acuminado; la corola verde-amarilla o amarilla, tubular a campanulada de hasta 5 cm de largo; anteras aglutinadas a la parte superior del estilo. Fruto compuesto de 2 folículos, angostamente teretes, de hasta 30 cm de largo y 7 mm de diámetro. Semillas apicalmente comosas (Méndez-González *et al.*, 2012). (Figura 1).



Figura 1. *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin, cultivadas en los terrenos del CICY.

1.1.2. Distribución geográfica

En México se puede encontrar en los estados de Campeche, Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz, y Yucatán (Figura 2).

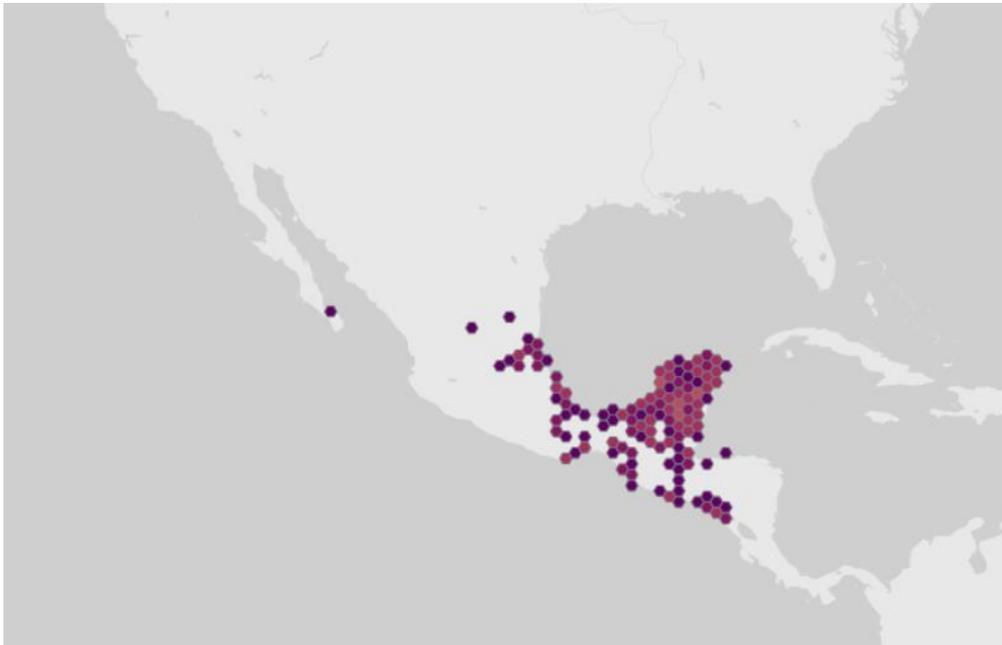


Figura 2. Distribución geográfica en México de *Pentalinon andrieuxii*. Imagen tomada de Global Biodiversity Information Facility, 2019.

1.1.3. Usos

Es usada en la medicina tradicional maya en la Península de Yucatán para el alivio de disturbios nerviosos y dolor de cabeza utilizando el látex; contra las mordeduras de serpientes, se aplica directamente a la parte afectada un extracto que resulta de masticar la raíz o las hojas frescas. También ha sido utilizada para contrarrestar la enfermedad causada por la *Leishmania mexicana*, conocida como leishmaniosis cutánea ó “úlceras de los chicleros” (Chan-Bacab *et al.*, 2003; Melchor *et al.*, 2005). La leishmaniosis pertenece al grupo de enfermedades tropicales causadas por parásitos protozoarios, los cuales entran en las células del sistema inmunológico por la picadura de una mosca infectada, causando lesiones desfigurantes en la piel, o en órganos internos, así como infecciones letales. Esta enfermedad afecta a más de 20 millones de personas en todo el mundo y es ahora endémica a 88 países en 5 continentes (Getti *et al.*, 2009). En la medicina tradicional se recomienda el uso de una infusión de las raíces frescas de *P. andrieuxii* para lavar las lesiones y la utilización de las raíces secas pulverizadas para aplicarlas sobre las lesiones después del lavado (Chan-Bacab *et al.*, 2003).

1.1.4. Investigaciones químicas recientes.

A la fecha se han logrado aislar trinorsesquiterpenoides (urechitol A y B) del extracto de la raíz de *P. andrieuxii*. Las estructuras se identificaron mediante la interpretación de datos espectroscópicos. La estereoquímica del urechitol A, fue confirmada a través de un estudio de cristalografía de rayos X. Este es el primer informe sobre el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios con el esqueleto de trinorsesquiterpenoide (Yam-Puc *et al.*, 2009) y el aislamiento de dos derivados esteroidales a partir del extracto de raíz de *P. andrieuxii* (Yam-Puc *et al.*, 2012b).

De las raíces de esta planta se han aislado metabolitos secundarios como esteroides, cumarinas y triterpenoides, derivados de pregnano, ácido betulínico y dos terpenos de estructura química inusual denominados: urechitol A y urechitol B (Domínguez-Carmona *et al.*, 2010; Yam-Puc *et al.*, 2012b; Yam-Puc *et al.*, 2009).

En los extractos crudos de hojas se han aislado ácido betulínico, acetato de ácido betulínico, éster metílico de ácido betulínico y la betulina, que fueron evaluados por su actividad antiprotozoaria contra la *Leishmania amazonensis*, *Tripanosoma cruzitalahuen* y *Plasmodium falciparum*. El ácido betulínico es un triterpenopentacíclico de tipo Lupano que se encuentra presente en muchas especies de plantas, y se reporta que posee propiedades medicinales contra la malaria, así como que presenta actividad anti-VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), antibacteriana, antifúngica, antiplasmodial y anti-inflamatoria. Se ha reportado que el ácido betulínico inhibe el crecimiento de células cancerígenas sin afectar a las células normales (Domínguez-Carmona *et al.*, 2010; Moghaddam *et al.*, 2012).

Recientemente se estudió el efecto de los extractos de hexano de la raíz sobre los parásitos y células huésped de la enfermedad leishmaniosis cutánea causada por *Leishmania mexicana* en condiciones *in vitro* (Lezama-Dávila *et al.*, 2014).

1.1.5. Investigaciones bioquímicas y moleculares recientes

La mayoría de los trabajos reportados están enfocados hacia el análisis fitoquímico, pero recientemente en el grupo de investigación del Dr. Gregorio Godoy, de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación

Científica de Yucatán, se ha logrado establecer protocolos para la regeneración de plantas a partir de explantes de raíces, hipocótilos y hojas, utilizando como un regulador de crecimiento al thidiazurón (TDZ) (Acosta-Martín, 2012), así como, cultivos de raíces normales y regeneración de plantas utilizando como reguladores de crecimiento al ácido indolbutírico (AIB) y al ácido naftalenacético (ANA) (Góngora-Sánchez, 2012). También se ha logrado la inducción de raíces transformadas utilizando la cepa ATCC15834 de *Agrobacterium rhizogenes*, la caracterización del crecimiento de las líneas de raíces transformadas y la cuantificación de la producción de ácido betulínico, así como la evaluación del uso de elicitores químicos sobre su producción a escala de matraz (Sandoval-Antúnez, 2014).

Otro trabajo realizado fue la regeneración de plantas a partir de raíces transformadas probando el efecto del regulador de crecimiento TDZ en un rango de 0-25 μM con la cepa ATCC15834 de *Agrobacterium rhizogenes* (Canul-Ek, 2014).

También se ha reportado la transformación transitoria de la especie vía *Agrobacterium tumefaciens* (Yam-Puc *et al.*, 2012a). Burgos-May, 2015 realizó un trabajo sobre la transformación genética de *P. andrieuxii* con un vector de expresión (pCAMBIA 23101) portando el gen truncado de la *HMGR* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase) de *Arabidopsis thaliana* y el gen reportero GUS, estableciendo por primera vez un protocolo de transformación estable para la especie vía *A. tumefaciens*, donde se regeneraron plantas en las que se detectó por PCR la presencia del transgén *35S::HMGR* en 5 líneas de *P. andrieuxii*.

Por otro lado, Llanes-Cocom (2015), realizó la identificación de metabolitos secundarios a partir de raíces transformadas, observando tres grupos de metabolitos: una mezcla de esteroides, una mezcla de ácidos grasos y sus derivados y el ácido betulínico como producto mayoritario. Además, realizando una comparación de perfiles cromatográficos, demostró que tanto el ácido betulínico, como la mezcla de ácidos grasos y de esteroides, si bien presentes en el extracto de las hojas de *P. andrieuxii* sin transformar (control), están en mayor cantidad en las hojas de plantas transformadas.

Hiebert-Giesbrecht (2015), en su trabajo sobre la variación espacio-temporal de terpenoides como el ácido betulínico y urechitol A en plantas silvestres jóvenes y adultas de *P. andrieuxii*, encontró que el ácido betulínico sólo se detectó en hojas y el urechitol A en raíces de plantas adultas.

Cano-Tun *et al.*, 2016 al trabajar con tres líneas de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834 RFP) provenientes de explantes de hojas, hypocótilos y raíces de *Pentalinon andrieuxii*, reportó que el urechitol no se encontró en ninguna de las tres líneas, en las que si logró identificar ácido betulínico. Lo anterior, contrasta con los resultados obtenidos a partir de plantas regeneradas a partir de raíces transformadas obtenidas a partir de hypocótilo por Ramírez-Albores (2016) y las obtenidas a partir de hojas por Jiménez-Aguilar (2016) vía la cepa *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834, quienes reportan la presencia de urechitol en todas las raíces de plantas regeneradas de diferentes edades, mientras que sólo en 1 de 10, lograron detectar ácido betulínico en las hojas (Cano-Tun *et al.*, 2016).

En el trabajo realizado por May-Mendoza en 2016, se logró el establecimiento de líneas de cultivo de raíces transformada a partir del explante de hoja infectados con una cepa de *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834, estableciéndose 9 líneas de cultivo de raíces que expresan el gen marcador de la proteína roja fluorescente (ATCC15834 RFP).

1.2. Isoprenoides

Los isoprenoides son moléculas esenciales sintetizadas por todos los organismos y la mayor diversidad de estos compuestos se presentan en las plantas. También son conocidos como terpenoides cuya fórmula química general es $(C_5H_8)_n$, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos con más de 80,000 moléculas diferentes (Christianson, 2017). Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citocininas), carotenoides, clorofilas, plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en las estructuras de membranas). Los terpenoides pueden conjugarse con estructuras moleculares derivadas de otras vías bioquímicas para formar grupos adicionales de

metabolitos secundarios. Por ejemplo, las unidades de isopreno se transfieren a compuestos fenólicos para obtener fenólicos prenilados.

Los terpenos se clasifican en función del número de unidades de isopreno en su estructura (López *et al.*, 2012) (Tabla 1), los monoterpenos, que constan de dos unidades de isopreno (C10), los sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y los tetraterpenos (C40), formados a partir de tres, cuatro, seis y ocho unidades de isopreno, respectivamente (Charles, 2003). Son de gran importancia debido a sus propiedades biológicas como anti-inflamatoria, anti-microbiana, anti-carcinogénica, anti-ulcerosa, anti-protozoaria, anti-micótica, entre otras (Withers & Keasling, 2007; Pan *et al.*, 2012; Pandreka *et al.*, 2015).

Tabla 1. Clasificación de los terpenos en función del número de unidades de isopreno en su estructura.

Nombre	No. De unidades de isopreno	No. De átomos de carbono	Ejemplos
Hemiterpenos	1	5	-
Monoterpenos	2	10	Mirceno
Sesquiterpenos	3	15	Artemona
Diterpenos	4	20	Paclitaxel
Triterpenos	6	30	Escualeno
Tetraterpenos	8	40	Licopeno
Poliisoprenos	>8	>40	Hule

1.2.1. La regla de isopreno

La regla de isopreno, propuesta por Wallach en 1887, define a los terpenoides como productos químicos que contienen un esqueleto de carbono formado por la unión de unidades de isopreno. El isopreno, el "componente básico" de los terpenoides, es 2-metilbuta-1,3-dieno. Si observamos el 2-metilbutano original, podríamos considerar que la molécula se asemeja a un renacuajo nanoscalar con una "cabeza" en el extremo ramificado de la molécula, y el otro extremo, por lo tanto, constituye la "cola". En principio, dos unidades de isopreno podrían unirse cabeza con cabeza, cola con cola o cabeza con cola. Con mucho, la fusión más común es de la cabeza a la cola.

En la Figura 3, se muestra dos unidades de isopreno que se unen de la cabeza a la cola para producir una columna vertebral monoterpénica. Ocasionalmente, ocurre un acoplamiento cola-cola. Esta es una característica de los esteroides y carotenoides. En ambas clases, hay una fusión de cola a cola exactamente en el centro de la columna vertebral, la otra se une al tipo de cabeza a cola. La hipotética fusión de cabeza a cabeza no ocurre.

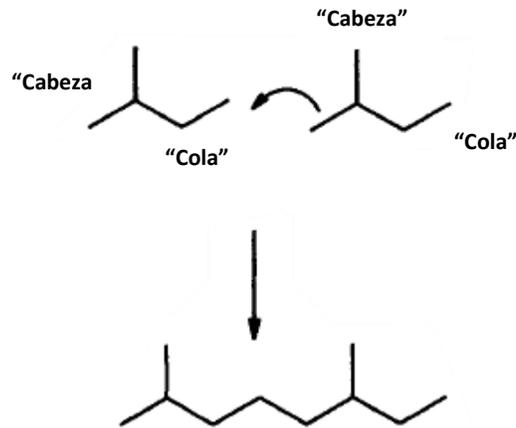


Figura 3. Formación del esqueleto monoterpénico (Modificado de Charles, 2003)

1.2.2. Biosíntesis

Los terpenos se forman a través de uniones biológicas de unidades biológicas de isopreno. La unión de dos monómeros de acuerdo a la Regla Isoprénica de Wallach pueden dar el precursor pirofosfato de geranilo (GPP). Los terpenos irregulares, tales como el ácido crisantémico de las piretrinas, no siguen esta regla. El pirofosfato de geranilo es precursor de los monoterpénicos. La incorporación de otra unidad isoprénica da como producto el farnesil pirofosfato (FPP), precursor de los sesquiterpenos. Una unidad más forma el geranilgeranilo pirofosfato (GGPP), el cual es el compuesto base para formar diterpenos. El escualeno, precursor de triterpenos y esteroides, se forma por la dimerización de dos unidades de FPP, mientras que el fitoflueno, compuesto base para los carotenoides, se obtiene de manera homóloga por dimerización del GGPP. Los politerpenos se forman por

uniones isoprénicas múltiples y repetitivas, y por regla general, no presentan ciclizaciones (Charles, 2003).

1.3. Rutas biosintéticas

Todos los terpenoides (también conocidos como isoprenoides) se derivan de dos unidades básicas, el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetil-alil difosfato (DMAPP). En las plantas, estos precursores se sintetizan por dos vías que operan en diferentes compartimentos celulares. La vía mevalónica, presente en el citoplasma y la vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP), que está confinada a los plástidos (León & Guevara-García, 2007).

1.3.1. Vía mevalónica

La vía mevalónica (MVA) se caracterizó hace casi 50 años y por mucho tiempo se le consideró como la vía universal para la síntesis de IPP y DMAPP. Esta vía inicia a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-coenzima A (CoA) por la acción de tres enzimas que producen ácido mevalónico, que es el primer intermediario comprometido de esta vía y de donde deriva su nombre. A través de tres enzimas adicionales el ácido mevalónico es convertido a IPP. Finalmente, la enzima IPP isomerasa (IDI) utiliza este compuesto como sustrato para producir DMAPP. De los múltiples estudios bioquímicos, genéticos y moleculares de la vía mevalónica, destaca la identificación de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa (HMGR) que es uno de los pasos limitantes de la ruta. La HMGR está codificada por una familia de genes cuyo número varía en diferentes especies. Estos genes están sujetos a una regulación compleja, incluyendo expresión tejido específica y por múltiples señales ambientales. Sin embargo, la caracterización bioquímica de la enzima HMGR es aún limitada, entre otras cosas, debido a lo difícil de su purificación. Tal vez uno de los logros más importantes de los estudios clásicos de la vía MVA es el desarrollo de inhibidores de la actividad de la enzima HMGR (Figura 4; León & Guevara-García, 2007).

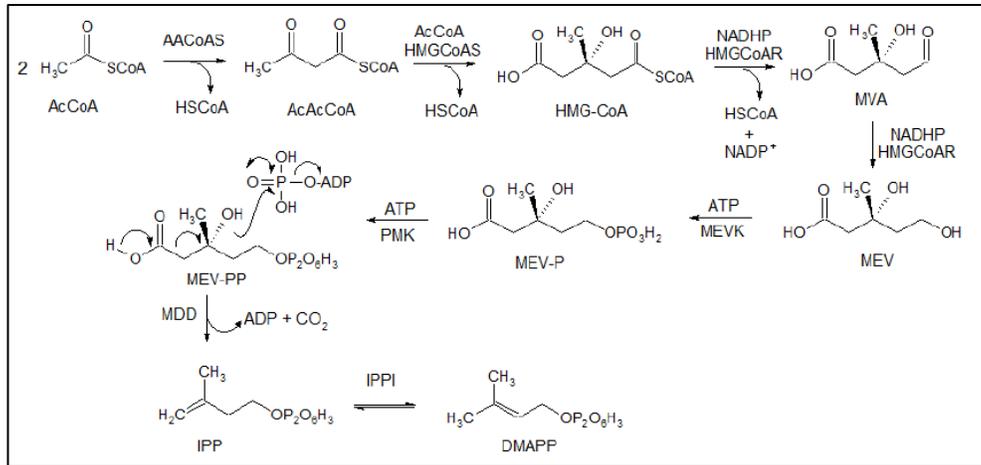


Figura 4. Ruta biosintética mevalónica. (AcCoA; Acetil CoA, AACoAS; acetoacetyl-CoA tiolasa, AcAcCoA; acetoacetyl-CoA, HMG-CoAs; HMG-CoA sintasa, HMG-CoA; 3-hidroxi-3 metil-glutaril CoA, HMGCoAR; HMG-CoA reductasa, MVA; Mevaldehído, MEV; ácido mevalónico, MEVK; mevalonato cinasa, PMK; fosfomevalonato cinasa, MEV-PP; MDD; Mevalonato 5-difosfato descarboxilasa, IPP; isopentenil pirofosfato, IPPI; difosfato de isopentenilo isomerasa, DMAPP; dimetil-alil difosfato)

1.3.2. Vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato (Vía MEP)

El primer paso de la vía MEP condensa el piruvato y el GA3-P a través de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS), produciendo el producto 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP). En el segundo paso biosintético, el DXP es convertido a 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), por la acción de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa (DXR). Este paso se postula como el primer intermediario comprometido de la vía, ya que el DXP en bacterias también se utiliza como precursor en la síntesis de las vitaminas B6 y B1. Sin embargo, estudios recientes en plantas sugieren que estas vitaminas son sintetizadas a través de una ruta biosintética no relacionada. En los pasos subsecuentes de la vía, el MEP es transformado en 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) por la acción consecutiva de las enzimas 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa (CMS), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato cinasa (CMK), 2C-metil-D-eritritol 2-4 difosfato sintasa (MCS) y 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa (HDS). En el último paso de la vía, la enzima 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato reductasa (HDR), convierte el 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) en isopentenil difosfato (IPP) y dimetil-alil difosfato (DMAPP), que son los productos finales de esta ruta biosintética. La funcionalidad de varios de estos genes fue

demostrada a través del rescate de mutantes de bacterias. En el caso de la vía MEP, se ha demostrado que la enzima HDR es capaz de sintetizar una mezcla de IPP y DMAPP, en una relación 1:5, lo que constituye una diferencia con la vía MVA, donde existe una enzima responsable para dicha conversión (Figura 5; León & Guevara-García, 2007).

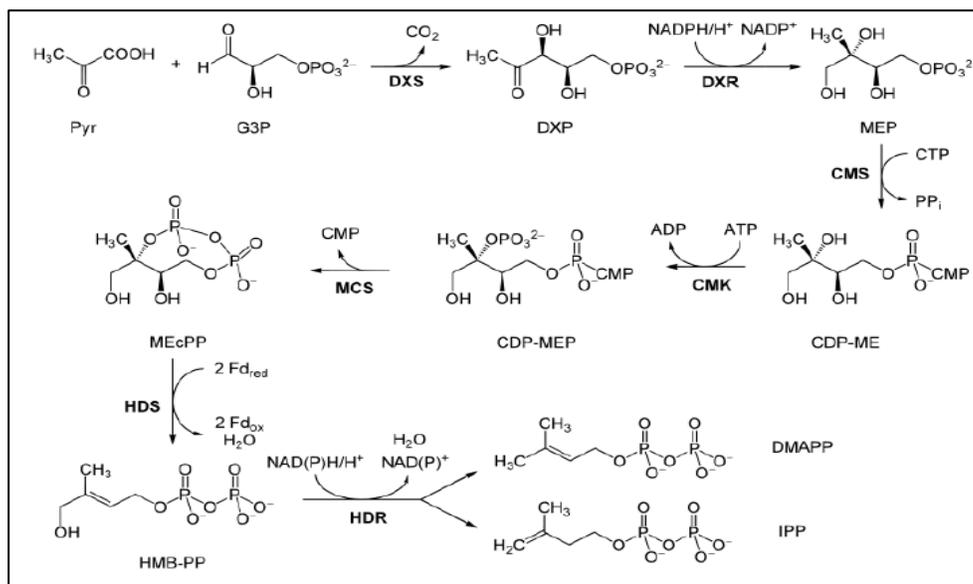


Figura 5. Ruta biosintética MEP o Vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato. (Pyr; pirofosfato, G3P; gliceraldehído 3 fosfato, DXS; 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, DXP; 5-fosfono-1-desoxi-D-xilulosa, DXR; 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa, MEP; 4-fosfono-2-C-metil-D-eritritol, CMS; 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa, CDP-ME; 4-(CDP)-2-C-metil-D-eritritol, CMK; 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato cinasa, CDP-MEP; 4-difosfocitidil-2C metil eritritol 2-fosfato, MCS; 2C-metil-D-eritritol 2-4 difosfato sintasa, MEcPP; 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclofosfato, HDS; 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa, HMB-PP; pirofosfato de 4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo, HDR; 1-hidroxi-2-metil-butenil 4-difosfato reductasa, IPP; isopentenil difosfato, DMAPP; dimetil-alil difosfato)

1.3.3. Triterpenos pentacíclicos

Los triterpenoides pertenecen a una clase grande y estructuralmente diversa de productos naturales que ocurren abundantemente en el reino vegetal, especialmente en plantas superiores en los casos de triterpenos pentacíclicos y tetracíclicos, mientras que los triterpenos mono, bi y tricíclico prevalecen en los helechos y las plantas sin flor (criptógamas) (Ghosh, 2016).

Los triterpenos pentacíclicos son conocidos por la variedad de actividades farmacéuticas, como antiinflamatorio, hepatoprotector, anticancerígeno, antihiperlipidémico, antidiabético, antioxidante y antimicrobiano. Los triterpenos pentacíclicos se clasifican comúnmente como friedelano, gammacerano, hopano, lupano, oleanano, serratano, taraxastano y ursano. Lupano, oleanano y ursano, son las tres clases principales de triterpenos pentacíclicos ampliamente distribuidos en las plantas. Los ejemplos de los triterpenos pentacíclicos de tipo lupano de origen vegetal son ácido betulínico, bacosina, bevirimat, ácido melaleúico, ácido cílicodiscólico, calenduladiol, glicidonol, etc. Entre estos, el ácido betulínico, bevirimat y bacosina, son bien conocidos por sus actividades farmacológicas, que incluyen actividades contra el cáncer, anti-VIH y anti-hiperglucémico (Ghosh, 2016).

El 2,3-oxidoescualeno es un intermediario biosintético común para triterpenos, esteroides y hormonas esteroides vegetales. El paso inicial de diversificación en la ruta de triterpeno / esteroide es catalizado por una familia de enzimas, conocidas como oxidoescualeno ciclasas (OSC), que pueden convertir el 2,3-oxidoescualeno en una variedad de triterpenos cíclicos. Las OSC pueden generar una gran cantidad de triterpenos tetracíclicos a partir de 2,3 S-oxidoescualeno a través de dos principales carbocationes intermedios (Ghosh, 2016).

En la Figura 6 se destaca la conversión mediada por oxidoescualeno ciclasa de 2,3-oxidoescualeno en diversos esqueletos de triterpeno. Las oxidoescualeno ciclasas se abrevian como, FRS (friedelin sintasa), LUP (lupeol sintasa), BAS (β -amirina sintasa), MOSC (multifuncional oxidoescualeno ciclasa). SSL y SHC denotan escualeno sintasa y escualeno hopene ciclasa, respectivamente (Ghosh, 2016).

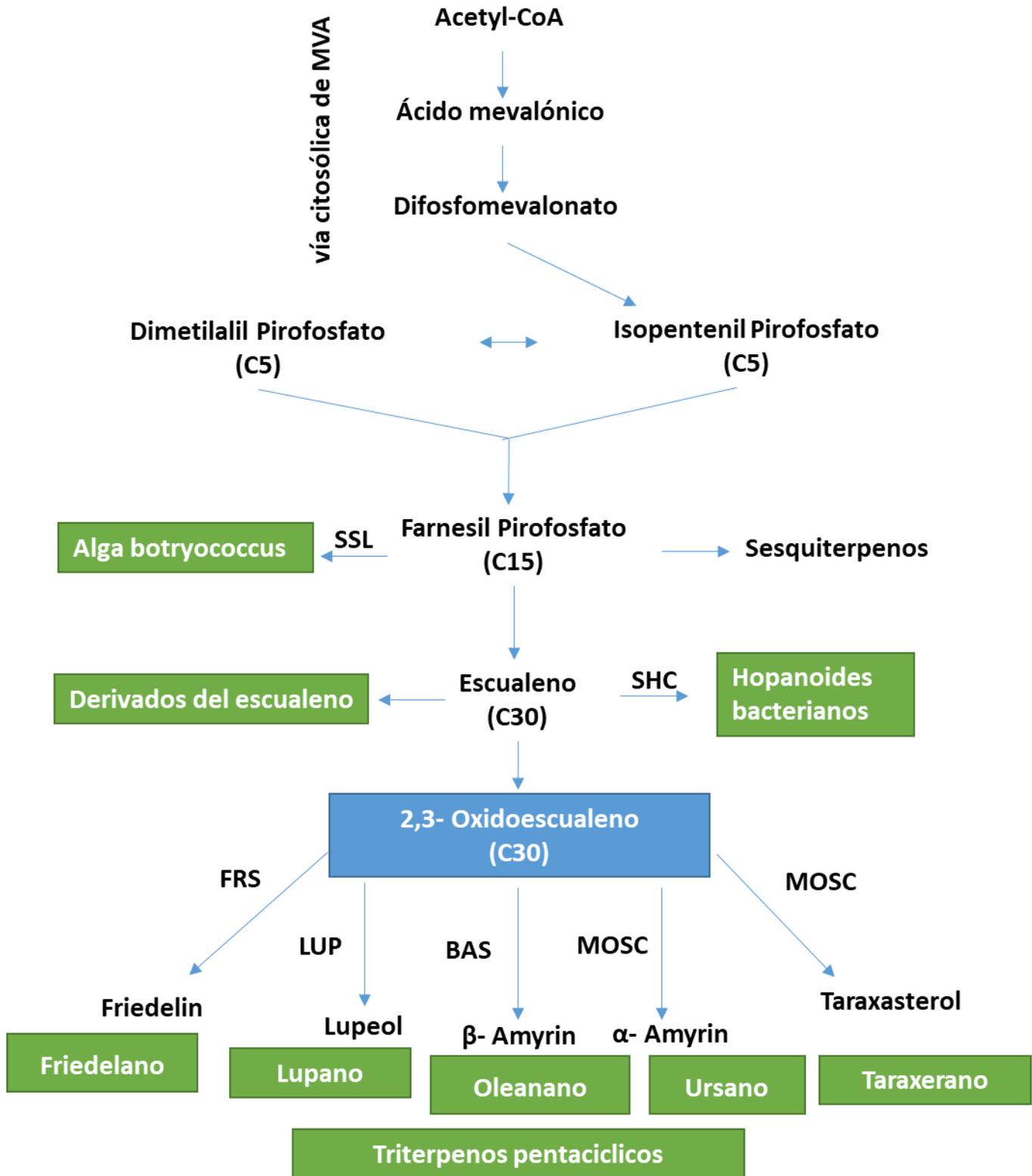


Figura 6. Producción de triterpenos pentacíclicos a partir de 2,3 oxidoescualeno (tomado y editado de Ghosh, 2016). SSL; escualeno sintasa, SHC; escualeno hopano ciclase, FRS; friedelin sintasa, LUP; lupenol sintasa, BAS; β-amirina sintasa, MOSC; multifuncional oxidoescualeno ciclase.

La cicloartenol sintasa de *A. thaliana* (AtCAS1) fue el primer gen OSC clonado de una especie vegetal (Corey *et al.*, 1993). AtCAS1 se identificó a través del cribado de la actividad CAS de una biblioteca de expresión de cDNAs de *A. thaliana* en un mutante de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) que acumula 2,3-oxidoescualeno debido a la mutación del gen de sinesina lanosterol (LAS). La actividad de LAS, un OSC, se requiere para la biosíntesis de lanosterol, un precursor de ergosterol en levadura y otros hongos. La ciclación de 2,3-oxidoescualeno en cicloartenol mediada por CAS se considera como el primer paso comprometido, así como el principal contribuyente para la biosíntesis de fitoesteroles esenciales (por ejemplo, campesterol, β -sitosterol y estigmasterol) y hormonas esteroideas (BR) en plantas. La identificación de LAS sugirió un posible papel del lanosterol como precursor de esterol/triterpeno en plantas (Suzuki *et al.*, 2006; Ohyama *et al.*, 2009), aunque su contribución a la biosíntesis y la fisiología de fitosteroles mayores podría ser menor (Gas-Pascual *et al.*, 2014). Después de la identificación de AtCAS1 se clonaron otras OSCs de plantas, la mayoría siguiendo una estrategia basada en homología de secuencias en bases de datos y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores degenerados. Estos esfuerzos condujeron al descubrimiento en diversas plantas de varios OSCs que pueden convertir el 2,3-oxidoescualeno en productos distintos al cicloartenol, como la amirina, el lupeol, el cucurbitadienol, el mineral, entre otros (Figura 6).

1.3.3.1 Ácido betulínico

El ácido betulínico (Figura 7) (ácido 3 β -hidroxi-lup-20 (29) -en-28-oico) es un triterpeno pentacíclico de origen natural con una amplia variedad de actividades biológicas, que incluyen potentes propiedades antitumorales. Se aísla principalmente un triterpenoide con interesantes actividades farmacológicas, se ha extraído de una amplia gama de especies de plantas, que van desde plantas carnívoras como *Sarracenia flava* (Sarraceniaceae) (Kingston & Munjal, 1978) hasta árboles y arbustos como *Diospyros spp.* (Ebenaceae), *Inga punctata* (Fabaceae), (Trumbull *et al.*, 1976) *Ziziphus spp.* (Rhamnaceae), *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae), (Eiznhamer & Xu, 2004) y *Syzygium spp.* (Myrtaceae) (Cichewicz & Kouzi, 2004) y (Chen *et al.*, 2009 a).

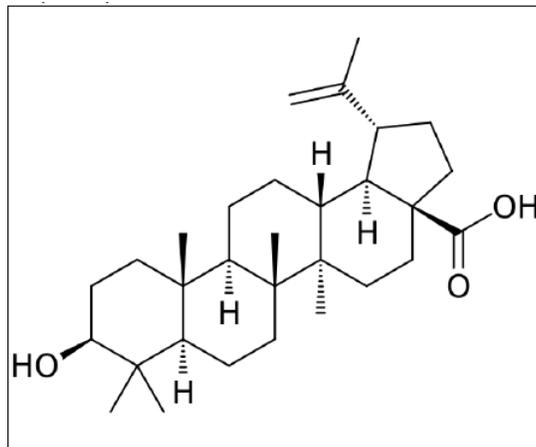


Figura 7. Estructura del ácido betulínico

Tanto el ácido betulínico como la betulina (compuesto triterpenoide), se extienden ampliamente por todo el reino vegetal. Cuantitativamente, la betulina se extrae en cantidades mayores que el ácido betulínico (Cichewicz & Kouzi, 2004), (Alakurtti *et al.*, 2006). Los abedules de corteza blanca (especie *Betula*) son una fuente común de materia prima para la extracción de betulina con un rendimiento del 20% en peso seco (Yogeeswari & Sriram, 2005; Rzymowska, 1998). Se sabe que white birch (Abedul blanco) tiene una amplia variedad de aplicaciones medicinales; crece en una amplia variedad de condiciones. Los componentes del abedul tienen propiedades antirreumáticas, estimulantes, astringentes, antihelmínticas, colagogas y diaforéticas, y se usa para tratar diversos problemas estomacales e intestinales por parte de los rusos y los nativos americanos (Kwon *et al.*, 2003). *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom), un hongo parásito en los abedules, se utiliza en la medicina folclórica tradicional para la terapia del cáncer; contiene altos niveles de ácido betulínico y betulina (Csuk R. , 2014). Johann Tobias Lowitz (1788) fue el primero en aislar e identificar el ácido betulínico de la corteza exterior de los abedules de corteza blanca. Él encontró que el ácido betulínico era un constituyente importante (Alakurtti *et al.*, 2006). En la Tabla 2, se muestra las plantas que son utilizadas para aislar ácido betulínico.

Tabla 2. Plantas donde se ha identificado el ácido betulínico (tomado y editado de (Ali-Seyed et al., 2016 y Moghaddam et al., 2012).

Espece	Espece	Espece
<i>Quisqualis fructus</i>	<i>Anemone raddeana</i>	<i>Vietnamita Orthosiphon stamineus</i>
<i>Coussarea paniculata</i>	<i>Doliocarpus schottianus</i>	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>
<i>Caesalpinia paraguariensis</i>	<i>Tovomita krukovii</i>	<i>Physocarpus intermedium</i>
<i>Vitex negundo</i>	<i>Chaenomeles lagenaria</i>	<i>Tetracentron sinense</i>
<i>Ilex macropoda</i>	<i>Berlinia grandiflora</i>	<i>Syncarpa glomulifera</i>
<i>Combretum quadrangulare</i>	<i>Ancistrocladus heyneanus</i>	<i>Ziziphus spp., Vauquelinia corymbosa</i>
<i>Tetracera boiviniana</i>	<i>Diospyros leucomelas</i>	<i>Syzygium spp</i>
<i>Zizyphus joazeiro</i>	hojas de <i>Syzygium claviflorum</i>	<i>Diospyros spp., Inga punctate</i>
<i>Uapaca nidida</i>	<i>Sarracenia flava</i>	<i>Ipomea pescaprae</i>
<i>Syzygium claviflorum</i>	<i>Ficus lutea Vahl</i>	<i>Forsythia suspensa</i>
<i>Berlina grandiflora</i>	<i>Dorstenia convexa.</i>	<i>Peltophorum africanum</i>
<i>Jacaranda mimosaefolia</i>	<i>Rhaphidophora hongkongensis</i>	<i>betuale cortex, Betula pendula</i>
<i>Ilex pubescens var. glabra.</i>	<i>Gladiolus segetum</i>	<i>Rosae pseudofructus cum/sine fructibus, Rosa canina</i>
<i>Pneumatophores of Avicennia marina</i>	<i>Anemone tomentosa</i>	<i>Platanus orientalis</i>
<i>Ficus lutea</i>	<i>Hyptidendron canum</i>	<i>Betula platyphylla</i>
<i>Avicennia officinalis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Cratoxylum arborescens</i>
<i>Eucalyptus globules</i>	<i>Amoora cucullata</i>	<i>Betulae cortex Outer</i>
<i>Calophyllum brasiliense</i>	<i>Bischofia javanica</i>	<i>Nerium oleanderand</i>
<i>Clusia ellipticifolia</i>	<i>Syncarpia glomulifera</i>	<i>Engelhardtia serrata</i>
<i>Eucalyptus globules</i>	<i>Uapaca nitida</i>	<i>Orthosiphon stamineus</i>
<i>Physocarpus intermedius</i>	<i>Paeonia japonica, Paeonia lactiflora and Paeonia suffruticosa</i>	<i>Vochysia divergens</i>
<i>Malaysian Callistemon specious D. E</i>	<i>Bacopa monniera</i>	<i>Paeonia lactiflora</i>
<i>Melaluca cajuputi</i>	<i>Tephrosia calophylla</i>	<i>Ligustrum lucidum , Ligustrum pricei , Ligustrum sinensis</i>
<i>Argania spinosa</i>	<i>Clusia nemorosa L.</i>	<i>Dillenia indica</i>
<i>Pentalinon andrieuxii</i>	<i>Uapaca species</i>	<i>Saussurea lappa</i>

En la Tabla 3 se muestra el contenido de ácido betulínico que se ha determinado y cuantificado en diferentes especies de plantas en su estado silvestre.

Tabla 3. Contenido de ácido betulínico (adaptada de Jäger *et al.*, 2009).

Contenido de ácido betulínico		Referencias
<i>Platanus acerifolia</i>	24.4 mg/gps*	Galgon <i>et al.</i> , 1999
<i>Doliocarpus schottianus</i>	20.6 mg/gps	Oliveira <i>et al.</i> , 2002
<i>Betula pendula</i>	18.6 mg/gps	Zhao <i>et al.</i> , 2007
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	15.3 mg/gps	Razboršek <i>et al.</i> , 2008
<i>Betula alba</i>	5-13 mg/gps	Laszczyk <i>et al.</i> , 2006
<i>Eucalyptus spp</i>	8.4 mg/gps	Siddiqui <i>et al.</i> , 2000
<i>Lavandula angustifolia</i> (hojas)	1.3 mg/gps	Gotfredsen, 2009
<i>Lavandula angustifolia</i> (flores)	1.2 mg/gps	Gotfredsen, 2009
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	1.2 mg/gps	Gotfredsen, 2009
<i>Nerium oleander</i>	1.1 mg/gps	Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>Pentalinon andrieuxii</i> (silvestre)	0.5 a 0.9 mg/gps	Hiebert-Giesbrecht, 2015

*miligramos por gramos de peso seco.

1.4. Cultivo de tejidos vegetales

Cultivo de tejidos vegetales es un término amplio que se refiere al cultivo de cualquier parte de una planta (células, tejidos u órganos) en medios artificiales, en condiciones asépticas y en ambientes controlados. Este conjunto de técnicas surgió como un enfoque experimental para demostrar la teoría celular, que establece que todos los organismos vivos están constituidos por células, las unidades básicas de estructura y reproducción, y también el concepto de totipotencia, que se define como el potencial genético de una célula para generar un organismo multicelular completo. (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018). 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.

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 bajos costos. 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.

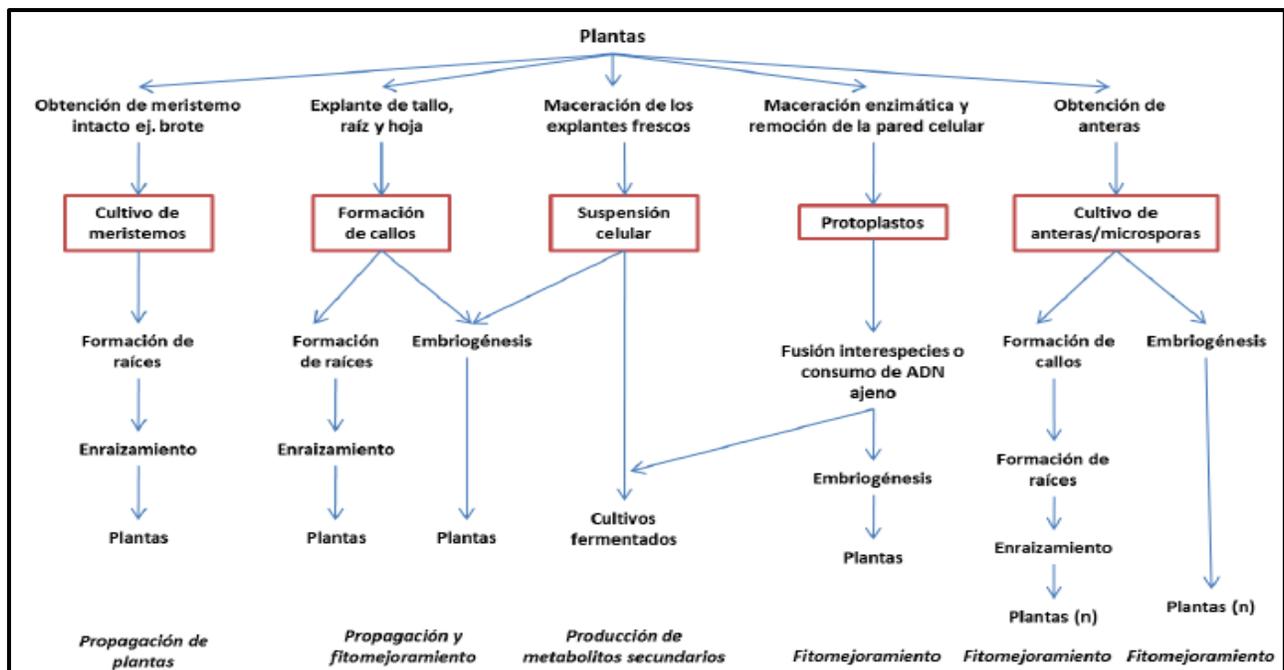


Figura 8. Presentación esquemática de las principales áreas en el cultivo de células y tejidos vegetales resaltando algunos de sus campos de aplicación (Modificado de Neumann *et al.*, 2009).

En términos prácticos, se pueden distinguir básicamente cinco áreas de trabajo en el cultivo de tejidos celulares: 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 8).

1.5. Cultivo de raíces

1.5.1. Raíces normales

Los cultivos de raíz pueden ser establecidos a partir de puntas de la raíz primaria o laterales de muchas plantas. Los explantes adecuados son pequeñas secciones que llevan el meristemo de la raíz. Dichos explantes se pueden obtener, por ejemplo, a partir de semillas germinadas en condiciones asépticas. Si los meristemos de las raíces pequeñas continúan con el crecimiento normal en un medio adecuado, producen un sistema de raíces que consiste solamente de raíces primarias y laterales (George, 2008).

Los explantes de raíces por lo general pueden ser cultivadas en medios relativamente simples, tales como el de White (1954) que contiene 2% de sacarosa. Para cultivo de raíces los medios líquidos son preferibles, ya que su crecimiento en un medio sólido o semisólido es más lento. Probablemente porque las sales están menos disponibles para las raíces y la disponibilidad de oxígeno puede ser restringida (George, 2008).

Para algunas especies, los cultivos de raíz pueden ser una fuente conveniente de material para la micropropagación de plantas, pero sólo son útiles para obtener brotes para micropropagación. Existen varias formas en que esto se puede lograr, aunque es un hecho que es eficaz para tan sólo un pequeño número de géneros de plantas, que por si mismas tienen una tendencia natural para producir brotes sobre raíces enteras o cortadas a través de:

- Brotes adventicios directos.
- Brotes o embriones procedentes de callos de raíz.
- Por la conversión de los meristemos de raíz a meristemos de brotes.

(George, 2008)

1.5.2. Raíces transformadas o pilosa

Es un tipo de cultivo de tejido vegetal que se utiliza para estudiar procesos metabólicos de plantas o para producir metabolitos secundarios valiosos o proteínas recombinantes, en combinación con la ingeniería genética vegetal. Las ventajas con las cuales se obtiene al utilizar este tipo de cultivo de tejido son:

- Las raíces peludas tienen una velocidad de crecimiento rápida.
- Son genéticamente estables.
- Son relativamente simples de mantener en medios libres de fitorreguladores.
- Proporcionan una fuente continua de metabolitos secundarios.

(Stiles & Liu, 2013)

Las raíces peludas son tejidos neoplásicos que se desarrollan como resultado de la expresión de los genes *rol* y los genes *aux* (*iaaM* y *iaaH*) de *Agrobacterium rhizogenes* transformados en genoma de la célula huésped después de la infección con esta bacteria Gram- negativa (Skarjinskaia *et al.*, 2013). El desarrollo de la raíz peluda se asocia con la formación de extensas raíces secundarias que pueden ser extirpadas y cultivadas indefinidamente bajo condiciones estériles. Estos cultivos se mantienen en medios que contienen una mezcla de sales, sacarosa y que carecen de productos de origen animal. Además, los medios de cultivo de raíces peludas son libres de hormonas.

1.6. Transformación genética de plantas

La transformación de plantas se refiere al evento de introducir e integrar DNA foráneo en células vegetales y regenerar plantas transgénicas. Los sistemas de transferencia pueden dividirse en dos grupos: los sistemas de transferencia directa de DNA y los basados en vectores biológicos (indirecta). Los sistemas de transferencia directa de DNA, están basados en la transferencia física, surgidos como una alternativa para transformar especies monocotiledóneas, que puede transferir DNA por bombardeo de partículas o biobalística, por cationes divalentes y/o electroporación. Por otra parte, en los sistemas basados en vectores biológicos, la transferencia puede ser mediada por *Agrobacterium*. La capacidad para introducir y expresar los genes específicos en las plantas proporciona una nueva y poderosa

herramienta experimental que permite pruebas directas en la fisiología de las plantas que han sido extremadamente difíciles de resolver.

1.6.1. Transformación genética vía *Agrobacterium rhizogenes*

La transformación genética utilizando *A. rhizogenes* se caracteriza por un crecimiento descontrolado de la raíz y un incremento notable en la producción de pelos radicales. Algunas plantas regeneradas a partir de raíces transformadas con *A. rhizogenes* se caracteriza por presentar entrenudos cortos, dominancia apical reducida y hojas arrugadas, mientras que otras presentan un genotipo completamente normal. *Agrobacterium rhizogenes* es una bacteria Gram-negativa, fitopatógeno natural del suelo que se desplaza mediante 2 a 3 flagelos y tiene un plásmido de más de 200 kb llamado "Ri" (inductor de raíces), mientras que para *A. tumefaciens* es "Ti" (inductor de tumores) (Chandra, 2012). Se sabe que las diferentes cepas de *A. rhizogenes* inducen tales raíces de las células de la planta huésped mediante la transferencia de su T-DNA (DNA de transferencia) a partir del plásmido inductor de raíces (Ri) hacia el genoma del huésped (Tepfer, 2016), es el único fragmento de DNA bacteriano que se transfiere a la célula vegetal durante el proceso de infección, codifica funciones para la conjugación del plásmido Ti / Ri, la síntesis de compuesto nitrocarbonados y el catabolismo, la iniciación, transferencia e integración del T-DNA.

El proceso de transformación genética inicia con el reconocimiento y unión de *Agrobacterium* a la célula de la planta a través de receptores específicos. Seguido de dos componentes de *Agrobacterium* (*virA* - *virG*), estos perciben señales específicas, de modo que *VirG* (que es un factor transcripcional) es activado para inducir la transcripción de la región de virulencia (*vir*) del plásmido Ti (para *A. tumefaciens*). Las proteínas codificadas por la región *vir*, generan la cadena sencilla del T-DNA, la cual forma un complejo con la proteína *VirD2*, que es transportado a través del pili que es formado por las proteínas *VirB2-11/D4*. En el citoplasma de la célula vegetal, al complejo T-DNA /*VirD2* se le unen proteínas *VirE2* que impide la degradación del T-DNA. Seguido, el complejo T-DNA /-*VirD2*/-*VirE2* es pasado hacia el núcleo, por proteínas del mismo hospedero, para su posterior integración

en el genoma de la célula hospedera, por recombinación ilegítima (McCullen & Binns, 2006) (Figura 9).

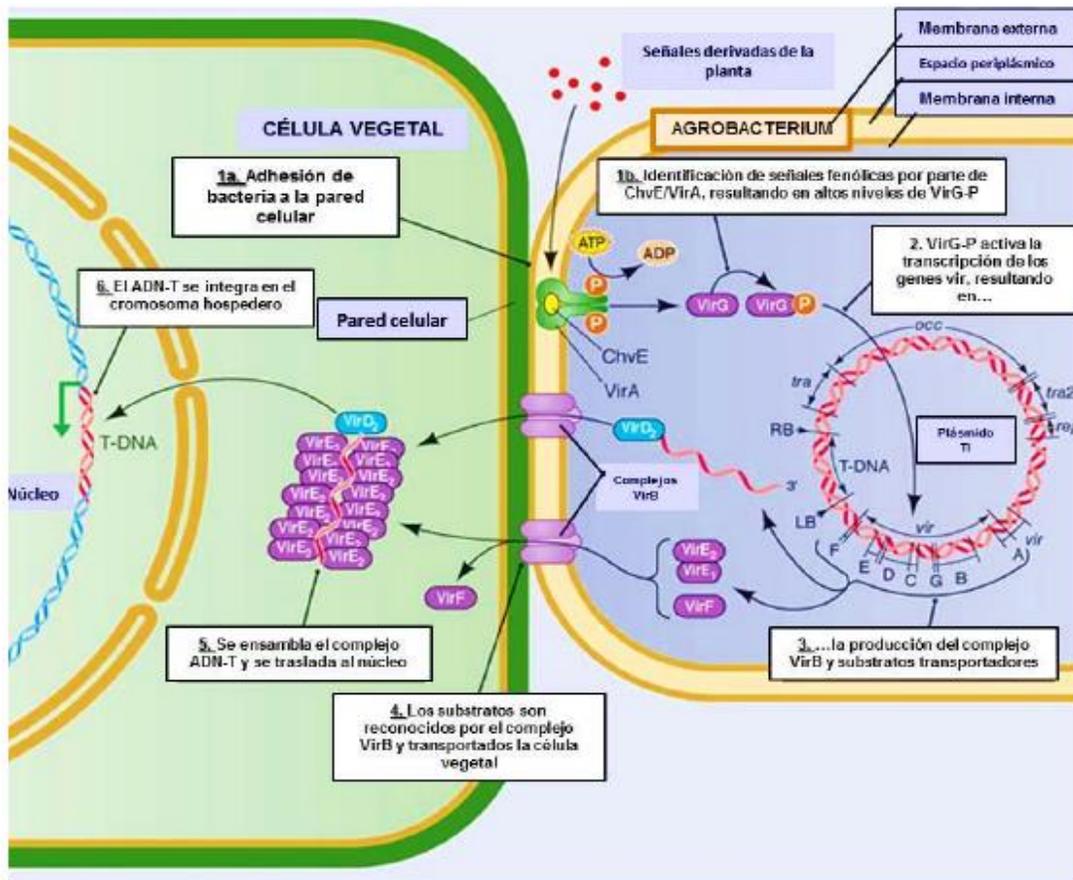


Figura 9. Proceso de infección de *Agrobacterium* en una célula vegetal (Modificado de McCullen & Binns, 2006). T-DNA; DNA transferido, virA, virG, virD2, virB, virE, virF; genes vir, RB; borde derecho, LB; borde izquierdo, ChvE; proteína de unión.

Los plásmidos Ri son clasificados de acuerdo al tipo de opinas producidas. En plásmidos tipo nopalina (Ti), manopina y cucumopina (Ri) se ha encontrado un solo T-DNA, mientras que en tipos octopina (pTi) y agropina (pRi) se han encontrado dos regiones (TL-DNA = DNA-T Izquierdo y TR-DNA = DNA-T Derecho) (Pavlova *et al.*, 2014). Los dos bordes T-DNA están separados por alrededor de 15 kb de DNA no transferido. El fragmento derecho (TR-DNA = DNA-TD) contiene genes homólogos a los genes de biosíntesis de auxinas como los *iaaM* y *iaaH* del T-DNA de los plásmidos Ti (Huffman *et al.*, 1984; Gelvin, 2012). Tanto DNA-TI y DNA-TD son transferidos e integrados de forma independiente en el genoma de la planta hospedera, pero la transferencia de DNA-TI es esencial para la inducción de “raíces

pilosas” y la transferencia de DNA-TD no provoca formación de raíces en cultivos transformados (Sevón & Oksman-Caldentey, 2002; Sandoval-Antúnez, 2014). (Figura 10; Tabla 4).

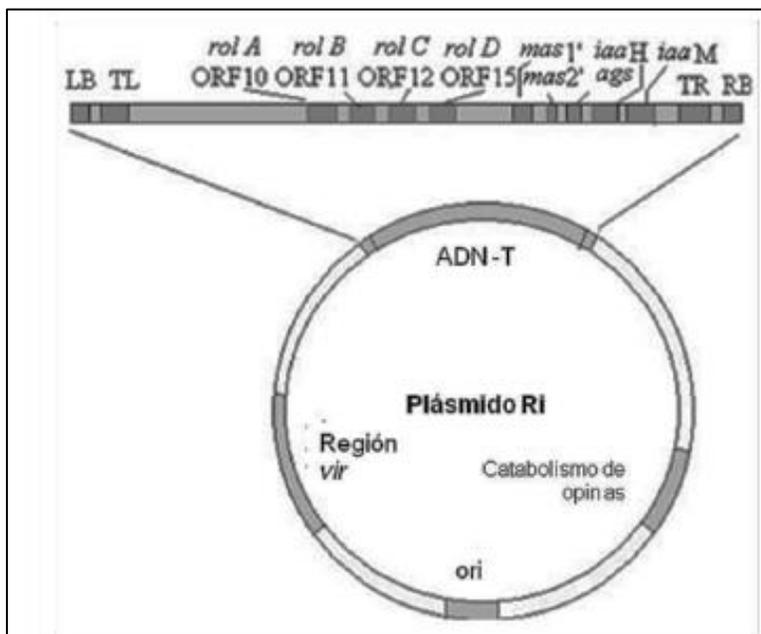


Figura 10. Presentación esquemática del plásmido Ri (modificado de Chandra, 2012)

Tabla 4. Principales características de los genes *Rol* (tomado y editado de Pavlova et al., 2014)

Gen	Característica	Función
ORF10 (<i>rolA</i>)	Gen de 300 kb y proteína de 11 kD.	Afecta la formación de haces vasculares, así como el acortamiento de entrenudos y formación de hojas arrugadas.
ORF11 (<i>rolB</i>)	Gen de 777 kb y proteína de 30 kD.	Es inducido por las auxinas, causa la formación de plantas ectópicas y afecta la formación de los meristemas.
ORF12 (<i>rolC</i>)	Gen de 540 kb y proteína de 20 kD.	Activa los procesos del metabolismo secundario además de conferir un espectro de defensa mayor en adición a esta estimulación.
ORF15 (<i>rolD</i>)	Proteína de 1032 kb	Se ha visto que causa la floración a temprana edad.

1.6.2 El 'efecto de los genes *rol*' en la producción de metabolitos secundarios

La preferencia por el sistema de plantas transformadas con Ri o raíces peludas sobre callos para la producción de metabolitos secundarios, se debió a sus altas tasas de crecimiento actuando como una fábrica para la producción continua de altas cantidades de compuestos importantes y la estabilidad en la acumulación de metabolitos a largo plazo (Häkkinen *et al.*, 2016; Roychowdhury *et al.*, 2016). Aunque hay varios otros factores que afectan la acumulación de metabolitos secundarios, incluyendo la composición de los medios y el pH, de reguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (ABA)) la cepa bacteriana utilizada para la inoculación, la temperatura y el efecto de los elicitores.

Efecto del gen *rolA* en la acumulación de metabolitos secundarios de plantas.

Existen pocos informes referentes al efecto del gen *rolA* sobre la producción de metabolitos secundarios (Palazón *et al.*, 1998; Shkryl *et al.*, 2007; Amanullah *et al.*, 2016). El primer informe en el que se observó que *rolA* estimulaba la producción de nicotina en líneas de raíces transformadas de *Nicotiana tabacum* fue el trabajo realizado por Palazón *et al.*, 1998. Más tarde, Shkryl *et al.*, 2007 en su trabajo de transformación de la planta *R. Cordifolia* con *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101) que alberga el gen *rolA* en su construcción (pPCV002-A), controlado por su propio promotor nativo. En este estudio, se investigó el efecto del gen *rolA* en la acumulación de antraquinona. Hubo un aumento de 2.8 veces en el contenido de antraquinonas en los callos transformados con *rolA* en comparación con los de tipo silvestre no transformados. En cultivos transformados con el gen *rolA* en plantas de *A. dubia*, se encontró que la artemisinina y sus compuestos derivados eran comparables a los de la planta no transformada (Amanullah *et al.*, 2016). Por lo tanto, por un lado, *rolA* mostró una mejora en la producción de metabolitos secundarios en las plantas transformadas de *N. tabacum* y *R. cordifolia* (Palazón *et al.*, 1998; Shkryl *et al.*, 2007;) y, por otro, mantuvo los niveles de producción de metabolitos secundarios comparables con las plantas de *Artemisia dubia* no transformadas.

Efecto del gen *rolB* sobre la acumulación de metabolitos secundarios

El gen *rolB* ha sido un regulador importante en la acumulación de metabolitos secundarios en la mayoría de los estudios, su presencia se ha relacionado positivamente con la producción de metabolitos secundarios, en plantas transformadas con los genes *rolA*, *rolC* y *rolABC*, con respecto a plantas no transformadas (Shkryl *et al.*, 2007 ; Kiselev *et al.*, 2007 ; Arshad *et al.*, 2014); Dilshad *et al.*, 2016; Grishchenko *et al.*, 2016).

En cultivos de callos transformados de *R. cordifolia* mostró un aumento de 15 veces en los niveles de antraquinona en comparación con el cultivo de callos no transformados. En este estudio, la estimulación del gen de la isocorismato sintasa (ICS) fue positivamente correlacionado con una mejora en el contenido antraquinona. En las líneas de callos transformados expresando niveles bajos de *rolB* produjeron niveles superiores al doble de antraquinonas, mientras que los transformantes que expresaban niveles medios y superiores del gen *rolB* produjeron 2.8 veces y 4.3 veces de antraquinonas, respectivamente. El efecto del gen *rolB* sobre la producción de otro metabolito de interés, como el resveratrol, fue estudiado por Kiselev *et al.*, (2007) en callos transformadas de *V. amurensis* Rupr. En comparación con los callos no transformados, se observó un aumento sorprendente de 100 veces en los callos transformados con *rolB*. También se demostró que los inhibidores de la tirosina fosfatasa desempeñaban un papel antagónico con los efectos estimulantes del gen *rolB*, lo que sugiere la participación de la fosforilación de la tirosina en el metabolismo secundario de las plantas. Grishchenko *et al.*, (2016) establecieron cultivos de callos transformados con *rolB*, de *M. amurensis* Rupr. y se estudió el rendimiento de isoflavonoides en los callos transformados. La acumulación de isoflavonoides en los callos transformados con *rolB* varió de 1.4 a 2.1% DW (peso seco) en comparación con 1.22% DW en el control de vector vacío.

Efecto del gen *rolC* sobre la acumulación de metabolitos secundarios

Hay varios informes disponibles que explican el papel de *rolC* como modulador de la producción de metabolitos secundarios entre diversos grupos de plantas

medicinales. (Palazón *et al.*,1998) examinaron los niveles de producción de nicotina en plantas transformadas con *rolC* de *N. tabacum* . En comparación con el control no transformado, las raíces de las plantas transformadas con *rolC* acumularon el doble de la cantidad de nicotina, y las hojas transformadas mostraron un aumento de tres veces. De forma similar, la transformación de *P. ginseng* con el oncogén *rolC* dio como resultado la producción de niveles triplemente más altos de ginsenósido (Bulgakov *et al.*, 1998). Los cultivos de callos transformados con *rolC* de *R. cordifolia* mostraron niveles de antraquinona 4.3 veces más altos en comparación con los callos del control (Shkryl *et al.*, 2007). (Dubrovina *et al.*, 2010) en su estudio con *V. amurensis* mostraron que las líneas de callos transformadas con *rolC* produjeron un aumento de 3.7 a 11.9 veces en el contenido de resveratrol en comparación con los callos no transformados. Se registró un aumento estable de dos a cuatro veces (estable durante un período de 2 años) en los niveles de polifenol en los callos transformados en *rolC* de *Cynara cardunculus* var. *atilis* DC (Vereshchagina *et al.*, 2014).

El contenido de artemisinina en la planta transgénica *rolC* de *A. annua* mostró un incremento de 4 a 4.6 veces (Dilshad *et al.*, 2015b). En el mismo estudio, artesunato y dihidroartemisina también aumentaron hasta 9.1 veces y 2 veces, respectivamente. Se llevó a cabo una investigación similar con otra especie de *Artemisia* , *A. carvifolia* (Dilshad *et al.*, 2015a), donde el contenido de artemisinina registrado en plantas transgénicas era hasta seis veces mayor que el determinado en plantas no transformadas. Se midió que el aumento en el contenido de artesunato, dihidroartemisina y arteméter era de hasta 8.9, 3.2 y 5 veces, respectivamente. Dilshad *et al.*, 2016 informaron un aumento doble del ácido caféico en plantas transformadas con *rolC* de *A. carvifolia* en comparación con controles no transformados. Además, tales plantas transformadas con *rolC* mostraron niveles aumentados de quercetina (cuádruple), isoquercetina (1.6 veces) y rutina (1.6 veces) en comparación con el control. Las plantas de *Lactuca sativa*, transformadas con *rolC*, mostraron una mejora en su contenido de

flavonoides en un rango de 7.5 – 8.2 µg/mL en comparación con el obtenido en el cultivo de control (5.1 µg/mL) (Ismail *et al.*, 2016).

El efecto estimulante de *rolC* sobre la acumulación de metabolitos secundarios fue bastante evidente en todos los ejemplos anteriores; sin embargo, es interesante observar que el gen *rolC* ha mostrado un efecto inverso sobre la producción de ciertos metabolitos en cultivos transformados de *Eritrichium sericeum* y *Lithospermum erythrorhizon* (Bulgakov *et al.*, 2005). En los cultivos transformados de *E. sericeum* con *rolC* (raíz y callos) y *L. erythrorhizon* (callos) mostraron un contenido reducido de radosina y ácido rosmarínico que sus controles respectivos. Grischenko *et al.*, 2013 reportaron cultivos de callos transformados de *M. amurensis* por *rolC* con una productividad de isoflavonoides ligeramente mayor en comparación con el control. Es interesante que, por un lado, en los cultivos de callos transformados por *rolC*, se obtuvieron mayores contenidos de seis isoflavonoides; Por otro lado, la producción de genistina disminuyó en comparación con el control. Este efecto de *rolC* sobre la producción de isoflavonoides fue estable durante 4 años.

Por lo tanto, el gen *rolC* mostró efectos estimulantes (Bulgakov *et al.*, 1998 ; Palazón *et al.*, 1998 ; Shkryl *et al.*, 2007 ; Dubrovina *et al.*, 2010 ; Vereshchagina *et al.*, 2014 ; Dilshad *et al.*, 2015a, Dilshad *et al.*, 2015b, Dilshad *et al.*, 2016 ; Ismail *et al.*, 2016) y efectos inhibitorios (Bulgakov *et al.*, 2005) sobre los niveles acumulados de metabolitos secundarios. El gen *rolC* podría considerarse responsable de la regulación diferencial de diferentes metabolitos secundarios dentro de la misma planta transformada, lo que provoca un aumento en el nivel de un compuesto y una reducción en el nivel de otros, simultáneamente (Grishchenko *et al.*, 2013).

1.7. Elicitores

Los elicitores son sustancias químicas que desencadenan la activación de las respuestas de defensa de las plantas, incluida la acumulación de fitoalexina. (Ferrari, 2010). Estos productos químicos pueden ser agentes abióticos, como iones metálicos y compuestos inorgánicos, o pueden derivarse de otros organismos, como

moléculas derivadas de hongos, bacterias, virus o herbívoros, así como productos químicos derivados de plantas que se liberan en el sitio de ataque o acumularse sistémicamente luego de un ataque de patógenos o herbívoros. Los elicitores bajo este criterio se pueden clasificar como endógenos y exógenos. (Wang & Wu, 2013). Los elicitores endógenos se originan en la planta como resultado de su interacción con el agresor y desempeñan papeles importantes en el sistema de transducción de señales intracelulares. Entre los mejor caracterizados se encuentran los oligosacáridos pécticos liberados de las paredes celulares de las plantas [oligogalacturonides (OGA) de la pectina de los cítricos] y los compuestos de señal intracelulares (o segundos mensajeros), como sistemina, ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), y compuestos relacionados como jasmonato de metilo (MeJA). Los elicitores endógenos también pueden estar involucrados en la mediación de las respuestas de las plantas a los estreses abióticos. Los elicitores exógenos se originan a partir del patógeno microbiano o el agresor, principalmente hongos y bacterias, y algunos de virus e insectos. Los compuestos elicitores más conocidos incluyen péptidos, polisacáridos y glicoproteínas derivadas de células microbianas y vegetales. Los indicadores para estimular la producción de metabolitos secundarios en cultivos de tejidos vegetales generalmente se clasifican como bióticos y abióticos en función de su origen. Los elicitores bióticos se originan a partir de fuentes microbianas y vegetales; los elicitores abióticos incluyen varios factores estresantes químicos y físicos, como la radiación UV, los metales pesados y el choque osmótico. En la Tabla 5 se muestran algunos trabajos en la elicitación de metabolitos secundarios utilizando los diferentes tipos de elicitores. En la Tabla 6 se muestran algunos ejemplos de producción de metabolitos secundarios (terpenoides) aumentada a través del uso de elicitores.

Tabla 5. Elicidores bióticos y abióticos y sus metabolitos secundarios en cultivos de raíces peludas (modificado de Wang & Wu, 2013).

Tipo de elicitor	Agentes del elicitor	Productos	Planta
Elicitor biótico			
Bacteria viva	<i>Rhizobium</i> spp.	Nodulación de raíces	<i>Pachyrhizus erosus</i>
	<i>Bacillus cereus</i>	Tanshinona	<i>Salvia miltiorrhiza</i>
Elicitor de levadura	Extracto de levadura	Saponina de ginseng	<i>Panax ginseng</i>
		Tanshinonas y ácidos fenólicos	<i>Salvia miltiorrhiza</i>
		Artemisinina	<i>Artemisia annua</i>
		Alcaloides de tropano	<i>Brugmansia candida</i>
		Flavonoides totales	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>
		Glucotropolina	<i>Tropaeolum majus</i>
Moléculas de señal			
	Jasmonato de Metilo (MeJA)	Paclitaxel	<i>Taxus × media</i> var. <i>Hicksii</i>
		Tanshinonas	<i>Salvia miltiorrhiza</i>
		Asiaticosido	<i>Centella asiatica</i>
		Artemisinina	<i>Artemisia annua</i>
		Alcaloides indol monoterpénoides	<i>Ophiorrhiza pumila</i>
	SA	Alcaloide de tropano	<i>Catharanthus roseus</i>
		Saponina de ginseng	<i>Panax ginseng</i>
		Alcaloides de tropano	<i>Atropa belladonna</i>
		Alcaloides indol monoterpénoides	<i>Atropa belladonna</i>

Tabla 5. (continuación) Elicitores bióticos y abióticos y sus metabolitos secundarios en cultivos de raíces peludas (modificado de Wang & Wu, 2013)

Elicitores abióticos			
Iones de metales pesados	Ag ⁺ (Ag ₂ S ₂ O ₃)	Tanshinone	<i>Salvia miltiorrhiza</i>
	VO _{SO} ₄	Thiarubrine A	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>
		Ginsenósido total	<i>Panax ginseng</i>
Luz y radiación UV	Luz de diferentes rangos espectrales (fluorescente, halogenuros metálicos, azul, rojo y azul más luz roja)	Saponina de ginseng	<i>Panax ginseng</i>
	Luz continua (lámparas fluorescentes de color blanco frío, 40 μM m ⁻² s ⁻¹) y en la oscuridad continua	Diterpenoides (ferruginol, salvipisona, aethiopinone, y 1-oxoaethiopinone) Dos tipos de triterpenoides de tipo ursene	<i>Salvia sclarea</i>
	Luz 280-315 nm a 9,000 μW / cm ²	Alcaloides indólicos terpenoides totales, lochnericina, estricitosidina	<i>Catharanthus roseus</i>
Estrés osmótico	Sorbitol	Tanshinones	<i>Salvia miltiorrhiza</i>
		Alcaloides indol monoterpenoides	<i>Ophiorrhiza pumila</i>

Tabla 6. Ejemplos de producción de metabolitos secundarios (terpenoides) aumentada a través del uso de elicitores (modificado de Giri & Zaheer, 2016)

Especie planta	Sistema de cultivo	Concentración del elicitador	Producto	Mejora máxima del rendimiento	Referencia
<i>Salvia castanea</i>	HR	MeJA (200 µM), Ag ⁺	Tanshinona	1.99	(Li <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ocimum basilicum</i> , <i>Ocimum kilimandscharicum</i> , <i>Ocimum sanctum</i>	C	MeJA (200 µM)	Ácido Betulínico	1.9	(Pandey <i>et al.</i> , 2015)
<i>Gymnema sylvestre</i>	CS	MeJA (150 µM), SA	Acido gimnemico	15.4	(Chodiseti <i>et al.</i> , 2015)
<i>Anisodus luridus</i>	HR	ASA (1000 µM), UV-B	Alcaloides de tropano	6.2	(Qin <i>et al.</i> , 2014)
<i>Panax ginseng</i>	HR	MeJA (100 µM)	Ginsenósido Rg3	5.0	(Kim <i>et al.</i> , 2013)
<i>Eryngium planum L</i>	C, CS	MeJA (100 µM)	Ácido Rosmarinico CGA, CA	3.0	(Kikowska <i>et al.</i> , 2012)
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	HR	MeJA (100 µM) SNP	Tanshinona	3.9	(Liang <i>et al.</i> , 2012)
<i>Vitis vinifera</i>	CS	MeJa (25 µM) CD	Trans resveratrol	713.0	(Belchi-Navarro <i>et al.</i> , 2012)
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	HR	MeJA (100 µM), Ag ⁺	Tanshinona	5.7	(Kai <i>et al.</i> , 2012)
<i>Artemisia annua</i>	CS	MeJA (22 µM), miconazole	Artemisinina	3.0	(Caretto <i>et al.</i> , 2011)

Tabla 6 (continuación). Ejemplos de producción de metabolitos secundarios (terpenoides) aumentada a través del uso de elicitores. (modificado de Giri & Zaheer, 2016).

Especie planta	Sistema de cultivo	Concentración del elicitor	Producto	Mejora máxima del rendimiento	Referencias
<i>Artemisia annua</i>	CS	MeJA (100 μ M), CD (50,000 IM)	Artemisinina	300.0	(Durante <i>et al.</i> , 2011)
<i>Artemisia annua</i>	MS	DMSO (0.25 v/v)	Artemisinina	2.26	(Mannan <i>et al.</i> , 2010)
<i>Artemisia annua</i>	HR	SNP (10 μ M), CB, NO	Artemisinina	2.3	(Wang <i>et al.</i> , 2009)
<i>Artemisia annua</i>	HR	SNP (50 μ M), NO, OSE	Artemisinina	2.0	(Zheng <i>et al.</i> , 2008)
<i>Centella asiatica</i> , <i>Ruscus aculeatus</i> , <i>Galphimia glauca</i>	WPC	MeJA (100 μ M)	Triterpeno, esteroles	152.0	(Mangas <i>et al.</i> , 2006)
<i>Taxus yunnanensis</i>	CS	US + SNP (10 μ M)	Baccatin	8.0	(Wang <i>et al.</i> , 2006)
<i>Coleus forskohlii</i>	HR	MeJA (100 μ M), SA	Ácido Rosmarínico	3.4	(Li <i>et al.</i> , 2005)

C callos, CS suspensión celular, CB cerebrósido, CD ciclodextrinas, SNP nitroprusiato de sodio, MS brotes múltiples, HR cultivo de raíces, US ultrasonido, WPC cultivo de plantas enteras. NO óxido nítrico, OSE oligosacárido elicitor, DMSO dimetilsulfóxido, SA ácido salicílico,

1.7.1. Modo de acción de los elicitores

Los elicitores son percibidos por receptores específicos en la membrana plasmática que dan como resultado su despolarización que conduce a la activación de canales, como el canal antiportador K^+ / H^+ . La acidificación citoplásmica transitoria debido a K^+ / H^+ el intercambio y eflujo de Cl^- , actúan como una señal para la producción de metabolitos secundarios (Zhao *et al.*, 2005).

La percepción del elicitor por los receptores también puede activar proteínas G o la cascada de proteínas quinasa activada por mitógenos. (MAPK). La cascada MAPK consiste en una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), MAPK quinasa (MAPKK) y MAPK que se activan secuencialmente por fosforilación (Zhang & Klessig, 2001). Los flujos de iones Ca^{2+} inducidos por el inductor dan como resultado niveles elevados de iones calcio libres citoplasmáticos que desencadenan muchos procesos intracelulares. Ca^{2+} se une a los sensores Ca^{2+} como la calmodulina y estimula a las proteínas dependientes Ca^{2+} quinasas (CDPK), enzimas unidas a la membrana y proteínas fosfatasas que, en consecuencia, desempeñan un papel en las respuestas de defensa, incluida la producción de metabolitos secundarios (Ludwig *et al.*, 2004). Los receptores ligados a la proteína G también son conocidos por activar las fosfolipasas C (PLC) que hidrolizan los fosfolípidos de la membrana como fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato (PIP₂), lo que resulta en la producción de mensajeros secundarios, diacilglicerol (DAG) e inositol- 1,4,5-trisfosfato (IP₃) (Meijer & Munnik, 2003). DAG activa la proteína quinasa C (PKC) que a su vez activa varias proteínas dentro de la célula por fosforilación (Kurosaki *et al.*, 1987). IP₃ moviliza los iones Ca^{2+} a través de un canal de iones Ca^{2+} desde las reservas de calcio intracelular, como el retículo endoplásmico (ER), el aparato de Golgi y las vacuolas, hasta el citosol. Cabe señalar que el ion Ca^{2+} también regula a la PLC, que se sabe que produce mensajeros secundarios, incluido el jasmonato. Se sabe que el ion Ca^{2+} activa en la membrana celular NADPH oxidasa (NOX), peroxidasa apoplástica u otras oxidasas en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas para generar especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Tuteja & Mahajan, 2007). Todos estos eventos de transducción de señales conducen finalmente a la activación de la biosíntesis de

novo de factores de transcripción que a su vez regulan la expresión de genes de defensa que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de señales secundarias o metabolitos secundarios (Ferrari, 2010; Zhao *et al.*, 2005). Además, existe una comunicación entre dos o más vías de señalización que permite la regulación de diferentes genes, tanto temporales como espaciales, frente a diferentes tipos de estrés (Ramirez-Estrada *et al.*, 2016). El diálogo cruzado más común es la interacción de las vías de señalización del ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) y los factores de transcripción como ORA59 (Pré *et al.*, 2008), CEJ1 (Nakano *et al.*, 2006), ERF1 (Lorenzo *et al.*, 2003). De manera similar, las cascadas MAPK también están involucradas en ET, JA y muchas otras vías de señalización celular (Jonak *et al.*, 2002). Del mismo modo, ROS puede activar la cascada de MAPK y viceversa (Ahmad *et al.*, 2008). Por lo tanto, las actividades celulares de plantas a nivel bioquímico y molecular pueden alterarse mediante la acción de elicitores que regulan un gran número de puntos de control bioquímicos y desencadenan la expresión de genes reguladores (Zhao *et al.*, 2005; Baenas *et al.*, 2014). Cabe señalar que la vía de los metabolitos secundarios es muy específica para el tipo de inductor al que están expuestas las células, y existe una variabilidad en el mecanismo de acción que implica un amplio rango de respuestas metabólicas al estrés en las plantas. Como resultado, el efecto de provocación sobre la producción de metabolitos secundarios en células vegetales es muy empírico. En la Figura 11, se ilustra los diferentes modos de acción de los elicitores mencionados.

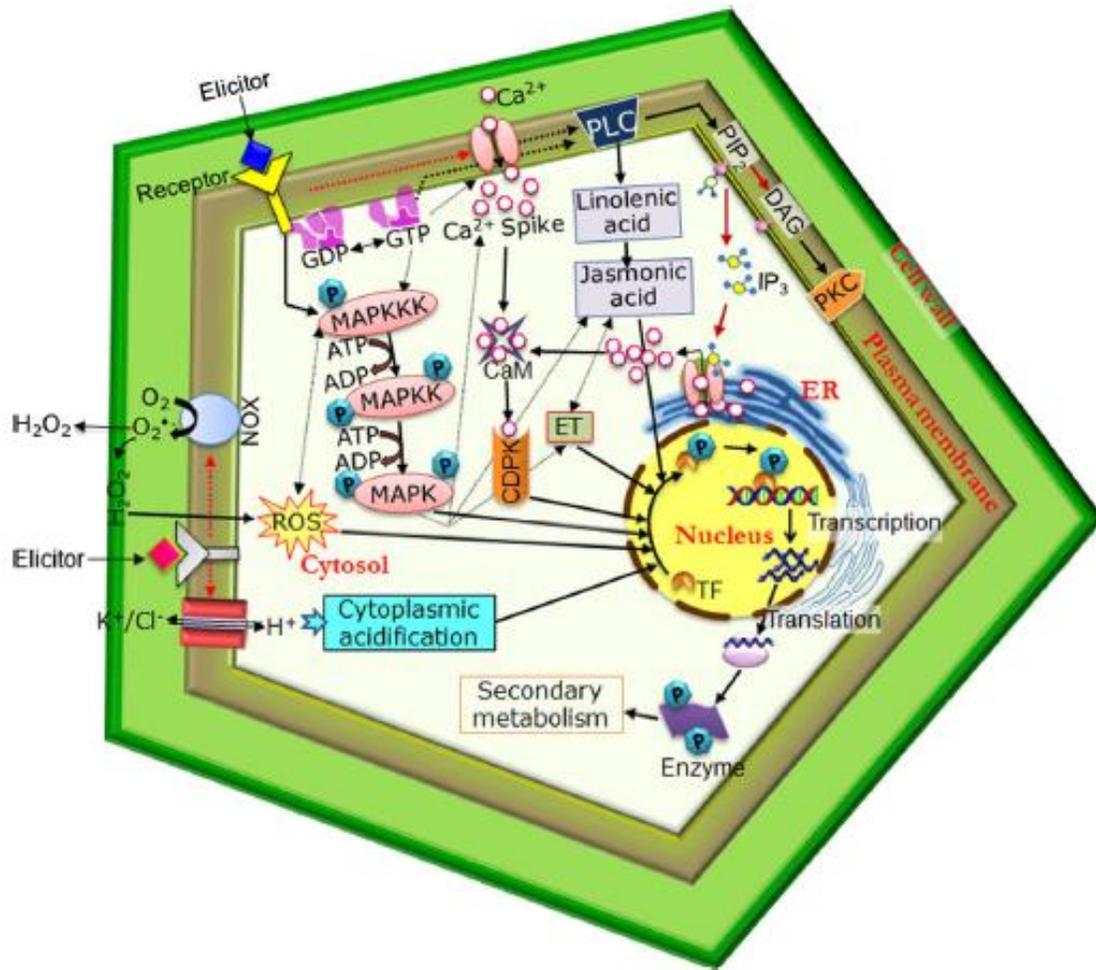


Figura 11. Ilustración de la vía de transducción de señal inducida por el elicitor para la producción de metabolitos secundarios de plantas. Imagen tomada de Narayani & Srivastava, 2017

Justificación

El ácido betulínico es usado ampliamente en la medicina tradicional maya y se tienen reportes de que su producción se puede mejorar en cultivos de raíces transformadas. Así, la obtención de raíces pilosas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin utilizando el método de transformación genética vía *Agrobacterium rhizogenes* es 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, a partir de explantes de diferentes partes de plántulas, transformadas con la cepa bacteriana *A. rhizogenes*, y sometidas en tres condiciones de crecimiento (fotoperiodo, luz continua y oscuridad) se evaluó el efectos de elicitores químicos (AS y MeJa) sobre la producción de ácido betulínico en este modelo experimental que eventualmente ayudaría a evitar la desaparición de las poblaciones silvestres de la especie, de donde actualmente se colectan las raíces de las plantas en campo, para su uso tópico.

Hipótesis

El uso de elicitores químicos aumentará la concentración de ácido betulínico en los cultivos de raíces transformada de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin.

Objetivo general

Evaluar el efecto del ácido salicílico y el jasmonato de metilo sobre la producción de ácido betulínico en las raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* a escala de matraz.

Objetivos específicos

- Establecer cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin a partir de explantes de raíz, hipocótilo y hoja,

- Determinar la presencia de ácido betulínico en las raíces transformadas en tres condiciones de cultivo (luz, fotoperiodo y oscuridad)
- Caracterizar el crecimiento y la producción de ácido betulínico de las tres líneas de raíces transformadas (raíz, hipocótilo y hoja) en la condición de cultivo previamente determinada.
- Evaluar el efecto de los elicitores ácido salicílico y jasmonato de metilo sobre la producción de ácido betulínico en una de las líneas de raíces transformadas.

Estrategia experimental.

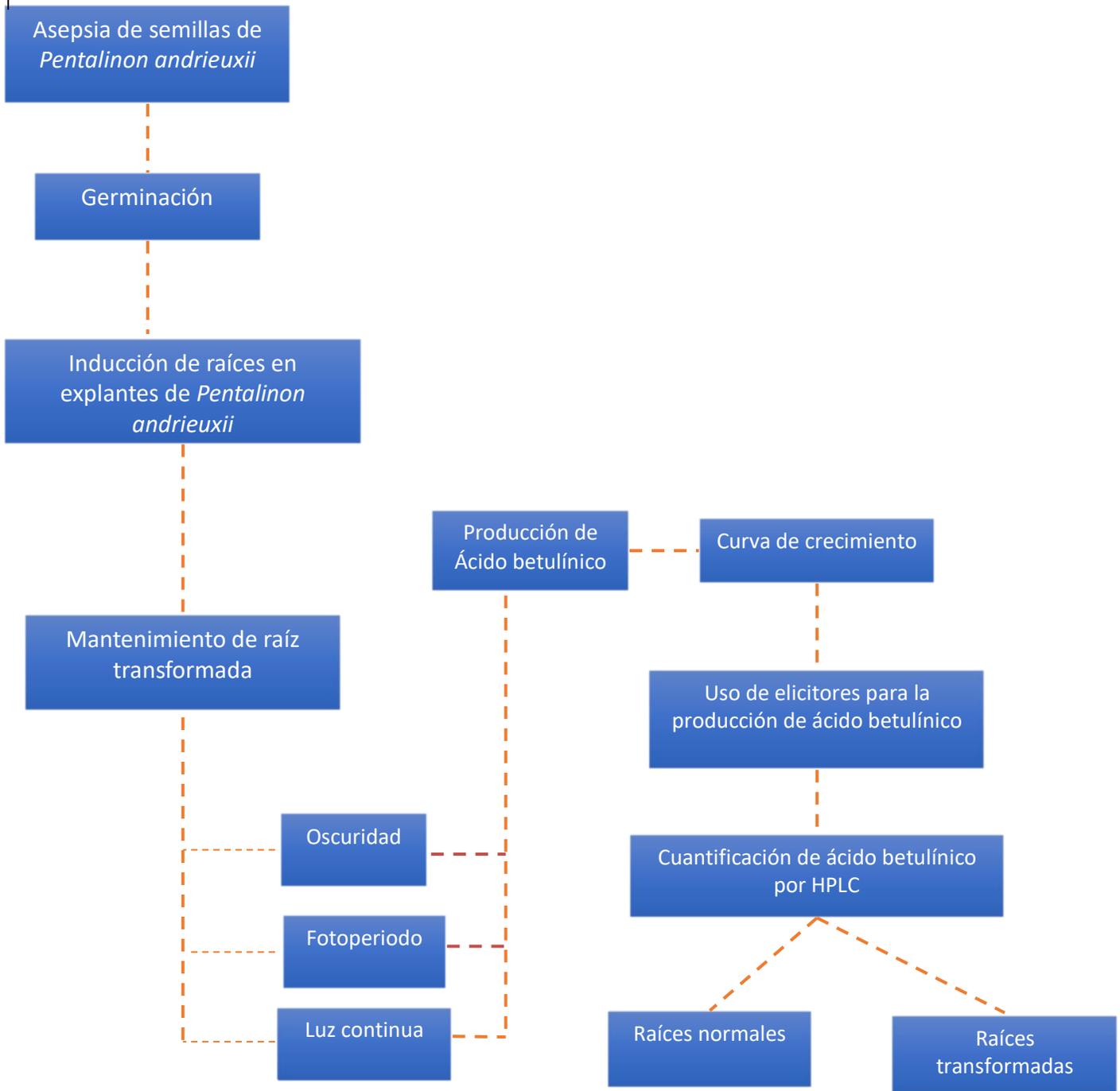


Figura 12. Diseño experimental

La estrategia experimental (Figura 12) consiste en obtener cultivos de raíces transformadas con *A. rhizogenes*, a partir de diferentes explantes (raíces, hipocótilo y cotiledones de plántulas) con el fin de seleccionar la que tenga un mejor rendimiento en la producción de ácido betulínico. Una vez seleccionada la línea de raíces, se expondrá a diferentes condiciones de iluminación (oscuridad, fotoperiodo y luz continua) para determinar aquella que promueve la mayor producción de ácido betulínico. Dicha condición se combinará con tratamientos con ácido salicílico y jamonato de metilo, para el tiempo de aplicación y la concentración que promueva la acumulación de este metabolito.

CAPÍTULO II

Materiales y métodos

Material vegetal

Para la producción de plántulas *in vitro* y la obtención de explantes (raíces, hipocótilos y hojas), se utilizaron semillas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin, colectadas en abril del 2017 (21°00'10.0"N 89°35'31.9"W) y pertenecientes al laboratorio 26 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Las semillas para su germinación fueron agrupadas en tres lotes: lote 01, fecha de siembra 08 de mayo de 2017; lote 02, fecha de siembra 16 de mayo de 2017 y el lote 03, fecha de siembra 29 de mayo de 2017.

Protocolo de germinación de semillas

Se siguieron los protocolos de Martín-Acosta 2012 y May-Mendoza 2016, brevemente:

En condiciones de laboratorio:

- 0.3 g de semillas secas se lavaron con Extrán al 5% durante cinco minutos seguido de:
- Cinco lavados con agua estéril
- Un lavado con etanol al 70% durante cinco minutos
- Dos a cuatro lavados con agua estéril.

Dentro de una campana de flujo laminar y utilizando material estéril:

- Un lavado con cloro comercial al 50%, con agitación durante 20 minutos.
- Lavados sucesivos rápidos con agua estéril hasta eliminar el cloro comercial.
- Mantener en agua estéril para mantener la humedad.
- Eliminar el exceso de agua, con ayuda de un colador.
- Colocar las semillas en posición vertical en frascos de cristal con medio de cultivo PC (Phillips y Collins, 1979).
- Mantener los frascos con semillas en un cuarto de cultivo en obscuridad y a 25° C durante dos semanas.

Transformación genética

La inducción de raíces transformadas se llevó a cabo siguiendo el protocolo de May-Mendoza (2016), utilizando la cepa ATCC15834-RFP de *A. rhizogenes*. El protocolo de transformación consistió en:

- Cultivar la cepa en 20 mL de medio YM (K₂HPO₄ 500mg/L, MgSO₄.7H₂O 200mg/L, NaCl 100mg/L, manitol 1000mg/L, extracto de levadura 400mg/L a un pH de 7.2 y libre de antibiótico) por 48 horas en agitación constante a 200 rpm en un orbitador protegido de la luz.
- Inocular 10 mL de medio YM fresco con 200 µL del cultivo anterior e incubar por 24 horas en las mismas condiciones descritas.
- Hacer una dilución 1:1 (V: V) de este último cultivo con medio YM y adicionar 10 µL acetosiringona (100 µM). Incubar por cinco horas en las mismas condiciones.
- Sumergir explantes (segmentos de hipocótilo, raíz y hoja de plántulas de un mes y medio de edad germinadas *in vitro*), en el cultivo bacteriano descrito a una D.O. = 0.1, adicionado con 25 µL de acetosiringona 200 mM.
- Aplicar vacío (15 inHG) durante 20 minutos.
- Secar los explantes infiltrados con papel secante estéril, sembrarlos en cajas de Petri con medio PC semisólido libre de reguladores de crecimiento y mantenerlos durante 2 días en oscuridad.
- Pasar los explantes cocultivados con la bacteria a frascos con medio PC semisólido y adicionado con cefotaxima (250 mg/L), mantenerlos en condiciones de luz continua para promover organogénesis.

Aproximadamente cuatro semanas después del proceso de transformación, se puede ver la formación de raíces, mismas que una vez que alcanzan una longitud aproximada de cinco cm, se cortan y se transfieren a medio PC líquido con cefotaxima (250 mg/L), manteniéndose en un orbitador a 25°C bajo luz continua.

Mantenimiento de raíces transformadas

Las raíces transformadas se resebraron cada 30 días en medio PC líquido (pH 5.5) adicionado con cefotaxima (250 mg/mL). Para la resiembra, las raíces se seccionaron en dos o más partes, dando preferencia para su conservación a las más jóvenes, que se distinguen por presentar una coloración verde-claro, en comparación con las raíces viejas, que presentan una coloración pardo-oscura.

Extracción de DNA.

Protocolo DNeasy Plant Mini KIT (QIAGEN) (a partir de tejido foliar joven)

Se siguió el protocolo de extracción, utilizando el Kit de extracción DNeasy® de la firma comercial QIAGEN (con columnas).

Comprobación de transformación genética por PCR

Amplificación del gen *roIC*.

La PCR “polymerase chain reaction” (reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica que tiene por objetivo amplificar específicamente un fragmento de DNA, por lo cual se realizó para determinar la presencia del gen *roIC* en los tejidos vegetales sometidos al proceso de transformación con la cepa ATCC15834 de *A. rhizogenes* que también porta el gen de la proteína roja fluorescente. Para comprobar la transformación de las raíces se utilizó el protocolo de Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific). Esta técnica consistió en tomar 0.3 mm del tejido de raíz y se colocó directamente al tubo de PCR con 20 µL de buffer de dilución, luego se mezcló durante tres minutos, con ayuda de una punta de micropipeta de 200 µL

Los componentes que se utilizaron para llevar a cabo la reacción PCR se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción de PCR

Componentes	1 rnx	4 rnx
2x Phire Plant PCR buffer	10 µL	40 µL
Oligonucleótido <i>roIC1</i>	1 µL	4 µL
Oligonucleótido <i>roIC2</i>	1 µL	4 µL
Phire Hot Start II DNA Pol	0.4 µL	1.6 µL
DNA	1.5 µg	-- µg
H ₂ O	6.1 µL	24.4 µL
Total	20 µL	74 µL

Para las reacciones de PCR se utilizaron los pares de oligonucleótidos de acuerdo con Bonhomme *et al.*, 2000, que son específicos para amplificar el gen referido (*rolC*).

Oligonucleótidos *rolC* (número de acceso: X64255)

5´- CGTTGTCGGAATGGCCCAGACC -3´ (forward primer)

5´- CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC -3´ (reverse primer)

Las PCR para la amplificación del gen *rolC*, se realizaron en un termociclador (BioRad Modelo: T100) programado con las siguientes condiciones:

<i>Etapas</i>	<i>Temperatura y tiempo</i>	<i>Ciclos</i>
<i>Iniciación</i>	98 °C x 5 minutos	-
<i>Desnaturalización</i>	98°C x 5 segundos	
<i>Alineamiento</i>	54°C x 5 segundos	40
<i>Extensión</i>	72°C x 30 segundos	
<i>Extensión final</i>	72°C x 1 minuto	-

Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis (85 V/40 minutos) en geles de agarosa al 1%, y se visualizaron con luz UV.

Caracterización del crecimiento y la producción de ácido betulínico de las líneas de raíces transformadas.

Curvas de crecimiento

Tres líneas de raíces transformadas obtenidas a partir de diferentes explantes (raíz, hipocotilo, hoja) y mantenidas en tres condiciones (luz contúa, obscurida y fotoperiodo), se caracterizaron en cuanto a su crecimiento a través del tiempo. La recolección de muestras se realizó cada tercer día durante un periodo de 48 días. Para obtener las curvas de crecimiento, se utilizaron 48 matraces Erlenmeyer de 250 mL para cada una de las líneas de raíces transformadas. En cada matraz conteniendo 75mL de medio líquido PC se inoculó un gramo de raíz transformada

de cada tipo de explante. Los datos de peso fresco se registraron en una balanza analítica y las muestras se guardaron en frascos Gerber estériles que se congelaron a -20°C. Posteriormente, cada una de las muestras se sometió a un proceso de liofilización y se pesaron para obtener los datos del peso seco.

Para cada muestra se registraron datos de biomasa: peso fresco y peso seco, así como la conductividad de los medios. Para medir la conductividad se utilizó un conductímetro (Marca HACH, modelo sensION EC5), colocando el tubo dentro del medio de cultivo líquido contenido en los matraces.

Una vez registrados los datos, las raíces fueron congeladas a -20°C para su posterior protocolo de extracción y cuantificar el ácido betulínico.

Con los datos se realizaron los cálculos de índice de crecimiento, tasa de crecimiento específico y el tiempo de duplicación, para cada una de las tres líneas utilizando las ecuaciones descritas por: Godoy-Hernández & Vázquez-Flota, (2006) cuyas fórmulas se describen a continuación:

Índice de crecimiento:

$$GI = \frac{Wf - W_0}{W_0}$$

Donde:

GI: índice de crecimiento

Wf: peso final

W₀: peso inicial

Tasa de crecimiento específico:

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{T}$$

Donde:

ln X₀: logaritmo natural de la biomasa inicial

ln X: logaritmo natural de la biomasa a tiempo (T)

T: tiempo

μ: tasa de crecimiento específico

Tiempo de duplicación:

$$dT = \frac{\ln 2}{\mu}$$

μ: tasa de crecimiento específico

Con los datos obtenidos, se realizó la cinética de crecimiento para las raíces transformadas.

Preparación de elicitores

Se utilizó el elicitor jasmonato de metilo, presentación líquida, de la marca Sigma, para su esterilización se filtró la solución con un filtro estéril.

La preparación del elicitor ácido salicílico (marca Sigma), se realizó utilizando 0.55248 gr de ácido salicílico, mezclado en 25 mL de agua destilada, ajustando su pH a 5.5 y su posterior disolución en el medio PC, alcanzando una concentración de 200 mM, la solución se llevó a esterilizar en la autoclave a una temperatura de 120°C y 1.2 psi. Ambos elicitores se añadieron a una concentración final de 100 µM y 200 µM al medio de cultivo de la raíz transformada que mostró un mayor crecimiento (biomasa) y una mayor producción de ácido betulínico. La elicitación se realizó al día 30 de cultivo de las raíces y se realizó un seguimiento durante 9 días tomando una muestra cada tres días. Al mismo tiempo del cultivo de raíces transformadas, se tuvo un cultivo control (raíz transformada) para observar la producción de ácido betulínico y poder comparar con las raíces tratadas.

Extracción de ácido betulínico mediante las preparaciones de fracciones de polaridad media

Para obtener los extractos metanólicos de las raíces transformadas, se congelaron tres gramos de raíces, durante dos días a -20 °C, después se liofilizaron durante dos días. Las muestras de entre 2.0 g y 1.9 g, totalmente secas, fueron cortadas y colocadas en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, luego fueron sonicados con 20 mL metanol al 99%, durante 20 minutos a 40° C después el disolvente fue evaporado en un rotavapor a una presión de 337 mBar durante 12 a 15 minutos. Los extractos metanólicos crudos fueron sonicados nuevamente ahora con 20 mL de diclorometano al 99% durante 20 minutos a 40°C, posteriormente el disolvente fue evaporado en el rotavapor a una presión de 500 mBar durante cinco minutos y colocados en viales previamente tarados.

La extracción de ácido betulínico en el medio líquido, donde se encontraban las raíces transformadas no se realizó, ya que Sandoval-Antúnez, 2014 reporta que en los extractos de medio líquido no se aprecia la producción de ácido betulínico.

Detección de ácido betulínico por HPLC

El método cromatográfico que se utiliza para la cromatografía de líquidos (HPLC) está basado de acuerdo con lo reportado por Hiebert-Giesbrecht, 2015 para la cuantificación de ácido betulínico. El método fue ligeramente modificado empleándose una fase móvil de acetonitrilo-agua (90:10 v:v) y una absorbencia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) < 210 nm. Las muestras se prepararon con metanol grado HPLC al 1% (1 mg/mL), haciendo 3 inyecciones de 20 μL con un tiempo de corrida de 14 minutos para cada una en el equipo HPLC Agilent 1100. La muestra fue eluida a través de una columna de fase reversa (C18), donde la interacción entre las fases (móvil y estacionaria) determinó su resolución.

CAPÍTULO III

Resultados

Establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin

Debido a que las cuatro líneas de raíces transformadas para la producción de metabolitos más abundantes de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin, caracterizadas por Raymundo Llanes, en el laboratorio 26 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, perdieron su capacidad de crecimiento y se contaminaron con hongos, se decidió por la inducción y obtención de nuevas líneas celulares.

Obtención de explantes de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin

Para cada uno de los lotes de siembra se usaron 0.3g de semillas (~100 semillas). Las semillas fueron colectadas en abril del 2007 por el Dr. Godoy-Hernández en Mérida Yucatán (21°00'10.0"N 89°35'31.9"W). El lote en el que se tuvo el mayor porcentaje de germinación fue el 03 con un 95%. Los porcentajes de germinación para cada uno de los lotes están registrados en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentajes de germinación de semillas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin

Número de lote	Fecha de siembra	Núm. de semillas	Núm. de semillas germinadas	Porcentaje de germinación
01	8/05/2017	100	20	20%
02	16/05/2017	100	94	94%
03	29 /05/2017	100	95	95%

Proceso de infección con *Agrobacterium rhizogenes*

La obtención de las raíces transformadas se realizó a partir de la infección con la cepa de *A. rhizogenes* de tres tipos de explantes: hoja, raíz e hipocótilo que en todos los casos fue exitosa (Figura 13).

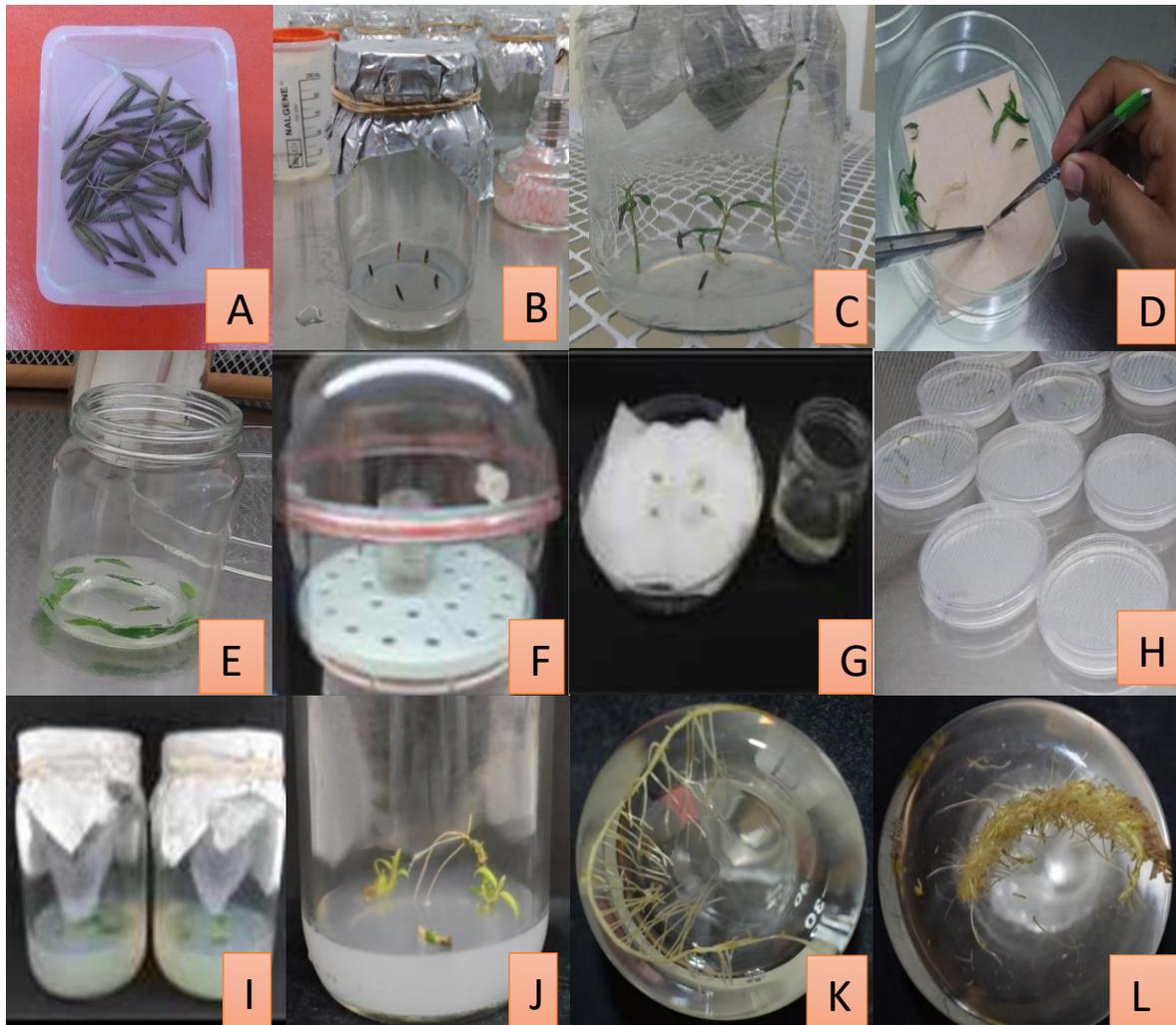


Figura 13. Proceso de transformación de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin mediado por *Agrobacterium rhizogenes*. A-B; proceso de desinfección de la semilla, C; germinación de la semilla de *Pentalinon andrieuxii*, D; cortes a los explantes, E-H; proceso de infección con la cepa ATCC15834-RFP *A. rhizogenes*. I; cocultivos de explantes en condición de luz continua, J; formación de raíces de explante de hipocótilo, K-L; mantenimiento de las raíces transformadas.

En la primera y segunda transformación realizadas aplicando vacío, el hipocótilo presentó una frecuencia de transformación de 20.6% y 45%, que corresponden a seis y diez explantes positivos, respectivamente. En la tercera transformación, en la que no se aplicó vacío, nuevamente el hipocótilo fue el que presentó el porcentaje mayor de transformación (23.07%, para seis explantes positivos), seguida de los explantes de hoja, con los que se obtuvo un porcentaje de transformación de 18.75%. En la cuarta transformación, agitación sin vacío, fue la hoja la que presentó

el mayor porcentaje de transformación (21.42%, para tres explantes positivos), mientras que con los explantes de raíz se obtuvo un 14.28% de transformación. Usando el mismo protocolo de infección, pero variando el modo de infección, aplicando vacío, sin agitación y sin vacío y agitación sin vacío, se logró obtener transformación en los tres tipos de tejidos (Tabla 9).

La frecuencia de transformación o FT (%) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ FT} = \# \text{ de explantes} / \# \text{ explantes forman raíces} \times 100 \text{ (Yam-Puc et al., 2012a).}$$

Tabla 9. Frecuencias de transformación

1° Transformación (vacío)				2° Transformación (vacío)			
Tipo de explante	Núm. de explante	Explantes positivos	Frecuencia de transformación	Tipo de explante	Núm. de explantes	Explantes positivos	Frecuencia de transformación
Hoja	19	0	0	Hoja	22	0	0
Hipocótilo	29	6	20.60%	Hipocótilo	22	10	45%
Raíz	19	0	0	Raíz	22	0	0
3° Transformación (sin agitación y sin vacío)				4° Transformación (agitación sin vacío)			
Tipo de explante	Núm. de explantes	Explantes positivos	Frecuencia de transformación	Tipo de explante	Núm. de explantes	Explantes positivos	Frecuencia de transformación
Hoja	16	3	18.75%	Hoja	14	3	21.42%
Hipocótilo	26	6	23.07%	Hipocótilo	21	0	0
Raíz	26	0	0	Raíz	21	3	14.28%

Con respecto al desarrollo de raíces transformadas a partir de la línea celular de raíz (LCR), estas fueron subcultivadas cada 20 días y sometidas a condiciones de fotoperiodo, luz continua y oscuridad. Las raíces que mayor biomasa presentaron fueron las que estuvieron en condiciones de fotoperiodo, seguidas de las que estuvieron sometidas a luz continua y las de menor desarrollo fueron las que se mantuvieron en oscuridad (Figura 14).



Figura 14. Raíces transformadas obtenidas de raíces (LCR) de *Pentalinon andrieuxii*. (F) Fotoperiodo, (L) Luz continua, (O) Oscuridad. Cultivos de 30 días

Para el desarrollo de las raíces transformadas de la línea celular de hoja (LA1H), estas fueron subcultivadas cada 20 días y sometidas a condiciones de fotoperiodo, luz continua y oscuridad. Las raíces que mayor biomasa presentaron fueron las que estuvieron en condiciones de fotoperiodo, seguidas de las que estuvieron sometidas a luz continua y las de menor desarrollo fueron las que se mantuvieron en oscuridad (Figura 15).



Figura 15. Raíces transformadas obtenidas de hojas (LA1H) de *Pentalinon andrieuxii*. (F) Fotoperiodo. (L) Luz continua. (O) Oscuridad. Cultivos de 30 días

Demostración de transformación genética por amplificación del gen *ro1C*.

Para corroborar el proceso de transformación se seleccionaron al azar raíces, las cuales se utilizaron para realizar reacciones de PCR para amplificar el gen *ro1C* que está presente en el T-DNA de *A. rhizogenes* e interviene en la inducción de raíces

pilosas. La amplificación del gen *rolC* representa una demostración de que proceso de infección resultó en la la integración del T-DNA en el genoma vegetal.

Se analizaron tres muestras independientes de raíces inducidas en explantes de hipocótilo, raíz y hoja, así como una muestra de raíz no transformada, pero mantenida en las condiciones de las raíces infectadas con *A. rhizogenes*, como control negativo. Los resultados obtenidos por el análisis de PCR, confirmaron la presencia del gen *rolC* en las raíces inducidas de hipocótilo, raíz y hoja, demostrando la transformación genética (Figura 16).

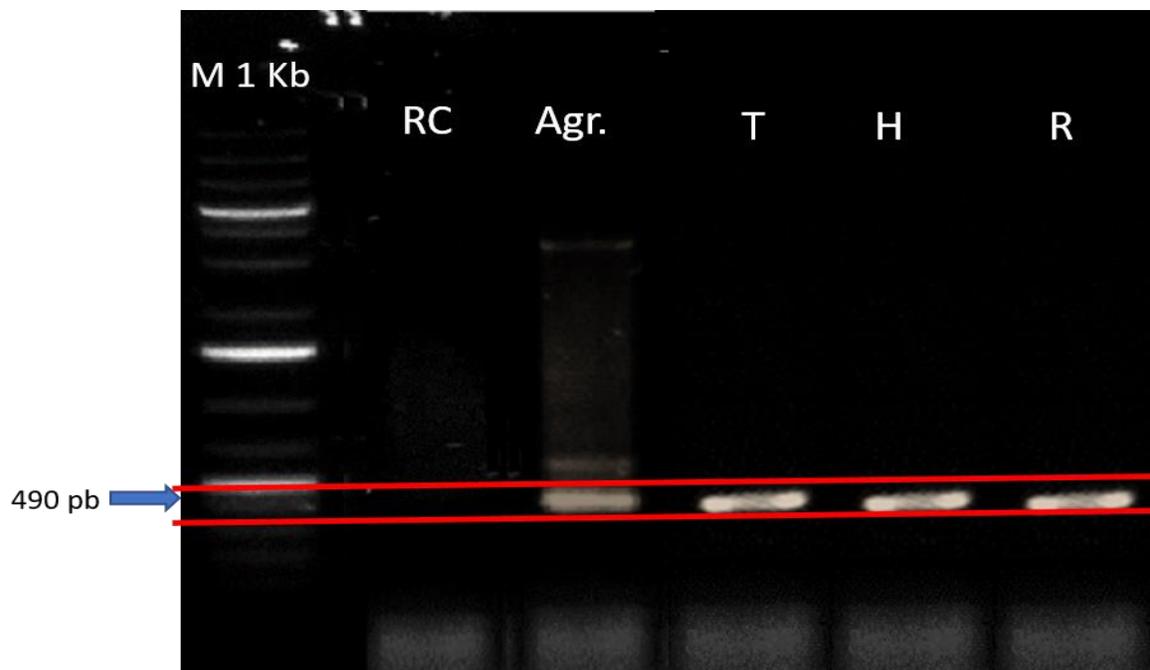


Figura 16. Amplificación del gen *rolC* por PCR de las raíces inducidas en explantes de hipocótilos sometidos al proceso de transformación genética, mediante la infección por la cepa ATCC15834 RFP de *Agrobacterium rhizogenes*: Kb DNA Ladder (M 1 kb)., RC (raíz normal sin transformar), Agr. (cepa de *Agrobacterium rhizogenes*) H (raíz transformada a partir de hoja), T (raíz transformada a partir de hipocótilo), R (raíz transformada a partir de raíz).

Determinación de la presencia de ácido betulínico en las raíces transformadas a partir de raíz, en tres condiciones de cultivo (luz, fotoperiodo y oscuridad)

Esta prueba se realizó para poder determinar la producción de ácido betulínico en las tres condiciones de cultivo y así continuar con la investigación en la condición de mayor producción. Para poder establecer la condición de cultivo idóneo para la caracterización de las líneas de raíces, se observó el área formada en los perfiles cromatográficos donde se detectó el ácido betulínico.

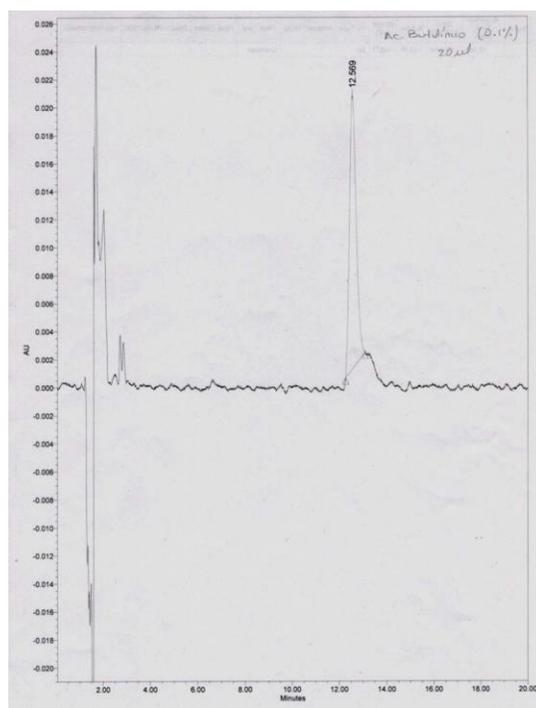


Figura 17. Perfil cromatógrafo de estándar de ácido betulínico.

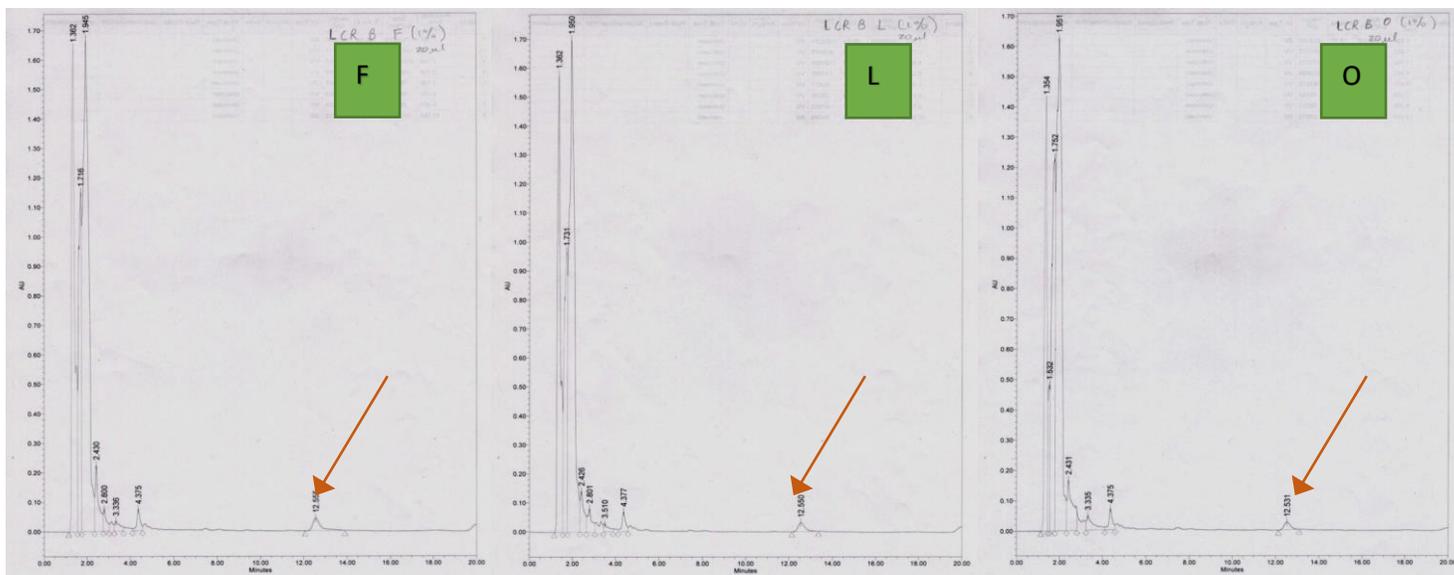


Figura 18. Perfiles cromatográficos de muestras de raíces transformadas a partir de raíz de *Pentalinon andrieuxii*. Las flechas indican la presencia de ácido betulínico en las muestras de raíces transformadas a partir de raíz. (F) fotoperiodo, (L) luz continua, (O) oscuridad.

Los perfiles cromatográficos revelan la presencia de ácido betulínico en las raíces transformadas, en todas las condiciones a las que fueron sometidas. (Figura 17 y Figura 18).

Como se observa en las diferentes áreas formadas cuando se detectó el ácido betulínico, la condición que presenta mayor porcentaje (% área) es la condición de fotoperiodo (1.62%), seguido de la condición de luz continua (1.10%) y por último, la condición de oscuridad (0.82%) (Tabla 10).

Tabla 10. Contenido de ácido betulínico en raíz transformada en diferentes condiciones de cultivo

Condición de cultivo	Área formada bajo la curva (mAU*S)	Porcentaje del área	Concentración de ácido betulínico
Fotoperiodo	1074815	1.62%	0.264 mg/g
Luz continua	660610	1.10%	0.057 mg/g
Oscuridad	515052	0.82%	0.0396 mg/g

Con estos resultados se decidió caracterizar las líneas de raíces transformadas que se obtuvieron de los tres tejidos (raíz, hipocótilo y hoja) en la condición de fotoperiodo.

Caracterización del crecimiento y la producción de ácido betulínico de las tres líneas de raíces transformadas (hoja, raíz, hipocótilo).

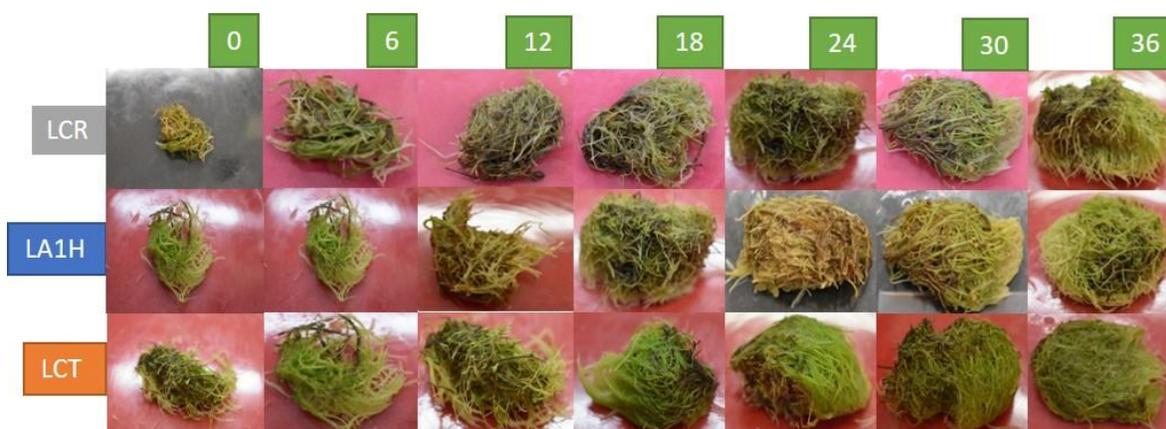


Figura 19. Crecimiento de las raíces transformadas. LCR: línea de raíces transformadas a partir de raíz, LA1H: línea de raíces transformadas a partir de hojas, LCT: línea de raíces transformadas a partir de hipocótilo.

Para la caracterización de los cultivos de raíces transformadas se establecieron curvas de crecimiento a partir de raíces similares a las mostradas en la Figura 19, a lo largo de 36 días en cultivo considerando diferentes parámetros de crecimiento, incluyendo el peso fresco, el peso seco, la conductividad del medio de cultivo para cada una.

Las curvas de crecimiento para las variables peso fresco y peso seco en las tres líneas de transformación (LCR, LA1H y LCT) indica que las raíces transformadas de la línea celular hoja (LA1H), fue la que generó más biomasa; inició con un peso fresco en promedio de 2.15 g y alcanzó en promedio 6.68 g (Figura 20, Tabla 11) con base en su peso seco inicio en 0.189 g en promedio y alcanzó 0.587 g en promedio (Figura 21, Tabla 12).

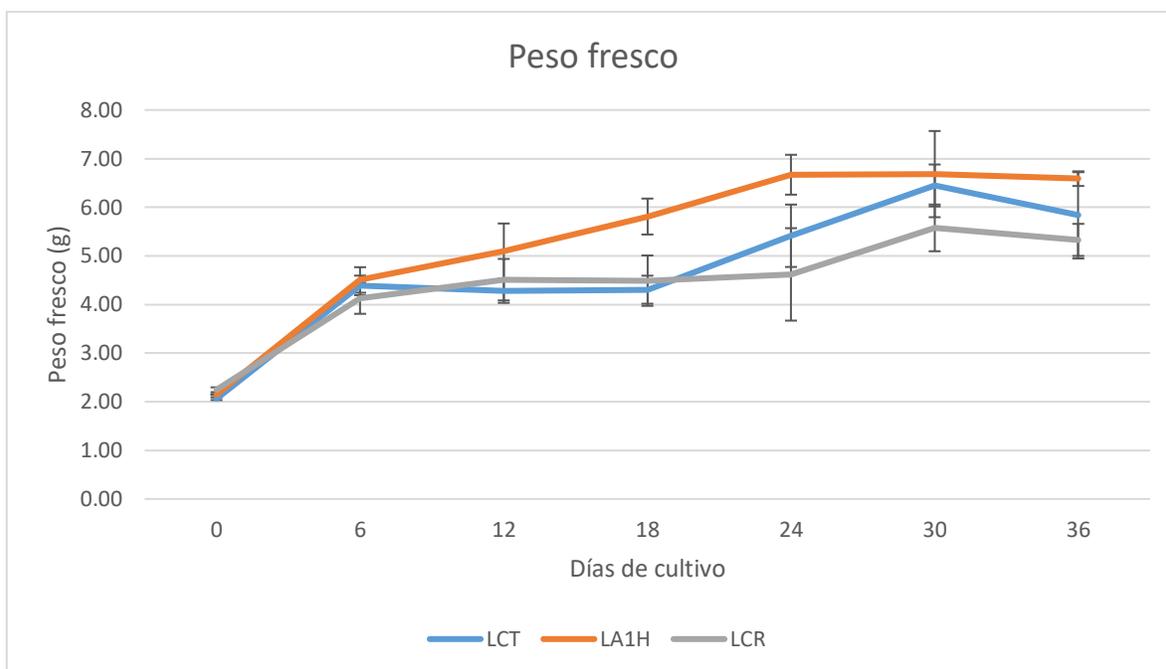


Figura 20. Gráfica del peso fresco durante los diferentes días de cultivo (0-36 días) de las tres líneas de raíces de *P. andrieuxii* bajo estudio. LCT, LA1H y LCR son medias de tres replicas (n= 3).

Tabla 11. Registro de peso fresco, en tres líneas de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin. Los datos presentados son medias de tres repeticiones \pm error estándar.

Días de cultivo	LCT	LA1H	LCR
0	2.06 \pm 0.027	2.15 \pm 0.010	2.25 \pm 0.050
6	4.39 \pm 0.201	4.50 \pm 0.263	4.13 \pm 0.320
12	4.28 \pm 0.244	5.10 \pm 0.564	4.51 \pm 0.427
18	4.30 \pm 0.288	5.81 \pm 0.370	4.49 \pm 0.518
24	5.41 \pm 0.642	6.67 \pm 0.410	4.62 \pm 0.951
30	6.45 \pm 0.431	6.68 \pm 0.886	5.58 \pm 0.481
36	5.83 \pm 0.888	6.59 \pm 0.151	5.33 \pm 0.330

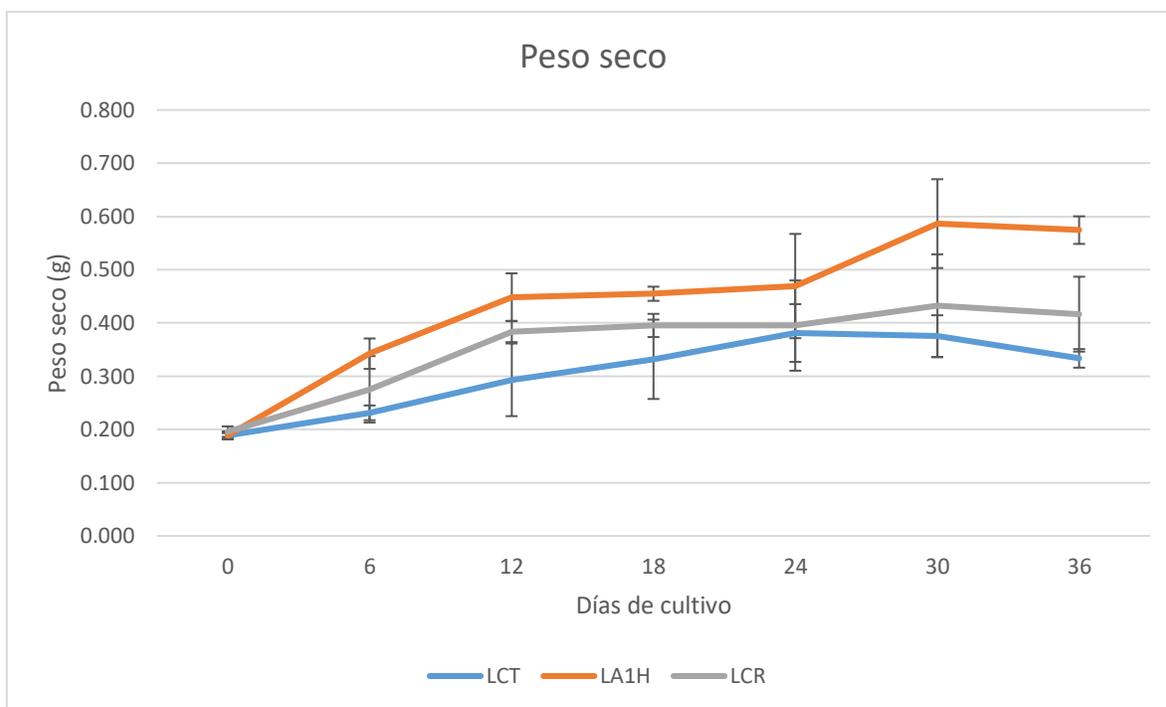


Figura 21. Gráfica del peso seco durante los diferentes días de cultivo (0-36 días) de las tres líneas de raíces de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin bajo estudio. LCT, LA1H y LCR son medias de tres replicas (n= 3).

Tabla 12. Registro de peso seco, en tres líneas de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin. Los datos presentados son medias de tres repeticiones \pm error estándar.

Días de cultivo	LCT	LA1H	LCR
0	0.189 \pm 0.007	0.189 \pm 0.005	0.196 \pm 0.010
6	0.231 \pm 0.014	0.342 \pm 0.029	0.275 \pm 0.062
12	0.293 \pm 0.068	0.449 \pm 0.045	0.384 \pm 0.020
18	0.332 \pm 0.074	0.455 \pm 0.013	0.395 \pm 0.022
24	0.381 \pm 0.054	0.469 \pm 0.098	0.395 \pm 0.085
30	0.375 \pm 0.039	0.587 \pm 0.083	0.433 \pm 0.096
36	0.334 \pm 0.017	0.574 \pm 0.026	0.417 \pm 0.070

El gráfico de conductividad, indica que hay una disminución de sales en el medio de cultivo, lo que revela que las raíces están aprovechando el medio de cultivo (Figura 22).

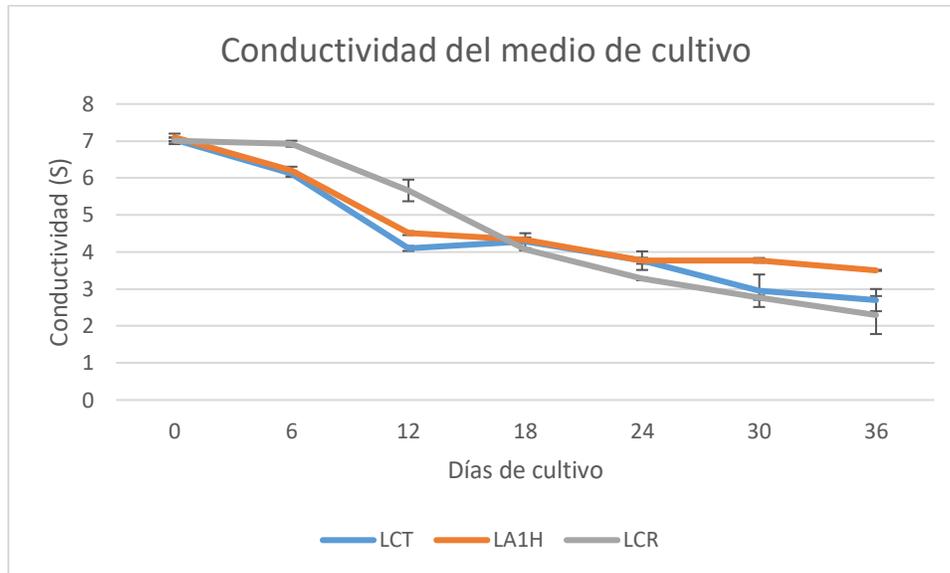


Figura 22. Conductividad del medio durante los diferentes días de cultivo (3-36 días) de las tres líneas de raíces de *P. andrieuxii* bajo estudio. LCT, LA1H y LCR son medias de tres replicas (n= 3). Se puede observar que las raíces transformadas aprovechan los nutrientes del medio de cultivo PC.

La línea LA1H (hoja), presentó un crecimiento continuo durante los 36 días de cultivo y la mayor producción de biomasa con respecto a las otras líneas, obteniendo un índice de crecimiento de 2.07 y un tiempo de duplicación de 22.26 en peso fresco (Tabla 13).

Tabla 13 Índice de crecimiento, tasa de crecimiento específico y tiempo de duplicación de las líneas de raíces en peso fresco.

	LA1H B	LCT B	LCR A
Índice de crecimiento	2.07	1.83	1.37
Tasa de crecimiento específico	0.031	0.029	0.024
Tiempo de duplicación	22.26	23.98	28.89

Los cálculos para los datos obtenidos mediante la curva de peso seco, expresan que las líneas LA1H (hoja) y LCR (raíz) presentan un índice de crecimiento de 2.045 y 1.126 (Tabla 14) respectivamente. Por lo que se eligió la línea LA1H B para la prueba de elicitación con diferentes concentraciones (100 μ M y 200 μ M) de ácido salicílico y metil jasmonato.

Tabla 14. Índice de crecimiento, tasa de crecimiento específico y tiempo de duplicación de las líneas de raíces transformadas: LA1H, LCT y LCR en peso seco.

	LA1H B	LCT B	LCR A
Índice de crecimiento	2.045	0.767	1.126
Tasa de crecimiento específico	0.031	0.016	0.021
Tiempo de duplicación	22.41	43.85	33.08

Producción de ácido betulínico

Los datos de la concentración de ácido betulínico de las raíces transformadas a partir de raíz, (por ser la línea de raíces con las cuales se conto con mayor cantidad), se compararon con los datos reportados por Hiebert-Giesbrecht, 2015, quienes reportan 0.5 a 0.9 mg/g, sobre la producción de ácido betulínico en la planta tipo silvestre de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin. A los 30 días de cultivo, se observa que la producción de ácido betulínico de las raíces transformadas es: 0.264 mg/g, 0.057 mg/g y 0.0396 mg/g en condiciones de fotoperiodo, luz continua y oscuridad, respectivamente, menor en comparación con lo reportado por Hiebert-Giesbrecht, 2015 en la planta tipo silvestre (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación de la concentración de ácido betulínico en la LCR con lo reportado por Hiebert-Giesbrecht, 2015

Contenido de ácido betulínico mg/g de peso seco	
<i>Pentalinon andrieuxii</i> (silvestre) (Hiebert-Giesbrecht, 2015)	0.5 a 0.9 mg/g
Línea de Raíz (LCR) fotoperiodo	0.264 mg/g
Línea de Raíz (LCR) luz continua	0.057 mg/g
Línea de Raíz (LCR) oscuridad	0.0396 mg/g

Debido a que los resultados para la concentración de ácido betulínico reportados Hiebert-Giesbrecht, 2015, proceden de una planta tipo silvestre no floreciendo, en este trabajo se realizaron cuantificaciones de ácido betulínico a diferentes tejidos de una planta de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin en floración,

intentando determinar el tipo de tejido donde este metabolito se acumula en mayor concentración (Tabla 16).

Tabla 16. Contenido de ácido betulínico en diferentes tejidos de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin.

Tejidos	Concentración de ácido betulínico (mg/g de peso seco)
Hojas	0.44
Flores	0.20
Botones	0.14
Hipocótilo	1.29
Raíz adventicia	2.29
Raíz principal	2.13

(Promedio de 3 repeticiones)

La cinética de cuantificación de ácido betulínico en las muestras de raíces liofilizadas, muestra que la fase estacionaria de producción la alcanzan las tres líneas (LA1H, LCT y LCR) en el día 30 del cultivo, así como que, en este, la línea LA1H tuvo la mayor producción (0.432 mg/g ps). Después de dicha fase estacionaria, inició el proceso de declinación de la producción de ácido betulínico (Figura 23 y Tabla 17).

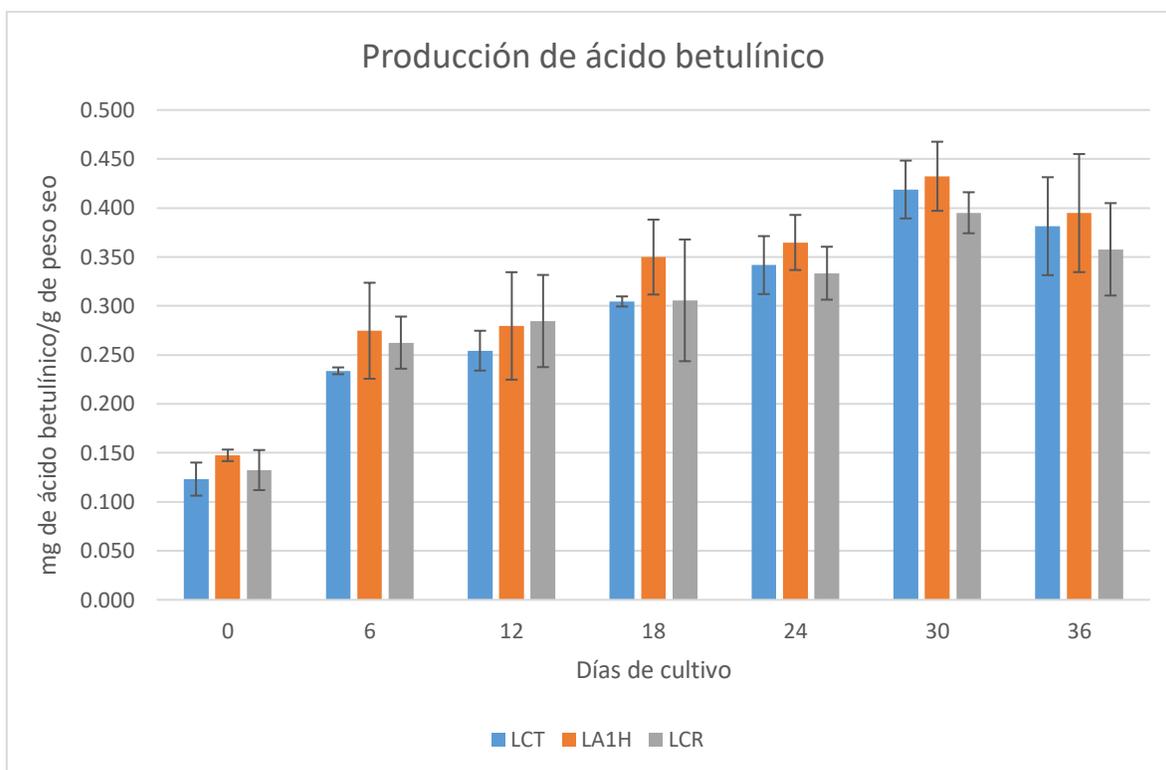


Figura 23. Producción de ácido betulínico de 3 líneas de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin durante 36 días. LCT, LA1H y LCR son medias de tres replicas (n= 3).

Tabla 17. Concentración en mg de ácido betulínico/g de peso seco, en tres líneas de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin. Los datos presentados son medias de tres repeticiones \pm error estándar.

Días de cultivo	LCT	LA1H	LCR
0	0.123 \pm 0.0169	0.147 \pm 0.0059	0.132 \pm 0.0205
6	0.234 \pm 0.0035	0.275 \pm 0.0490	0.263 \pm 0.0266
12	0.254 \pm 0.0203	0.280 \pm 0.0549	0.285 \pm 0.0470
18	0.305 \pm 0.0052	0.350 \pm 0.0383	0.306 \pm 0.0621
24	0.342 \pm 0.0296	0.365 \pm 0.0281	0.333 \pm 0.0270
30	0.419 \pm 0.0295	0.432 \pm 0.0353	0.395 \pm 0.0210
36	0.381 \pm 0.0500	0.395 \pm 0.0603	0.358 \pm 0.0471

De acuerdo con estos resultados, el día 30 de cultivo y las raíces transformadas de la línea LA1H, se seleccionaron para evaluar los efectos del ácido salicílico y jasmonato de metilo como elicitores.

Efecto del uso de elicitores sobre la producción de ácido betulínico.

Para la elicitación de las raíces transformadas se utilizó la línea LA1H y un control (raíz transformada sin tratamiento). A los cuales se añadió diferentes concentraciones de los elicitores: 100 μM y 200 μM de ASA (ácido salicílico) y 100 μM y 200 μM de MeJa (jasmonato de metilo) con 3 réplicas de cada uno.

Tres días después de la elicitación, las muestras tratadas con elicitores sufrieron una disminución en la concentración de ácido betulínico (Figura 24). Seis días después de la elicitación, en todos los tratamientos se observaron incrementos en la producción de ácido betulínico, aunque únicamente la aplicación de 200 μM de MeJa, mostró niveles superiores al control (Figura 25). Nueve días después de la elicitación, destaca que los tratamientos con 200 μM de MeJa y ASA favorecieron la producción de ácido betulínico por arriba de la condición control (Figura 26), siendo el MeJa el mejor tratamiento para estos fines (0.804 mg). El promedio de los efectos de los elicitores a lo largo de 9 días de elicitación se muestra en la Tabla 18.

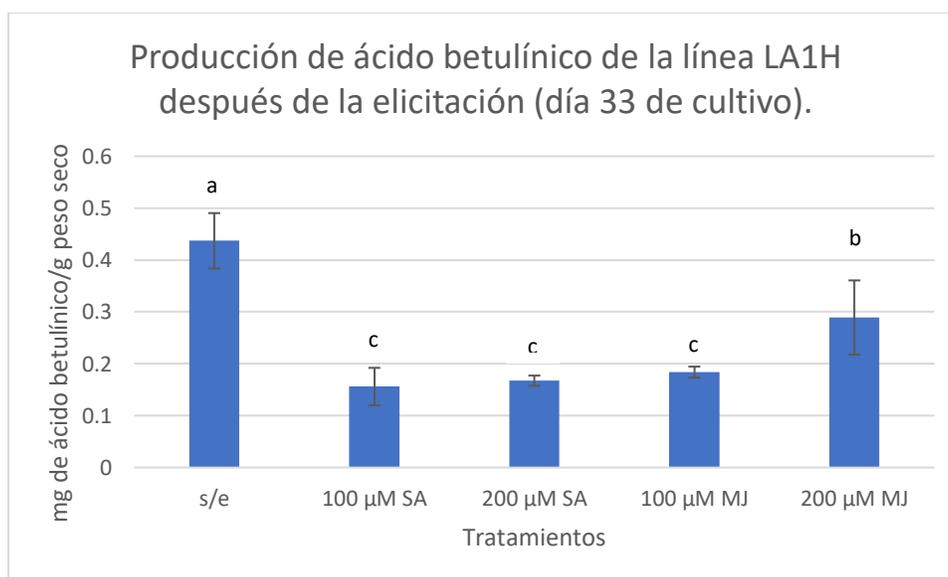


Figura 24. Producción de ácido betulínico de la línea LA1H raíz transformada a partir de hoja de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin después de 3 días de la elicitación (día 33 de cultivo). Los tratamientos son medias de tres replicas

(n=3) Nota; s/e: sin elicitor raíz transformada sin tratamiento. Los datos presentados son las medias de tres repeticiones \pm error estándar.

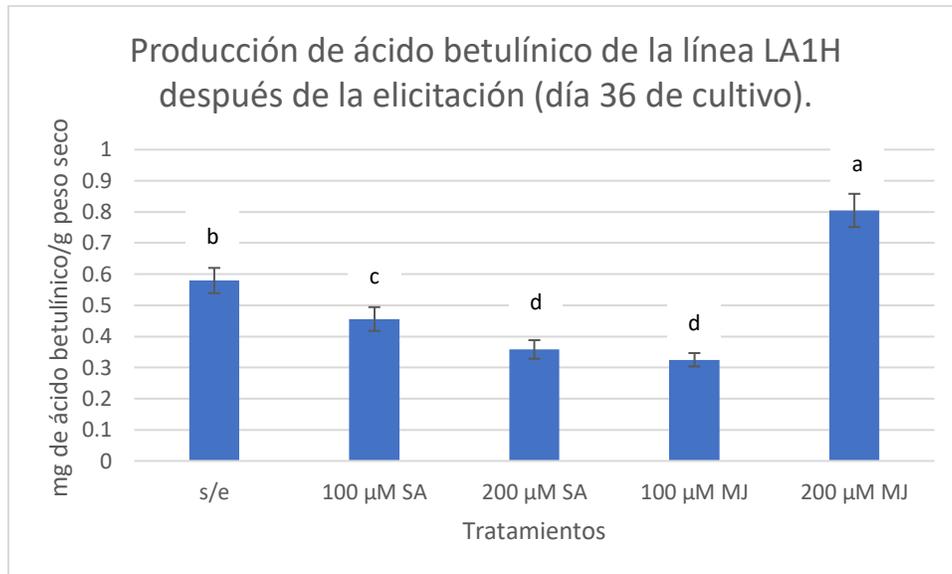


Figura 25. Producción de ácido betulínico de la línea LA1H raíz transformada a partir de hoja de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin después de 6 días de la elicitación (día 36 de cultivo). Los tratamientos son medias de tres replicas (n=3). Nota: s/e: sin elicitor raíz transformada sin tratamiento. Los datos presentados son las medias de tres repeticiones \pm error estándar.

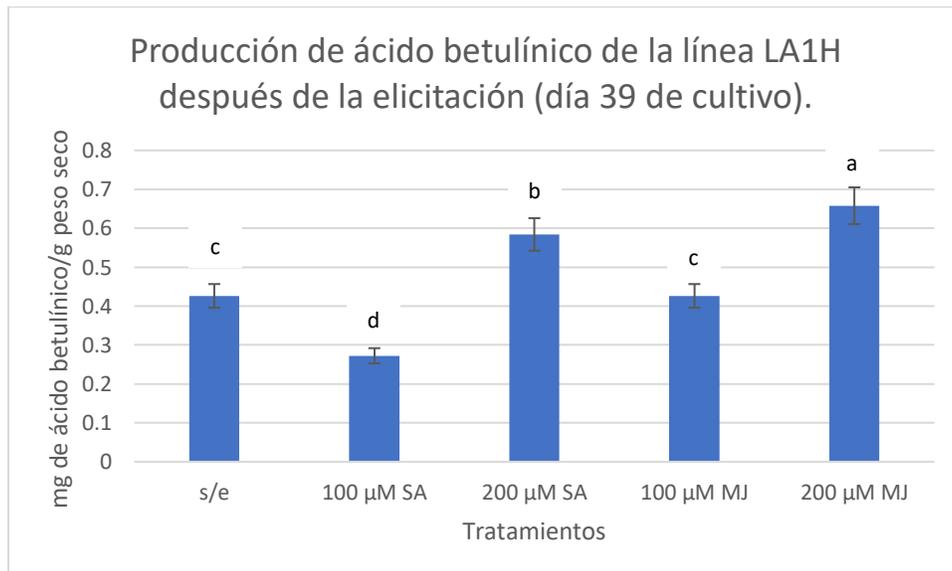


Figura 26. Producción de ácido betulínico de la línea LA1H raíz transformada a partir de hoja de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin después de 9 días de la elicitación (día 39 de cultivo). Los tratamientos son medias de tres

replicas (n=3). Nota: s/e: sin elicitor raíz transformada sin tratamiento. Los datos presentados son las medias de tres repeticiones \pm error estándar.

Tabla 18. Promedios de producción de ácido betulínico en tres líneas de raíces transformadas a partir de hoja de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin post-elicitación (mg de ácido betulínico/g de peso seco).

Concentración (mg/ g ps)*	Días de Elicitación		
	3	6	9
Sin elicitor	0.44 \pm 0.05	0.58 \pm 0.04	0.43 \pm 0.03
100 μM SA	0.16 \pm 0.03	0.46 \pm 0.03	0.27 \pm 0.01
200 μM SA	0.17 \pm 0.009	0.36 \pm 0.029	0.58 \pm 0.04
100 μM MJ	0.18 \pm 0.01	0.33 \pm 0.021	0.43 \pm 0.03
200 μM MJ	0.29 \pm 0.07	0.80 \pm 0.05	0.66 \pm 0.04

Los datos presentados son las medias de tres repeticiones \pm error estándar. Los datos fueron obtenidos atravez de HPLC, el acido betulínico fue identificado usando los tiempos de retención conocidos de estándares.

*mg de ácido betulínico/g de peso seco.

CAPÍTULO IV

Discusión general

Al inicio de este trabajo se plantearon como objetivos obtener diferentes líneas de raíces transformadas de *P. andriuxii* con el fin de utilizarlas como una fuente para la producción de ácido betulínico, un compuesto con diversas aplicaciones medicinales. Contando con esas líneas, éstas se expondrían a condiciones de iluminación diferentes, ya que esto afecta la acumulación del metabolito. Una vez seleccionadas las condiciones de cultivo (iluminación) en que se produce la mayor cantidad de ácido betulínico, se trató de aumentar aún más la producción mediante la aplicación de elicitors del metabolismo secundario.

De este modo, la primera fase consistió en experimentos de infección de los explantes con *A. rhizogenes*. La frecuencia de infección que se obtuvo con la cepa ATCC15834 fue de 21.42% en el explante de hoja mediante un proceso de transformación en agitación sin la aplicación de vacío, hipocótilo 45% y raíz de 14.28%. Comparando nuestros resultados con los promedios de frecuencia de infección reportados por May-Mendoza (2016) de los tres procesos realizados para la cepa ATCC15834, estos no coinciden, ya que ella reporta que para el explante de hoja fue del 11.3%, hipocótilo 6.3% y raíz 0%, valores bajos debido a que los explantes presentaron necrosis y contaminación fúngica. Sandoval Antúnez (2014), trabajó con la misma cepa infectando los explantes de hoja, raíz e hipocótilo, observando el crecimiento de raíces peludas a partir de seis semanas de transformados, logrando obtener dos líneas transformadas a partir de hipocótilo, seis líneas a partir de hoja y ninguna línea a partir de raíz; estos resultados coinciden parcialmente con la presente investigación, en la que se lograron recuperar 22 líneas de raíces transformadas a partir de hipocótilo, seis líneas a partir de hoja y 3 líneas a partir de raíz. Existen trabajos donde se reportan diferentes frecuencias de infección con cepas de *Agrobacterium rhizogenes*, se ha reportado la inducción de la raíz en *Rubia akane* Nakai (Lee *et al.*, 2010) donde con la cepa R1601 se obtuvo la mayor frecuencia de infección (85.6%) así como la inducción de raíces en *Berberis aristata* DC (Brijwal & Tamta, 2015) (61.11 %); *Platycodon grandiflorum* (Park *et al.*, 2011) (87.5%).

Con respecto al índice de crecimiento, aquí se reporta de 2.12% (peso fresco) que es menor que lo reportado por Sandoval Antúnez 2014, quien obtuvo un crecimiento continuo de una línea, durante los 45 días de cultivo y la mayor producción de biomasa con respecto a las otras líneas (5.66%), dato menor que el reportado por May-Mendoza, 2016, quien obtuvo un índice de crecimiento de 12.03% en condiciones de luz continua en función a su peso fresco.

Sobre las condiciones de iluminación ensayadas, se observó que la condición de mayor producción de ácido betulínico es la de fotoperiodo (0.264 mg/g), la cual se eligió como la óptima, seguido de la condición de luz continua (0.057 mg/g) y la condición de oscuridad (0.0396 mg/g). Los resultados conseguidos en el cultivo de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin, obtenidas a partir de hoja, indican que a partir del día 30 del cultivo se produce 0.432 mg de ácido betulínico/g peso seco, en la condición de fotoperiodo. Dentro de los trabajos reportados con respecto a la producción de ácido betulínico en modelos *in vitro*, se cuenta con el uso de biotransformación con hongos y bacterias (Chen *et al.*, 2009 b; Chatterjee *et al.*, 2000); la biotransformación fúngica a partir de 100g de corteza pulverizada de *Platanus orientalis* arrojó datos de 0.69 g de ácido betulínico (Bastos *et al.*, 2007); Zhang *et al.*, (2005) lograron 21% de ácido betulínico 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 ácido betulínico) alcanzando valores de 3.1% de ácido betulínico 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.

Finalmente, es interesante observar que en el trabajo reportado por Sandoval-Antúnez C, 2014 no se logró aumentar la concentración de ácido betulínico en los cultivos de raíces transformadas de *P. andrieuxii* tras haber sido sometidos a

tratamientos con los elicitores ácido jasmónico y sulfato de vanadilo. En este trabajo, se obtiene una respuesta positiva en las raíces transformadas donde se observó un aumento de 28% (0.804 mg de ácido betulínico/gps) en la concentración de ácido betulínico con una concentración de 200 μ M del jasmonato de metilo en comparación con la raíz control (raíz transformada sin tratamiento; 0.579 mg de ácido betulínico/gps). De acuerdo con los reportes que se tienen sobre estudios realizados sobre el efecto negativo que se provoca con el jasmonato de metilo en cultivos celulares durante la fase tardía en *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. (durante un periodo de 10 días lo que corresponde a su fase tardía) (Stojakowska *et al.*, 2002) y *Centella asiatica* (L.) Urban. (30 días que corresponde a su fase tardía) (Kim *et al.*, 2007). Además, la estrategia de uso de elicitores en una fase exponencial tardía (20 días) empleada por Savitha *et al.*, 2006 para aumentar la producción de betalaína en el cultivo de raíces peludas de *Beta vulgaris*. (Kuzma, *et al.*, 2009), son elementos que permitieron fundamentar en la presente investigación, la elección del día 30 como el periodo óptimo (fase tardía) para llevar a cabo la elicitación de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin. Respecto a la efectividad de los elicitores usados en este trabajo, se debe destacar que el tratamiento con una concentración de 200 μ M de jasmonato de metilo fue mejor (0.804 mg) en comparación con la raíz transformada sin tratamiento (0.579 mg) que mantuvo sus niveles de producción por encima del control (raíz transformada sin tratamiento). Los resultados coinciden con los obtenidos por Giri & Zaheer, 2016, quienes mencionan que en el día 36 del cultivo, el mejor elicitor para obtener un mejoramiento en la producción del metabolito de interés es el jasmonato de metilo a una concentración de 200 μ M. También se observó que a partir del día 39, la concentración de 200 μ M de jasmonato de metilo (0.657 mg de ácido betulínico/gps) y la concentración de 200 μ M de ácido salicílico (0.584 mg de ácido betulínico/gps), se encuentran por encima del control sin elicitor (0.425 mg de ácido betulínico/ gps). Se ha reportado en diferentes estudios el uso de elicitores en diferentes tipos de cultivos; (Alsoufi *et al.*, 2019), sometieron dos líneas de cultivo de raíces pilosas de *Caléndula officinalis*, obtenidas como resultado de la transformación con la cepa ATCC 15834 de *Agrobacterium rhizogenes* de tipo

silvestre, a la elicitación con ácido jasmónico y quitosano, en el contexto de la posible estimulación de la biosíntesis, acumulación y secreción de triterpenoides. Se encontró que el ácido jasmónico es un inductor muy efectivo, aumentando tanto la acumulación de saponinas del ácido oleanólico en el tejido de la raíz pilosas (hasta 20 veces) como, en particular, la secreción de estos compuestos al medio (hasta 113 veces). Sin embargo, también promovió la inhibición en la biosíntesis y la acumulación de esteroides (aproximadamente en un 60%) con algunas alteraciones de su perfil. Los resultados obtenidos sugieren que la respuesta metabólica de las raíces pilosas de *C. officinalis* a la elicitación con una hormona del estrés de las plantas, el ácido jasmónico, incluye la estimulación de la biosíntesis y la posterior secreción de triterpenoides pentacíclicos secundarios (considerados como metabolitos de defensa) y la inhibición simultánea de la biosíntesis de metabolitos primarios, esteroides. Se ha demostrado que el jasmonato de metilo es eficaz para aumentar la biosíntesis de varios triterpenoides, por ejemplo, ácidos oleanólicos y ursólicos en cultivos en suspensión de *Datura innoxia*, *Luffa cylindrica*, *Lycopersicon esculentum* y *Uncaria tomentosa* (Flores-Sánchez *et al.*, 2002). En la mayoría de estos experimentos, la acumulación máxima de triterpenoides pentacíclicos coincidió con la biosíntesis de esteroides cesada. MeJA estimuló de manera efectiva la producción de varias saponinas, por ejemplo, glicirricina en cultivos de células de *Glycyrrhiza glabra*, saikosaponina en raíces adventicias de *Bupleurum falcatum* y soyasaponina en cultivos de suspensión de células de *Medicago truncatula* (Choi *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005). El análisis de *M. truncatula*, también reveló que el tratamiento con jasmonato de metilo produjo una inducción de 50 veces de los transcritos que codifican la β -amirina sintasa (β -AS). Los estudios más extensos se dedicaron a las saponinas que se producen en el ginseng *Panax spp* (también conocido como ginsenósidos). MeJA ha sido probado en un amplio rango de concentraciones, en ausencia o en presencia de otros elicitores, en cultivos adventicios y de raíces pilosas de *Panax ginseng*, produciendo un aumento, varias veces mayor en la producción de ginsenósidos (Kim *et al.*, 2007; Wang & Wu, 2013). Se ha reportado los efectos del jasmonato de metilo y el ácido salicílico en el crecimiento y producción de glicirricina en las raíces de plantas

cultivadas in vitro de *Glycyrrhiza glabra*. (Shabani *et al.*, 2009). Las cantidades crecientes de glicirricina en las raíces tratadas con MeJa inhibieron el crecimiento de las raíces, mientras que el AS aumentó la cantidad de glicirricina sin efectos negativos sobre el crecimiento. El tratamiento de las plántulas con 0.1–2 mM de MeJa y 0.1 y 1 mM de AS aumentó la producción de glicirricina en 3.8 y 4.1 veces, respectivamente, en comparación con los controles. Cultivos de raíces adventicias derivadas de callos a partir de hojas de *Withania somnifera* (L.) Dunal se trataron con metil jasmonato y ácido salicílico independientemente. Entre los dos elicitores, el ácido salicílico mejoró la producción de los principales withanolidos (withanolido A, withanolido B, withaferin A y withanona), así como sus constituyentes menores (12-deoxi-withastramonolido, withanosido V, y withanosido IV) (Sivanandhan *et al.*, 2012).

CAPÍTULO V

Conclusiones

Con base en los resultados de esta investigación se concluye que se acepta la hipótesis planteada ya que:

- 1) Se logró la inducción de raíces transformadas a partir de tres explantes (hoja, hipocótilo y raíz) de plántulas germinadas *in vitro* de *P. andrieuxii* vía transformación con *A. rhizogenes* (cepa ATCC15834-RFP).
- 2) Derivado de este proceso, actualmente en el laboratorio se cuenta con 22 líneas de raíces transformadas a partir de hipocótilo, 6 líneas transformadas a partir de hoja y 3 líneas transformadas a partir de raíz.
- 3) La naturaleza transgénica de las líneas de raíces generadas en este trabajo se corroboró mediante la amplificación por PCR del gen *rolC* partir del ADN genómico.
- 4) La condición de fotoperiodo es la más adecuada para mantener los cultivos de raíces transformadas de *P. andrieuxii*.
- 5) El día 30 de cultivo, donde en promedio la producción de biomasa llega a 0.264 mg/g ps, es el más adecuado para la incorporación de elicitores que permitan elevar la producción de ácido betulínico, que sin elicitar en ese momento alcanza una producción de 0.4306 mg/g ps.
- 6) La inducción con jasmonato de metilo a una concentración de 200 μ M, a los 6 y 9 días de su aplicación, incrementó en un 39 y en un 54%, respectivamente, la producción de ácido betulínico en raíces transformadas de *P. andrieuxii*.
- 7) La inducción con ácido salicílico a una concentración de 200 μ M a los 6 y 9 días de su aplicación, causó una disminución del 38% y un incremento del 37%, respectivamente, en la producción de ácido betulínico en raíces transformadas de *P. andrieuxii*.

De este modo, los objetivos planteados al inicio del trabajo se alcanzaron de manera satisfactoria.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten proponer alternativas para el uso de las raíces transformadas de *P. andrieuxii* para la producción de ácido betulínico. Algunas son las siguientes:

1. Realizar pruebas con el elicitor Jasmonato de Metilo a diferentes concentraciones, para intentar mejorar sus efectos positivos sobre la producción de ácido betulínico.
2. Evaluar el efecto de otros elicitores bióticos y/o abióticos, sobre la producción tanto de ácido betulínico, como de otros metabolitos de interés comercial, como el urechitol, producidos por *P. andrieuxii*.
3. Promover e implementar la producción de ácido betulínico en el sistema de raíces transformadas a escala comercial, como una alternativa que permita evitar la sobreexplotación de las especies endémicas para favorecer su conservación.

Referencias

- Ahmad, P., Sarwat, M., & Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51(3):167-173.
- Alakurtti, S., Mäkelä, T., Koskimies, S., & Yli-Kauhaluoma, J. (2006). Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(1):1-13.
- Ali-Seyed, M., Jantan, I., Vijayaraghavan, K., & Bukhari, S. (2016). Betulinic acid: recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy. *Chemical Biology & Drug Design*, 87(4): 517-536.
- Alsoufi, A., Pączkowski, C., Szakiel, A., & Długosz, M. (2019). Effect of jasmonic acid and chitosan on triterpenoid production in *Calendula officinalis* hairy root cultures. *Phytochemistry Letters*, 31, 5-11.
- Amanullah, B., Rizvi, Z., & Zia, M. (2016). Production of artemisinin and its derivatives in hairy roots of *Artemisia dubia* induced by *rolA* gene transformation. *Pak. J. Bot*, 48(2): 699-706.
- Arshad, W., Waheed, M., Mysore, K., & Mirza, B. (2014). *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with *rolB* gene results in enhancement of fruit quality and foliar resistance against fungal pathogens. *PLoS One*, 9(5): e96979.
- Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. (2014). Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19:13541–13563.
- Bastos, D., Pimentel, I., de Jesus, D., & Oliveira, B. (2007). Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. *Phytochemistry*, 68 (6), 834-839.
- Belchi-Navarro, S., Almagro, L., Lijavetzky, D., Bru, R., & Pedreño, M. (2012). Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyl jasmonate. *Plant Cell Rep*, 31:81–89.
- Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M., & Jacquin-Dubreuil, A. (2000). Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rolA*, *B*, *C* genes only. *Journal of Biotechnology*, 81 (2), 151-158.
- Brijwal, L., & Tamta, S. (2015). *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in endangered *Berberis aristata* DC. *SpringerPlus*, 4(1), 443.

- Bulgakov, V., Khodakovskaya, M., Labetskaya, N., Chernoded, G., & Zhuravlev, Y. (1998). The impact of plant *roIC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry*, 49(7): 1929–1934.
- Bulgakov, V., Veselova, M., Tchernoded, G., Kiselev, K., Fedoreyev, S., & Zhuravlev, Y. (2005). Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes roIC* gene on radosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. *Planta*, 221(4): 471-478.
- Burgos-May, J. (2015). Transformación genética de *Pentalinon andrieuxii* con el gen truncado de la *HMGR* de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 90p.
- Cano-Tun, M., May-Mendoza, P., Ramírez-Albores, E., Jiménez-Aguilar, L., García-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L., Avilés-Berzunza E., Godoy-Hernández, G. (2016). Detección de ácido betulínico y urechitoles en las raíces transformadas con el gen de la proteína roja fluorescente de *Pentalinon andrieuxii*. *Revista del Centro de Graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida.*, 31: 58-61.
- Canul-Ek, J. (2014). Regeneración de plantas a partir de raíces transformadas de hipocótilo y hoja de *Pentalinon andrieuxii* Müll. Arg. (Bejuco de la vibora). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida. 131p.
- Caretto, S., Quarta, A., Durante, M., Nisi, R., De Paolis, A., Blando, F., & Mita, G. (2011). Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures. *Plant Biol*, 13:51–58.
- Chan-Bacab, M., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., García, R., & Peña-Rodríguez, L. (2003). Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3): 243-247.
- Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*, 34:407-415.
- Chatterjee, P., Kouzi, S., Pezzuto, J., & Hamann, M. (2000). Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9), 3850-3855.
- Chen, Q., Fu, M., Liu, J., Zhang, H., He, G., & Ruan, H. (2009 a). Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(5): 599-604.

- Chen, Q., Liu, J., Zhang, H., He, G., & Fu, M. (2009 b). The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi. *Enzyme Microb Technol*, 45 (3), 175-180.
- Chodiseti, B., Rao, K., Gandi , S., & Giri , A. (2015). Gymnemic acid enhancement in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* by using the signaling molecules—methyl jasmonate and salicylic acid. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 51:88–92.
- Choi, D., Jung, J., Im Ha, Y., Park, H., In, D., Chung, H., & Liu, J. (2005). Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. *Plant Cell Reports*, 23(8), 557-566.
- Christianson, D. (2017). Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chemical reviews*, 117(17), 11570-11648.
- Cichewicz, R., & Kouzi, S. (2004). Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Medicinal research reviews*, 24(1), 90-114.
- Corey, E., Matsuda, S., & Bartel, B. (1993). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11628-11632.
- Csuk, R. (2014). Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008–2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(8):913-923.
- Csuk, R., Schmuck, K., & Schäfer , R. (2006). A practical synthesis of betulinic acid. *Tetrahedron Letters*, 47 (49), 8769-8770.
- Dilshad, E., Cusido, R., Estrada, K., Bonfill, M., & Mirza, B. (2015a). Genetic transformation of *Artemisia carvifolia* Buch with *rol* genes enhances artemisinin accumulation. *PLoS One*, 10(10): e0140266.
- Dilshad, E., Cusido, R., Palazón, J., Estrada, K., Bonfill, M., & Mirza, B. (2015b). Enhanced artemisinin yield by expression of *rol* genes in *Artemisia annua*. *Malaria Journal.*, (1): 424.
- Dilshad, E., Ismail, H., Cusido, R., Palazón, J., Ramirez-Estrada, K., & Mirza, B. (2016). *Rol* genes enhance the biosynthesis of antioxidants in *Artemisia carvifolia* Buch. *BMC Plant Biology*, 16(1):125.
- Domínguez-Carmona, D., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ruiz-Pinell, G., Gutierrez-Yapu, D., Chan-Bacab, M., & Peña-Rodríguez, L. (2010). Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivative. *Phytomedicine*, 17: 379-382.

- Dubrovina, A., Manyakhin, A., Zhuravlev, Y., & Kiselev, K. (2010). Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in *ro/C* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(3): 727-736.
- Durante, M., Caretto, S., Quarta, A., De Paolis, A., Nisi, R., & Mita, G. (2011). β -Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(6), 1905.
- Eiznhamer, D., & Xu, Z. (2004). Betulinic acid: a promising anticancer candidate. *IDrugs: the investigational drugs journal*, 7(4): 359-373.
- Fan, G., Zhai, Q., Li, X., & Zhan, Y. (2013). Compounds of *Betula platyphylla* cell suspension cultures in response to fungal elicitor. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(1), 3569-3572.
- Ferrari, S. (2010). Biological elicitors of plant secondary metabolites: mode of action and use in the production of nutraceuticals. *Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698: 152-166.
- Flores-Sánchez, I., Ortega-López, J., Montes-Horcasitas, M., & Ramos-Valdivia, A. (2002). Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Plant and cell physiology*, 43(12), 1502-1509.
- Fu, L., Zhang, S., Li, N., Wang, J., Zhao, M., Sakai, J., Hasegawa, T., Mitsui, T., Kataoka, T., Oka, S., Kiuchi, M., Hirose, K., & Ando, M. (2005). Three New Triterpenes from *Nerium oleander* and Biological Activity of the Isolated Compounds. *Journal of Natural Products*, 68(2):198-206.
- Galgon, T., Hoke, D., & Drager, B. (1999). Identification and quantification of betulinic acid. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 187-190.
- Gas-Pascual, E., Berna, A., Bach, T., & Schaller, H. (2014). Plant oxidosqualene metabolism: cycloartenol synthase– dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 9: e109156.
- Gelvin, S. (2012). Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome. *Frontiers in plant science*, 3, 52.
- George, F. (2008). Plant propagation by tissue culture. *Plant Tissue Culture Procedure*, 3(1): 1-28.
- Getti, G., Durgadoss, P., Domínguez-Carmona, D., Martín-Quintal, Z., Peraza-Sánchez, S., Peña-Rodríguez, L., & Humber, D. (2009). Leishmanicidal

- activity of Yucatecan medicinal plants on *Leishmania* species responsible for cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology*, 95(2), 456-461.
- Ghosh, S. (2016). Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: the role of oxidosqualene cyclases. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 82(4), 1189-1210.
- Giri, C., & Zaheer, M. (2016). Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(1), 1-18.
- Global Biodiversity Information Facility. (2019). *Pentalinon andrieuxii* (Müll.Arg.) B.F.Hansen & Wunderlin. Obtenido: <https://www.gbif.org/species/3618330>
- Gotfredsen, E. *Liber Herbarum II: The incomplete reference-guide to Herbal medicine*. Available online: <http://www.liberherbarum.com/> (27.03.2009).
- Godoy-Hernández, G., & Vázquez-Flota, F. (2006). Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion. *Methods in Molecular Biology*, 877: 41-48.
- Góngora-Sánchez, D. (2012). Inducción de raíces normales a partir de tallos y regeneración de plantas *in vitro* de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen y Wunderlin. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. 84p.
- Grishchenko, O., Kiselev, K., Tchernoded, G., Fedoreyev, S., Veselova, M., Bulgakov, V., & Zhuravlev, Y. (2013). The influence of the *rolC* gene on isoflavonoid production in callus cultures of *Maackia amurensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113(3), 429-435.
- Grishchenko, O., Kiselev, K., Tchernoded, G., Fedoreyev, S., Veselova, M., Bulgakov, V., & Zhuravlev, Y. (2016). *RolB* gene-induced production of isoflavonoids in transformed *Maackia amurensis* cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(17), 7479-7489.
- Häkkinen, S., Moyano, E., Cusidó, R., & Oksman-Caldentey, K. (2016). Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance. *Frontiers in plant science*, 7, 1486.
- Hiebert-Giesbrecht M. (2015). Variación espacio-temporal de terpenoides en poblaciones silvestres de *Pentalinon andrieuxii*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 66p.
- Huffman, G., White, F., Gordon, M., & Nester, E. (1984). Hairy-root-inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids. *Journal of bacteriology*, 157(1), 269-276.

- Ismail, H., Dilshad, E., Waheed, M. T., Sajid, M., Kayani, W. K., & Mirza, B. (2016). Transformation of *Lactuca sativa* L. with *rolC* gene results in increased antioxidant potential and enhanced analgesic, anti-inflammatory and antidepressant activities in vivo. *3 Biotech*, 6(2), 215.
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. N., & Scheffler, A. (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants—rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 14(6): 2016-2031.
- Jiménez-Aguilar L, A. (2016). Análisis de ácido betulínico y/o urechitoles en plantas regeneradas a partir de raíces transformadas de hoja de *Pentalinon andrieuxii*. Residencia Profesional. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 75p.
- Jonak, C., Ökrész, L., Bögre, L., & Hirt, H. (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:415–424.
- Juárez-Jaimes, V., Alvarado-Cárdenas, L. O., & Villaseñor, J. L. (2007). La familia Apocynaceae *sensu lato* en México: Diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78: 459-482.
- Kai, G., Liao, P., Xu, H., Wang, J., Zhou, C., Zhou, W., Qi, Y., Xiao, J., Wang, Y., & Zhang, L. (2012). Molecular mechanism of elicitor-induced tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34:1421–1433.
- Kikowska, M., Budzianowski, J., Krawczyk, A., & Thiem, B. (2012). Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in *in vitro* cultures of *Eryngium planum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34:2425–2433.
- Kim, O. T., Bang, K. H., Shin, Y. S., Lee, M. J., Jung, S. J., Hyun, D. Y., Kim, Y. C., Seong, N. S., Cha, S. W., & Hwang, B. (2007). Enhanced production of asiaticoside from hairy root cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Reports*, 26(11):1941-1949.
- Kim, O., Yoo, N., Kim, G., Kim, Y., Bang, K., Hyun, D., Kim, S., Kim, M., & Kim, M. (2013). Stimulation of Rg3 ginsenoside biosynthesis in ginseng hairy roots elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell, Tissue Organ Culture (PCTOC)*, 112:87–93.
- Kim, Y., Yeung, E., Hahn, E., & Paek, K. (2007). Combined effects of phytohormone, indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* CA Meyer. *Biotechnology letters*, 29(11), 1789-1792.
- Kingston, D., & Munjal, R. (1978). Plant anticancer agents. VIII. Constituents of *Inga punctata*. *Lloydia*, 41:499–500.

- Kiselev, K. V., Dubrovina, A. S., Veselova, M. V., Bulgakov, V. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2007). The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology*, 128(3): 681–692.
- Kurosaki, F., Tsurusawa, Y., & Nishi, A. (1987). Breakdown of phosphatidylinositol during the elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Plant physiology*, 85:601–604.
- Kuźma, Ł., Bruchajzer, E., & Wysokińska, H. (2009). Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6-7): 406-410.
- Kwon, H. C., Min, Y. D., Kim, K. R., Bang, E. J., Lee, C. S., & Lee, K. R. (2003). A new acylglycosyl sterol from *Quisqualis fructus*. *Archives of Pharmacal Research*, 26(4):275-278.
- Laszczyk, M., Jäger, S., Simon-Haarhaus, B., Scheffler, A., & Schempp, C. M. (2006). Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*betulae cortex*). *Planta Medica*, 72(15): 1389-1395.
- Lee, S. Y., Kim, S. G., Song, W. S., Kim, Y. K., Park, N., & Park, S. U. (2010). Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on hairy root induction and production of alizarin and purpurin in *Rubia akane* Nakai. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(4), 5406.
- León, P., & Guevara-García, A. (2007). La síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP; un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano. *Universidad Nacional Autónoma de México. Mensaje Bioquímico Vol. XXXI*, 77-89.
- Lezama-Dávila, C., Isaac-Márquez, A., Terrazas, C., Pan, L., Oghumu, S., Pech-Dzib, M., Barbi, J., Calomeni, E., Parinandi, N., Kingghorn, A., Isaac-Márquez, R., & Satoskar, A. (2014). *Pentalinon andrieuxii* root extract is effective in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. *Fitoterapia*, 28: 909–916.
- Li, B., Wang, B., Li, H., Peng, L., Ru, M., Liang, Z., Yan, X., & Zhu, Y. (2016). Establishment of *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib. hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag+, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation. *Protoplasma*, 253: 87–100.

- Li, W., Koike, K., Asada, Y., Yoshikawa, T., & Nikaido, T. (2005). Rosmarinic acid production by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 80:151–155.
- Liang, Z., Yang, D., Liang, X., Zhang, Y., Liu, Y., & Liu, F. (2012). Roles of reactive oxygen species in methyl jasmonate and nitric oxide-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell Reports*, 31:873–883.
- Llanes-Cocom, R. (2015). Identificación de metabolitos secundarios a partir de las raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 131p.
- López-Carreras, N., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 32 (3):81-91.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J., & Solano, R. (2003). Ethylene response Factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15:165–178.
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 3-13). New York, NY.: Humana Press,.
- Ludwig, A. A., Romeis, T., & Jones, J. D. (2004). CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of experimental botany*, 55(395), 181-188.
- Mangas, S., Bonfill, M., Osuna, L., Moyano, E., Tortoriello, J., Cusido, R., Piñol, M.T., & Palazón, J. (2006). The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca*. *Phytochemistry*, 67:2041–2049.
- Mannan, A., Liu, C., Arsenault, P., Towler, M., Vail, D., Lorence, A., & Weathers, P. (2010). DMSO triggers the generation of ROS leading to an increase in artemisinin and dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* shoot cultures. *Plant Cell Reports*, 29:143–152.
- Martín-Acosta, J. (2012). Regeneración de plantas in vitro de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. 70p.
- May-Mendoza, A. (2016). Regeneración de plantas a partir de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. arg.) Hansen & Wunderlin con el gen de la proteína roja fluorescente. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de Los Ríos. 73p.

- McCullen, C., & Binns, A. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22:101-127.
- Meijer, H. J., & Munnik, T. (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 54(1), 265-306.
- Melchor-Macías, P., Carballo-Perea, J. A., & Hernández, U. (2005). Posible actividad biológica del extracto de la raíz de *Pentalinon andrieuxii*. Universidad del Valle de México. Dirección General Académica. *Episteme*, (3).
- Méndez-González, M., Durán-García, R., Borges-Argáez, R., Peraza-Sánchez, S., Dorantes-Euan, A., Tapia-Muñoz, J. L., & Ferrer-Cervantes, M. (2012). Flora medicinal de los Mayas peninsulares. [Medicinal flora of peninsular Mayas]. Mérida, Yucatán, México,: Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC, Fordecyt-Conacyt, Fomix, Pronatura Península de Yucatán 81p.
- Moghaddam, M. G., Ahmad, F. B., & Samzadeh-Kermani, A. (2012). Biological activity of betulinic acid: a review. *Pharmacology & Pharmacy*, 3(02), 119.
- Nakano, T., Suzuki, K., Ohtsuki, N., Tsujimoto, Y., Fujimura, T., & Shinshi, H. (2006). Identification of genes of the plant-specific transcription-factor families cooperatively regulated by ethylene and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 119(4):407-413.
- Narayani, M., & Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1227-1252.
- Ohyama, K., Suzuki, M., Kikuchi, J., Saito, K., & Muranaka, T. (2009). Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 725–730.
- Oliveira, B. H., Santos, C. A., & Espíndola, A. P. (2002). Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(2): 95-98.
- Palazón, J., Cusidó, R. M., Roig, C., & Pinol, M. T. (1998). Expression of *roIC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants. *Plant Cell Reports*, 17:384-390.
- Pan, L., Lezama-Davila, C. M., Isaac-Marquez, A. P., Calomeni, E. P., Fuchs, J. R., Satoskar, A. R., & Kinghorn, A. D. (2012). Sterols with antileishmanial

- activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry*, 82, 128-135.
- Pandey, H., Pandey, P., Singh, S., Gupta, R., & Banerjee, S. (2015). Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation. *Protoplasma*, 252(2), 647-655.
- Pandreka, A., Dandekar, D., Haldar, S., Uttara, V., Vijayshree, S., Mulani, F., Aarthi, T., & Thulasiram, V. (2015). Triterpenoid profiling and functional characterization of the initial genes involved in isoprenoid biosynthesis in neem (*Azadirachta indica*). *BMC plant biology*, 15(1), 214.
- Park, N. I., Tuan, P. A., Li, X., Kim, Y. K., Yang, T. J., & Park, S. U. (2011). An efficient protocol for genetic transformation of *Platycodon grandiflorum* with *Agrobacterium rhizogenes*. *Molecular biology reports*, 38(4), 2307-2313.
- Pavlova, O. A., Matveyeva, T. V., & Lutova, L. A. (2014). *RoI*-Genes of *Agrobacterium rhizogenes*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 4(2), 137-145.
- Phillips, G. C., & Collins, G. B. (1979). In Vitro Tissue Culture of Selected Legumes and Plant Regeneration from Callus Cultures of Red Clover 1. *Crop Science*, 19(1), 59-64.
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C. M., & Memelink, J. (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology*, 147(3): 1347-1357.
- Qin, B., Ma, L., Wang, Y., Chen, M., Lan, X., Wu, N., & Liao, Z. (2014). Effects of acetylsalicylic acid and UV-B on gene expression and tropane alkaloid biosynthesis in hairy root cultures of *Anisodus luridus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(3), 483-490.
- Ramírez-Albores, E. O. (2016). Análisis de ácido betulínico y/o urechitoles en plantas regeneradas a partir de raíces transformadas de hipocótilo de *Pentalinon andrieuxii*. Residencia Profesional. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez Chiapas. 53p.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R., & Palazón, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182.
- Razboršek, M. I., Vončina, D. B., Doleček, V., & Vončina, E. (2008). Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia*, 67(5-6), 433-440.

- Roychowdhury, D., Halder, M., & Jha, S. (2017). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: genetic stability in long-term culture. *Transgenesis and Secondary Metabolism*, 323-345.
- Rzymowska, J. (1998). The effect of aqueous extracts from *Inonotus obliquus* on the mitotic index and enzyme activities. *Bollettino chimico farmaceutico*, 137(1), 13-15.
- Sandoval-Antúnez C, A. (2014). Producción de ácido betulínico en cultivos de raíces transformadas de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) Hansen & Wunderlin. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 92p.
- Savitha, B. C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., & Ravishankar, G. A. (2006). Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*, 41(1), 50-60.
- Sell, C. S. (2003). A fragrant introduction to terpenoid chemistry. The Royal Society of Chemistry. 426p.
- Sevón, N., & Oksman-Caldentey, K. M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica*, 68(10), 859-868.
- Shabani, L., Ehsanpour, A. A., Asghari, G., & Emami, J. (2009). Glycyrrhizin production by in vitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(5), 621-626.
- Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Fedoreyev, S. A., & Zhuravlev, Y. N. (2008). Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and bioengineering*, 100(1), 118-125.
- Siddiqui, B. S., Sultana, I., & Begum, S. (2000). Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *obtusa* leaves. *Phytochemistry*, 54(8), 861-865.
- Sivanandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Jeyaraj, M., Dev, G. K., Manickavasagam, M., Selvaraj, N., & Ganapathi, A. (2012). Optimization of elicitation conditions with methyl jasmonate and salicylic acid to improve the productivity of withanolides in the adventitious root culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(3), 681-696.

- Skarjinskaia, M., Ruby, K., Araujo, A., Taylor, K., Gopaldasamy-Raju, V., Musiychuk, K., Chichester, J. A., Palmer, G. A., de-la-Rosa, P., Mett, V., Ugulava, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2013). Hairy Roots as a Vaccine Production and Delivery System. *Biotechnology of Hairy Root Systems*, 134: 115-134.
- Srivastava, P., Kasoju, N., Bora, U., & Chaturvedi, R. (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.
- Stiles, A., & Liu, C. (2013). Hairy Root Culture: Bioreactor Design and Process Intensification. In: Doran P. (eds) *Biotechnology of Hairy Root Systems. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 134: 91-114.
- Stojakowska, A., Malarz, J., & Kisiel, W. (2002). Salicylate and methyl jasmonate differentially influence diacetylene accumulation pattern in transformed roots of feverfew. *Plant Science*, 163(6): 1147-1152.
- Suzuki, H., Reddy, M., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G., Huhman, D., Summer, L.W., Blount, J.W., Mendes, P., & Dixon, R. (2005). Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 220, 696–707.
- Suzuki, M., Xiang, T., Ohyama, K., Seki, H., Saito, K., Muranaka, T., Hayashi, H., Katsube, Y. J., Kushiro, T., Shibuya, M., & Ebizuka, Y. (2006). Lanosterol synthase in dicotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology*, 47: 565-571.
- Tepfer, D. (2016). DNA transfer to plants by *Agrobacterium rhizogenes*: A model for genetic communication between species and biospheres. *Transgenesis and Secondary Metabolism*, 1-41.
- Trumbull, E. R., Bianchi, E., Eckert, D. J., Wiedhopf, R. M., & Cole, J. R. (1976). Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). *Journal of pharmaceutical sciences*, 65(9), 1407-1408.
- Tuteja, N., & Mahajan, S. (2007). Calcium signaling network in plants: an overview. *Plant Signaling & Behavior*, 2:79–85.
- Vereshchagina, Y. V., Bulgakov, V. P., Grigorochuk, V. P., Rybin, V. G., Veremeichik, G. N., Tchernoded, G. K., & Chau, L. (2014). The *ro1C* gene increases caffeoylquinic acid production in transformed artichoke cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(18): 7773-7780.
- Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y., & Tan, R. X. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol

- production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, 15(4), 351-358.
- Wang, J. W., Zheng, L. P., Zhang, B., & Zou, T. (2009). Stimulation of artemisinin synthesis by combined cerebroside and nitric oxide elicitation in *Artemisia annua* hairy roots. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(2), 285-292.
- Wang, J., & Wu, J. (2013). Effective Elicitors and Process Strategies for Enhancement of Secondary Metabolite Production in Hairy Root Cultures. *Biotechnology of Hairy Root Systems. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 134: 55-89.
- Withers, S., & Keasling, J. (2007). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73:980-990.
- Yam-Puc, A., Avilés-Berzunza, E., Chan-Bacab, M. J., Peña-Rodríguez, L. M., & Godoy-Hernández, G. (2012a). *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Pentalinon andrieuxii* Müll. Arg. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(03): 256.
- Yam-Puc, A., Chee-González, L., Escalante-Erosa, F., Chan-Bacab, M., Arunachalampillai, A., Wendt, O., Sterner, O., Peña-Rodríguez, L.M., & Godoy-Hernández, G. (2012b). Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry Letters*, 5:45-48.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-Lopez, M., Chan-Bacab, M. J., Arunachalampillai, A., Wendt, O. F., Sterner, O., & Peña-Rodríguez, L.M (2009). Trinorsesquiterpenoids from the Root Extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Journal of natural products*, 72(4), 745-748.
- Yogeeswari, P., & Sriram, D. (2005). Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry*, 12:657-666. *Current Medicinal Chemistry*, 12:657-666.
- Zhang, J., Cheng, Z. H., Yu, B. Y., Cordell, G. A., & Qiu, S. X. (2005). Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646. *Tetrahedron letters*, 46(13), 2337-2340.
- Zhang, S., & Klessig, D. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, 6:520–527.
- Zhao, G., Yan, W., & Cao, D. (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.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4), 283-333.

Zheng, L. P., Guo, Y. T., Wang, J. W., & Tan, R. X. (2008). Nitric oxide potentiates oligosaccharide-induced artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *Journal of integrative plant biology*, 50(1), 49-55.