



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE ÁCIDO
BETULÍNICO Y URECHITOL A DURANTE EL
DESARROLLO DE *Pentalinon andrieuxii* Y SU
RELACIÓN CON LA METILACIÓN DE ADN**

Tesis que presenta

AUGUSTO IGNACIO ALMEYDA CEN

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán Mayo de 2017

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



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **AUGUSTO IGNACIO ALMEYDA CEN**, titulado "ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE ÁCIDO BETULÍNICO Y URECHITOL A DURANTE EL DESARROLLO DE *PENTALINON ANDRIEUXII* Y SU RELACIÓN CON LA METILACIÓN DE ADN", fue realizado en la Unidad de Biotecnología en la línea de Farmacobiología, en los laboratorios de Química orgánica 2 y Cromatina y Epigenética de plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la Dra. Clelia De la Peña Seaman, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 29 de Mayo de 2017

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, 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: _____



Augusto Ignacio Almeйда Cen

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado, Estudio del origen biosintético de terpenoides con esqueleto campechano producidos por *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae). Bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la Dra. Clelia De la Peña Seaman.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada número 397735.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y a la Dra. Clelia De la Peña por su asesoría y ayuda en la realización de la tesis.

A los técnicos; Karlina García, Fabiola Escalante, Eduardo castillo y Gabriel Dzib, por su valiosa ayuda en la realización de este proyecto de investigación

Al Dr. Gregorio Hernández por las semillas proporcionadas

Al Ing. Fernando Contreras por el espacio y apoyo en el vivero

Al M. en C. Radamés Alvarez por su ayuda en los análisis de HPLC

A mis compañeros del laboratorio de Química orgánica y del laboratorio de Epigenética y Cromatina de plantas por sus valiosas aportaciones y consejos.

DEDICATORIA

A mi familia (Augusto, Eloísa, Pinthya, Suemy, Margarita, Teresa, Basilia); gracias por su continuo apoyo, los quiero.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 Metabolitos secundarios	3
1.1.1 Terpenos.....	3
1.1.2 Sesquiterpenos.....	6
1.1.3 Triterpenos.....	7
1.1.3.1 Ácido betulínico.....	7
1.1.2 Biosíntesis de los metabolitos secundarios	8
1.1.3 Importancia ecológica de los metabolitos secundarios.....	8
1.1.2 Epigenética	11
1.1.2.1 Metilación global del ADN	13
1.1.2.2 Metilación del ADN durante el desarrollo de la planta y la senescencia	14
1.1.2.3 Correlación entre la metilación del ADN y la edad cronológica de la planta	14
1.1.2.4 Influencia de la metilación del ADN en la producción de metabolitos secundarios	15
OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo general.....	18
1.2.2 Objetivos particulares.....	18
HIPÓTESIS	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	19
CAPITULO II.....	21
2.2. METODOLOGÍA	21
2.2.1 Material vegetal.....	21
2.2.2. Extracción y cuantificación de ácido betulínico y urechitol A.	22
2.2.3 Análisis del ácido betulínico por cromatografía de alta resolución (HPLC)	22

2.2.4 Análisis del urechitol A por cromatografía de gases	23
2.2.5 Extracción de ADN.....	23
2.2.6 Digestión del ADN.....	24
2.2.7. Análisis por HPLC y cuantificación del porcentaje de metilación.....	24
2.2.8 Análisis estadístico	25
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
2.3.1. Caracterización morfológica.....	25
2.3.2 Cuantificación de ácido betulínico	30
2.3.3 Cuantificación de Urechitol A	32
2.3.4. Extracción de ADN.....	33
2.3.5 Metilación global del ADN	34
CAPÍTULO III.....	43
3.1 CONCLUSIONES	43
3.2 PERSPECTIVAS	44
REFERENCIAS	45

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Ruta biosintética de los Terpenos	5
Figura 1.2 Urechitoles	6
Figura 1.3 Estructura del AB.....	7
Figura 1.4 Modificaciones epigenéticas	12
Figura 1.5 Plasticidad en la metilación	13
Figura 1.6 Distribución geográfica de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	16
Figura 1.7 Estrategia experimental	19
Figura 2.1 Plantas de <i>P.andrieuxii</i> en dos condiciones de crecimiento.....	16
Figura 2.2 Crecimiento de <i>P. andrieuxii</i>	27
Figura 2.3 Cambios morfológicos durante el desarrollo en condiciones MS.....	28
Figura 2.4 Caracterización morfológica durante el desarrollo en condiciones MS.....	29
Figura 2.5 Contenido de AB en plantas MS y S	30
Figura 2.6 Contenido de AB durante el desarrollo de plantas MS	31
Figura 2.7 Cromatogramas con CG	32
Figura 2.8 Geles de agarosa , integridad del ADN.....	34
Figura 2.9 Niveles de metilación en condiciones MS y S	35
Figura 2.10 Niveles de metilación MS durante el desarrollo.....	36
Figura 2.11 Comparación de los niveles de metilación entre órganos.....	37
Figura 2.12 Relación características morfológicas- edad	39
Figura.2.13 Relación Metilación del ADN- edad.....	40
Figura 2.14 Dinámica acumulación AB y metilación del ADN.....	41

LISTADO DE CUADROS

Tabla 1 Clasificación de los terpenos.....	4
--	---

ABREVIATURAS

AB	Ácido betulínico
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CG	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPP	Isopentil difosfato
MEP	Metileritritol fosfato
MSAP	Polimorfismo de amplificación sensible a la metilación
MS	Plantas en media sombra
S	Plantas en sombra
H	Hoja
T	Tallo
R	Raíz
UA	Urechitol A
5mdC	5-metil-2´deoxicitidina
dC	2´-deoxicitidina



RESUMEN

Las plantas producen metabolitos secundarios los cuales les confieren ventajas ecológicas, además estos metabolitos pueden presentar actividades biológicas lo que demuestra la importancia de su estudio. Recientemente, el estudio fitoquímico de *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae), una planta utilizada en la medicina tradicional maya, reportó el aislamiento del ácido betulínico, un triterpeno con una amplia variedad de actividades biológicas, del urechitol A, un tri-nor-sesquiterpeno con una estructura química novedosa. Sin embargo, hasta ahora, no se conoce en que momento de su desarrollo se empiezan a producir estos metabolitos ni la influencia de las condiciones ambientales en su acumulación.

Se ha demostrado que el nivel de metilación del ADN puede utilizarse para predecir la edad de las plantas y también se ha reportado que existe una relación entre el nivel de metilación del ADN y la producción de algunos metabolitos secundarios. Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la relación entre la edad cronológica de *P. andrieuxii* y la metilación del ADN, con la acumulación de ácido betulínico y urechitol A durante el crecimiento de la planta en dos condiciones diferentes de crecimiento; en condiciones de media sombra (MS) y sombra (S).

Los resultados obtenidos mostraron que bajo estas dos condiciones de crecimiento las plantas presentan diferencias en la morfología y un menor crecimiento en las plantas (S), bajo esta condición se encontró la cantidad de ácido betulínico (AB) es menor que en las plantas MS. Adicionalmente la cantidad de AB en hojas se encuentra presente durante todo el desarrollo de la planta, sin embargo, su concentración es mayor al inicio del crecimiento, sugiriendo que el ácido betulínico podría estar funcionando como un metabolito relacionado con la defensa de la planta. Por otra parte, en este trabajo no se detectó la presencia de urechitol A en ningún órgano de plantas de diferentes edades, a diferencia de los resultados obtenidos en el estudio de plantas silvestres donde la producción de este terpenoide inicia en la etapa en la que la planta desarrolla una morfología de trepadora, por lo cual dada la similitud entre la población de estudio y las poblaciones silvestres, es posible que la producción de urechitol A tenga que ver más con factores ambientales que con factores genéticos. Con respecto a los niveles de metilación global del ADN, aun cuando se detectaron cambios diferenciales de éstos durante el desarrollo de la planta, no se encontró una relación clara entre la edad cronológica de la planta. Tampoco se observó una relación entre la cantidad de AB con los niveles de metilación en el ADN durante el desarrollo, sin

embargo, se sugiere que, a una mayor cantidad de luz, mayor metilación del ADN y mayor producción de AB.

ABSTRACT

Plants can produce secondary metabolites which confers them environmental advantages, these metabolites also may have biological activities demonstrating the importance of studying secondary metabolites. *Pentalinon andrieuxii* is an interesting plant that has been using in the Mayan traditional medicine, where is possible to isolate betulinic acid, a triterpenoid that has proven a wide variety of biological activities It has also been isolated urechitol A, a trinorsesquiterpene with a novel chemical structure. However, it is unknown where and when these metabolites are begun to produce and the influence of environmental on the production of this terpenes.

It has been demonstrated that DNA methylation level can be used to predict the of plants, also has been reported a relationship between the DNA methylation level and the production of some secondary metabolites. Based on the above the aim of this work was to evaluate the relationship between chronological age of *Pentalinon andrieuxii* and DNA methylation, with the accumulation of betulinic acid and urechitol A during plant development in two environmental growth conditions; Plants in half shade (MS) and plants in shade (S)

The results showed that under these two growing conditions, the plants showed differences in the morphology and a lower growth in the plants (S), in this condition the amount of Betulinic acid (AB) is lower than in MS plants. In addition, the amount of AB in leaves is present throughout the development of the plant, however, its concentration is higher at the beginning of growth, suggesting that betulinic acid could be related as a defense metabolite. On the other hand, the presence of urechitol A was not detected in any organ of plants of different ages, unlike the results obtained in the study of wild plants where the production of this terpenoid begins in the stage in which the plant develops a climber morphology, so that given the similarity between the study population and the wild populations, it is possible that the production of urechitol A has to be more related with environmental factors than with genetic factors. Regarding the levels of global DNA methylation, even when differential changes were detected during plant development, no clear relationship was found between the chronological age of the plant. Neither was there a relationship between the amount of AB with the methylation levels in the DNA during the development, however, it is suggested that, to a greater amount of light, greater DNA methylation and greater AB production.

INTRODUCCIÓN

Las plantas producen una amplia y diversa cantidad de productos orgánicos conocidos como metabolitos secundarios que son ecológicamente importantes para éstas. Además, los metabolitos secundarios son fuente de productos naturales tales como agroquímicos, productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, colorantes, saborizantes, etc. (Croteau et al., 2000). Un gran grupo de los metabolitos que producen las plantas pertenecen a los terpenos, como por ejemplo el ácido betulínico, del cual se han reportado diversas actividades biológicas como antiprotozoaria, antifúngica, antibacteriana, anticancer, anti-VIH, etc. (McGarvey y Croteau, 1995).

Se ha demostrado que la producción de metabolitos secundarios depende del entorno y del órgano específico en la planta (De Luca y St Pierre, 2000) y que éstos pueden acumularse dependiendo de la edad de ésta (Whitmer et al., 2002; Janzen y Waterman, 1984). Asimismo, existen reportes que señalan que la producción de metabolitos secundarios puede estar relacionada con la regulación de ciertos genes, los cuales pueden expresarse o reprimirse a través de mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN (Fu et al., 2012; Chan et al., 2005).

Por otra parte, se ha reportado que los niveles de metilación en el ADN están relacionados con la edad de las plantas ya que estos niveles se regulan a lo largo de la ontogenia (Hasbún et al., 2005; Baurens et al., 2004; Fraga et al., 2002; Zluvova, 2001). Esta característica puede ser empleada para establecer un tipo de reloj biológico (Valledor et al., 2007) y estudios recientes demuestran que es factible establecer una relación entre la metilación en el ADN y la edad de la planta (Horvath, 2013). Un ejemplo reciente de este tipo de estudios es el realizado con el bambú (*Phyllostachys heterocycla*), una especie que presenta dificultades para el establecimiento de su edad; en este caso se pudo establecer una relación entre la edad cronológica y la metilación del ADN, observándose que a mayor edad había una mayor metilación en el ADN (Yuang et al., 2014).

Una planta reconocida por su producción de metabolitos secundarios de interés es *Pentalinon andrieuxii*; de esta especie se ha reportado el aislamiento del ácido betulínico y el urechitol A, un trinorsesquiterpeno con un esqueleto novedoso (Yam-Puc et al., 2009). Recientemente se reportó que la producción de urechitol A en *P. andrieuxii* ocurre en algún

momento durante la transición de plantas jóvenes a plantas de edad intermedia (Hiebert-Giesbrecht et al., 2016). Sin embargo, hasta ahora se desconoce el momento cronológico en el que empieza la producción de este novedoso metabolito. En este trabajo se investigó la posible correlación entre los niveles de metilación global del ADN en diferentes órganos de *P. andrieuxii* con la edad cronológica de la planta y con la acumulación de ácido betulínico y urechitol A durante su desarrollo en condiciones de vivero.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES


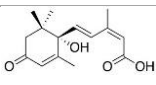
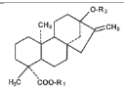
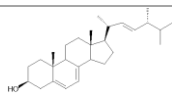
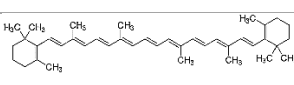
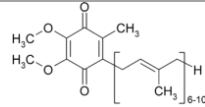
1.1 Metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de productos orgánicos de bajo peso molecular que no son utilizados en el metabolismo primario, es decir, parecen no tener una función directa en su crecimiento y desarrollo (Pichersky y Gang, 2000). Estos productos orgánicos se conocen como metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Actualmente se reconoce la importancia ecológica de los metabolitos secundarios como mediadores en las interacciones de las plantas con el ambiente (Wink, 2003). Los productos naturales son un recurso económicamente valioso debido a que han sido fuente de productos farmacéuticos, de agroquímicos, saborizantes, fragancias, colorantes, biopesticidas y aditivos para alimentos (Hussain, 2012). Los metabolitos secundarios en plantas están clasificados dependiendo de su origen biosintético: desde los ácidos grasos y policétidos que provienen de la ruta del acetato, a los aminoácidos aromáticos, fenilpropanoides y alcaloides que derivan de la ruta del shikimato, y los terpenoides que provienen de la ruta del mevalonato y metileritritol fosfato (Dewick, 2009).

1.1.1 Terpenos

Los terpenos o terpenoides son compuestos que están contruidos de unidades de isopreno, por lo que sus estructuras se pueden dividir en unidades de cinco carbonos (C5) (Hanson, 2003). Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de las unidades de isopreno que contienen (Tabla1).

Tabla 1 Clasificación de los terpenos

Nombre	Unidades de isopreno	Ejemplo
Monoterpenos C₁₀	2	Linanol 
Sesquiterpenos C₁₅	3	Ácido abscísico 
Diterpenos C₂₀	4	Esteviol 
Triterpenos C₃₀	6	Ergosterol 
Tetraterpenos C₄₀	8	β-caroteno 
Politerpenos	Más de 8	Ubiquinona 

Los terpenos se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico (MEV), la cual ocurre en el citosol, y la ruta del metileritritol fosfato (MEP), que se encuentra en los cloroplastos. En la ruta MEV tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), los sustratos para la formación de terpenos de mayor tamaño. Por la ruta MEP se puede generar también IPP, mediante la producción de 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato a partir del ácido pirúvico y del gliceraldehido 3-fosfato. El IPP y DMAPP son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por PRENIL TRANSFERASAS para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursores de diterpenos (Fig. 1.1).

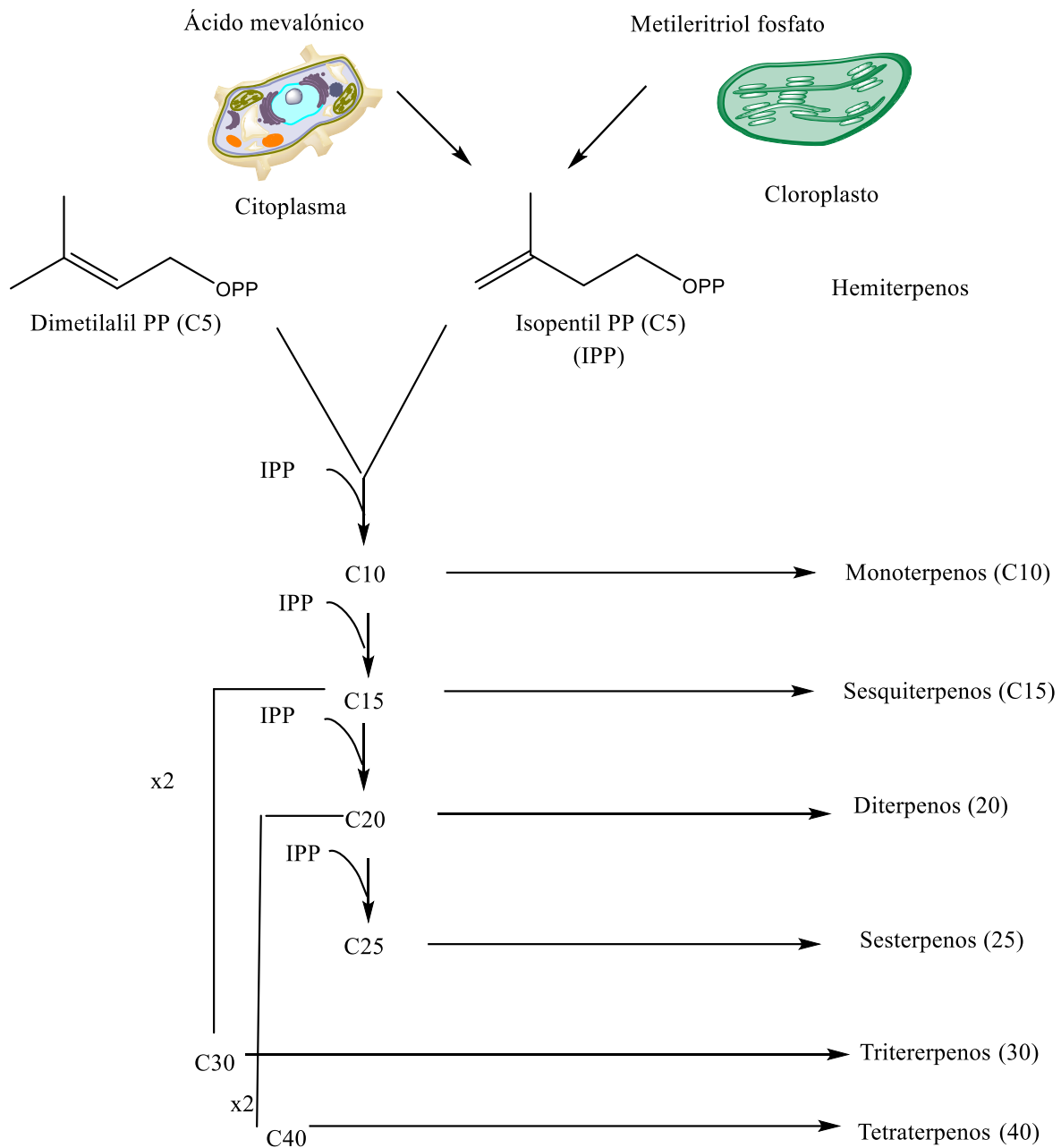


Figura 1.1 Ruta biosintética de los terpenos

Los terpenos constituyen la familia más grande de productos naturales (Aharoni et al., 2005; McGarvey y Croteau, 1995). La ruta metabólica biosintética de los isoprenoides genera metabolitos primarios y secundarios que son de gran importancia en el crecimiento y supervivencia de las plantas (Aharoni et al., 2005). Los terpenos están a cargo de diversas funciones en las plantas, por ejemplo, son reguladores del crecimiento vegetal (gibberinas

y ácido abscísico), forman parte de los pigmentos fotosintéticos (fitol, carotenoides), transportan electrones (ubiquinona, plastoquinona), y son componentes estructurales de las membranas (fitoesteroles). Además de funciones estructurales y fisiológicas, muchos terpenos (generalmente de las familias de C10, C15 y C20) están relacionados con la comunicación y la defensa de las plantas (Mc Garvey y Croteau, 1995). Por ejemplo, los terpenos pueden funcionar como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas, fitotoxinas competitivas, antibióticos y repelentes de herbívoros (Kutchan, 2001). Los terpenos, también, se pueden encontrar en numerosos aceites esenciales, resinas y ceras (Dawson, 1994). El grupo de los terpenos incluye también productos utilizados en la industria de polímeros (caucho, chicle), fármacos (artemisinina, taxol) y agroquímicos (piretrina, azdiractina) (Schwab et al., 2013).

1.1.2 Sesquiterpenos

La estructura de los sesquiterpenos (C15) se basa en tres unidades de isopreno. Estas moléculas se pueden unir formando cadenas hidrocarbonadas alifáticas abiertas y sistemas cíclicos. Los cíclicos pueden ser de tres tipos: los sesquiterpenos tipo mono, bi y tricíclicos (Craley, 2009). Se tiene un registro de cerca de 300 tipos de esqueletos de los compuestos sesquiterpénicos (Chen y Chiu, 2006). En las plantas, estos compuestos juegan un papel ecológico importante en interacciones con insectos y microbios, y actúan como atrayentes, repelentes, antialimentarios y fitoalexinas (Modzelewska et al., 2005; Wang et al., 2005). En *P. andrieuxii* se aislaron dos nuevos sesquiterpenos, el urechitol A y el urechitol B, que son biológicamente no activos, pero con una interesante estructura trinorsesquiterpenoide (Fig.1.2) (Yam-Puc et al., 2009).

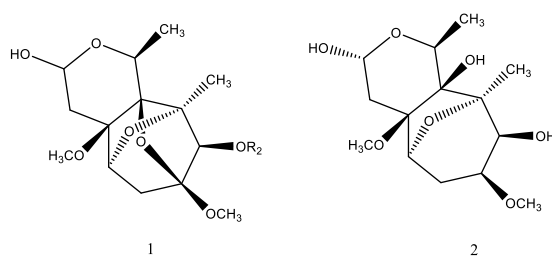


Figura 1.2 Urechitol A (1) y urechitol B (2), trinorsesquiterpenos aislados de las raíces de *Pentalinon andrieuxii*.

1.1.3 Triterpenos

Los triterpenos son formados biosintéticamente de seis unidades de isopreno y comparten en común el precursor escualeno (C₃₀). Los distintos tipos de cierre del anillo en el intermediario acíclico (escualeno) pueden dar lugar a más de un tipo de triterpeno y en las últimas etapas de síntesis pequeños fragmentos de carbono pueden ser removidos para producir moléculas con menos de 30 átomos de carbono. Debido al reordenamiento que puede ocurrir durante la biosíntesis existen más triterpenos producidos en las plantas que cualquier otro grupo de terpenoides.

Los triterpenos son un grupo de metabolitos secundarios que han mostrado una amplia actividad biológica (Kayser et al, 2003), tal es el caso del ácido betulínico, el cual ha sido aislado en diferentes especies de plantas, incluyendo *P. andrieuxii*, donde mostró actividad antiprotozoaria (Domínguez-Carmona et al., 2010).

1.1.3.1 Ácido betulínico

El ácido betulínico, ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29) en-28-oico, es un lupano pentacíclico que se encuentra ampliamente distribuido en diversos organismos, principalmente en las plantas (Chatterjee et al., 2000). La forma reducida (betulina) del ácido betulínico fue primeramente aislada de plantas en 1788 por Johan Tobias Lowitz a partir de cortezas de abedul. La betulina y el ácido betulínico han sido extraídos de diversas plantas como por ejemplo *Sarracenia flava* (Sarraceniaceae), *Diospyros spp.* (Ebenaceae), *Inga punctata* (Fabaceae), *Ziziphus spp.* (Rhamnaceae), *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae), *Syzygium spp.* (Myrtaceae) y *Betula alba*. Esta última exhibe un alto contenido de betulina en su corteza (superior al 22%); una simple oxidación de la betulina permite la obtención de ácido betulínico (Fig. 1.3).

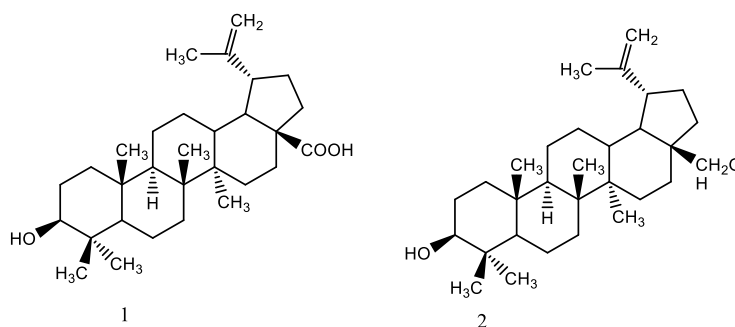


Figura 1. 3 Estructuras del ácido betulínico (1) y la betulina (2)

El ácido betulínico y sus derivados han sido reportados con diversas actividades biológicas como son actividad anti VIH, antibacterial, antifúngica, antiplasmodial, anticancerígena y anti inflamatoria (Lee et al., 2015; Bache et al., 2014).

1.1.2 Biosíntesis de los metabolitos secundarios

Una ruta biosintética es una secuencia de reacciones química que con pocas excepciones son mediadas por enzimas. El principal objetivo en las investigaciones de rutas biosintéticas es conocer las secuencias de las reacciones y las enzimas que intervienen en ellas. Los estudios de biosíntesis empiezan con la especulación y propuestas de las distintas reacciones basándose generalmente en las reacciones conocidas; para probar estas propuestas es necesaria la incorporación de precursores marcados isotópicamente a la planta o al organismo que produce el metabolito que se desea estudiar. Para tener éxito en estos experimentos es de vital importancia que el organismo esté activamente sintetizando el producto de interés durante el periodo en el que es expuesto a los precursores marcados. Una vez terminado el proceso de incorporación, el metabolito es aislado, purificado y analizado para detectar la presencia del isótopo en su estructura y reconocer los cambios que ocurrieron durante la biosíntesis (Dewick, 2009).

1.1.3 Importancia ecológica de los metabolitos secundarios

Se ha acumulado evidencia de que los metabolitos secundarios están relacionados en la comunicación planta-ambiente (Kliebenstein, 2015). En primer lugar, éstos pueden tener un papel en la defensa, ya que las plantas al ser organismos sésiles no pueden huir cuando son atacadas por otras plantas, animales y microorganismos, por lo cual éstas tuvieron que desarrollar estrategias para mantener alejadas a otras plantas competidoras, parásitos y depredadores (Wink, 2003). Existen metabolitos que actúan como anti-alimentarios y deterrentes, e.g. los glucósidos cianogénicos que son tóxicos para muchos depredadores (Gleadow y Woodrow, 2002), los alcaloides que confieren una defensa química contra el ataque de insectos y que su liberación puede ser inducida como respuesta al daño de la planta (Shinya et al., 2016), los terpenos, también relacionados con la protección, que pueden ser volátiles y liberarse como consecuencia del ataque de un herbívoro, con el objetivo de atraer a una depredador del herbívoro (Turlings et al., 1993). Varios terpenos pentacíclicos como la β -amirina, los derivados de la betulina, el ácido ursólico y el ácido oleanólico han demostrado poseer actividad insecticida (González-Coloma et al., 2010), en

tanto que otros triterpenos cumplen la función de evitar el crecimiento de plantas competidoras (Wang et al., 2014).

Los metabolitos secundarios también pueden jugar un papel en la fisiología de la planta e.g. algunos flavonoides pueden proteger a la planta de la radiación ultravioleta (Kootstra, 1994), en tanto que otros metabolitos como las poliaminas promueven el crecimiento en situaciones de estrés abiótico (Akula y Ravishankar, 2011).

Otra de las funciones que tienen los metabolitos secundarios es como atrayentes de polinizadores. Por ejemplo, algunos monoterpenos les confieren una fragancia a las plantas (Gershenzon y Dudareva, 2007), en tanto que las antocianinas y carotenoides pueden proporcionar color que estimula a los polinizadores (Bartley y Scolnik, 1995; Schemske y Bradshaw, 1999). Adicionalmente, la producción de algunos metabolitos secundarios representa una ventaja evolutiva dado que éstos pueden funcionar como antialimentarios, deterrente de herbívoros, fungicida, antimicrobianos y antioxidantes. La presencia de algunos metabolitos secundarios en varios grupos de plantas, como los triterpenos, dejan en evidencia que aun representando un costo energético alto, su producción en la planta es importante por las ventajas ecológicas que le otorgan (Neilson et al., 2013).

1.1.4 Acumulación de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios pueden distribuirse ampliamente en diversos taxones como es el caso de los glucósidos cianogénicos que se han encontrado en más 2000 especies, cubriendo todos los grupos de plantas vasculares, incluyendo angiospermas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Bennet y Wallsgrove, 1994). Por otra parte, existen metabolitos cuya distribución es más restringida, e.g. la camptothecina que se encuentra en géneros de sólo cinco familias como Icacinaceae, Rubiaceae y Apocynaceae (Zhang et al., 2004), y la brucina que solamente se ha reportado en el género *Strychnos* (Agrawal et al., 2011). Otros metabolitos sólo se han reportado de una especie en particular, tal es el caso del urechitol A y el urechitol B (Yam-Puc et al., 2009).

Los metabolitos secundarios pueden estar presentes en todos los órganos de las plantas o pueden estar restringidos a órganos específicos, a tejidos e incluso a tipos celulares, como ocurre en *Catharantus roseus*, donde los alcaloides indólicos se acumulan en unas células llamadas ideoblastos y lactíferos (Guirimand et al., 2011). Los metabolitos secundarios no necesariamente son acumulados en los lugares donde se producen. Por ejemplo, algunos

alcaloides quinolizidinicos son producidos en los cloroplastos de las hojas, pero son acumulados en las células de la epidermis del tallo (Wink y Roberts, 1998).

La acumulación de los metabolitos secundarios puede ser variable y ésta puede depender de factores ambientales, así como del estado de desarrollo de la planta; se ha observado que en *Panax ginseng*, la acumulación de ginsenósidos aumenta con la edad de la planta (Brown et al., 2003; Li et al., 1996). Asimismo, algunos metabolitos secundarios pueden aparecer en un momento determinado del desarrollo de la planta y su concentración puede variar conforme al tiempo, como se observa en algunos monoterpenos producidos por *Pinus pinea*. Esta variación con respecto al estado de desarrollo se ha puesto de manifiesto también en otro grupo de metabolitos como las cumarinas, debido a que se ha reportado que la acumulación de furanocumarinas en las hojas de *Heracleum lanatum* aumenta con el tiempo de crecimiento (Zobel y Brown, 1990). Finalmente, en un estudio sobre la producción de aceites esenciales en plantas de *Cymbopogon citratus* de diferentes edades cronológicas, se observó que la producción de aceites esenciales aumenta con la edad de la planta (Rocha et al., 2014).

1.1.5 Importancia de conocer la edad en las plantas

Para el estudio de plantas de interés medicinales importante conocer su edad o estado de desarrollo, con el fin de saber en qué momento deben ser colectadas para obtener la mayor cantidad de ingredientes activos (Liang et al., 2015; Ronicely et al., 2014).

De la misma forma, en los estudios de biosíntesis es indispensable conocer en qué momento se produce el metabolito de interés, para asegurar el éxito en la incorporación de los precursores marcados, pues como se demostró en el trabajo de Sauerwein (1993), durante el estudio de la biosíntesis de alcaloides tropánicos utilizando [13-C]-acetatos se obtuvieron altos niveles de incorporación en metabolitos como la tropinona, la littorina y la escopolamina, se obtuvieron bajos niveles de incorporación en la hiabildona, lo que sugirió que este metabolito podría estar produciéndose en una etapa del crecimiento tardía cuando el precursor marcado ya había sido incorporado y consumido en el medio de cultivo.

Diversos estudios en ecología subrayan la importancia de conocer la edad cronológica de las plantas como dato importante que ayuden a entender fenómenos de la estructura, ecofisiología y de restauración ecológica de los bosques (Verheyden et al, 2004; Bond, 2000; Tappeiner et al., 1997). Cabe resaltar que la mayoría de los estudios realizados para conocer la edad de las plantas se basan en aspectos morfológicos, sin embargo, como se

ha puesto en evidencia, cuando se miden aspectos morfológicos éstos pueden ser diferentes en plantas de la misma edad. Lo anterior se observó en el trabajo de Yakota y Hagira (1996), en donde plantas con la misma edad presentaron tamaños diferentes. Por esta razón se ha sugerido buscar herramientas alternativas que permitan la estimación de la edad de las plantas y se ha sugerido que análisis moleculares pueden brindar información más clara acerca de los estados de desarrollo. En ese sentido, se pueden aprovechar las marcas epigenéticas, como la metilación en el ADN, como un factor relacionado con etapas de crecimiento (Hernandez et al., 2011).

1.1.2 Epigenética

En las células eucariotas, el ADN se encuentra empaquetado en la cromatina, es decir en el complejo de ADN y proteínas que constituyen los cromosomas. Existen modificaciones covalentes en las histonas y además metilaciones en las citocinas en el ADN que pueden influir en la expresión de los genes (Margueron y Reinberg, 2010) y así modificar la epigenética del organismo que a su vez puede ser heredada a futuras generaciones.

Las modificaciones epigenéticas pueden tener consecuencias morfológicas, fisiológicas y ecológicas (Henderson y Jacobsen, 2007; Rapp y Wendel, 2005) (Fig. 1.4). Las regulaciones de estos mecanismos están implicados en la expresión de genes, ya que afectan el acceso de la maquinaria de transcripción a la información genética (Fig. 1.4) (Miguel y Marum, 2011). Estos mecanismos regulan casi todas las funciones genéticas incluyendo la transcripción, la replicación, la reparación del ADN, la transposición de genes y la diferenciación celular (Feil y Fraga, 2011).

La metilación del ADN es probablemente el mecanismo epigenético más estudiado y el cual juega un papel en la impronta genómica, en el silenciamiento de transposones, así como en la expresión de genes endógenos (Boyko y Kovalcuk, 2013). La metilación del ADN puede clasificarse en tres tipos, de acuerdo al contexto de la secuencia de citosina, i.e. ésta puede ser en los sitios CG, CHG y CHH (H= A, C o T). Las metilaciones en la secuencia CG predomina en animales, en cambio en las plantas se encuentran los tres contextos de citosina metilada, siendo altamente metilados los sitios CG, los sitios CHG a un nivel medio y los sitios CHH a un nivel bajo (Feng et al., 2010). Actualmente se sabe que una hipermetilación puede estar relacionada con la represión génica, mientras que una hipometilación provoca la expresión de algunos genes (Meyer, 2011).

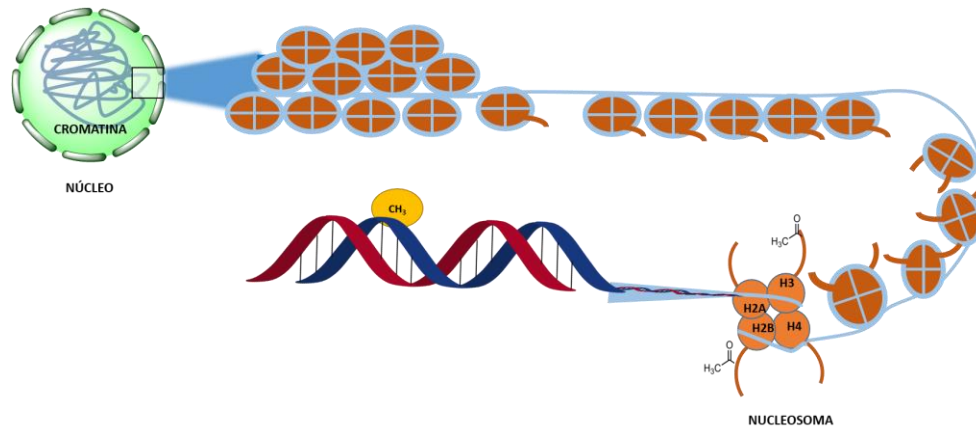


Figura 1.4 La cromatina puede verse afectada por modificaciones en el ADN como las metilaciones de las citosinas, relacionadas con la represión de genes, modificaciones en las histonas como acetilaciones y metilaciones, todas éstas marcas inducen al compactamiento de la cromatina (heterocromatina) o al relajamiento (eucromatina), dificultando o favoreciendo la transcripción.

La plasticidad en la metilación se refiere a los cambios en la metilación y desmetilación que ocurren durante el crecimiento y desarrollo de la planta. La reducción de la metilación en un tejido u órgano se conoce como desmetilación, la cual está presente en eventos de diferenciación programada como la floración, el crecimiento activo o la embriogénesis (Steimer et al., 2004; Zluvova et al., 2001). Los cambios en la expresión de los genes efectuados por la metilación del ADN han sido reportados como un evento ontogénico normal en el desarrollo y en la ganancia-pérdida de la habilidad morfológica durante el proceso de envejecimiento o revigorización. La diferenciación implica un incremento de la metilación, llamada metilación *de novo*, la cual se ha observado durante el envejecimiento (Valledor et al., 2007).

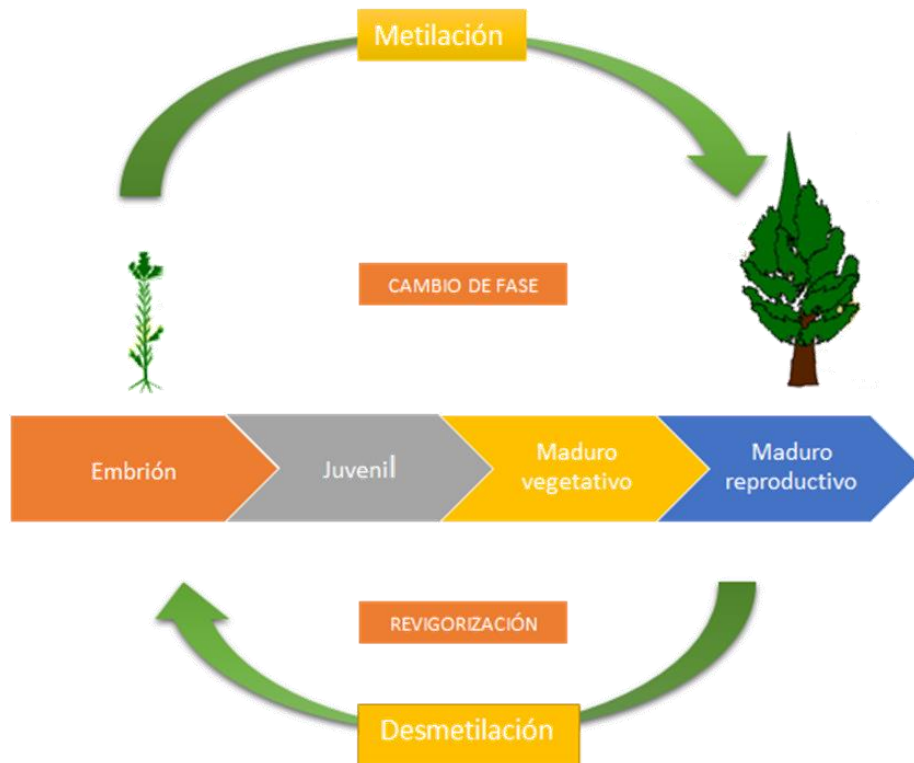


Figura. 1.5 Plasticidad en la metilación. Los cambios en la metilación durante el crecimiento de la planta son un proceso dinámico. Pueden incrementarse durante el desarrollo de la planta y regresar a niveles de metilación anteriores debido a la desmetilación que activa ciertos genes.

1.1.2.1 Metilación global del ADN

La cuantificación global de la 5-metildeoxitocina (5mdC) en el ADN establece ciertos grados de metilación que pueden ser utilizados como un marcador en los procesos de crecimiento y desarrollo (Thomas, 2013), así mismo desde una perspectiva molecular, las variaciones en la metilación del ADN global pueden significar el cambio en la estructura de la cromatina durante el crecimiento y envejecimiento (Valledor et al., 2007). El análisis de la metilación global del ADN se define como la relación entre las desoxicitidina metiladas y el total de desoxicitidina del genoma expresado en porcentaje. Este análisis puede realizarse una electroforesis capilar (High performance Capillary Electrophoresis, HPCE) (Herranz et al., 2006), que consiste en la hidrólisis de las cadenas de ADN utilizando enzimas y tratamientos alcalinos para liberar los desoxinucleósidos, seguido de una HPCE. Un

proceso similar puede llevarse a cabo por HPLC, para lo cual se ha reportado que también es necesaria una degradación enzimática (Kuo et al., 1980). Los 2'-deoximononucleósidos pueden ser obtenidos usando Nucleasa PI, DNAasa I y fosfodiesterasas (Ehrlich et al., 1982), seguido de una hidrólisis con una fosfatasa alcalina. Los niveles de metilcitosina son cuantificados por HPLC comparando la absorbancia relativa de la citosina y de la metilcitosina a una longitud de onda determinada (Fraga et al., 2002).

1.1.2.2 Metilación del ADN durante el desarrollo de la planta y la senescencia

Los niveles globales de metilación del ADN son específicos para la edad, la especie, un tejido y el órgano en las plantas. Se ha reportado que los brotes juveniles de *Castanea sativa* tienen un nivel de metilación menor (13.7%) que los brotes de árboles maduros (15%), en tanto que en un estudio con *Pinus radiata* se encontró que la porción basal de las agujas foliares de los individuos juveniles (sin habilidad reproductiva) posee un nivel de metilación 42%, menor que el de adultos maduros en etapa reproductiva (Fraga et al., 2002). Sin embargo, una clona que adquirió su competencia reproductiva de manera temprana mostró un aumento en sus niveles de metilación, lo que confirmó que los niveles de metilación aumentan cuando ocurre un cambio de fase, e.g. entre individuos juveniles y maduros (Fraga et al., 2002).

Dado que los niveles de metilación dependen de la edad o el estado de desarrollo, algunos investigadores consideran al nivel de metilación del ADN como un reloj biológico para evaluar la edad en las plantas (Valledor et al., 2007).

1.1.2.3 Correlación entre la metilación del ADN y la edad cronológica de la planta

Debido a que es difícil establecer la edad de ciertas plantas, se ha aprovechado la factibilidad de las marcas epigenéticas para relacionarlas con la edad. En el estudio de Guo y colaboradores (2011) se observaron diferencias significativas cuando se compararon los niveles de metilación en plantas de bambú de diferentes edades (5, 31 y 60 años). Se demostró que los niveles de metilación aumentan conforme aumenta la edad de la planta. Un estudio más reciente se enfocó en establecer la relación numérica entre la metilación del ADN y la edad cronológica del bambú, utilizando un análisis de MSAP (polimorfismo de amplificación sensible a la metilación) en plantas de nueve edades cronológicas, utilizando seis oligos para observar diferencias en la metilación (Yuan et al., 2014). Los resultados

obtenidos mostraron diferentes niveles de metilación para cada una de las edades cronológicas, siendo mayores las diferencias entre plantas de mayor edad, lo que permitió establecer una relación entre la edad cronológica de las plantas y sus niveles de metilación en el ADN genómico. Estos resultados demuestran la importancia de ampliar el conocimiento sobre la relación entre la epigenética y la edad de las plantas.

1.1.2.4 Influencia de la metilación del ADN en la producción de metabolitos secundarios

Diversos trabajos han reportado que la inhibición de enzimas responsables de las modificaciones epigenéticas como las metiltransferasas o las desacetiltransferasas puede regular genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Kristsky y colaboradores (2001) encontraron que en cultivos de *Neurospora crassa* expuestos a la 5-azacitidina, un análogo de la citosina, se incrementaba la producción de carotenoides; un resultado similar se observó al agregar triscostatina, un inhibidor de la desacetilación de las histonas, a los cultivos de *Alternaria alternata* y *Penicillium expansum* (Shawab et al., 2007). Asimismo, se ha reportado que el uso de la 5-azacitidina para inhibir la metilación del ADN en cultivos de *Cladosporium cladosporoides* resulta en la obtención de un nuevo perfil metabólico, con productos no reportados anteriormente (e.g. presencia de nuevas oxilipinas). De la misma forma, la inhibición de la metilación del ADN en *Diatrype disciformis* y la inhibición de la desacetilación de las histonas con suberoylanilida en *Cladosporium cladosporoides* resulta en la producción de nuevos metabolitos secundarios (Williams et al., 2008).

Dado que la metilación del ADN juega un papel importante en la regulación del patrón espacial y temporal de genes durante el desarrollo temprano y a lo largo de la vida de la planta, recientemente se ha demostrado que el nivel de metilación en cultivos *in vitro* de plantas también está relacionado con la biosíntesis de metabolitos secundarios (Li et al., 2013; Fu et al., 2012; Pan et al., 2012). Al evaluar las variaciones genéticas y epigenéticas en diferentes cultivos celulares *in vitro* de *Taxus medica* y su relación con la producción de paclitaxel, se encontró que aun cuando no se observaron variaciones genéticas significativas los niveles de metilación del ADN fueron diferentes y que los niveles de acumulación de paclitaxel estaban relacionados con los cambios en los niveles de metilación de los diferentes cultivos (Li et al., 2013; Fu et al., 2012). Estos resultados confirman la importancia de las variaciones epigenéticas como bases moleculares para los

cambios en crecimiento, cambios morfológicos y la producción de metabolitos secundarios en plantas (Li et al., 2013). Sin embargo, hasta ahora, no existen reportes sobre la relación entre la producción de metabolitos secundarios y los niveles de metilación del ADN en plantas *in vivo*, con base a lo anterior, en este trabajo se pretende estudiar la marca epigenética de *Pentalinon andrieuxii*, una especie reconocida por su producción de metabolitos secundarios de interés.

1.1.3 *Pentalinon andrieuxii*

Pentalinon andrieuxii (Müll. Arg.) B. F. Hansen & Wunderlin es una liana trepadora también conocida como *Urechites andrieuxii* Müll. Arg. perteneciente a la familia Apocynaceae, del orden Genantiales. *P. andrieuxii* se distribuye desde el sur de Estados Unidos de América hasta Nicaragua (Morales, 2009.) En México se ha reportado esta planta en Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Tabasco y en la península de Yucatán. Esta planta se distribuye en bosques secos y márgenes de manglares y florece entre febrero y octubre. Su fructificación normalmente ocurre entre abril y noviembre.



Figura 1.6 Distribución geográfica de *P. andrieuxii* (mapa generado en Global Biodiversity Information <http://www.gbif.org/species/3618330>)

P. andrieuxii es conocida comúnmente como “Contrayerba”, “quebra cajete”, Ya'ax juux, Xiiw kaan o Tip'te' aak' (maya) y se han reportado algunos usos medicinales para la especie (Chan-Bacab et al., 2003). Las raíces se han empleado de manera tradicional para tratar las lesiones cutáneas causadas por la leishmaniasis y también para aliviar los dolores de

cabeza. La raíz se ha empleado contra la mala digestión en forma de infusiones, así como para tratar las mordeduras de víboras, en tanto el látex de la planta se ha empleado para aliviar los dolores de cabeza y disturbios nerviosos.

Del género *Pentalinon* se tienen pocos reportes en cuanto a su composición química. En la literatura se ha mencionado la producción de cardenólidos, alcaloides pirrolizidínicos, triterpenos, esteroides glicósidos y cumarinas (Domínguez-Carmona et al., 2010; Tillequin et al., 1993). Los primeros reportes con *P. andrieuxii* señalaron que éste posee actividad anti-inflamatoria, antileishmania y antidepresivo (Lezama-Dávila y Issac-Marquez, 1994; Jiu, 1996). Posteriormente se encontró que los extractos de metanol de las raíces de *P. andrieuxii* presentan una potente actividad citotóxica frente a varios géneros de *Leishmania spp.* (Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001).

De las hojas de *P. andrieuxii* se ha aislado el ácido betulínico, el cual mostró actividad antiprotozoaria contra *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum* (Dominguez-Carmona et al., 2010). En el estudio de Yam-Puc y colaboradores (2009) se aislaron dos novedosos trinorsesquiterpenos, de la raíz de *P. andrieuxii*, denominados urechitol A y urechitol B. Estos tienen un esqueleto nuevo denominado Campechano de los cuales no se han reportado actividad biológica, pero son metabolitos secundarios interesantes desde el punto de vista biosintético por las inusuales conformaciones que presentan, además que únicamente se han aislado de esta especie en un momento determinado de su desarrollo. En estudios posteriores fueron aislados de la raíz dos derivados esteroidales (Yam-puc et al., 2012). Pan y colaboradores (2012) obtuvieron de una fracción hexánica de la raíz de *P. andrieuxii* un derivado del colesterol, el pentalinonesterol, el cual presentó actividad antileishmaniacida.

En el estudio de Hiebert-Giesbrecht y colaboradores (2016) se estudió la relación espacio-temporal de la variación del ácido betulínico y urechitol A en tres etapas de crecimiento en plantas silvestres de *P. andrieuxii*, poniendo en evidencia que la planta produce constantemente ácido betulínico en las hojas. Sin embargo, el urechitol A fue detectado en raíces en un momento determinado del ciclo de vida de la planta, presentando una relación de mayor crecimiento y mayor acumulación de urechitol A. Desafortunadamente, el momento específico de la aparición de éste terpeno es desconocido, lo cual deja interrogantes sobre su posible función ecológica.

OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la relación entre la edad cronológica de *Pentalimon andrieuxii* con la metilación global del ADN y la acumulación del ácido betulínico y el urechitol A durante el crecimiento de la planta en dos condiciones de crecimiento.

1.2.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar morfológicamente las plantas de *Pentalimon andrieuxii* en las diferentes edades
2. Relacionar los niveles de metilación global del ADN con la edad cronológica de *P. andrieuxii*
3. Relacionar el contenido de urechitol A y ácido betulínico durante el desarrollo de la planta con los niveles de metilación global en los diferentes órganos de *P. andrieuxii*

HIPÓTESIS

Debido a que el mecanismo epigenético de la metilación del ADN puede influenciar la expresión y represión de ciertos genes relacionados con el desarrollo y crecimiento en las plantas, es probable que exista un cambio en los patrones de metilación del ADN durante el crecimiento de *Pentalimon andrieuxii*, influenciado la producción y acumulación de ácido betulínico y urechitol A

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

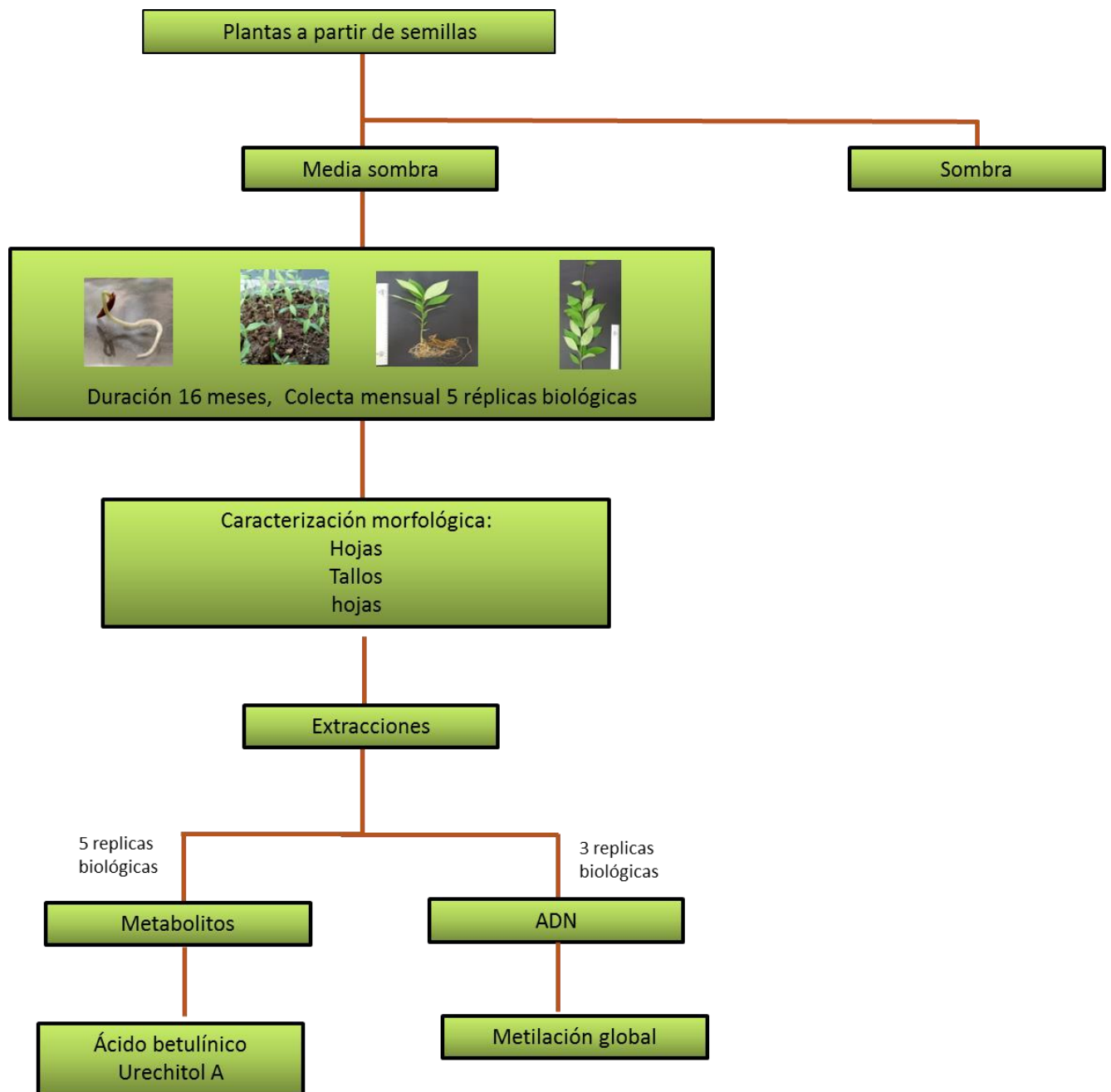


Figura 1.7 El experimento consistió en 16 meses en los que mensualmente se colectaron cinco replicas biológicas para la extracción de metabolitos y de ADN en hojas, tallos y raíces.

CAPITULO II

2.1 INTRODUCCIÓN

Durante la ontogenia de las plantas diversos factores pueden influir en su desarrollo, entre ellos factores ambientales como; sequía, humedad, contenido de nutrientes en el suelo, cantidad de luz etc. afectado sus características morfológicas y fisiológicas, plantas con un mismo genotipo pueden tener diferencias drásticas si crecen en ambientes contrastantes, esto se ha denominado plasticidad del fenotipo (Sultan, 2000). Algunas plantas pueden adaptarse a diferentes condiciones mediante cambios morfológicos fisiológicos y metabólicos, que aseguren su supervivencia. Por ejemplo, se ha visto que existe plasticidad fenotípica en condiciones de bajo porcentaje de luz dependiendo de la especie, hay plantas que incrementan la biomasa de la raíz, plantas en las cuales la biomasa disminuye y en las cuales este parámetro no se ve afectado (Ryser y Eek, 2000) algunas plantas pueden tener un fenotipo etiolado debido a cambios en el porcentaje de luz (Bradshaw, 2006), incluso bajo diferentes condiciones de luz la floración se puede retardar o acelerar (Galloway, 1995). Esta respuesta puede estar influenciada por factores epigenéticos como es el caso de la metilación del ADN, modificaciones de la cromatina y la acción de los microARNs (Nicotra et al., 2010). Estudiar las diferencias entre condiciones ambientales en el crecimiento de una planta es importante para evitar el enmascaramiento del fenotipo, el cual puede tener consecuencias en el metabolismo de productos naturales de interés, como el ácido betulínico y el urechitol A. Por lo cual se estudió la influencia de la cantidad de luz en el crecimiento de *P. andrieuxii*, en la metilación del ADN y en la producción de ácido betulínico y urechitol A.

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1 Material vegetal

Las semillas de *P. andrieuxii* se germinaron en papel filtro húmedo y en oscuridad. Transcurridos 15 días después de la germinación, las plantas se pasaron a un sustrato (sunshine3 con suelo) por 40 días. Una vez que las plantas desarrollaron hojas verdaderas,

se trasplantaron en bolsas negras con suelo y sustrato. Las plantas se mantuvieron en condiciones similares a campo en el vivero del CICY, con periodos de 12 horas de luz solar y 12 horas de oscuridad. La caracterización morfológica se realizó midiendo cada mes la longitud de las hojas, las raíces y los tallos. Adicionalmente se cuantificó el peso fresco y peso seco de cada órgano.

2.2.2. Extracción y cuantificación de ácido betulínico y urechitol A.

Durante un periodo de 16 meses en total, cada mes se colectaron cinco plantas para su análisis. De cada una de las plantas se separaron el tallo, la raíz y las hojas, teniendo así un total de 15 muestras para analizar. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido, se liofilizaron y se trituraron. Para la extracción, 50 ml de metanol fueron utilizados para 1g de tejido seco, mediante sonicación por 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se filtró con papel filtro Whatman no. 1, el disolvente fue evaporado, y se realizó una nueva extracción con diclorometano por sonicación durante 20 minutos. Para la cuantificación de los metabolitos se requirió disolver en metanol grado HPLC (para el caso del ácido betulínico) y en diclorometano (para el caso de urechitol A) en un volumen determinado para obtener una solución final de 5mg/mL.

2.2.3 Análisis del ácido betulínico por cromatografía de alta resolución (HPLC)

La detección y cuantificación de ácido betulínico se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en la literatura (Olivera et al., 2002; Zhao *et al.*, 2007; Kumar et al., 2010) en un equipo cromatográfico HPLC Waters con una bomba binaria Waters 600 y un autosampler 717.; se utilizó un método isocrático con una mezcla de acetonitrilo (75) y de ácido fórmico al 0.1% (25), con un tiempo de corrida de 20 min y un flujo de 1.5 mL/min, y el detector a 210 nm. El volumen total inyectado fue de 20µL por muestra; se utilizó una columna fase reversa C-18 (Agilent Eclipse 5µm); la curva de calibración fue preparada utilizando una muestra comercial de ácido betulínico (Sigma). La cantidad de ácido betulínico fue determinada en razón de mg cuantificados del metabolito y el peso seco de la planta.

2.2.4 Análisis del urechitol A por cromatografía de gases

La detección de urechitol A se realizó con un equipo de cromatografía de gases Varian 430-GC (Varian, Palo Alto, California, Estados Unidos) con una autosampler (Varian, Palo Alto, California, Estados Unidos). Se utilizó una columna capilar Ultra 1, de 25 m de largo x 0.320 mm diámetro interno, y una fase estacionaria de 100% de dimetilpolisiloxano (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Estados Unidos). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: volumen de inyección de 1 μ L con división, gas portador nitrógeno, flujo de 1 mL/min. El programa usado fue 150°C por 3 min; 9.3 °C/min hasta 260 °C y 260 °C mantenido durante 5 min. Las temperaturas de inyección y de detección por ionización de llama (FID) fueron de 250 y 280 °C. La curva fue preparada con una muestra estándar de urechitol A.

2.2.5 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de las hojas de las plantas se realizó siguiendo el método de Murray y Thompson (1980). Para la extracción se añadió al material vegetal triturado con nitrógeno líquido 1 mL de buffer CTAB (NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100mM, CTAB 2%) con β -mercaptanol al 1%, precalentado a 65°C. Se mezcló la muestra vigorosamente y los tubos se incubaron a 65 °C durante 40 min. Posteriormente se le adicionó a cada tubo 600 μ L de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló rigurosamente. La mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido fue nuevamente mezclado con alcohol isoamílico y centrifugado como se describió anteriormente. Se adicionó 1.5 μ l de RNAasa al sobrenadante y se incubó por 20 minutos a 37°C. posteriormente se adicionó 70% del volumen de isopropanol y se centrifugó la mezcla por 10 minutos a 13000 rpm a 4°C. el sobrenadante se lavó con etanol 2 veces y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. La pastilla seca se resuspendió en 25 μ L de agua HPLC.

La extracción de ADN genómico de raíz se realizó mediante una modificación del método de Adcock, y Austen (1991). Se utilizó 250 mg de tejido fresco, el cual fue macerado con nitrógeno líquido y a cada muestra se le añadieron 700 μ L del buffer TELT, se mezcló y se incubó a 55 °C por 20 min, seguidamente la muestra se dejó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se agregaron 700 μ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1) y se homogenizó suavemente. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min

a temperatura ambiente. Se tomó el sobrenadante y se agregó 1:1 de cloroformo al 100%. La mezcla se homogenizó y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min; este proceso fue repetido dos veces. Para precipitar el ADN, se tomó el sobrenadante y se agregó la tercera parte del volumen de éste de isopropanol. La muestra se incubó por 20 min a -20 °C, seguidamente se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70% (700 µL). Se dejó secar la pastilla y ésta se resuspendió en 30 µL con agua desionizada, y se trataron con 3µL RNAasa a 37 °C durante 15 minutos.

La integridad del ADN se verificó a través de un gel de agarosa al 1% y la cantidad de ADN se cuantificó espectrofotométricamente mediante un equipo NanoDrop.

2.2.6 Digestión del ADN

Una vez obtenido el ADN genómico de las hojas, tallos y raíz, éste fue mezclado con un buffer de digestión (ácido acético 200 mM, glicina 200 mM, cloruro de magnesio 50 mM, acetato de zinc 5 mM, cloruro de calcio 2 mM a un pH de 5.3). La mezcla se hidrolizó con DNAasa (2µL) y la nucleasa P (1µL) toda la noche a 37 °C y luego se mantuvieron a -20° C por 10-15 min. Las muestras fueron mezcladas con hidróxido de sodio 100 mM y fosfatasa alcalina intestinal de becerro (1U/µL). Las muestras se mantuvieron incubadas por 3 h a 37 °C y posteriormente fueron mezcladas con 100 µL de agua destilada y 50 µL de la fase móvil, para luego centrifugar a 18,000 xg por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo mantenido a -20 °C.

2.2.7. Análisis por HPLC y cuantificación del porcentaje de metilación

50 µL de la muestra se inyectaron en un sistema de cromatografía líquida (HPLC). La absorbancia fue medida usando un detector de rearreglos de diodos a 286 nm. Usando una columna Luna C18 (2) 150 × 4.6mm 5µm. La separación se realizó de acuerdo a una modificación del método de Fieldes et al. (2005). La fase móvil fue A: KH₂PO₄(50 mM, pH 4.5) B: metanol, con un gradiente de 1–10 min; 100 A; 10–20 min, 20% B, 80% A, y un flujo 1 ml/ min. El porcentaje de la metilación global del ADN fue calculado con la siguiente fórmula: concentración de 5-metil-2'-deoxicidina (5mdC) dividida entre concentración de 5mdC + la concentración de la 2-deoxicidina (dC) X 100.

2.2.8 Análisis estadístico

Las comparaciones pares se realizaron mediante la prueba t student, las comparaciones de múltiples grupos fueron realizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba pos hoc Tukey, con el software Statitics 23.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Caracterización morfológica

Pentalinon andrieuxii es una planta trepadora que se encuentra en selvas medianas subperenifolias (Rzedowski y calderón, 1998; Gutierrez et al., 2012), por lo cual la cantidad de luz que recibe depende de la planta tutora, la vegetación adyacente y la estación del año; se ha reportado que algunas plantas que crecen en la península de Yucatán pueden recibir hasta tres veces más flujo de fotones en la estación seca (marzo-mayo), que en la estación lluviosa (Andrade et al., 2006). Tomando en cuenta que el ambiente puede afectar la morfología, fisiología, el metabolismo y la epigenéticas de las plantas, en esta investigación se establecieron dos lotes de plantas cultivadas en vivero, una en condiciones de media sombra (MS), similares a las condiciones naturales en las que crece *P. andrieuxii*, y otra en condiciones de sombra (S), con el fin de conocer la influencia de la cantidad de luz, tanto en el desarrollo de las plantas, como en su producción de metabolitos secundarios de interés y en sus niveles de metilación global del ADN.

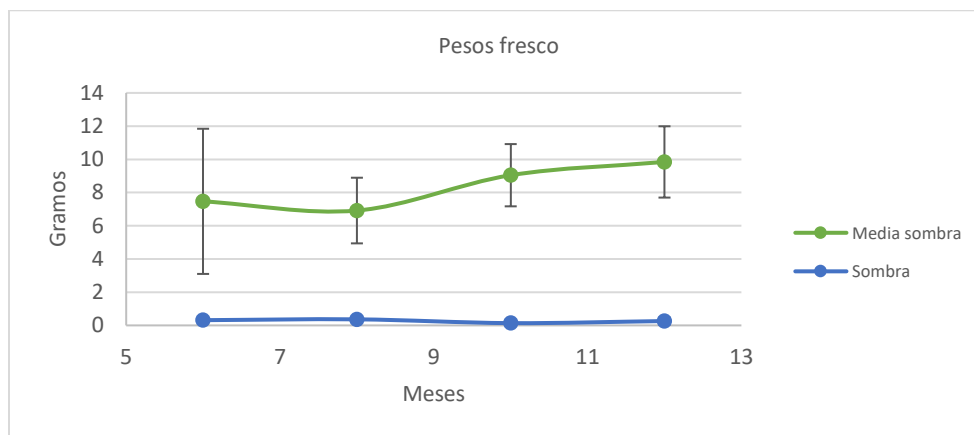
Durante el desarrollo de las plantas se realizó su caracterización morfológica, observándose diferencias notables entre las plantas cultivadas en condiciones de MS y S (Fig. 3.1); las plantas MS de la misma edad cronológica presentaron un mayor número de hojas, con mayor área y longitud, que las hojas S. Estos resultados coinciden con reportes en la literatura donde se describe que individuos expuestos a una mayor intensidad de luz presentan una mayor superficie foliar que los expuestas a menores intensidades de luz (Boardman, 1977). Adicionalmente, las plantas MS mostraron un mayor diámetro en sus tallos y un mayor diámetro y longitud en las raíces (Fig. 2.1a), que los observados en las plantas S (Fig. 2.1b).



Figura 2.1 Plantas de *P. andrieuxii* de 10 meses de edad. (a) En condiciones de media sombra (MS) y (b) En condiciones de sombra (S).

Asimismo, se observó un mayor peso fresco y altura ($p < 0.05$) en las plantas MS en cualquiera de los meses registrados (Fig. 2.2). Como ejemplo se puede mencionar los registros del mes 10, donde las plantas MS mostraron valores de 9 g de peso fresco, en tanto que las plantas S apenas alcanzaron un valor de 0.13 g. De la misma forma, mientras que las plantas MS alcanzaron una altura de aproximadamente 31 cm, las plantas S sólo alcanzaron una altura de 12 cm.

A



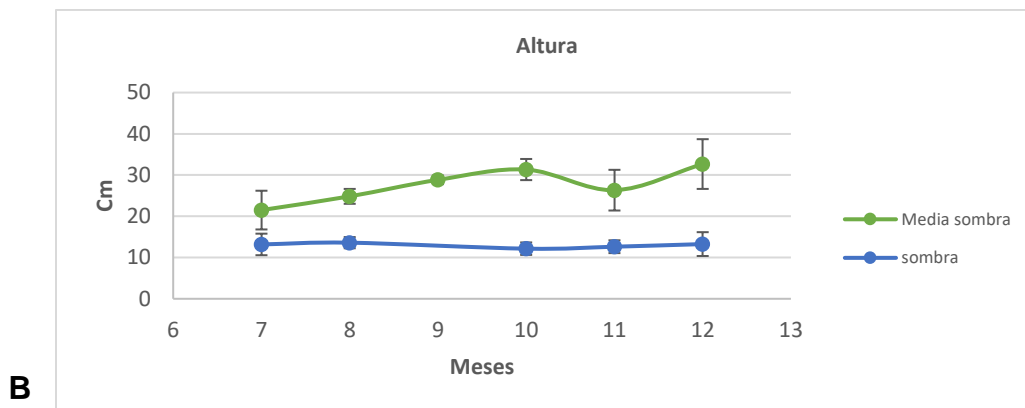


Figura 2.2 Tendencia en el crecimiento durante el desarrollo de plantas que estuvieron a media sombra (MS) y en S. (A) plantas MS presentaron un incremento en peso fresco ($p < 0.05$). (B) Existe mayor longitud del tallo en plantas MS que en plantas S

Diversos factores ambientales influyen en el desarrollo de las plantas. La temperatura, la luz, el agua y la gravedad están entre los estímulos que sirven para la activación de programas endógenos de desarrollo. De todos estos, la luz es quizá el factor más importante pues tiene un papel fundamental como sustrato para la fotosíntesis, lo cual se ve reflejado en la ganancia de biomasa. Lo anterior explica el mayor crecimiento, observado un mayor peso fresco y una mayor altura, en las plantas MS. Adicionalmente la luz es un estímulo para diversos procesos del desarrollo, incluyendo la biogénesis de los cloroplastos, la diferenciación del meristemo foliar y la inducción floral. Asimismo, la luz estimula diversos genes del núcleo y del cloroplasto que codifican para las subunidades de RUBISCO, para proteínas de unión a la clorofila a/b (CAB) y para las ferredoxinas -NAD⁺ reductasa. La luz estimula también la expresión de genes de metabolitos secundarios como las antocianinas, que están encargadas de proteger a la planta de la radiación (Barnes et al 1997). Si bien se puede asumir que las plantas que están expuestas a mayores intensidades de luz son más eficientes en fotosíntesis y crecimiento, esto depende de la especie; existen plantas que están adaptadas a bajas intensidades de luz, teniendo eficiencias fotosintéticas mayores (Boardman, 1977).

Dado que se observó un mayor crecimiento en plantas MS, éstas se caracterizaron morfológicamente durante 16 meses de desarrollo (Fig. 3.3).

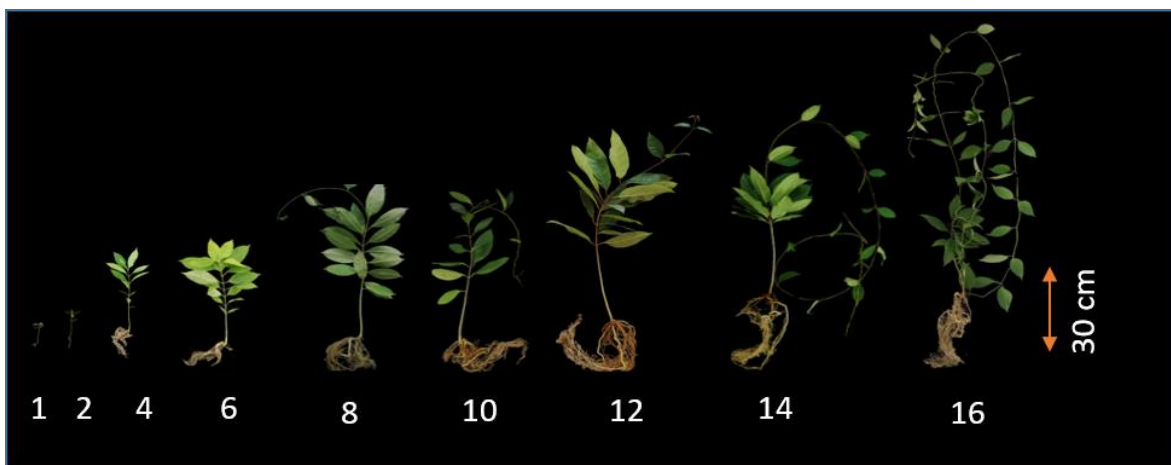
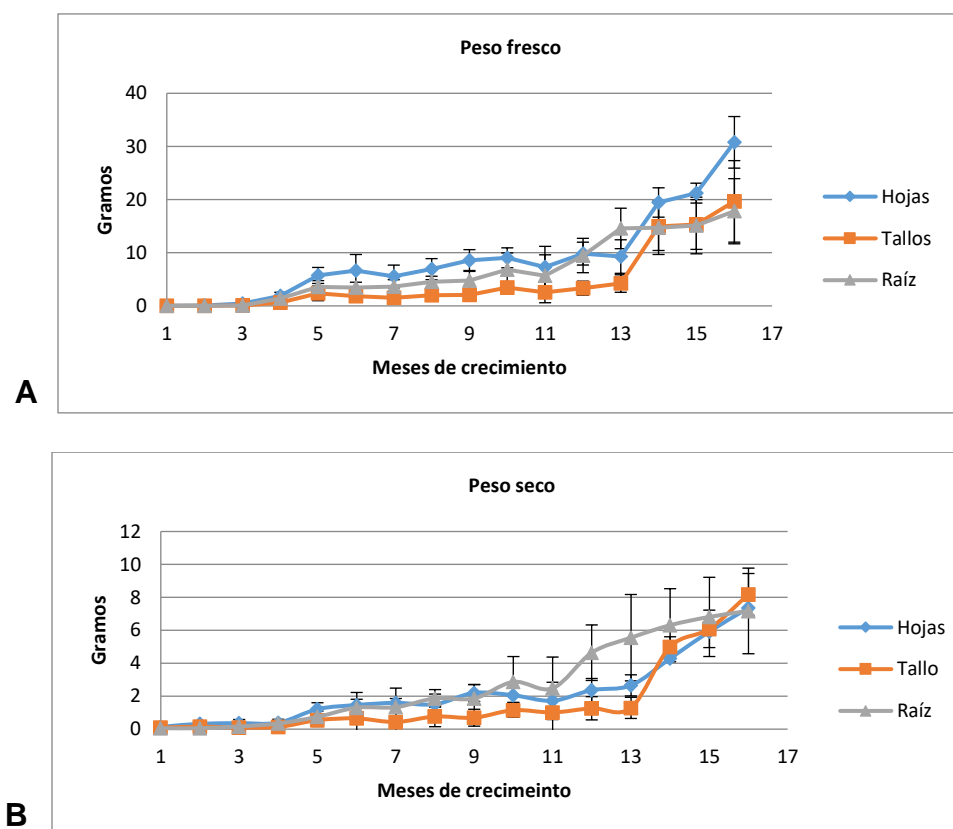


Figura 2.3 Cambios morfológicos en el desarrollo de plantas MS de *P. andrieuxii*. Se observa un cambio marcado en la morfología de plántulas a plantas trepadoras.



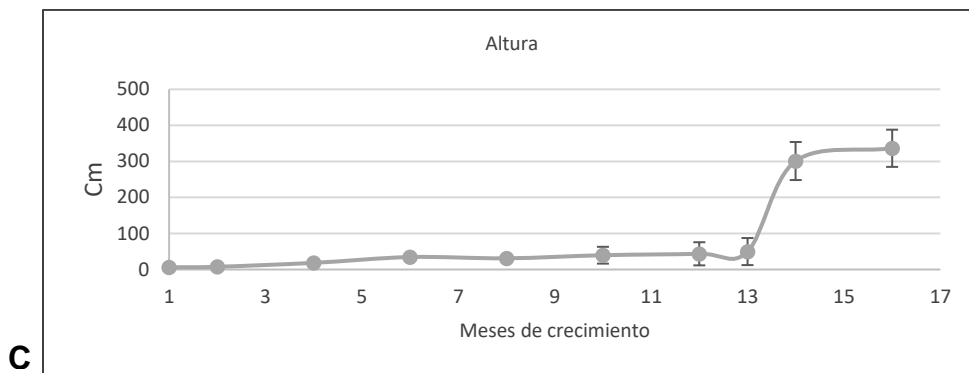


Figura 2.4 Caracterización morfológica durante el desarrollo de plantas MS. Existe un aumento gradual durante los primeros meses en peso fresco (A), peso seco (B) y altura (C) $p < 0.05$.

En las plantas MS se observó un aumento gradual en el peso fresco, peso seco y altura desde el primer mes hasta el mes 13 ($p < 0.05$); para el mes 14 el valor de peso fresco y peso seco aumentó hasta el doble y el incremento en la altura fue de más de tres veces (Fig. 2.2). Los meses de crecimiento más marcado correspondieron a la época de secas (Marzo-Abril), por lo que las plantas se vieron expuestas a una mayor cantidad de luz debido a la pérdida de las hojas de la vegetación circundante. Las plantas MS presentaron, desde el primer mes, la morfología de triángulo invertido, donde las hojas más jóvenes son más grandes que las más antiguas, característica de plantas jóvenes. Con el paso del tiempo se observó un incremento en la altura y en el número de hojas, y para el cuarto mes las plantas presentaron la morfología característica de individuos juveniles (Hiebert 2015). A partir del quinto mes algunas plantas mantuvieron la morfología de plantas juveniles, en tanto que otras desarrollaron características de plantas intermedias, con las hojas más pequeñas en la parte superior, el tallo mucho más delgado en el ápice y con la aparición de la morfología característica de la planta trepadora (Fig. 2.1). Sin embargo, para el mes 14 todas las plantas presentaron características de plantas trepadoras. Esta variación fenotípica puede explicarse por la falta de control genético al seleccionar las semillas utilizadas en este trabajo.

Cabe mencionar que en ninguna condición de crecimiento se registró floración, la cual es importante porque marca el final de la etapa vegetativa que se caracteriza porque los meristemas se encargan de producir órganos reproductivos en lugar de hojas (Fornara, et al., 2010). Esto se debe probablemente a que, en algún momento de su desarrollo, *P. andrieuxii* necesita más luz para transitar a la etapa adulta. Se ha reportado que en arroz

(*Oryza sativa*), soya (*Glycine max*) y *Arabidopsis thaliana*, la floración está relacionada con el fotoperiodo, activando factores de transcripción relacionados con la inducción floral (Hayama y Coupland, 2004; Fornara et al., 2010; Xia et al., 2012).

2.3.2 Cuantificación de ácido betulínico

Aun cuando se ha reportado la presencia de ácido betulínico (AB) en las hojas de plantas silvestres de *P. andrieuxii* de diferentes estados de desarrollo (Hiebert-Giesbrecht et al., 2016), hasta ahora no se conoce el efecto de la luz en su producción o la dinámica de acumulación de este triterpeno durante el desarrollo de *P. andrieuxii*. En este trabajo, aun cuando se pudo detectar la presencia de AB en las hojas de algunas plantas S, los niveles de AB en plantas MS fueron significativamente mayores (Fig.2.4).

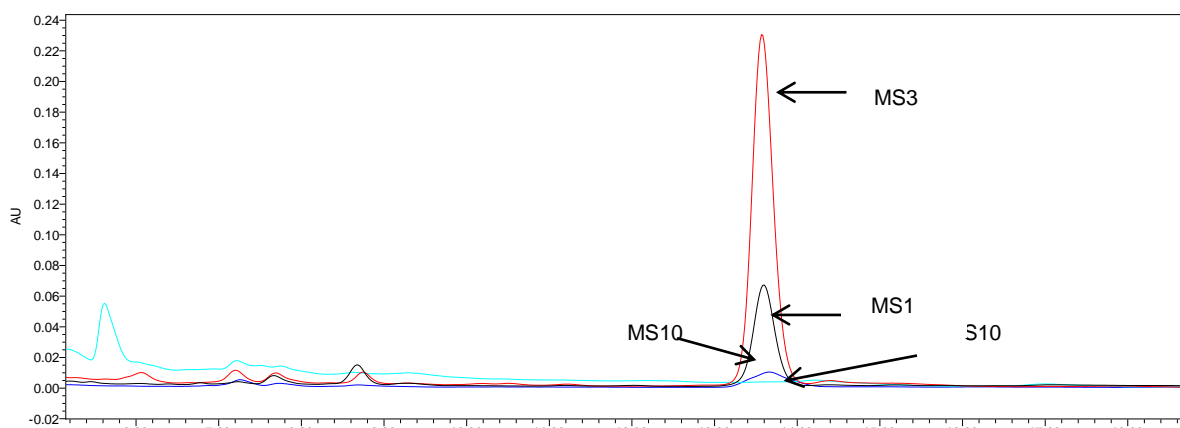


Figura 2.5 Contenido de AB en extractos de plantas S de 10 meses de edad (aguamarina, S10) y en extractos de plantas MS de tres meses de edad (rojo, MS3), un mes (negro, MS1), diez meses de edad (azul, MS10).

Los resultados confirman la importancia de la luz como estímulo para la producción de metabolitos secundarios y coinciden con los reportado en la literatura para especies como *Betula platyphila*, en donde se observó que diferentes tipos de luz pueden inducir distintos patrones de acumulación de triterpenos (Yin et al., 2013), y *B. papyrifera*, donde se observó una correlación entre los niveles de betulina y el crecimiento de la planta. Estos resultados confirman la importancia de la luz que, al favorecer la fotosíntesis, provee los fotosintatos necesarios para la biosíntesis de metabolitos secundarios, incluyendo terpenos (Meeningen et al., 2017; Staudt et al., 2011; Rodríguez-Concepción, 2006).

Para el caso de *P. andrieuxii* no se observó una correlación directa entre el crecimiento de las plantas MS y la acumulación de AB; la mayor concentración de AB se detectó durante los primeros tres meses de desarrollo de las plantas ($p < 0.05$), llegándose a cuantificar hasta 8.5 mg/g de AB (Fig. 2.5). A partir del mes 4, cuando las plantas aun presentaban una morfología de jóvenes y alcanzaban una altura de aproximadamente 30 cm, se observó una disminución drástica (94%) en los niveles de AB en las hojas (Fig. 2.5). Estos resultados coinciden con los reportados por Hiebert (2015), quien encontró niveles de 0.5 mg/g en hojas de plantas silvestres consideradas como jóvenes (aprox. 30 cm de altura). A diferencia por lo reportado por Hiebert (2015) en plantas silvestres, AB fue detectado durante los primeros meses en tallos y raíces de plantas MS (Fig 2.5); sin embargo, la presencia del triterpeno desapareció en los extractos de tallo y hoja a partir del mes 6. Lo anterior sugiere que el AB cumple una función importante, posiblemente como metabolito de defensa, al inicio del desarrollo.

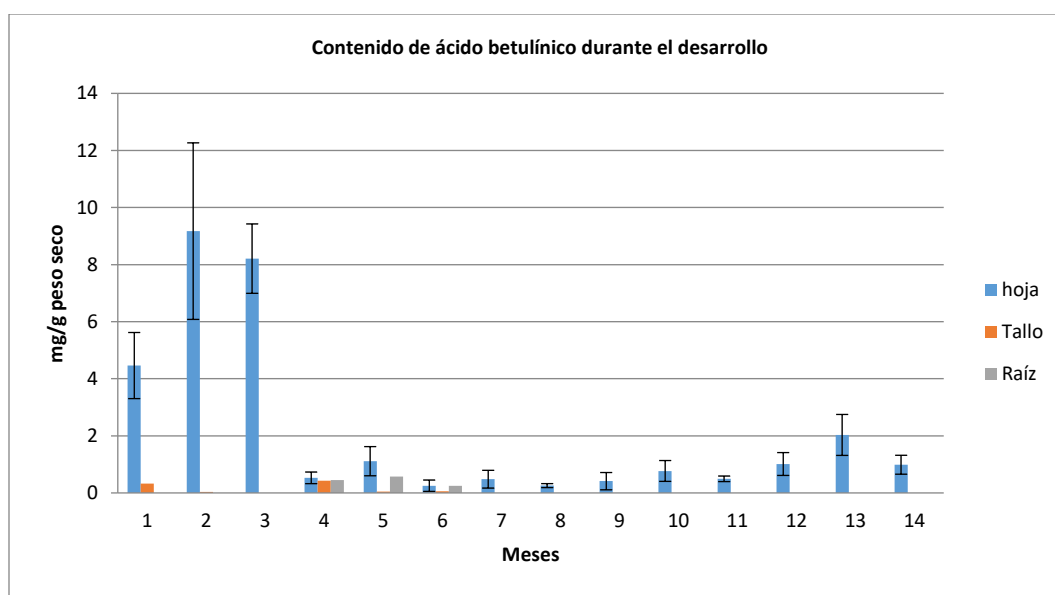


Figura 2.6 Cuantificación de ácido betulínico en plantas MS de *Pentalinon andrieuxii* durante su desarrollo. Los primeros tres meses producen más ácido betulínico ($p < 0.05$) y a partir del mes 4 el contenido del triterpeno se mantiene constante.

Diversos triterpenos juegan un papel importante como metabolitos de defensa, generalmente contra herbívoros, en plantas (González-Coloma et al., 2010), tal y como se ha reportado para el caso del AB en diferentes especies como *Betula alba* (Palo, 1984).

Asimismo, se ha reportado que el ácido papiriférico cumple esta función en *Betula resinífera* y que este triterpeno se acumula hasta en un 15% del peso seco en la etapa juvenil de la planta y su concentración disminuye hasta en un 94% en la etapa de madurez de la planta. Esta disminución coincide con los resultados de un meta análisis realizado para la detección de metabolitos relacionados con la defensa (Barton y Koricheva, 2010). Los altos niveles de AB y otros triterpenos relacionados con la defensa de las plantas durante las etapas tempranas de su desarrollo, aseguran la sobrevivencia de las plántulas porque estas son más vulnerables al ataque de depredadores y parásitos.

2.3.3 Cuantificación de Urechitol A

Aun cuando se analizaron por cromatografía de gases todas las fracciones diclorometánicas de todos los órganos de las plantas MS y S, en ninguno de los tratamientos se detectó la presencia de urechitol A (Fig 2.6). Estos resultados no coinciden con lo reportado en la literatura, donde se reporta la detección de urechitol A en plantas silvestres de *P. adrieuxii*, siendo mayor el contenido en plantas adultas que en plantas intermedias; esta variación en la producción diferencial de algunos metabolitos secundarios en plantas silvestres y plantas cultivadas concuerda con la hipótesis del equilibrio carbono-nutrientes, la cual sugiere que el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios puede estar limitada por la fuente de carbono (fotosíntesis) y por los nutrientes del suelo (Hamilton et al., 2001).

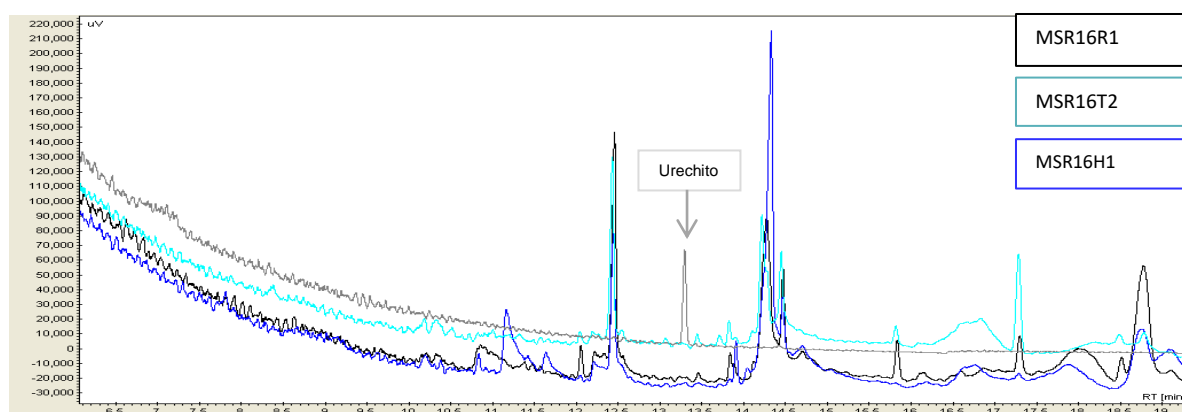


Figura 2.7 Comparación de cromatogramas representativos de cada órgano del mes 16 en condiciones MS con la referencia de urechitol A

La predicción en cuanto a la producción de metabolitos secundarios es difícil de lograr, dado que los procesos biosintéticos son influenciados no solamente por factores ambientales, sino también por factores genéticos y por las interacciones bióticas (Hamilton et al., 2001). Dado que la presencia de urechitol A en los extractos de raíz de plantas silvestres de *P. andrieuxii* se ha observado en plantas adultas, con flores y frutos (Hiebert-Giesbrecht et al., 2016), es posible que la biosíntesis de este tri-nor-sesquiterpeno comience antes de la floración de las plantas y que además esté influenciado por algún factor ambiental.

2.3.4. Extracción de ADN

Para el análisis de la metilación del ADN se evaluaron varios métodos de extracción de ADN de hojas, tallos y raíces; el basado en sílica (Echevarría- Maldonado *et al* 2005), el de CTAB (Murray y Thompson, 1980), el de SDS (Dellaporta et al., 1983) y el basado en buffer TELT (Kaderbhai et al., 1991).

El mejor método para extraer ADN de hojas y tallos fue el de CTAB (Fig. 2.7), en tanto que el método basado en buffer TELT fue el que dio mejores resultados para el caso de la raíz, obteniéndose altos rendimientos (mayores de 100 ng/μl) de un ADN íntegro (Fig. 2.7). El ADN obtenido de las hojas y tallos utilizando los métodos SDS y TELT no mostró una buena integridad, en tanto que el ADN obtenido con el método de sílica, aunque mostró una buena integridad, su rendimiento fue bajo. De la misma forma, el ADN obtenido de la raíz utilizando los métodos de sílica y CTAB mostró bajos rendimientos y una fácil degradación, probablemente debido a los altos niveles de lignificación y la gran cantidad de contaminantes presentes en la epidermis de la raíz.

Tener un ADN genómico de buena calidad y libre de contaminantes es de vital importancia, ya que de eso depende el éxito en los experimentos de metilación de ADN; se ha reportado que trazas de productos fenólicos, carbohidratos y proteínas podrían inhibir la actividad de las enzimas durante la obtención de nucleósidos (Johnston et al., 2005).

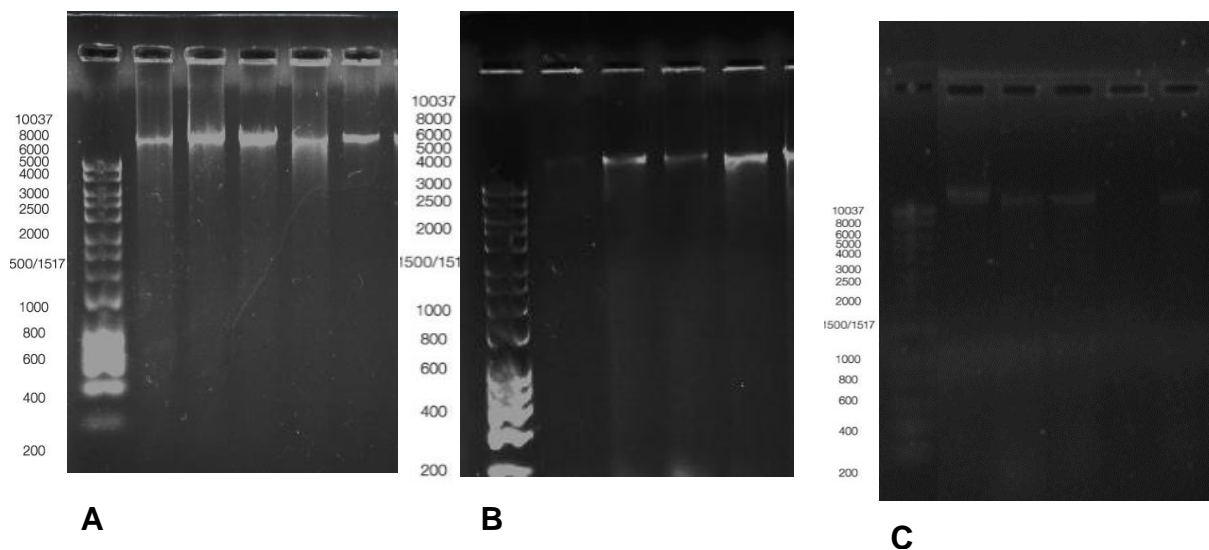


Figura 2.8 Geles de Agarosa que muestran la integridad del ADN extraído en hojas, tallos y raíces de plantas MS de *P. andrieuxii*. A y B, método CTAB; C, Método.

2.3.5 Metilación global del ADN

Para analizar los niveles de metilación global de ADN se cuantificó por HPLC el porcentaje de las desoxicitidinas metiladas. Mientras que los niveles de metilación que se obtuvieron en hojas y tallos variaron entre el 9 y 16% (Fig. 2.9.), los niveles de metilación en las raíces no pudieron ser cuantificados debido a que no se pudo detectar el pico correspondiente a la 5-metil dexocitidina; esto puede deberse a que los niveles de metilación en este órgano son muy bajos o a que no hubo una total digestión del ADN debido a la presencia de impurezas en la muestra puesto que se ha sugerido que las impurezas pueden inhibir la acción de las nucleasas.

Al analizar los niveles de metilación de las hojas de las plantas MS y S se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos ($P < 0.05$), siendo mayores en las plantas MS (Fig. 2.8) y no encontrándose diferencias significativas entre los niveles de metilación de plantas S de diferentes edades. Estos resultados pueden explicarse tomando en cuenta que la intensidad de luz puede causar un remodelamiento de la cromatina, i.e. compactar o relajar la cromatina mediante una deacetilasa de histonas, y esto puede influenciar los niveles de metilación del ADN (Tessadori et al., 2009). De igual manera, tomando en cuenta que la luz puede influenciar la regulación de genes de la fotosíntesis mediante la metilación del ADN (Ngermprasirtsiri et al, 1989), las diferencias en los niveles de metilación del ADN

en plantas MS y S de *P. andrieuxii* podrían tener como consecuencia la expresión y el silenciamiento de genes relacionados con fotosíntesis, el crecimiento y/o la producción de metabolitos secundarios.

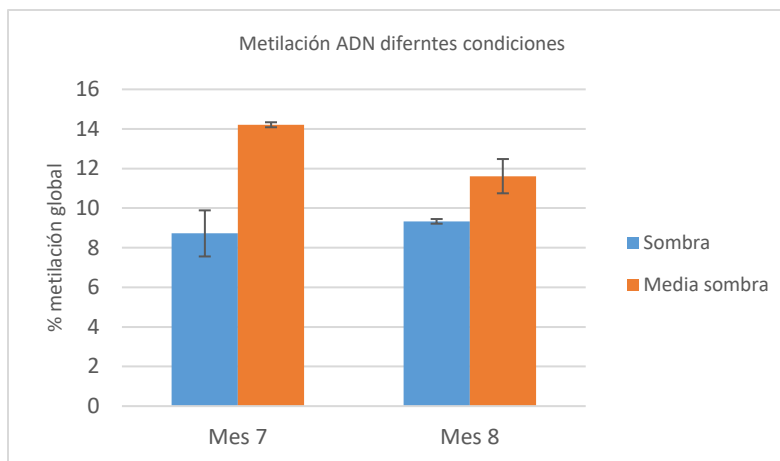


Figura 2.9 Niveles de metilación entre dos condiciones. Existen diferencias significativas en los niveles de metilación entre las condiciones de MS y S ($p < 0.05$)

Cabe señalar que mientras los niveles de metilación del ADN de las hojas de plantas MS mostraron diferencias significativas durante su desarrollo ($p < 0.05$), los niveles de metilación en los tallos no mostraron cambios significativos ($p > 0.05$) durante el crecimiento de las plantas. Aun cuando los niveles de metilación del ADN detectados en las hojas y tallos de las plantas MS coinciden con los reportados para otras especies (Adams y Burdon, 2012; Baurens et al., 2004), la variación en los niveles de metilación en las hojas de las plantas MS puede deberse a los cambios de fase o estado de desarrollo de las plantas, dado que se ha reportado que los niveles de metilación del ADN pueden variar de una especie a otra, de un órgano a otro, e incluso de una etapa de desarrollo a otra (Monteuuis et al., 2008). Lo anterior puede explicar la variabilidad observada para el caso de las plantas MS de *P. andrieuxii*, donde se observaron niveles de metilación similares para diferentes órganos en algunas de las etapas del desarrollo (Fig. 2.10), mientras que en otras etapas (e.g. 10, 12 y 13 meses) se observaron mayores niveles de metilación en las hojas que en los tallos. ($P > 0.05$).

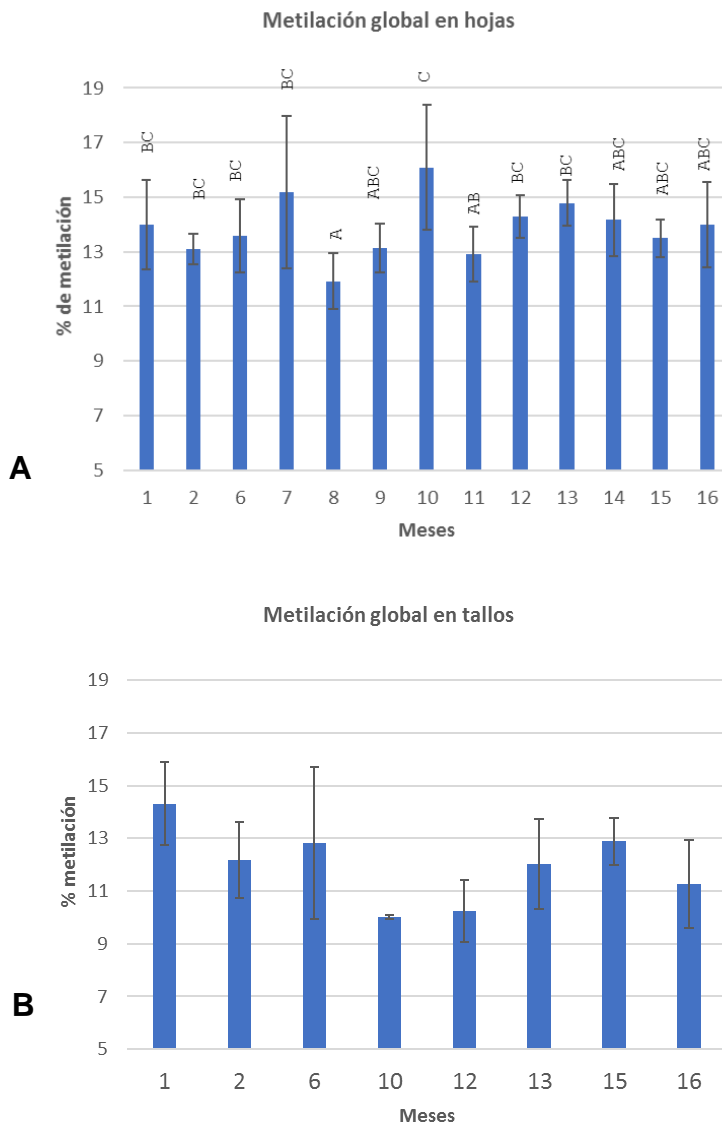


Figura 2. 10 Niveles de metilación en plantas MS de *P. andrieuxii*. (A) metilación global en hojas; existen diferencias significativas ($p < 0.05$). (B) metilación global en tallos; las diferencias no son significativas ($p > 0.05$).

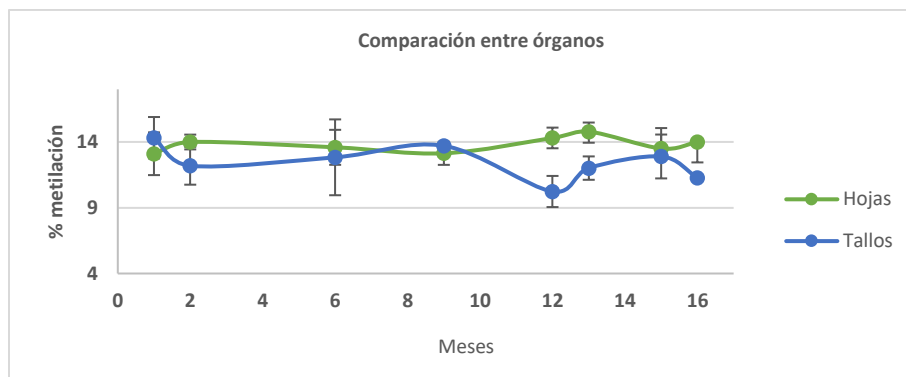
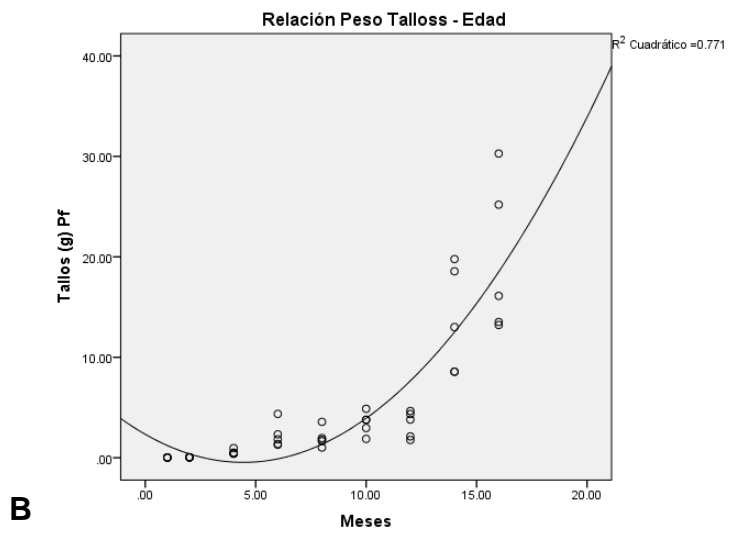
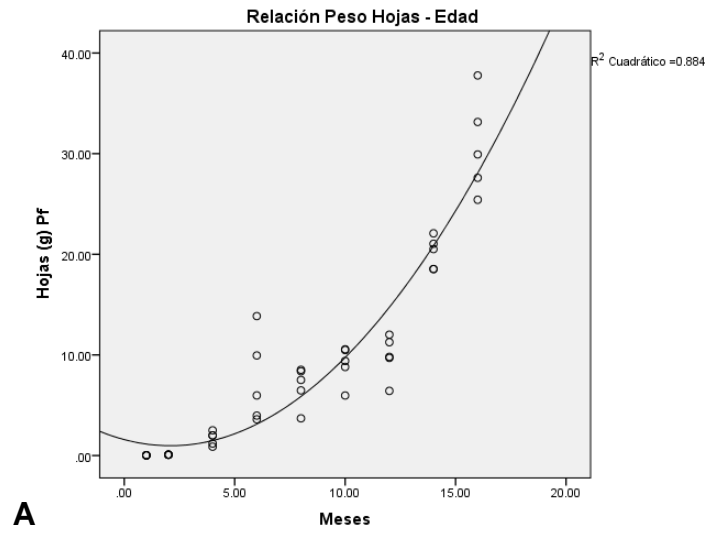


Figura. 2.11 Comparación entre los niveles de metilación entre órganos de plantas MS de *P. andrieuxii*.

2.3.6 Relación metilación Edad

La determinación de la edad es un factor importante en las plantas, principalmente en plantas medicinales y plantas que producen metabolitos secundarios de interés. A pesar de que se ha reportado que la ontogenia y la senescencia pueden estar reguladas por mecanismos epigenéticos como las modificaciones en las histonas y la metilación en el ADN (Ay et al., 2014) y que existen reportes que muestran que los niveles de metilación son mayores en edades maduras en contraste con etapas juveniles (Monteuuis et al., 2009; Monteuuis et al., 2008; Baurens et al., 2004; Hasbún et al., 2005; Demeulemeester et al., 1999), para el caso de las plantas MS de *P. andrieuxii*, y aun cuando se pudo establecer una relación clara entre la edad de las plantas y sus características morfológicas (e.g. peso fresco, altura) (Fig. 2.11), no se encontró una relación significativa entre los niveles de metilación global de ADN y la edad cronológica de las plantas de *P. andrieuxii* (Fig.2.12).

Cabe mencionar que también se ha reportado que los niveles de metilación dependen del organismo, e.g. en *Arabidopsis thaliana* se encontró que los niveles de metilación global disminuyen durante el crecimiento (Ogneva et al., 2016), en tanto que en *Larix laricina* los niveles de metilación permanecen constantes durante diferentes etapas de desarrollo (Greenwood et al., 1989). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de metilación en cultivo de microbrotes de *Acacia mangium* provenientes de plantas maduras y plantas jóvenes (Baurens et al., 2004).



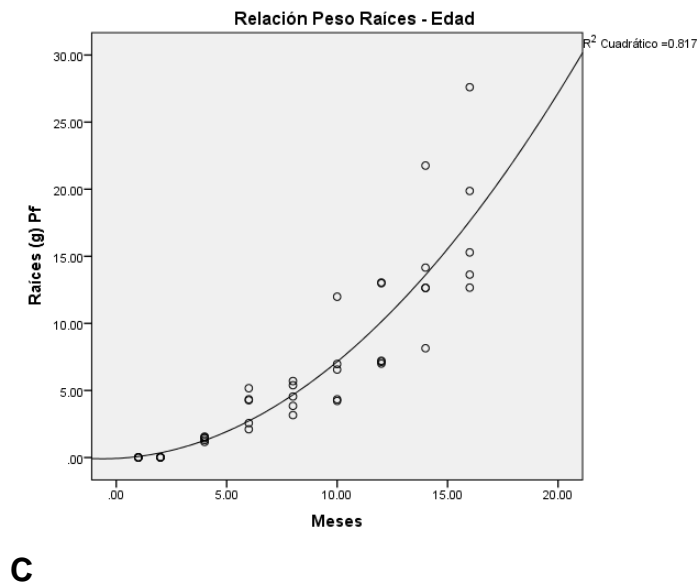
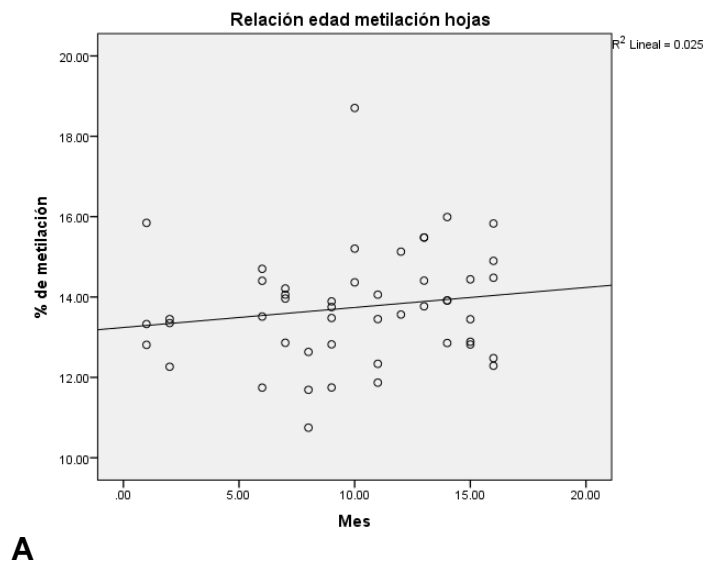


Figura 2.12. Relación de características morfológicas-edad cronológica, peso fresco ($P < 0.05$): (A) hojas, coeficiente de spearman 0.94. (B) tallos, coeficiente de spearman, 0.94. (C) raíces, Coeficiente de spearman 0.96.



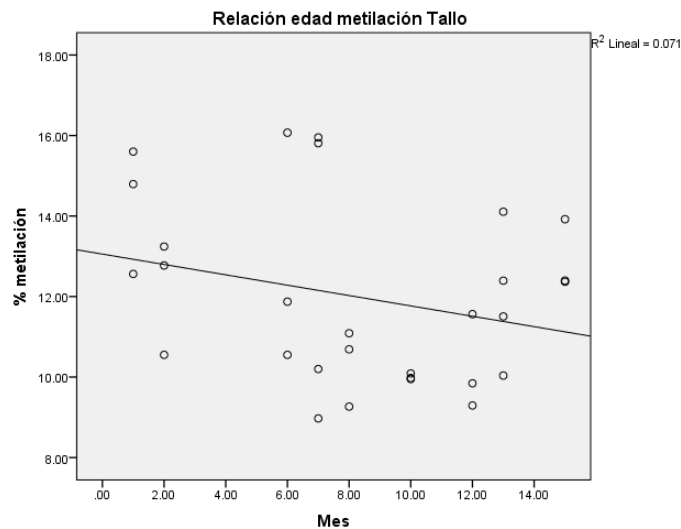
**B**

Figura 2.13 Relación metilación del ADN- Edad cronológica (A) hojas B (tallos). No existe una correlación significativa (coeficiente de Spearman 0.4).

Es posible que no se haya podido establecer una relación clara entre los niveles de metilación global del ADN y los estados de desarrollo de las plantas de *P. andrieuxii* debido a que el periodo de tiempo de estudio fue relativamente corto y la variabilidad genética de las plantas no fue controlada. Se ha reportado que para especies como *Pinus radiata* y el Bambú (*Phyllostachys heterocycla*) los niveles de metilación no cambian en periodos cortos de tiempo, sino a través de varios años (Yuan et al., 2014); asimismo, se ha sugerido que para estudiar los aspectos moleculares de un cambio de fase es conveniente limitar la variabilidad genética del modelo de estudio (Baurens et al., 2004). Finalmente, se ha reportado que, además de los cambios en los niveles de metilación del ADN, las modificaciones en las histonas también contribuyen al proceso de desarrollo, madurez y senescencia (Bruslan et al., 2015; Dubrovina y Kiselev, 2016).

2.3.7 Relación entre la metilación del ADN y la producción de metabolitos secundarios

A diferencia de los hongos, donde se ha reportado que las modificaciones epigenéticas juegan un papel importante en los cambios morfológicos, fisiológicos y en la producción de metabolitos secundarios, hasta ahora existen pocos reportes sobre la relación entre la

producción de metabolitos secundarios y los niveles de metilación del ADN en plantas, aunque el papel de los niveles de metilación del ADN en los cambios morfológicos y fisiológicos de diferentes especies ha sido bien documentado (Martienssen et al., 2001; Feil y Fraga, 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que no existe una relación directa entre la producción de AB y los niveles de metilación del ADN en las hojas de plantas MS de *P. andrieuxii*; sin embargo, al comparar los resultados obtenidos entre los dos tratamientos de las plantas de *P. andrieuxii* se encontró que los niveles de metilación del ADN y la concentración de AB en las hojas de las plantas MS son mayores que los de las plantas S. Estos resultados confirman nuevamente la importancia de la luz no solamente como fuente de fotosintatos para la biosíntesis de metabolitos secundarios, sino también como un factor importante que afecta la metilación del ADN y que está relacionado a cambios morfológicos y metabólicos.

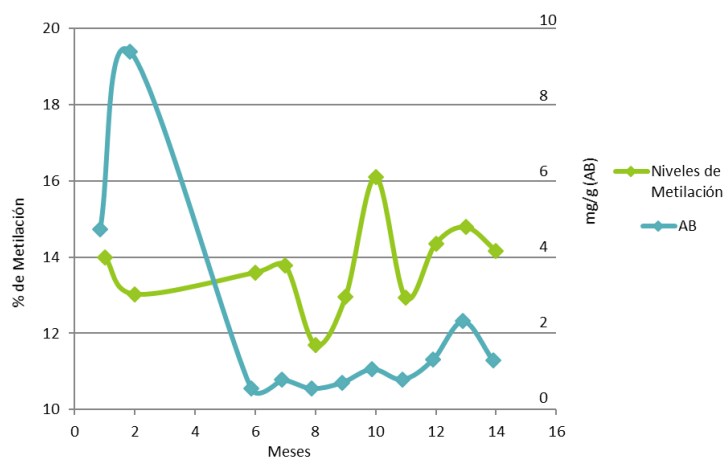


Figura 2.14 Dinámica de producción de AB con los niveles de metilación de ADN

CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos al comparar el crecimiento de plantas de *P. andrieuxii* bajo dos tratamientos de luz (MS y S) mostraron que tanto la metilación global del ADN, como el crecimiento de la planta y la producción de AB en *P. andrieuxii* son influenciados por la cantidad de luz, observándose menores niveles de metilación del ADN, menor crecimiento y menor producción de AB en plantas con menores niveles de iluminación; estos resultados demuestran una plasticidad en el fenotipo. Adicionalmente, los resultados obtenidos en plantas MS mostraron que la cantidad de AB depende de la edad de la planta, sugiriendo que éste triterpeno en *P. andrieuxii* tiene una función de defensa al inicio del desarrollo, en tanto que el urechitol A no fue detectado en ninguna etapa de desarrollo de la planta, por lo que es posible que su biosíntesis sea estimulada por un factor ambiental diferente de la luz. Finalmente, la variabilidad observada en los niveles de metilación en hojas de plantas MS de *P. andrieuxii* no permitió el establecimiento de una relación clara con la edad cronológica de las plantas, probablemente debido a la falta de control en el genotipo de las plantas y el tiempo del estudio.

3.2 PERSPECTIVAS

Dado que se observaron cambios en la morfología en dos condiciones contrastantes de luz, sería conveniente analizar detalladamente los cambios morfológicos (no sólo macroscópicos) y fisiológicos de *P. andrieuxii* en diferentes intensidades de luz, con el fin de entender mejor el metabolismo secundario de la planta.

Para tener una aproximación de los cambios epigenéticos que ocurren naturalmente sería importante estudiar los niveles de metilación en plantas silvestres de varios estados de desarrollo y compararlos con los niveles de metilación de plantas cultivadas.

Debido a que estudiar las modificaciones epigenéticas en genotipos muy parecidos y en condiciones controladas puede dar mucha más información sobre el papel de la morfología y la fisiología en el metabolismo secundario, sería conveniente evaluar el efecto de la adición de un agente desmetilante o modificador de las histonas en cultivos *in vitro* de *P. andrieuxii*.

Un enfoque importante para saber cuál es el papel ecológico del urechitol A sería analizar la acumulación de este terpeno bajo diferentes condiciones de estrés, bajo este esquema también sería interesante analizar otras marcas epigenéticas y su posible relación con adaptaciones a diferentes condiciones ambientales.

REFERENCIAS

- Adams, R. L., & Burdon, R. H. (2012). *Molecular biology of DNA methylation*. Springer Science & Business Media.
- Agrawal, S. S., Saraswati, S., Mathur, R., y Pandey, M. (2011). Brucine, a plant derived alkaloid inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 1(3), 180–185. <http://doi.org/10.1016/j.bionut.2011.06.014>
- Aharoni, A., Jongsma, M. A., y Bouwmeester, H. J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*, 10(12), 594–602. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.005>
- Akula, R., y Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720–1731. <http://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Andrade, J. L., Rengifo, E., Ricalde, M. F., Simá, J. L., Cervera, J. C., y Vargas Soto, G. (2006). Microambientes de luz, crecimiento y fotosíntesis de la pitahaya (*Hylocereus Undatus*) en un agrosistema de Yucatán, México. *Agrociencia*, ISSN-E 1405-3195, Vol. 40, Nº. 6, 2006, Págs. 687-697, 40(6), 687–697.
- Barton, K. E. y Koricheva, J. (2010). The ontogeny of plant defense and herbivory: Characterizing general patterns using metaanalysis. *The American Naturalist*, 175(4): 481-493.
- Bache, M., Bernhardt, S., Passin, S., Wichmann, H., Hein, A., Zschornak, M., y Vordermark, D. (2014). Betulinic acid derivatives NVX-207 and B10 for treatment of glioblastoma--an in vitro study of cytotoxicity and radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 19777–90. <http://doi.org/10.3390/ijms151119777>
- Barnes, S. A., McGrath, R. B., & Chua, N. H. (1997). Light signal transduction in plants. *Trends in cell biology*, 7(1), 21-26.
- Bartley, G. E., y Scolnik, P. A. (1995). Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *The Plant Cell*, 7, 1027–1038.
- Barton, K. E., & Koricheva, J. (2010). The ontogeny of plant defense and herbivory:

-
- characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist*, 175(4), 481-493.
- Baurens, F.-C., Nicolleau, J., Legavre, T., Verdeil, J.-L., y Monteuis, O. (2004). Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated in vitro with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Tree Physiology*, 24(4), 401–407. <http://doi.org/10.1093/treephys/24.4.401>
- Boyko, A., & Kovalchuk, I. (2013). Epigenetic modifications in plants under adverse conditions: agricultural applications. In *Plant Acclimation to Environmental Stress* (pp. 233-267). Springer New York.
- Boardman, N. K. (1977). Comparative Photosynthesis of Sun and Shade Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 28(1), 355–377. <http://doi.org/10.1146/annurev.pp.28.060177.002035>
- Bond, B. J. (2000). Age-related changes in photosynthesis of woody plants. *Trends in Plant Science*, 5(8), 349–353. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01691-5](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01691-5)
- Bradshaw, A. D. (2006). Unravelling phenotypic plasticity ? why should we bother? *New Phytologist*, 170(4), 644–648. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01761.x>
- Brown, P. D., Tokuhsa, J. G., Reichelt, M., y Gershenzon, J. (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62(3), 471–481. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00549-6](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00549-6)
- Brusslan, J. A., Bonora, G., Rus-Canterbury, A. M., Tariq, F., Jaroszewicz, A. y Pellegrini, M. (2015). A Genome-Wide Chronological Study of Gene Expression and Two Histone Modifications, H3K4me3 and H3K9ac, during Developmental Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 168(4), 1246–1261. <http://doi.org/10.1104/pp.114.252999>
- Chan, A. O., Soliman, A. S., Zhang, Q., Rashid, A., Bedeir, A., Houlihan, P. S. y Hamilton, S. R. (2005). Differing DNA methylation patterns and gene mutation frequencies in colorectal carcinomas from Middle Eastern countries. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(23), 8281–7. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1000>
- Chan-Bacab, M. J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., García, R. D. y Peña-Rodríguez, L. M. (2003). Variation of leishmanicidal activity in four populations

-
- of *Urechites andrieuxii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3), 243–247. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00011-4](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00011-4)
- Chan-Bacab, M. J. y Peña-Rodríguez, L. M. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*, 18(6), 674–688. <http://doi.org/10.1039/B100455G>
- Chatterjee, P., Kouzi, S. A., Pezzuto, J. M., y Hamann, M. T. (2000). Biotransformation of the Antimelanoma Agent Betulinic Acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3850–3855. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3850-3855.2000>
- Chen, Y.-L., y Chiu, H.-T. (2006). Trichodiene Synthase: Synthesis and Inhibition Kinetics of 12-Fluoro-farnesylphosphonophosphate for Sesquiterpene Cyclases. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 53(5), 1161–1172. <http://doi.org/10.1002/jccs.200600154>
- Croteau, R., Kutchan, T. M., y Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Dawson, F. A. (1994). *The amazing terpenes. Naval stores review* (New Orleans, La.: 1979)(USA).
- Dellaporta, S. L., Wood, J. y Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1(4), 19-21.
- De Luca, V., y St Pierre, B. (2000). The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 5(4), 168–173. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01575-2](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01575-2)
- Demeulemeester, M. A. C., Van Stallen, N., & De Proft, M. P. (1999). Degree of DNA methylation in chicory (*Cichorium intybus* L.): influence of plant age and vernalization. *Plant Science*, 142(1), 101–108. [http://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00010-2](http://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00010-2)
- Domínguez-Carmona, D. B., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ruiz-Pinell, G., Gutierrez-Yapu, D., Chan-Bacab, M. J., y Peña-Rodríguez, L. M. (2010). Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine*, 17(5), 379–82. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.08.002>
- Dubrovina, A. S., y Kiselev, K. V. (2016). Age-associated alterations in the somatic mutation and DNA methylation levels in plants. *Plant Biology*, 18, 156–196. <http://doi.org/10.1111/plb.12375>

-
- Echevarría-Machado, I., Sánchez-Cach, L. A., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, R., y Moreno-Valenzuela, O. A. 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology*, 31(2): 129-135.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L.-H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A., y Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Research*, 10(8), 2709–2721. <http://doi.org/10.1093/nar/10.8.2709>
- Feil, R., y Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews. Genetics*, 13(2), 97–109. <http://doi.org/10.1038/nrg3142>
- Feng, S., Cokus, S. J., Zhang, X., Chen, P.-Y., Bostick, M., Goll, M. G., y Jacobsen, S. E. (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8689–94. <http://doi.org/10.1073/pnas.1002720107>
- Fornara, F., de Montaigu, A., y Coupland, G. (2010). SnapShot: Control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell*, 141(3), 550, 550.e1–2. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.024>
- Fraga, M. F., Cañal, M. J., y Rodríguez, R. (2002). Phase-change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta*, 215(4), 672–8. <http://doi.org/10.1007/s00425-002-0795-4>
- Fu, C., Li, L., Wu, W., Li, M., Yu, X., y Yu, L. (2012). Assessment of genetic and epigenetic variation during long-term *Taxus* cell culture. *Plant Cell Reports*, 31(7), 1321–31. <http://doi.org/10.1007/s00299-012-1251-y>
- Galloway, L. F. (1995). Response to Natural Environmental Heterogeneity: Maternal Effects and Selection on Life-History Characters and Plasticities in *Mimulus guttatus*. *Evolution*, 49(6), 1095. <http://doi.org/10.2307/2410434>
- Gershenzon, J., y Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 408–414. <http://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>
- Ghaffari Moghaddam, M., Bin H. Ahmad, F., y Samzadeh-Kermani, A. (2012). Biological Activity of Betulinic Acid: A Review. *Pharmacology & Pharmacy*, 03(02), 119–123. <http://doi.org/10.4236/pp.2012.32018>
- Gleadow, R. M., y Woodrow, I. E. (2002). Mini-Review: Constraints on Effectiveness of Cyanogenic Glycosides in Herbivore Defense. *Journal of Chemical Ecology*,

28(7), 1301–1313. <http://doi.org/10.1023/A:1016298100201>

- González-Coloma, A., López-Balboa, C., Santana, O., Reina, M., y Fraga, B. M. (2010). Triterpene-based plant defenses. *Phytochemistry Reviews*, 10(2), 245–260. <http://doi.org/10.1007/s11101-010-9187-8>
- Greenwood, M. S., Hopper, C. A., y Hutchison, K. W. (1989). Maturation in larch : I. Effect of age on shoot growth, foliar characteristics, and DNA methylation. *Plant Physiology*, 90(2), 406–12. <http://doi.org/10.1104/PP.90.2.406>
- Guirimand, G., Guihur, A., Ginis, O., Poutrain, P., Héricourt, F., Oudin, A., y Courdavault, V. (2011). The subcellular organization of strictosidine biosynthesis in *Catharanthus roseus* epidermis highlights several tonoplast translocations of intermediate metabolites. *FEBS Journal*, 278(5), 749–763. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07994.x>
- Gutiérrez Báez, C., Zamora-Crescencio, P., & Hernández-Mundo, S. C. (2012). Estructura y composición florística de la selva mediana subcaducifolia de Mucuychacán, Campeche, México. *Foresta Veracruzana*, 14(1).
- GUO, G.-P., GU, X.-P., YUAN, J.-L., y WU, X.-L. (2011). Research on the features of DNA methylation in leaves of different chronological ages of *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* based on the method of MSAP. *Hereditas (Beijing)*, 33(7), 794–800. <http://doi.org/10.3724/SP.J.1005.2011.00794>
- Hamilton, J. G., Zangerl, A. R., DeLucia, E. H., y Berenbaum, M. R. (2001). The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology Letters*, 4(1), 86–95. <http://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00192.x>
- Hanson, J. R. (2003). *Natural products: the secondary metabolites* (Vol. 17). Royal Society of Chemistry.
- Hasbún, R., Valledor, L., Berdasco, M., Santamaría, E., Cañal, M. J., Rodríguez, R., y Sánchez, M. (2005). In Vitro Proliferation and Genome DNA Methylation in Adult Chestnuts. *Acta Horticulturae*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301536934>
- Hayama, R., y Coupland, G. (2004). The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, 135(2), 677–84. <http://doi.org/10.1104/pp.104.042614>
- Henderson, I. R., y Jacobsen, S. E. (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 447(7143), 418–24. <http://doi.org/10.1038/nature05917>
- Hernandez, D. G., Nalls, M. A., Gibbs, J. R., Arepalli, S., van der Brug, M., Chong,

-
- S., y Singleton, A. B. (2011). Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Human Molecular Genetics*, 20(6), 1164–72. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddq561>
- Herranz, M., Martín-Caballero, J., Fraga, M. F., Ruiz-Cabello, J., Flores, J. M., Desco, M., y Esteller, M. (2006). The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. *Blood*, 107(3), 1174–7. <http://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2033>
- Hiebert, R. M. (2015). Variación espacio-temporal de terpenoides en poblaciones silvestres de *Pentalinon andrieuxii*. Tesis de maestría. CICY.
- Hiebert-Giesbrecht, M. R., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Dzib, G. R., Calvo-Iraben, L. M., y Peña-Rodríguez, L. M. (2016). Spatio-Temporal Variation of Terpenoids in Wild Plants of *Pentalinon andrieuxii*. *Chemistry & Biodiversity*, 13(11), 1521–1526. <http://doi.org/10.1002/cbdv.201600085>
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*. Retrieved from <http://genomebiology.com/2013/14/10/R115/>
- Hussain, M. S., Fareed, S., Saba Ansari, M., Rahman, A., Ahmad, I. Z., y Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4(1), 10.
- Jäger, Sebastian, Holger Trojan, Thomas Kopp, Melanie N. Laszczyk, y Armin Scheffler. (2009). Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)* 14(6):2016–31.
- JANZEN, D. H., y WATERMAN, P. G. (1984). A seasonal census of phenolics, fibre and alkaloids in foliage of forest trees in Costa Rica: some factors influencing their distribution and relation to host selection by Sphingidae and Saturniidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 21(4), 439–454. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1984.tb01605.x>
- Jarunya Ngernprasirtsiri, Raymond Chollet, Hirokazu Kobayashi, Tatsuo Sugiyama, A., y Takashi Akazawa. (1989). DNA Methylation and the Differential Expression of C4 Photosynthesis Genes in Mesophyll and Bundle Sheath Cells of Greening Maize Leaves. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 8241–8248. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/264/14/8241.short>
- Jerzy Rzedowski, P., y Calderón de Rzedowski, G. (1998). *FLORA DEL BAJÍO Y DE REGIONES ADYACENTES VITACEAE**. Instituto de Ecología. Retrieved from

<http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Vitaceae131.pdf>

- Johnston, J. W., Harding, K., Bremner, D. H., Souch, G., Green, J., Lynch, P. T., y Benson, E. E. (2005). HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 43(9), 844–53. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.015>
- Kaderbhai, M. A., Adcock, I., y Austen, B. M. (1991). An improved and rapid procedure for isolating RNA-Free Escherichia coli plasmid DNA. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 8(3), 107–110. [http://doi.org/10.1016/1050-3862\(91\)90045-S](http://doi.org/10.1016/1050-3862(91)90045-S)
- Kayser, O., Kiderlen, A. F., y Croft, S. L. (2003). Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, 90 Suppl 2, S55–62. <http://doi.org/10.1007/s00436-002-0768-3>
- Kliebenstein, D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana tinted glasses. *Plant, Cell & Environment*, 27(6), 675-684.
- Kootstra, A. (1994). Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Molecular Biology*, 26(2), 771–774. <http://doi.org/10.1007/BF00013762>
- Kuo, K. C., McCune, R. A., Gehrke, C. W., Midgett, R., y Ehrlich, M. (1980). Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(20), 4763–4776. <http://doi.org/10.1093/nar/8.20.4763>
- Kritsky, M. S., Filippovich, S. Y., Afanasieva, T. P., Bachurina, G. P., & Russo, V. E. A. (2001). Effect of inhibitors of enzymatic DNA methylation on the formation of reproductive structures and carotenoid production in Neurospora crassa. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(3), 243-247.
- Kutchan, T. M. (2001). Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant physiology*, 125(1), 58-60.
- Lee, S. Y., Kim, H. H., y Park, S. U. (2015). Letter to the editor: Recent studies on betulinic acid and its biological and pharmacological ACTIVITY. *EXCLI Journal*, 14, 199–203. <http://doi.org/10.17179/excli2015-150>
- Li, L., Li, X., Fu, C., Zhao, C., y Yu, L. (2013). Sustainable use of Taxus media cell cultures through minimal growth conservation and manipulation of genome methylation. *Process Biochemistry*, 48(3), 525–531. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.01.013>

-
- Li, T. S. C., Mazza, G., Cottrell, A. C., y Gao, L. (1996). Ginsenosides in Roots and Leaves of American Ginseng. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 717–720. <http://doi.org/10.1021/jf950309f>
- Liang, J., Jiang, C., Peng, H., Shi, Q., Guo, X., Yuan, Y., y Huang, L. (2015). Analysis of the age of *Panax ginseng* based on telomere length and telomerase activity. *Scientific Reports*, 5, 7985. <http://doi.org/10.1038/srep07985>
- Martienssen, R. A., y Colot, V. (2001). DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, 293(5532), 1070-1074.
- Margueron, R., y Reinberg, D. (2010). Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature Reviews. Genetics*, 11(4), 285–96. <http://doi.org/10.1038/nrg2752>
- McGarvey, D. J., y Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1015–26. <http://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1015>
- Meyer, P. (2011). DNA methylation systems and targets in plants. *FEBS Letters*, 585(13), 2008–15. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.017>
- Miguel, C., & Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3713-3725.
- Modzelewska, A., Sur, S., Kumar, S., y Khan, S. (2005). Sesquiterpenes: Natural Products That Decrease Cancer Growth. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(5), 477–499. <http://doi.org/10.2174/1568011054866973>
- Monteuuis, O., Doulebeau, S., y Verdeil, J.-L. (2008). DNA methylation in different origin clonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype. *Trees*, 22(6), 779–784. <http://doi.org/10.1007/s00468-008-0238-3>
- Monteuuis, O., Baurens, F., Goh, D., Quimado, M., Doulebeau, S., Verdeil, J. (2009). DNA Methylation in *Acacia mangium* In vitro and Ex-vitro Buds, in relation to their Within-shoot Position, Age and Leaf Morphology of the Shoots. *Silvae Genetica*, 58, 5–6.
- Morales, J. F. (2009). La familia Apocynaceae (Apocynoideae, Rauvolfioideae) en Guatemala. *Darwiniana, Nueva Serie*, 47(1), 140–184. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0011-67932009000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Murray MG, Thompson WF. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, (19):4321-4325.

-
- Neilson, E. H., Goodger, J. Q. D., Woodrow, I. E., y Møller, B. L. (2013). Plant chemical defense: At what cost? *Trends in Plant Science*, 18(5), 250–258. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.001>
- Nicotra, A. B., Atkin, O. K., Bonser, S. P., Davidson, A. M., Finnegan, E. J., Mathesius, U., y Van Kleunen, M. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*, 15(12), 684–692. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.09.008>
- Ogneva, Z. V., Dubrovina, A. S., y Kiselev, K. V. (2016). Age-associated alterations in DNA methylation and expression of methyltransferase and demethylase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 60(4), 628–634. <http://doi.org/10.1007/s10535-016-0638-y>
- Olivera, B.H.D., Santos C., y Espíndola, A. (2002). Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Dolicarpus schottianus* by HPLC. *Phytochemical Analysis* 13(2); 95-98
- Palo, R. T. (1984). Distribution of birch (*Betula* SPP.), willow (*Salix* SPP.), and poplar (*Populus* SPP.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 10(3), 499–520. <http://doi.org/10.1007/BF00988096>
- 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, 128–35. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.06.012>
- Pichersky, E., y Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 5(10), 439–445. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01741-6](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01741-6)
- Rapp, R. A., y Wendel, J. F. (2005). Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist*, 168(1), 81–91. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01491.x>
- Rocha, R. P., de Castro Melo, E., dos Santos, R. H. S., Cecon, P. R., Dallacort, R., y Santi, A. (2014). Influence of plant age on the content and composition of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(37), 1121-1126.
- Rzedowski, J., & Calderón de Rzedowski, G. (2005). Vitaceae. Fascículo 131
- Rodríguez-Concepción, M., Forés, O., Martínez-García, J. F., González, V., Phillips, M. A., Ferrer, A., & Boronat, A. (2004). Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis*

seedling development. *The Plant Cell*, 16(1), 144-156.

- Ronicely, P. R., Evandro, de C. M., Ricardo, H. S. dos S., Paulo, R. C., Rivanildo, D., y Adalberto, S. (2014). Influence of plant age on the content and composition of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(37), 1121–1126. <http://doi.org/10.5897/JMPR2013.5549>
- Ryser, P., y Eek, L. (2000). Consequences of phenotypic plasticity vs. interspecific differences in leaf and root traits for acquisition of aboveground and belowground resources. *American Journal of Botany*, 87(3), 402–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719001>
- Shwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., & Keller, N. P. (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell*, 6(9), 1656-1664.
- Schwab, W., Fuchs, C., & Huang, F. C. (2013). Transformation of terpenes into fine chemicals. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(1), 3-8.
- Sauerwein, M., Shimomura, K., & Wink, M. (1993). Incorporation of 1- ¹³C-Acetate into tropane alkaloids by hairy root cultures of *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry*, 32(4), 905–909. [http://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85227-I](http://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85227-I)
- Schemske, D. W., y Bradshaw, H. D. (1999). Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), 11910–11915. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/96/21/11910.full.pdf>
- Shinya, T., Hojo, Y., Desaki, Y., Christeller, J. T., Okada, K., Shibuya, N., y Galis, I. (2016). Modulation of plant defense responses to herbivores by simultaneous recognition of different herbivore-associated elicitors in rice. *Scientific Reports*, 6, 32537. <http://doi.org/10.1038/srep32537>
- Staudt, M., Bertin, N., Frenzel, B., y Seufert, G. (2000). Seasonal Variation in Amount and Composition of Monoterpenes Emitted by Young *Pinus pinea* Trees Implications for Emission Modeling. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 35(1), 77–99. <http://doi.org/10.1023/A:1006233010748>
- Staudt, M., y Lhoutellier, L. (2011). Monoterpene and sesquiterpene emissions from *Quercus coccifera* exhibit interacting responses to light and temperature. *Biogeosciences*, 8, 2757–2771. <http://doi.org/10.5194/bg-8-2757-2011>
- Steimer, A., Schöb, H., & Grossniklaus, U. (2004). Epigenetic control of plant development: new layers of complexity. *Current opinion in plant biology*, 7(1), 11-19.

-
- Sultan, S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science*, 5(12), 537–542. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01797-0](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01797-0)
- Tappeiner, J. C., Huffman, D. W., Marshall, D., Spies, T. A., y Bailey, J. D. (1997). Density, ages, and growth rates in old-growth and young-growth forests in coastal Oregon. *Canadian Journal of Forest Research*, 27, 638–648. Retrieved from <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/x97-015?journalCode=cjfr>
- Tessadori, F., van Zanten, M., Pavlova, P., Clifton, R., de Pontvianne, F., Basten Snoek, L., y Barsh, G. S. (2009). PHYTOCHROME B and HISTONE DEACETYLASE 6 Control Light-Induced Chromatin Compaction in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 5(9), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000638>
- Thomas, H. (2013). Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist*, 197(3), 696–711. <http://doi.org/10.1111/nph.12047>
- Turlings, T. C. J., McCall, P. J., Alborn, H. T., y Tumlinson, J. H. (1993). An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology*, 19(3), 411–425. <http://doi.org/10.1007/BF00994314>
- Valledor, L., Hasbún, R., Meijón, M., Rodríguez, J. L., Santamaría, E., Viejo, M., y Rodríguez, R. (2007). Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(2), 75–86. <http://doi.org/10.1007/s11240-007-9262-z>
- Van Meeningen, Y., Schurgers, G., Rinnan, R., y Holst, T. (2017). Isoprenoid emission response to changing light conditions of English oak, European beech and Norway spruce. *Biogeosciences Discussions*, 1–25. <http://doi.org/10.5194/bg-2016-526>
- Verheyden, A., Kairo, J. G., Beeckman, H., & Koedam, N. (2004). Growth rings, growth ring formation and age determination in the mangrove *Rhizophora mucronata*. *Annals of botany*, 94(1), 59-66.
- Wang, C.-M., Chen, H.-T., Li, T.-C., Weng, J.-H., Jhan, Y.-L., Lin, S.-X., y Chou, C.-H. (2014). The Role of Pentacyclic Triterpenoids in the Allelopathic Effects of *Alstonia scholaris*. *Journal of Chemical Ecology*, 40(1), 90–98. <http://doi.org/10.1007/s10886-013-0376-y>
- Wang, H.-B., Zhang, H.-P., Zhou, Y., Zuo, J.-P., y Qin, G.-W. (2005).

-
- Sesquiterpenoids from *Saussurea laniceps*. *Journal of Natural Products*, 68(5), 762–5. <http://doi.org/10.1021/np0500326>
- Whitmer, S., van der Heijden, R., y Verpoorte, R. (2002). Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*. *Journal of Biotechnology*, 96(2), 193–203. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00027-5](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00027-5)
- Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E., y Cichewicz, R. H. (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6(11), 1895–7. <http://doi.org/10.1039/b804701d>
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
- Wink, M., & Roberts, M. F. (1998). Compartmentation of alkaloid synthesis, transport, and storage. In *Alkaloids* (pp. 239-262). Springer US.
- Xia, Z., Zhai, H., Liu, B., Kong, F., Yuan, X., Wu, H., y Harada, K. (2012). Molecular identification of genes controlling flowering time, maturity, and photoperiod response in soybean. *Plant Systematics and Evolution*, 298(7), 1217–1227. <http://doi.org/10.1007/s00606-012-0628-2>
- Yokota, T., & Hagihara, A. (1996). Dependence of the aboveground CO₂ exchange rate on tree size in field-grown hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*). *Journal of Plant Research*, 109(2), 177-184.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-López, M., Chan-Bacab, M. J., Arunachalampillai, A., Wendt, O. F., y Peña-Rodríguez, L. M. (2009). Trinorsesquiterpenoids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Journal of Natural Products*, 72(4), 745–8. <http://doi.org/10.1021/np800554n>
- Yin, J., Ma, H., Gong, Y., Xiao, J., Jiang, L., Zhan, Y., y Yang, Y. (2013). Effect of MeJA and Light on the Accumulation of Betulin and Oleanolic Acid in the Saplings of White Birch (*Betula platyphylla* Suk.). *American Journal of Plant Sciences*, 4, 7–15. <http://doi.org/10.4236/ajps.2013.4.12A3002>
- Yuan, J.-L., Sun, H.-M., Guo, G.-P., Yue, J.-J., y Gu, X.-P. (2014). Correlation between DNA methylation and chronological age of Moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*). *Botanical Studies*, 55(1), 4. <http://doi.org/10.1186/1999-3110-55-4>
- Zhang, Z., Li, S., Zhang, S., Liang, C., Gorenstein, D., y Beasley, R. S. (2004). New camptothecin and ellagic acid analogues from the root bark of *Camptotheca*

acuminata. *Planta Medica*, 70(12), 1216–21. <http://doi.org/10.1055/s-2004-835854>

Zhao, G., Yan, W., y 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.

Zluvova, J. (2001). Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2265–2273. <http://doi.org/10.1093/jexbot/52.365.2265>

Zobel, A. M., & Brown, S. A. (1990). Seasonal changes of furanocoumarin concentrations in leaves of *Heracleum lanatum*. *Journal of chemical ecology*, 16(5), 1623-1634.