

**POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE
PLANTAS**

**Análisis molecular de enzimas involucradas en el
metabolismo secundario de *Argemone mexicana*.
Una planta productora de alcaloides
bencilisoquinolínicos**

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias
presenta:

KAREN AURIMELY TRUJILLO VILLANUEVA

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

**Mérida, Yucatán, México
2010**





**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATA A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Análisis molecular de enzimas involucradas en el metabolismo secundario de *Argemone mexicana*. Una planta productora de alcaloides bencilisquinolínicos” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, dentro de la Opción Biología Experimental, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente,

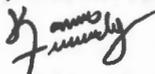


Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Declaración de propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que dicha información le pertenece en términos de la ley de la propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



IBQ. Karen Aurimely Trujillo Villanueva

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del D. Felipe Augusto Vázquez Flota, a quien agradezco la dedicación y apoyo otorgado durante la planeación, desarrollo y evaluación del mismo.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada a Karen Aurimely Trujillo Villanueva para estudios de doctorado (185757).

Este trabajo fue financiado con fondos de CONACYT Convocatorias para la Consolidación de Investigadores (SNI), 52062 y para el Apoyo para la formación de estudiantes de posgrado 52778, y de The Academy of Sciences for the Developing World (TWAS), 06-177 RG/BIO/LA – UNESCO FR:3240157854.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral, fue realizada con el apoyo de muchas personas que a continuación citaré y cuya participación considero invaluable.

Antes que nada, gracias, primero Dios por darme la vida, y después el amor de esta, mi familia. Te doy gracias Dios por dejarme vivir, y a ustedes padres por enseñarme a llorar y reír.

A mis padres (José y Landy) por la fortuna de ser hija suya, y por permitirme con su ayuda mi meta alcanzar. Con todo mi amor y cariño les doy gracias por su apoyo para mi formación profesional.

A mis hermanitos (José Luis y Mitzu), que me han acompañado en momentos difíciles, y han sonreído conmigo en los felices.

A mi esposo (Juan Manuel), amigo y compañero, cuya presencia en mi vida hace que todo parezca posible.

Al Dr. Felipe A. Vázquez Flota, mi asesor de tesis, gracias por su dedicación, paciencia y entrega, así como por sus consejos y enseñanzas de las cuales he aprendido mucho.

Al Dr. Peter Facchini, del Dpto. de Ciencias Biológicas de la Universidad de Calgary, Canadá, por su colaboración en el presente proyecto, al facilitar los EST's de la TyDC y la PPO para los estudios realizados.

Al Dr. Efraín Ramírez Benítez, por su amistad y por el apoyo técnico brindado durante el análisis microscópico de los alcaloides en las células en suspensión.

De manera especial agradezco a la M.C. Miriam Monforte González y a la M.C. Mildred Carrillo Pech, por su amistad, asesoramiento y el apoyo técnico prestado durante la realización de esta tesis.

A la Ing. Wilma Araceli Gonzalez Kantun, por el apoyo técnico brindado.

Agradezco de manera particular a los miembros de mi comité tutorial y de evaluación de tesis: Dra. Ileana Echevarria, Dr. José Narváez, Dr. Gregorio Godoy, Dr. Felipe Sánchez, Dr. Victor Suarez, Dra. Luisa López, por su tiempo y dedicación durante la revisión del presente escrito.

A los profesores del Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas del Centro, que al compartir su experiencia hicieron una gran aportación a mi formación por lo que les estaré siempre agradecida.

A mis amigos y compañeros, por todos los gratos recuerdos.

DEDICATORIA

A mi bebé

Tan pequeño y tan grande a la vez, eres la razón de mí ser

A Juan Manuel Peniche Brito

Unidos por el destino
Unidos por un sentimiento
Dos corazones unidos que laten al mismo tiempo

A mis padres José y Landy

Cuando nací mis padres aparecían para aplaudir mis logros
Cuando iba creciendo, eran la figura que me enseñaba la diferencia entre el bien y el mal. Durante mi adolescencia eran la autoridad que ponía límites a mis deseos. Ahora que soy adulta, son los mejores consejeros y amigos que tengo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	9
1.1. ANTECEDENTES	9
1.1.1. ESTUDIO DE LAS PLANTAS MEDICINALES	9
1.1.2. <i>Argemone mexicana</i>	10
1.1.3. PRODUCTOS NATURALES DE <i>Argemone mexicana</i>	12
1.1.4. METABOLISMO SECUNDARIO	13
1.1.5. BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES	16
1.1.6. ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS (ABI's)	18
1.1.7. REACCIONES INICIALES DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LOS ABI'S	19
1.1.8. FORMACIÓN DE RETICULINA A PARTIR DE NORCOCLAURINA	21
1.1.9. RAMIFICACIÓN DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LOS ABI'S	22
1.1.9.1. Síntesis de alcaloides morfínicos	23
1.1.9.2. Síntesis de alcaloides protoberberina y benzofenantridina	24
1.1.10. EXPRESIÓN TEJIDO ESPECÍFICA DE LOS GENES DE LA RUTA DE SÍNTESIS DE LOS ABI's	26
1.1.11. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LA TyDC	28
1.1.11.1 Otras funciones de la TyDC en plantas	30
1.1.12. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LAS TIROSINASAS O POLIFENOLOXIDASAS (PPO's)	31

1.1.13.	EFFECTOS DE LA INDUCCIÓN DE LA TyDC Y DE LA PPO EN DIFERENTES ESPECIES	32
1.1.14.	RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES	34
1.2.	JUSTIFICACIÓN	37
1.3.	HIPOTESIS	37
1.4.	OBJETIVOS	37
1.4.1.	Objetivo general	37
1.4.2.	Objetivos específicos	38
1.5.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	38
1.6.	REFERENCIAS	39
	CAPITULO 2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA TIROSINA DESCARBOXILASA (TYDC) Y LA TIROSINASA/POLIFENOLOXIDASA (PPO) DE <i>Argemone mexicana</i>	51
2.1.	INTRODUCCIÓN	51
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	52
2.2.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	52
2.2.2.	AISLAMIENTO DE LOS ADNc CORRESPONDIENTES A LA TyDC Y LA PPO DE <i>Argemone mexicana</i>	52
2.2.3.	ANÁLISIS DE SECUENCIAS	54
2.2.4.	EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	56
2.2.4.1.	Extracción de ADN genómico	56
2.2.4.2.	Extracción de ARN total	56
2.2.5.	ANÁLISIS TIPO SOUTHERN	57
2.2.6.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA TyDC Y LA PPO A PARTIR DE RETROTRANSCRITOS (RT-PCR)	58
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60

2.3.1.	OBTENCIÓN DE LAS CLONAS DE TyDC Y PPO DE <i>Argemone mexicana</i>	60
2.3.2.1.	ANÁLISIS DE LA CLONA DE TyDC DE <i>Argemone mexicana</i>	61
2.3.2.2.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA TyDC	64
2.3.2.3.	REDUNDANCIA GÉNICA DE LA TyDC DE <i>A. mexicana</i>	66
2.3.2.4.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA TyDC EN TEJIDOS DE <i>A. mexicana</i>	68
2.3.3.1.	ANÁLISIS DE LA CLONA DE PPO DE <i>Argemone mexicana</i>	69
2.3.3.2.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA PPO	71
2.3.3.3.	REDUNDANCIA GÉNICA DE LA PPO DE <i>A. mexicana</i>	73
2.3.3.4.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PPO EN TEJIDOS DE <i>A. mexicana</i> .	74
2.3.4	CONCLUSIONES	76
2.4.	REFERENCIAS	76
	CAPITULO 3. INDUCCIÓN DE ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS EN CULTIVOS CELULARES DE <i>Argemone mexicana</i>	81
3.1.	INTRODUCCIÓN	81
3.2.	METODOLOGÍAS	85
3.2.1.	CULTIVOS <i>in vitro</i> DE <i>Argemone mexicana</i>	85
3.2.2.	DOSIS-RESPUESTA CON INDUCTORES QUÍMICOS	85
3.2.3.	CURSO TEMPORAL CON INDUCTORES QUÍMICOS	86
3.2.4.	EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	86
3.2.5.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A PCR (RT-PCR)	87

3.2.6.	MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA	87
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
3.3.1.	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR DE <i>A. mexicana</i>	89
3.3.2.	INDUCCIÓN INDIVIDUAL	90
3.3.2.1.	Análisis de expresión en respuesta al tratamiento con MeJa, SA y YE	93
3.3.3.	INDUCCIÓN SIMULTÁNEA	97
3.3.4.	INDUCCIÓN SECUENCIAL.	99
3.3.5.	LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE BENZOFENANTRIDINAS EN LOS CULTIVOS CELULARES	102
3.3.6.	CONCLUSIONES	104
3.4.	REFERENCIAS	106
	CAPITULO 4. DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS	113
4.1.	REFERENCIAS	128
	DATOS COMPLEMENTARIOS	135
	ANEXO I	143

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1.	Litografía y fotografía de la flor de <i>Argemone mexicana</i> .	11
FIGURA 1.2.	Algunos alcaloides fisiológicamente activos y las plantas que los producen (Tomado de Kutchan, 1995).	15
FIGURA 1.3.	Ramificación de la vía del shikimato para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos y la participación de la TDC, TyDC y PAL, en la utilización de estos.	17
FIGURA 1.4.	Biosíntesis de los ABI's, formación de norcoclaurina a partir de dos moléculas de tirosina.	20
FIGURA 1.5.	Biosíntesis de los ABI's, formación de reticulita a partir de norcoclaurina.	22
FIGURA 1.6.	Biosíntesis de los ABI's. Ramificación de la ruta para la síntesis de los alcaloides tipo morfina	23
FIGURA 1.7.	Biosíntesis de los ABI's, Ramificación de la ruta para la síntesis de los alcaloides tipo benzofenantridina y tipo protoberberina.	25
FIGURA 1.8.	Comparación de la expresión tejido-específica de genes involucrados en la biosíntesis de los ABI's en dos especies.	27
FIGURA 1.9.	Expresión tejido específica de los genes de TyDC1 y TyDC2 en <i>P. somniferum</i> .	29
FIGURA 1.10.	Dominios conservados entre las tirosinasas de diferentes grupos.	32
FIGURA 1.11.	Inducción de la expresión de la TyDC y la PPO/tirosinasa.	34

FIGURA 1.12.	Esquema de la estrategia experimental utilizada.	39
FIGURA 2.1.	Esquema de la secuenciación de las clonas.	54
FIGURA 2.2.	Electroforesis de las clonas de TyDC y PPO de <i>A. mexicana</i> .	60
FIGURA 2.3.	Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del marco de lectura abierto de AmTyDC de <i>A. mexicana</i> .	62
FIGURA 2.4.	Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de AmTyDC con una supuesta tirosina/Dopa descarboxilasas (TyDC) reportada para <i>Escholtzia californica</i> .	63
FIGURA 2.5.	Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de AmTyDC con otras aminoácido aromático descarboxilasas.	64
FIGURA 2.6.	Relación filogenética entre la TyDC de <i>A. mexicana</i> y las aminoácido descarboxilasas de plantas.	65
FIGURA 2.7.	Análisis de restricción del ADNc de la TyDC (AmTyDC) de <i>A. mexicana</i> .	66
FIGURA 2.8.	Análisis tipo Southern blot de la TyDC de <i>A. mexicana</i> .	67
FIGURA 2.9.	Northern reverso de la TyDC de <i>A. mexicana</i> .	68
FIGURA 2.10.	Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del marco de lectura abierto de AmPPO de <i>A. mexicana</i> .	70
FIGURA 2.11.	Comparación de la secuencia de aminoácidos de los dominios de unión a cobre de la polifenol oxidasa (PPO) de <i>A. mexicana</i> con los dominios de las PPO's de diferentes especies.	71

FIGURA 2.12.	Relación filogenética entre la PPO de <i>A. mexicana</i> y las secuencias reportadas para diferentes especies de plantas.	72
FIGURA 2.13.	Análisis de restricción del ADNc de la TyDC (AmTyDC) de <i>A. mexicana</i> .	73
FIGURA 2.14.	Análisis tipo Southern blot de la PPO de <i>A. mexicana</i> .	74
FIGURA 2.15.	Northern reverso de la PPO de <i>A. mexicana</i> .	75
FIGURA 3.1.	Ruta condensada de la biosíntesis de los alcaloides benzilisoquinolínicos.	84
FIGURA 3.2.	Caracterización de la suspensión celular AmMv.	90
FIGURA 3.3.	Respuesta de los cultivos a la Inducción individual.	92
FIGURA 3.4.	Efecto de la inducción individual sobre la expresión de los transcritos.	93
FIGURA 3.5.	Respuesta de los cultivos a la Inducción simultánea.	98
FIGURA 3.6.	Respuesta de los cultivos a la inducción secuencial.	101
FIGURA 3.7.	Localización a nivel celular de los alcaloides tipo benzofenantridina.	103
FIGURA 4.1.	Esquema de la transducción de señales que da lugar a la activación de genes involucrados en la biosíntesis de los ABI's.	121
FIGURA 4.2.	Comparación del efecto de dos estrategias de inducción utilizadas para evaluar la respuesta de los cultivos de <i>A. mexicana</i> a la mezcla de inductores.	123

INDICE DE CUADROS

CUADRO 2.1.	Oligonucleótidos específicos diseñados para la secuenciación completa de las clonas.	53
CUADRO 2.2.	Relación de secuencias utilizadas en los análisis de comparación y filogenéticos.	55
CUADRO 2.3.	Cebadores empleados para la amplificación del ADNc parcial de la TyDC y la PPO de tejidos de plantas de <i>Argemone mexicana</i> .	59
CUADRO 3.1.	Cebadores empleados para la amplificación del ADNc parcial de los genes en estudio en suspensiones celulares de <i>Argemone mexicana</i> .	88

ÍNDICE DE CUADROS

<p>83</p>	<p>Cálculos de los efectos de los cambios de los tipos de cambio de los países de la zona del Euro.</p>	<p>CUADRO 2.1</p>
<p>85</p>	<p>Relación de cuentas corrientes en los países de la zona del Euro y el resto del mundo.</p>	<p>CUADRO 2.2</p>
<p>87</p>	<p>Cálculos de los efectos de la emisión de la moneda de la zona del Euro y la zona del Euro en los países de la zona del Euro.</p>	<p>CUADRO 2.3</p>
<p>89</p>	<p>Cálculos de los efectos de la emisión de la moneda de la zona del Euro y la zona del Euro en los países de la zona del Euro.</p>	<p>CUADRO 2.4</p>

ABREVIATURAS

4-HPAA: 4-hidroxifenilacetaldehído

4-HPP: 4-hidroxifenilpiruvato

4'OMT : 4'-hidroxi-N-metilcoclaurina O-metiltransferasa

6-OMT : 6-O-metiltransferasa

A. mexicana: *Argemone mexicana*

ABI's: Alcaloides bencilisoquinolínicos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AS: antranilato sintasa

AJ: ácido jasmónico

BBE: Enzima del puente de berberina

CDO: canadina oxidasa

CFS: quelantifolina sintasa

CM: corismato mutasa

COR: codeinona reductasa.

CYP80B1: hidroxilasa N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa

DAHPS: 3-desoxi-d-arabino-heptulose-7-fosfato sintasa

DBOX: dihidrobenzofenantridina oxidasa

DEPC: Dietilpirocarbonato

DOPA: Dihidroxifenilalanina

Dopamina: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethylamina

DRR: 1,2-dehidroreticulina reductasa

E. californica: *Escholzia californica*

E4P: eritrosa-4-fosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EST's: expressed sequences tag

ETS: estilopina sintasa

fkat: fentokatal

MAO: monoamine oxidase.
MeJa : Methyl jasmonate = jasmonato de metilo
MSH: N-metilestilopina-14-hidroxilasa
NaCl: cloruro de sodio
NCS: norcoclaurina sintasa,
NMT: coclaurina N-metiltransferasa
P. somniferum: Papaver somniferum
PAL: fenilalanina amonio liasa
PCR: Polymerase Chain Reaction ó Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEP: fosfoenol piruvato
PPH: protopina 6-hidroxilasa
PPO: polifenol oxidasa/tirosinasa
PVPP: polivinilpolipirrolidona
SA: salycilic acid = ácido salicílico
SAT: acetil-CoA dependiente la salutaridinol-7-O-acetiltransferasa
SDS: dodecil-sulfato de sodio
SOMT: escoulerina-9-O-metiltransferasa
SOR: salutaridina:NADPH 7-oxidoreductasa
SSC: Saline-Sodium Citrate
STOX: tetrahidroprotoberberina oxidasa
STS: salutaridina sintasa
T. flavum: Thalictrum flavum
T. rugosum: Thalictrum rugosum
TDC: triptofano descarboxilasa
TPNMT: tetrahidroprotoberberina cis-N-metiltransferasa
TyDC: tirosina/DOPA descarboxilasa
VIH1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
YE: Yeast extract = extracto de levadura

RESUMEN

Argemone mexicana L (Papaveraceae), es una planta con propiedades medicinales y tóxicas que se deben a su capacidad de producir alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's), los cuales se forman a partir de dos unidades de tirosina. En este trabajo, se aislaron los ADNc correspondientes a la tirosina descarboxilasa (TyDC) y la tirosinasa/polifenoloxidasas (PPO), dos enzimas que participan en las reacciones biosintéticas tempranas de estos alcaloides. Ambos ADNc fueron identificados en una colección de EST (*Expression Sequence Tags*), obtenida de un cultivo de callos. Las clonas fueron denominadas AmTyDC y AmPPO. El análisis de cada secuencia reveló que ambas contienen marcos de lectura abiertos completos. En ambos casos se identificaron los dominios característicos para cada enzima. Hibridaciones tipo Southern blot mostraron que AmTyDC está presente en un bajo número de copias en el genoma de *A. mexicana*, posiblemente dos, con mayor afinidad al subgrupo TyDC-2 de *Papaver somniferum*. La expresión de este gen se pudo detectar en niveles importantes en todos los tejidos de plantas maduras. Por su parte, AmPPO, también tuvo una baja redundancia génica, y sus transcritos presentaron una alta expresión en todos los tejidos analizados.

Células en suspensión de *A. mexicana* productoras de sanguinarina, un ABI del subgrupo de las benzofenantridinas, expuestas a jasmonato de metilo (MeJa) o ácido salicílico (AS), aumentaron de manera limitada la producción del alcaloide en comparación con suspensiones celulares de otras especies. Esta respuesta limitada podría estar relacionada con un mecanismo para evitar la toxicidad de la sanguinarina y que involucra la reducción de sanguinarina a dihidrosanguinarina, su transporte y posterior acumulación en el espacio extracelular.

Finalmente, se desarrolló una estrategia de inducción de la síntesis de sanguinarina, que provocó una mayor respuesta en los cultivos en suspensión, y consistió en la aplicación secuencial de MeJa, SA y extracto de levadura con intervalos de 24 h entre cada uno de ellos. El incremento en la producción de sanguinarina provocado por los inductores se asoció parcialmente con la acumulación de los transcritos correspondientes a la TyDC y la enzima del puente de la berberina (BBE), una enzima que participa en reacciones biosintéticas posteriores.

ABSTRACT

Argemone mexicana L (Papaveraceae) is a plant with medicinal and toxic properties based on the presence of benzylisoquinoline alkaloids (BIA's), which are formed from two units of tyrosine. cDNA's corresponding to tyrosine decarboxylase (TyDC) and tyrosinase/polyphenoloxidase (PPO) were identified from an EST (Expression Sequence Tags) collection made from a callus culture. Sequence analysis of both clones, named AmTyDC and AmPPO, revealed complete open reading frames and the characteristic domains for both enzymes. Southern blots showed that both AmTyDC and AmPPO are present in a low number of copies in the *A. mexicana* genome. AmTyDC was closely related to the *Papaver somniferum* TyDC-2 subgroup. Transcripts from both genes were detected in all tissues from mature plants.

A. mexicana cell suspensions producing sanguinarine, a benzophenanthridine-type BIA, presented a limited induction response upon exposure to methyl jasmonate (MeJa) or salicylic acid (SA), in comparison to cell cultures from other species. This limited response may be related to a detoxification mechanism, which involved sanguinarine reduction to dihydrosanguinarine, its transport and final accumulation in the extracellular space.

Finally, an induction strategy was developed by the sequential application of MeJa, SA and yeast extract to cell cultures, with a 24 h interval between them. A high accumulation of transcripts corresponding to TyDC and the berberine bridge enzyme (BBE), which is involved in subsequent biosynthetic reactions, was observed in cells exposed to these treatments.

INTRODUCCIÓN

Las plantas productoras de alcaloides son muy apreciadas en la medicina tradicional y recientemente se han realizado muchos estudios sobre la biosíntesis de los metabolitos que producen, tanto a nivel de los propios productos finales como de sus intermediarios biosintéticos. Estos estudios se han realizado a nivel de las enzimas y de los genes involucrados. En algunos casos, estos análisis han tenido como fin la manipulación del metabolismo para la explotación comercial de algunas de estas sustancias fisiológicamente activas (Verpoorte et al. 1999).

Entre los alcaloides que actualmente tienen aplicaciones médicas se encuentran la morfina y la codeína, las cuales pertenecen al grupo de los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's; Kutchan, 1995; Roberts y Wink, 1988). Otros alcaloides de este mismo grupo, como la sanguinarina, están siendo estudiados para su posible aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como la leucemia, entre otras (Ahmad et al., 2000). Los ABI's se encuentran presentes en las plantas pertenecientes a las familias del superorden de las Magnoliflorae y de las Ranunculiflorae (Facchini, 2000), dentro de las cuales las especies más estudiadas son *Papaver somniferum* y *Eschscholtzia californica*.

Argemone mexicana (Papaveraceae) es una planta medicinal que se ha utilizado por largo tiempo en nuestro país. La presencia de algunos ABI's en sus distintos tejidos podría explicar sus propiedades curativas. De esta manera, consideramos que *A. mexicana* es un buen modelo para la investigación de estos alcaloides en México, ya que es una de las Papaveráceas más abundantes de nuestro país (Bhardwaj et al., 1982).

Existe evidencia de que la producción de los ABI's se activa en respuesta al ataque de herbívoros y patógenos (Schmeller et al., 1997), por ello, se les ha relacionado con los mecanismos de defensa inducibles. En *P. somniferum* se conoce gran parte de la ruta de síntesis de este tipo de alcaloides; sin embargo, se sabe relativamente poco acerca de su regulación, especialmente en las etapas tempranas en las que dos moléculas de tirosina se convierten en dopamina y 4-hidroxifenilacetaldehído (4-HPAA) (Rueffer y Zenk, 1987), los intermediarios que se condensan para formar la norcoclaurina, el precursor central de todos los ABI's (ver Fig. 1.4). En estas reacciones, solo se ha analizado la participación de la TyDC, que es la enzima encargada de la

descarboxilación de la tirosina y su derivado hidroxilado, dihidroxifenilalanina (DOPA), formando sus correspondientes aminas (Maldonado-Mendoza et al., 1996; Facchini et al., 1996; Facchini y De Luca, 1994). Sin embargo, en especies no productoras de ABI's, las reacciones de hidroxilación de tirosina y tiramina para formar DOPA y dopamina respectivamente, requieren la participación de una tirosinasa/polifenol oxidasa (PPO) (Gandia Herrero et al., 2005). Las PPO's tienen dos actividades por que, además de las reacciones ya descritas, también pueden catalizar la oxidación de DOPA y dopamina, formando sus correspondientes quinonas, compuestos que tienen propiedades antimicrobianas (Balažová et al., 2002) y que pueden polimerizarse para formar melanina o compuestos relacionados (Mason 1948).

Tanto la TyDC como la PPO se inducen en diferentes especies en respuesta a patógenos y heridas mecánicas, entre otros estímulos. Estos eventos parecen involucrar la participación de moléculas señales como los jasmonatos (Facchini et al., 1996a; Constabel et al., 1995; 2000; Park et al., 1999). Sin embargo, debemos tomar en cuenta que, además de su participación en la síntesis de ABI's, la TyDC también participa en otros mecanismos de defensa (Kawalleck et al., 1993; Trezzini et al., 1993) que incluyen la formación de amidas derivadas del ácido hidroxicinámico. Éstas se forman mediante la transferencia de los ácidos hidroxicinámicos de los ésteres de hidroxicinamoil-CoA (como el coumaroil y feruloil-CoA), a las hidroxifenetilaminas, como la tiramina, el producto de la descarboxilación de tirosina (Yu and Facchini, 1999; Facchini, 1998; Guillet and De Luca, 2005).

Debido a la participación versátil de estas enzimas en la biosíntesis de diversos metabolitos secundarios, es posible que sean un punto importante de regulación que debe tomarse en cuenta durante el estudio de la biosíntesis de los ABI's. Por ello, en el presente trabajo se propuso iniciar su estudio mediante la caracterización molecular de la TyDC y la PPO de *A. mexicana*. cuyos ADNc correspondientes se identificaron como secuencias cortas de expresión (EST's: *Expression Sequence Tags*) a partir de una biblioteca construida con ARN de callos de *A. mexicana*. Ambas clonas tuvieron marcos de lectura abiertos completos dentro de los cuales se identificaron los dominios característicos para cada una de estas enzimas. Se determinó que *A. mexicana* posee un bajo número de copias de ambos genes, los cuales se expresan abundantemente en los diferentes tejidos de

la planta. Finalmente, se realizó un análisis de la expresión de estos genes en suspensiones celulares expuestas a diferentes inductores del metabolismo secundario como jasmonato de metilo (MeJa), ácido salicílico (AS) y extracto de levadura (YE: yeast extract, SIGMA); así como su relación con la expresión de la norcoclaurina sintasa (NCS) y la enzima del puente de la berberina (BBE), dos enzimas que participan en etapas posteriores de la ruta. Estos resultados permitirán contribuir al entendimiento del mecanismo por el cual se regula la biosíntesis de estos compuestos en esta planta.

En el presente trabajo se realizó un análisis de la evolución de estos genes en los últimos años, se observó que los genes que se expresan en los tejidos de los organismos marinos, como el músculo, el hígado y el riñón, son los que se expresan en los tejidos de los organismos terrestres, como el músculo, el hígado y el riñón. Esto sugiere que los genes que se expresan en los tejidos de los organismos marinos y terrestres son los mismos, lo que indica que los genes que se expresan en los tejidos de los organismos marinos y terrestres son los mismos.

Capítulo 1

Antecedentes, objetivos y estrategia experimental

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. ESTUDIO DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Además de los compuestos químicos necesarios para construir sus elementos estructurales y mantenerse funcionales, las plantas tienen la capacidad de producir una gran diversidad de compuestos que no parecen necesarios para estas tareas aunque les pueden conferir ciertas ventajas adaptativas. Estos compuestos se denominan metabolitos secundarios y se producen a partir de intermediarios del metabolismo primario como son aminoácidos, glúcidos y ácidos grasos. Muchos de estos metabolitos secundarios son sustancias fisiológicamente activas en organismos distintos a las plantas que los producen y, por lo tanto, le pueden conferir algunas propiedades medicinales. Por ello, ha surgido un gran interés en su estudio (Guillet et al., 2000; Lovkova et al., 2001). Hasta mediados de la década de 1980 se asumía que las rutas del metabolismo secundario eran reguladas de manera laxa y que existía poca o ninguna coordinación entre el metabolismo primario y el secundario (Kutchan, 2001). Esta percepción ha cambiado gracias a avances recientes y hoy se acepta que las rutas del metabolismo secundario están estrictamente reguladas y en coordinación con las rutas del metabolismo primario (van der Fits & Memelink, 2000).

Las plantas medicinales son actualmente la única fuente para la obtención de algunos medicamentos debido a la complejidad de la estructura del compuesto activo que limita la posibilidad de una síntesis química (Dixon, 2001; Bashmakova et al., 2009). Por lo tanto, muchas de las plantas que los producen son investigadas con el fin de poder manipular su metabolismo con fines de una explotación comercial. Un problema común en los estudios bioquímicos de plantas medicinales es lo errático que puede llegar a ser la disponibilidad del material biológico, por razones geográficas o temporales. El cultivo *in vitro* de tejidos o de células de estas plantas permite superar este problema. No obstante, con frecuencia la capacidad de síntesis de los metabolitos bioactivos es menor en los cultivos *in vitro* que en las plantas completas. Por lo tanto, para superar esta limitante se han empleado varias estrategias, como la selección de líneas

altamente productoras del metabolito de interés, o promoviendo su acumulación mediante la aplicación de inductores del metabolismo secundario (Marques & Brodelius, 1988a,b; Facchini et al., 1996; Facchini, 1998). Sin embargo, es importante que la estrategia empleada para inducir la acumulación del metabolito de interés no debe incrementar la producción de compuestos no deseables, por ejemplo, fenoles, debido a que se ha reportado que en algunas plantas medicinales, cuyos propiedades curativas se relacionan con alcaloides u otros metabolitos diferentes a los fenoles, estos últimos pueden afectar sus propiedades específicas (Lovkova et al., 2001). Otra estrategia es la aplicación de la ingeniería metabólica que pretende la manipulación de genes regulatorios o bien, el bloqueo de rutas alternas que impidan el desvío de esqueletos carbonados de los compuestos de interés, así como el bloqueo del catabolismo (Verpoorte et al., 1994). El empleo de estas estrategias requiere de un conocimiento de las rutas biosintéticas a nivel de productos, de las enzimas y los genes involucrados; así como, la regulación a todos estos niveles, incluyendo aspectos de compartimentalización y transporte, lo que limitaría su aplicación a un número reducido de plantas (Fiehn & Weckwerth, 2003).

De esta manera, los estudios bioquímicos sobre la síntesis de los compuestos que funcionan como los principios activos en las plantas medicinales de una región permitirían el mejor empleo de estos valiosos recursos. En la península de Yucatán se dispone de un amplio acervo de plantas medicinales. Se estima que cerca del 30 % de las más de 2500 plantas vasculares de la península (alrededor de 750 especies) tienen usos medicinales (Méndez & Durán, 2009). Entre estas plantas, se enlistan remedios para diferentes enfermedades respiratorias, gastrointestinales, cutáneas, etc. Una de las plantas que se reconoce por sus propiedades medicinales es *Argemone mexicana* L, comúnmente llamada cardosanto (Siddiqui et al., 2002). Esta planta puede deber sus propiedades medicinales a su composición química, principalmente a los alcaloides que acumula.

1.1.2. *Argemone mexicana*

Argemone mexicana (Fig. 1.1) es una planta que pertenece a la familia Papaveraceae, con una larga historia en la medicina tradicional mexicana. Distintas preparaciones de esta planta se han utilizado en el

tratamiento contra de diferentes enfermedades como las cataratas, úlceras cutáneas, y afecciones de la garganta (Lozoya & Lozoya, 1982). La presencia de diversos alcaloides bencilsioquinolínicos (ABI's) en sus tejidos podría explicar las propiedades que se le atribuyen a esta especie (Capasso et al., 2002). Esta planta es una de las papaveráceas más abundantes en nuestro país. Su nombre común es chicalote, el término castellanizado de *chicálotl*, el nombre que le dieron los indígenas mexicas (Bhardwaj et al., 1982). En Yucatán se le conoce como cardosanto, entre otros nombres comunes (Lozoya & Lozoya, 1982).



Figura 1.1. Litografía y fotografía de la flor de *Argemone mexicana*.

Esta planta es originaria de América y prefiere los climas semi-cálidos, semi-secos y templados, desde el nivel del mar hasta los 2,750 msnm. Crece en terrenos abandonados, en zonas agrícolas o a las orillas de los caminos (Argueta et al., 1994). En México, esta planta es considerada como una maleza por los agricultores y está ampliamente distribuida en los estados de Baja California, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luís Potosí, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Lozoya & Lozoya, 1982). Mide entre 30 y 90 cm de alto, su tallo es solitario, glauco y ramoso en la base, con espinas escasas

perpendiculares o ligeramente reflejas; sus hojas son alternas y sésiles, lobuladas, de aproximadamente 2 a 8 cm de ancho y de 6 a 20 cm de largo, las basales son ovalolanceoladas y las superiores elípticas u ovobadas y espinosas. Sus flores pueden ser amarillas o blancas de 3 a 7.5 cm de diámetro, las cápsulas tienen de 4 a 6 carpelos y son dehiscentes por el vértice (Lozoya & Lozoya, 1982).

1.1.3. PRODUCTOS NATURALES DE *Argemone mexicana*

A. mexicana puede acumular una gran variedad de productos naturales. Se han identificado varios flavonoides en las flores y se ha logrado aislar la isorharmnetina, así como sus glucósidos 3 y 7. Por otro lado, se ha determinado que las semillas de *Argemone* presentan un alto contenido de ácidos grasos, de los cuales el 80% corresponden a ácidos grasos insaturados (linoleico, oleico, palmitoléico y linolénico), mientras que el resto lo constituyen los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico (Lozoya & Lozoya, 1982). Por el alto contenido de aceite en las semillas, la planta presenta un buen potencial para la explotación industrial con fines alimenticios y cosméticos; sin embargo, el alto contenido de compuestos tóxicos ha impedido su utilización (Siddiqui et al., 2002).

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

esculerina y la estilopina (Lozoya & Lozoya, 1982). Esta planta es una especie poco estudiada, por lo que se dispone de una información limitada acerca de las enzimas y genes involucrados en su metabolismo secundario. Debido a que los alcaloides producidos por esta planta son derivados del aminoácido tirosina, se decidió realizar la caracterización molecular de la tirosina descarboxilasa (TyDC) y la tirosinasa o polifenol oxidasa (PPO), cuya posible participación en el metabolismo secundario de esta planta se explica con detalle mas adelante.

1.1.4. METABOLISMO SECUNDARIO

Los metabolitos secundarios pueden definirse como compuestos de bajo peso molecular que, aunque no tienen un papel directo en el crecimiento y desarrollo de las plantas que los producen, sí tienen una función para su defensa contra el ataque de predadores, o en la respuesta a señales de estrés biótico y/o abiótico (Kutchan, 2001). De esta manera, contribuyen a la adaptación de la planta a las condiciones adversas que se le presenten. Los metabolitos secundarios son usualmente clasificados de acuerdo a su origen biosintético (Harborne, 1999). Así, se han considerado tres familias principales: fenoles, terpenos, y alcaloides. De estos tres grupos, los fenoles presentan la mayor distribución en plantas, debido a que están involucrados en diferentes procesos, dentro de los que se encuentra la síntesis de lignina y por lo tanto, son comunes en todas las plantas superiores (Bourgaud et al., 2001). Los terpenos por su parte, son un grupo muy diverso de productos naturales que participan en interacciones benéficas y antagonicas entre organismos, ya que defienden a muchas especies de plantas, animales y microorganismos contra sus predadores, patógenos y competidores (Gershenzon & Dudareva, 2007). Sin embargo, debido a que sólo un pequeño porcentaje de estos compuestos ha sido investigado, se desconoce cómo organismos filogenéticamente distantes pueden utilizar estructuras similares para el mismo propósito. Por su parte, los alcaloides, tienen una distribución más restringida en el reino vegetal, ya que son mucho más específicos para una familia, género y en algunos casos, para una sola especie (Dixon, 2001). Desde la identificación del primer alcaloide, la morfina, encontrado en 1806 en el opio (*Papaver somniferum*), se han aislado y elucidado las estructuras de más de 20,000 compuestos de este tipo (Kutchan, 1995). Los alcaloides han recibido un

interés particular debido a que presentan ciertas actividades fisiológicas en animales y humanos que se pueden aprovechar en el diseño de medicamentos (Roberts & Wink, 1998). Algunos alcaloides con estas características, así como las plantas que los producen se presentan en la Figura 1.2.

Los metabolitos secundarios y en particular los alcaloides, son de gran interés, entre otros estudios, para la ingeniería metabólica, la cual busca incrementar la producción de estos compuestos para su aprovechamiento comercial (Verpoorte et al. 1999). Sin embargo, para aplicarla es necesario un buen entendimiento de la bioquímica y de la regulación de las rutas de síntesis.

1.1.5. BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES

La mayoría de los alcaloides se sintetizan a partir de ciertos aminoácidos que dan lugar a familias de estos compuestos. Por ejemplo, los alcaloides del tropano se forman a partir de arginina/ornitina y los monoterpen indólicos se forman a partir del triptofano, entre otras familias (Facchini, 2001). En general, las reacciones iniciales de las diversas rutas de síntesis de alcaloides, involucran la descarboxilación y/o desaminación de los aminoácidos de los que se forman. Estas reacciones se llevan a cabo mediante la participación de enzimas como la fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC 4.3.1.5) que dirige a la fenilalanina hacia la biosíntesis de fenilpropanoides, catalizando su conversión en ácido transcinámico (Hahlbrock & Scheel, 1989). Otro ejemplo es la triptofano descarboxilasa (TDC; EC 4.1.1.28), que convierte al triptofano en triptamina, dirigiéndolo hacia el metabolismo de los alcaloides monoterpen-indólicos (Waller & Dermer, 1981). De igual forma, la tirosina descarboxilasa (TyDC; EC 4.1.1.25) es la enzima que dirige a la tirosina hacia la biosíntesis de los ABI's (Facchini et al., 1996a; Marques & Brodelius, 1988a). Estos tres aminoácidos son productos de la vía del shikimato (Herrmann & Weaver, 1999) y sólo son sintetizados por plantas y microorganismos mientras que los animales deben obtenerlos en su dieta, ya que carecen de esta vía metabólica. El shikimato, proviene de la condensación del fosfoenol piruvato (PEP), que se origina de la glucólisis, con la eritrosa-4-fosfato (E4P), de la vía de las pentosas fosfato (Figura 1.3). El shikimato se convierte en corismato en tres pasos en los cuales se incorporan tres átomos de carbono provenientes de otra molécula de fosfoenol piruvato. Posteriormente, el corismato puede ser convertido en antranilato, dirigiéndose a la síntesis de triptofano, o bien, puede ser transformado en prefenato que es el precursor de la biosíntesis de fenilalanina y tirosina (Fig. 1.3). La participación de PAL, TDC y TyDC convierte a cada aminoácido aromático en el primer intermediario para la síntesis de diversos metabolitos (Guillet et al., 2000). Debido a que estas enzimas operan en la interfase entre el metabolismo primario y secundario, se ha sugerido que podrían representar puntos claves de regulación en la biosíntesis de estos compuestos (Facchini et al., 2000)

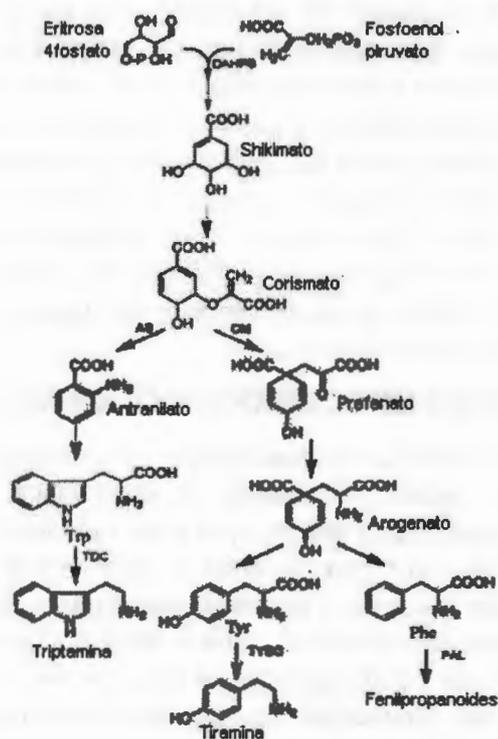


Figura 1.3. Ramificación de la vía del shikimato para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos y la participación de la TDC, TyDC y PAL en la utilización de estos. Las enzimas que se muestran son: 3-desoxi-d-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa (DAHPS), corismato mutasa (CM), antranilato sintasa (AS), triptofano descarboxilasa (TDC), tirosina descarboxilasa (TYDC), y fenilalanina amonio liasa (PAL).

De este modo, se ha propuesto que PAL podría representar un punto clave de regulación para la ruta de los fenilpropanoides, que se inicia a partir de la fenilalanina y que suministra compuestos para la síntesis de ligninas, coumarinas y flavonoides, entre otros (Nakazawa et al., 2001). La regulación de la expresión de PAL ocurre principalmente a nivel transcripcional (Nakazawa, 2001), controlando de manera general el metabolismo de los fenilpropanoides. Por otra parte, en cuanto a las

descarboxilasas de aminoácidos aromáticos de las plantas, el gen que codifica la TDC fue el primero en ser clonado (De Luca et al., 1989), y subsecuentes trabajos han reportado que esta enzima tiene un patrón de regulación complejo tanto a nivel transcripcional (Pasquali et al., 1992; Noe et al., 1984), como post-transcripcional y post-traducciona (Fernandez & De Luca, 1994). Por su parte, se ha sugerido que la TyDC podría suministrar el precursor de una clase ubicua de metabolitos de defensa de las plantas (Kawalleck et al., 1993; Trezzini et al., 1993), además de participar en la biosíntesis de los ABI's (Facchini et al., 1996a). Sin embargo, se conoce relativamente poco acerca de su regulación y del papel que juega en los mecanismos de defensa de las plantas.

1.1.6. ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS (ABI's)

Los ABI son derivados de dos unidades de tirosina que, después de ser modificados se condensan formando un intermediario central que da lugar los diferentes subgrupos que incluyen a las benzofenantridinas, como la sanguinarina y la macarpina (Kutchan & Zenk, 1993), los alcaloides protoberberina, como berberina y palmitina (Hashimoto y Yamada, 1994) y, finalmente los alcaloides morfina, como la morfina y la codeína (Rueffer & Zenk, 1987). Mas de 2,500 alcaloides de este tipo han sido identificados en las familias del superorden de las Magnoliiflorae (Annonaceae, Eupomatiaceae, Aristochiaceae, Laureceae, Monimiaceae, Nelumbonaceae) y de las Ranunculiflorae (Berberidaceae, Ranunculaceae, Menispermaceae, Fumariaceae, Papaveraceae) (Facchini et al., 2000). La actividad farmacológica de los ABI's los hace útiles en el tratamiento de diversas afecciones humanas. Por ejemplo, la morfina tiene eficacia como analgésico, la colchicina provoca la disrupción de los microtúbulos y la (+)-tubocurarina es un bloqueador neuromuscular (Wink, 1998). Esto sugiere que también funcionan en las plantas como protectores contra el ataque de herbívoros. La propiedad antimicrobiana de la sanguinarina y de la berberina sugiere que pueden conferir protección a la planta contra microorganismos (Schmeller et al., 1997). *P. somniferum*, como muchas plantas, invierten considerables recursos para la producción de estos alcaloides, lo que sugiere que estos componentes juegan un papel esencial y fisiológico dentro de la misma (Dixon, 2001).

En general, el proceso de síntesis de los ABI's se puede dividir en tres etapas. La primera etapa consiste en las reacciones iniciales que conducen a la formación de norcoclaurina (Fig. 1.4), la segunda etapa es la conversión de éste intermediario en reticulina (Fig. 1.5) y la etapa final es la ramificación de la ruta para la formación de los diferentes subgrupos de alcaloides, a partir de reticulina (Fig. 1.6 y Fig. 1.7).

1.1.7. REACCIONES INICIALES DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LOS ABI'S

Las reacciones iniciales de la síntesis de los ABI's consisten en una serie de descarboxilaciones, orto-hidroxilaciones y desaminaciones, que convierten dos unidades de tirosina en dopamina y en 4-hidroxifenilacetaldehído (4-HPAA), respectivamente (Rueffer & Zenk, 1987). Estos dos compuestos se condensan entre sí para formar la norcoclaurina, por la acción de la norcoclaurina sintasa (NCS; Fig. 1.4). La descarboxilasa de aminoácido aromático, que convierte a la tirosina y a su derivado hidroxilado dihidrofenilalanina (DOPA) en sus correspondientes aminas, tiramina y dopamina, ha sido purificada a homogeneidad (Marques & Brodelius, 1988a). Además, se dispone de su correspondiente ADNc (Facchini & De Luca, 1994; Maldonado-Mendoza et al., 1996). En *P. somniferum* y otras especies, esta enzima se conoce como tirosina/DOPA descarboxilasa (TyDC) y es codificada por una familia multigénica (Facchini & De Luca, 1994). De este modo, la dopamina puede formarse directamente a partir de la DOPA por acción de la TyDC o bien, mediante la hidroxilación de la tiramina (Fig. 1.4.).

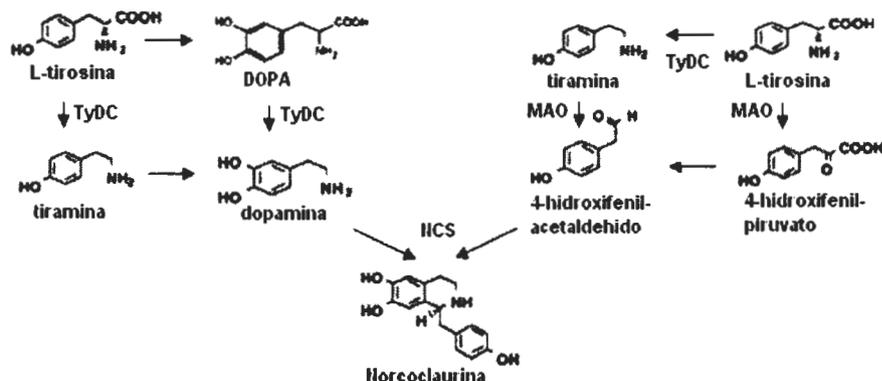


Figura 1.4. Biosíntesis de los ABI's, formación de norcoclaurina a partir de dos moléculas de tirosina. Se presentan las dos rutas propuestas para la formación de dopamina y 4-hidroxiacetilaldehído. TyDC: tirosina descarboxilasa, NCS: norcoclaurina sintasa, MAO: monoamine oxidase (Facchini et al., 1996a).

Si bien la mayoría de las oxidaciones necesarias para la formación de los ABI's son llevadas a cabo por monoxigenasas dependientes de citocromo P450 (Chou & Kutchan, 1998), la hidroxilación de tirosina y tiramina, para producir DOPA y dopamina, respectivamente, parece que procede por un mecanismo diferente. El proceso de orto-hidroxilación de monofenoles, así como la oxidación de difenoles que puede formar melanina y otros polifenoles, es catalizada por enzimas conocidas como polifenol oxidasas o tirosinasas (PPO's; Selinheimo et al., 2007; Mayer, 2006). De hecho, estas enzimas participan en la síntesis de diversos metabolitos secundarios. Por ejemplo, catalizan la hidroxilación de tiramina para formar dopamina, que en presencia de ácido betalámico, forma dopamina-beta-xantina (Gandia Herrero et al., 2005). En las especies productoras de ABI's, se han realizado pocos estudios sobre las PPO's; sin embargo, existen reportes que sugieren su participación en esta ruta. El primer informe sobre la participación de las PPO en la síntesis de ABI's proviene de los años 70's, cuando se descubrió que estaban presentes en la fracción 1000 x g del látex de *P. somniferum* (Roberts, 1971). En un estudio posterior, se evaluó su actividad en cultivos celulares de *P.*

somniferum tratados con un inductor fúngico, usando como sustratos los intermediarios tempranos, DOPA y dopamina. En este estudio se observó un incremento de nueve veces en la acumulación de sanguinarina, en comparación con los cultivos no inducidos, que coincidió con un aumento de tres veces en la actividad de la PPO (Balažová et al., 2002).

Al igual que la dopamina, el 4-HPAA tiene dos posibles rutas de síntesis. Puede formarse directamente a partir de la tiramina por acción de la tiramina oxidasa (monoamina oxidasa). Alternativamente esta misma enzima puede desaminar oxidativamente a la tirosina, produciendo 4-hidroxifenilpiruvato (4-HPP) que puede ser reducido posteriormente a 4-HPAA (Rueffer & Zenk, 1987; Fig. 1.4).

Independientemente de cómo se hayan sintetizado, una vez que se han formado la dopamina y el 4-HPAA, la norcoclaurina sintasa (NCS) cataliza la condensación de ambos para producir (S)-norcoclaurina, el precursor central de todos los ABI (Fig. 1.3; Stadler et al., 1989). Esto sugiere que la regulación de la NCS juega un papel importante en el control del flujo metabólico para la formación de ABI's. La NCS ha sido purificada de cultivos de células de *Eschscholzia tenuifolia* (Rueffer et al., 1981) y de *P. somniferum*, en los cuales el tratamiento con inductores produjo un notable aumento de la actividad (Samanani & Facchini, 2001). Recientemente se aislaron dos genes que codifican para la NCS de *A. mexicana*, los cuales se expresan casi a un mismo nivel en todos los tejidos de la planta madura y la presencia de los mensajeros es prácticamente constante durante la germinación y en las primeras etapas del desarrollo de las plántulas (Rubio-Piña, 2009), lo que sugiere que la regulación de estas enzimas posiblemente tenga otros elementos, además del nivel transcripcional.

1.1.8. FORMACIÓN DE RETICULINA A PARTIR DE NORCOCLAURINA

La (s)-norcoclaurina es convertida en (S)-reticulina mediante una serie de reacciones ordenadas que incluyen una hidroxilación y tres metilaciones (Fig. 1.5). El suministro y rastreo de precursores marcados indica que el orden de estas reacciones, y las enzimas involucradas son las siguientes: la norcoclaurina 6-O-metiltransferasa (6OMT) (Sato et al., 1994); la coclaurina N-metiltransferasa (NMT), que cataliza la segunda reacción,

mientras que la N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa (CYP80B1) es la responsable de la tercera reacción (Pauli & Kutchan, 1998). Finalmente, la 4'-hidroxi-N-metilcoclaurina O-metiltransferasa (4'OMT) lleva a cabo la última reacción de esta serie (Sato et al., 1994), formándose así la (S)-reticulina. La mayoría de las enzimas involucradas en estas vías han sido aisladas, al igual que los ADNc's correspondientes y muchas se han purificado (Fig. 1.5).

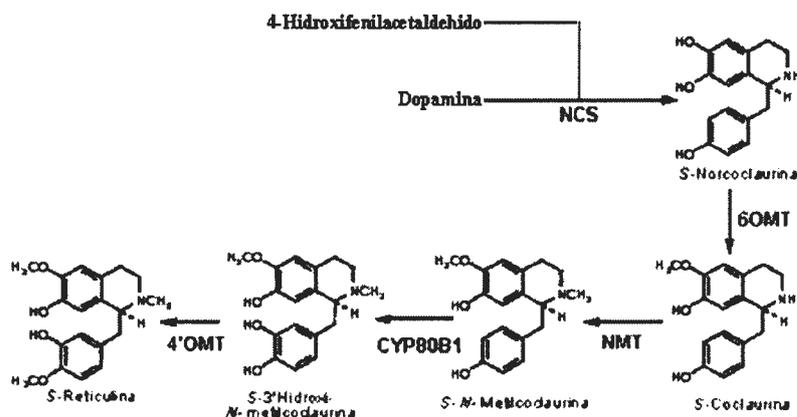


Figura 1.5. Biosíntesis de los ABI's, formación de reticulita a partir de norcoclaurina, TyDC: tirosina descarboxilasa. NCS: norcoclaurina sintasa, 6'OMT: norcoclaurina 6-O-metiltransferasa. NMT: N-metiltransferasa, CYP80B1: N-metilcoclaurina 3-hidroxilasa y 4'OMT: 4-O-metiltransferasa.

1.1.9. RAMIFICACIÓN DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LOS ABI'S

Después de la formación de S-reticulina, la ruta se ramifica dando lugar a las diferentes estructuras como son los alcaloides tipo benzofenantridina, los tipo protoberberina y los tipo morfina (Fig. 1.6). Cabe mencionar que esta última clase de alcaloides solo se produce en algunas especies de género *Papaver* y las investigaciones de las enzimas que participan en esta rama de la ruta se han basado prácticamente en *P. somniferum*. Sin embargo, algunas especies relacionadas han resultado útiles para aislar nuevos genes asociados con la síntesis de morfina (Liscombe and Facchini, 2008).

1.1.9.1. Síntesis de alcaloides morfinanos

Para la síntesis de morfina, la conversión de (S)-reticulina a su (R)-enantiómero representa el primer paso (Fig. 1.6). La enzima citosólica dependiente de NADPH, 1,2-deshidroreticulina reductasa, ha sido purificada de *P. somniferum* y cataliza la reducción estereoespecífica de la 1,2-deshidroreticulina a (R)-reticulina (De-Eknamkul & Zenk, 1992). El siguiente paso requiere el acoplamiento del carbón intramolecular con el carbón fenólico de la (R)-reticulina. Esta reacción es catalizada por la salutaridina sintasa (STS) que da lugar a la salutaridina (Gerardy & Zenk, 1993). La enzima citosólica salutaridina NADPH 7-oxidoreductasa (SOR), reduce salutaridina a (7S)-salutaridinol (Gerardy & Zenk, 1993). La transformación de (7S)-salutaridinol en tebaina es catalizada por una enzima acetil-CoA dependiente, la salutaridinol-7-O-acetiltransferasa (SAT). En los últimos pasos en la síntesis de morfina, la tebaina es convertida a codeinona, la cual es subsecuentemente reducida a codeína (Lenz & Zenk, 1995). Finalmente, la codeína es desmetilada para producir morfina.

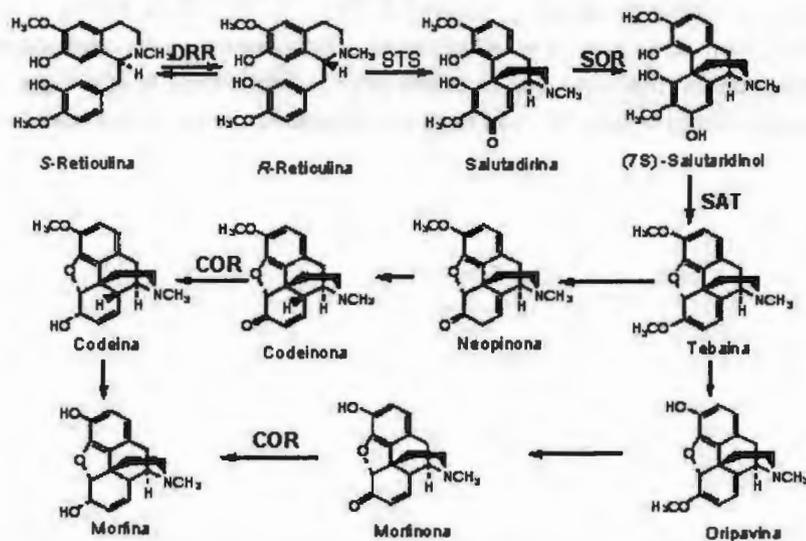


Figura 1.6. Biosíntesis de los ABI's. Ramificación de la ruta para la síntesis de los alcaloides tipo morfina. DRR: 1,2-deshidroreticulina reductasa, STS: salutaridina sintasa, SOR: salutaridina:NADPH 7-oxidoreductasa, SAT: acetil coenzima A:salutaridinol-7-O-acetiltransferasa y COR: codeinona reductasa.

1.1.9.2. Síntesis de los alcaloides protoberberina y benzofenantridina

Estos dos grupos de alcaloides se separan de la síntesis de morfina pero comparten un paso más, que consiste en la conversión del grupo N-metilo de la (S)-reticulina en el componente del puente metilénico de la (S)-escoulerina, por acción de la enzima formadora del puente de la berberina (BBE; Fig. 1.7; Steffens et al, 1985; Dittrich & Kutchan, 1991; Chou & Kutchan, 1998; Facchini et al., 1996b). Recientemente se clonaron dos genes que codifican para esta enzima en *A. mexicana*, uno de los cuales se expresa en todos los tejidos de la planta, presentando una mayor acumulación de mensajeros en la hoja, cápsula y brote floral, mientras que el otro tiene un nivel menor de expresión y sus transcritos están ausentes en la semilla inmadura (Rubio-Piña, 2009). En cultivos celulares de *E. californica*, la inducción transcripcional y de la actividad la BBE ocurre en respuesta a la aplicación de homogenados fúngicos (Dittrich & Kutchan, 1991), de igual forma que en cultivos de *P. somniferum* en los que también responde al daño mecánico (Facchini & Park, 2003). Esto indica que la inducción transcripcional de estas enzimas podría ser un punto clave para la regulación de la ruta. Una vez formada la (S)-escoulerina, la ruta vuelve a ramificarse dando lugar a los dos tipos de alcaloides antes mencionados.

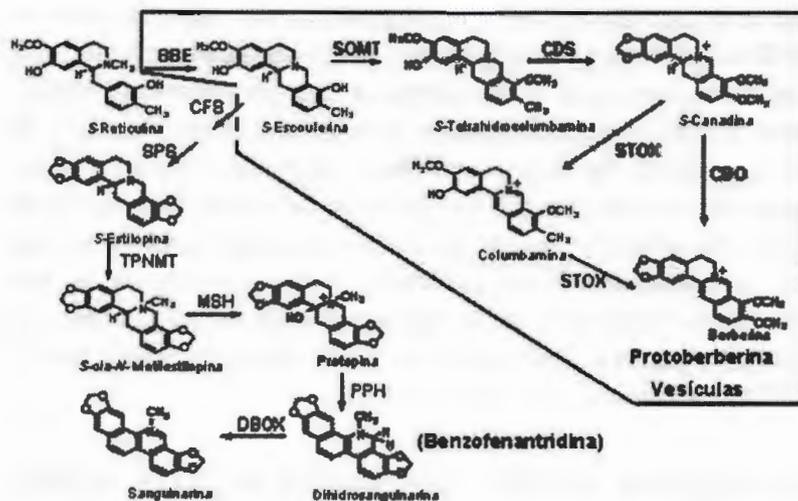


Figura 1.7. Biosíntesis de los ABI's, Ramificación de la ruta para la síntesis de los alcaloides tipo benzofenantridina y tipo protoberberina. BBE: Enzima del puente de berberina, CFS: chelantifolia sintasa, ETS: estilopina sintasa, TPNMT: tetrahidroprotoberberina cis-N-metiltransferasa, MSH: N-metilestilopina-14-hidroxilasa, PPH: protopina 6-hidroxilasa, DBOX: dihidrobenzofenantridina oxidasa, SOMT: escoulerina-9-O-metiltransferasa, CDO: canadina oxidasa y STOX: tetrahidroprotoberberina oxidasa.

Para la síntesis de los alcaloides tipo benzofenantridina, la (S)-escoulerina puede ser convertida a (S)-estilopona por acción de dos oxidases dependientes del citocromo P-450, la (S)-chelantifolia sintasa (CFS) y la (S)-estilopina sintasa (SPS), resultando en la formación de dos grupos metilenodioxi (Bauer & Zenk, 1989; 1991). Posterior a esto, las reacciones que dan lugar a la síntesis de sanguinarina (y otros alcaloides tipo benzofenantridina) incluyen una metilación, catalizada por la tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TPNMT) (Rueffer et al., 1990), seguida de dos hidroxilaciones, catalizadas por la (S)-cis-N-metilestilopina 14-hidroxilasa (MSH) (Rueffer & Zenk, 1987) y la protopina-6-hidroxilasa (PPH), inmediatamente se produce un rearrreglo intramolecular que da lugar a la formación de la dihidrosanguinarina (Tanahashi & Zenk, 1990). Finalmente, la dihidrobenzofenantridina oxidasa (DBOX) convierte la dihidrosanguinarina en sanguinarina (Schumacher & Zenk, 1988) (Fig. 1.7).

Para la síntesis de berberina en algunas plantas, especialmente de las familias Berberidaceae y Ranunculaceae, la (S)-escoulerina es metilada, en lugar de ser oxidada, por la escoulerina-9-O-metiltransferasa (SOMT), para producir (S)-tetrahydrocolumbamina (Sato et al., 1993) (Fig. 1.7). El ADNc de esta enzima ha sido aislado de *C. japonica* (Takeshita et al., 1995). El segundo paso involucra la formación de un puente metilendioxi en la (s)-tetrahydrocolumbamina, llevada a cabo por la enzima canadina sintasa (CDS), que es dependiente del citocromo P-450. Finalmente la (S)-canadina, es oxidada para producir berberina por acción de la (S)-canadina oxidasa (CDO) en *Coptis* y *Thalictrum* o por la (S)- tetrahydroprotoberberina oxidasa (STOX) en *Berberis* (Amman et al., 1986).

1.1.10. EXPRESIÓN TEJIDO ESPECÍFICA DE LOS GENES DE LA RUTA DE SÍNTESIS DE LOS ABI's

En plantas de *P. somniferum* la abundancia de los transcritos correspondientes a la mayoría de los genes biosintéticos de algunos alcaloides, como la sanguinarina y la tebaina, generalmente correlaciona con la acumulación de los propios alcaloides (Facchini and De Luca, 1995b). Sin embargo, en *T. flavum* la acumulación de los transcritos involucrados en la síntesis de protoberberinas no se corresponde necesariamente con la acumulación de la berberina (Samanani et al., 2005). Por otro lado, al comparar la expresión tejido específica de estos genes en ambas especies, se observaron algunas diferencias (Fig. 1.8.). Por ejemplo, en *P. somniferum* los transcritos de varios genes fueron detectados en los diferentes órganos. Sin embargo, la mayor acumulación se presentó en los tallos y en el botón floral, siendo menor en las hojas (Fig. 1.8A, Facchini & Park, 2003). Además, la acumulación de los transcritos de la TyDC fue mayor en la raíz, aunque en este órgano dichos transcritos fueron de menor tamaño a los detectados en los tejidos aéreos. Esto sugiere que posiblemente corresponden a diferentes miembros de una familia multigénica (Facchini & De Luca, 1994). Por su parte, en *T. flavum* los transcritos de todos los genes, incluyendo a los de TyDC, tienen una mayor acumulación en el rizoma (tallo modificado), pero se observa su expresión en prácticamente todos los tejidos, siendo la hoja el sitio de menor acumulación (Fig. 1.8B, Samanani et al., 2005). En comparación con el

rizoma, la raíz posee un nivel mucho menor y más variable de los transcritos correspondientes a TyDC, 6OMT, CNMT, CYP80B, 4OMT y BBE, mientras que la expresión de algunos de estos genes es relativamente abundante en los pecíolos y los botones florales (Fig. 1.8B). Además, los transcritos de la BBE en *A. mexicana* al igual que la BBE en *P. somniferum*, se acumulan en todos los tejidos de la planta madura (Rubio-Piña, 2009). Sin embargo, a diferencia de esta especie, la mayor acumulación de los mensajeros en *Argemone* se presenta en la cápsula y en el brote floral. Además, el gene para la NCS de *A. mexicana* se expresa de manera casi constitutiva en todos los tejidos (Rubio-Piña, 2009).

En conjunto, los datos anteriores sugieren que cada especie, incluso aquellas pertenecientes a una misma familia, podría tener un mecanismo de regulación diferente para los genes involucrados en la biosíntesis de los ABI's. Por lo tanto, para poder aprovechar las propiedades de *A. mexicana* por medio de la ingeniería metabólica, es importante estudiar los puntos clave de regulación de la biosíntesis de los alcaloides para esta especie.

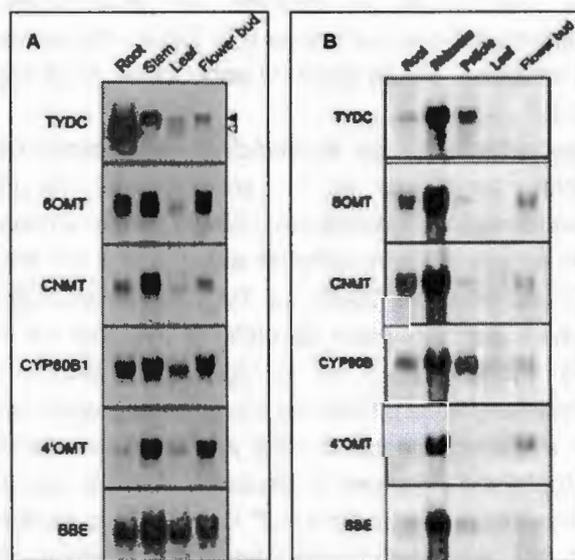


Figura 1.8. Comparación de la expresión tejido-específica de genes involucrados en la biosíntesis de los ABI's en dos especies. A) *P. somniferum*, tomado de Facchini & Park, 2003; B) *T. flavum*, tomado de Samanani et al., 2005.

Puesto que la acumulación de ABI's se considerada una respuesta de defensa y que las reacciones iniciales involucran la modificación de la tirosina, en las que participan la TyDC y la PPO, estas enzimas podrían ser un punto importante de regulación. De este modo, su estudio a nivel molecular podría determinar su participación específica en la regulación del proceso. En este sentido, es importante considerar que la inducción de la síntesis de alcaloides en respuesta al MeJa y a los homogenados fúngicos requiere la activación transcripcional de la TyDc y que estos agentes también promueven la activación de la PPO en diferentes especies (Constabel et al., 2000; 1995; Park et al., 1999; Facchini et al., 1996a). No obstante, los productos de las reacciones que ambas enzimas catalizan no necesariamente se dirigen hacia la biosíntesis de los ABI's, por lo tanto, es necesario determinar si la activación de la expresión de estos genes en *A. mexicana*, esta relacionada con la producción de los metabolitos de interés.

1.1.11. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LA TyDC

Por su posición en la interfase del metabolismo primario y secundario, esta enzima que pertenece a la familia de descarboxilasas de aminoácidos aromáticos, puede tener un papel clave en la regulación de la síntesis de ABI's.

Las descarboxilasas de aminoácidos aromáticos de animales y plantas presentan similitudes en un gran número de características, incluyendo su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, en contraste con las de animales, las de plantas generalmente exhiben una alta especificidad por sus sustratos (Facchini et al., 2000). La TyDC se ha encontrado en varias especies y se ha logrado purificar de cultivos celulares de *P. somniferum* (Facchini & De Luca, 1994) y de *T. rugosum*, tratados con inductores (Marques & Brodelius 1988a). Esta dos especies son productoras de ABI's. La TyDC de *E. californica* acepta tirosina y DOPA como sustratos, pero no fenilalanina ni triptofano (Marques & Brodelius, 1988b). Las preparaciones de TyDC son muy inestables, incluso a 2° C, lo cual causa la rápida pérdida de su actividad. Así, el congelamiento y almacenamiento a -70° C previene este efecto durante los primeros pasos de purificación (Marques & Brodelius, 1988a). Debido a esto, muchos intentos de purificación de la TyDC por métodos convencionales no han sido exitosos. Sin embargo,

Marques y Brodelius (1988a; 1988b), obtuvieron una preparación pura a partir de una suspensión celular de *E. californica*.

En *P. somniferum* estas enzimas son codificadas por una familia génica de entre 10 y 14 miembros, los cuales inicialmente se dividieron en dos grupos. Los miembros de cada grupo se expresan diferencialmente en los tejidos de plantas maduras (Fig. 1.9.A), siendo la raíz el sitio de expresión predominante para el grupo TyDC1 (Facchini & De Luca, 1994). En contraste, el grupo TyDC2, se expresan predominantemente en tallos, aunque también hay una expresión significativa en la raíz (Facchini & De Luca, 1994; Facchini & De Luca, 1995b). La actividad enzimática en los diferentes tejidos, corresponde, en cierta medida con la acumulación de los transcritos, siendo mucho mayor en raíz, en comparación con la encontrada en tallo, hoja y demás tejidos (Facchini & De Luca, 1994). De igual forma, en cultivos *in vitro* también se pudo detectar actividad de esta enzima, siendo incluso mayor que la detectada en tallo (Figura 1.9.B).

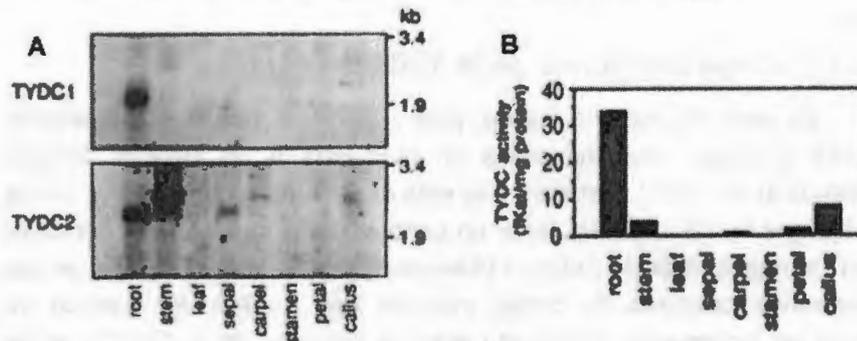


Figura 1.9. Expresión tejido específica de los genes de TyDC1 y TyDC2 en *P. somniferum*. A) Northern blot a partir de ARN fue aislado de raíz, tallo, hojas, sépalos, carpelos, estambres, pétalos y callos. B) Actividad enzimática de TyDC en extractos de los mismos tejidos del panel A (Tomado de Facchini & De Luca, 1994).

Los representantes de las familias TyDC1 y TyDC2 poseen una Mr de 57 y 59.3 kDa respectivamente y en ambos casos muestran una mayor preferencia por DOPA como sustrato sobre la tirosina. La velocidad de descarboxilación de tirosina con respecto a DOPA fue 90% y 65% para TyDC-1 y TyDC-2, respectivamente. Sin embargo, los parámetros cinéticos para las enzimas recombinantes mostraron el mismo valor de Km aparente,

1 mM, tanto para tirosina como para DOPA, a pH 7.2 (Facchini & De Luca, 1995a). Asimismo, los valores de V_{\max} aparente para la TyDC-1 para la descarboxilación de tirosina y DOPA son virtualmente idénticos ($0.59 \text{ fkat mg}^{-1}$). Sin embargo, el valor de V_{\max} para la conversión de DOPA en dopamina por la TyDC-2 fue de $0.21 \text{ fkat mg}^{-1}$, mientras que para la conversión de tirosina a tiramina fue de $0.12 \text{ fkat mg}^{-1}$ (Facchini & De Luca, 1995). Posteriormente, se reportó el aislamiento de la TyDC5 de *P. somniferum*, que contiene un marco de lectura abierto para 523 residuos que resulta en una proteína de 57 kDa, con un pI de 5.96. Esta enzima presentó una actividad específica de $6.5 \pm 0.24 \mu\text{kat/kg}$ de proteína para la tirosina, y de $4.16 \pm 0.51 \mu\text{kat/kg}$ de proteína para la DOPA (Maldonado-Mendoza et al., 1996). Sin embargo, esta secuencia no pudo ser clasificada dentro de los dos grupos mencionados anteriormente, ya que presentó similitudes significativas con ambos grupos (86 y 75 % para TyDC1 y TyDC 2 respectivamente; (Maldonado-Mendoza et al., 1996; Facchini & De Luca, 1995b).

1.1.11.1. Otras funciones de la TyDC en plantas

Se han descubierto genes para TyDC en perejil (*Petroselinum crispum*), y éstos son inducibles en respuesta a un inductor fúngico (Kawalleck et al., 1993). Debido a que esta especie no produce ABI's, se ha sugerido que la TyDC podría tener un papel en la producción de una clase ubicua de metabolitos de defensa (Kawalleck et al. 1993). Además, en las suspensiones celulares de perejil tratadas con un inductor fúngico se presentó un incremento coordinado entre la actividad de la TyDC y la de PAL (Kawalleck et al. 1993). En hojas de tabaco, la actividad de TyDC se incrementa marcadamente en paralelo con la actividad de la ornitina descarboxilasa, durante la reacción hipersensitiva al virus del mosaico del tabaco (Negrel et al., 1984). Lo anterior, sugiere que la TyDC podría ser un punto de regulación para la biosíntesis diversos metabolitos secundarios, actuando en combinación con enzimas de diferentes rutas metabólicas que se inducen por el mismo estímulo.

Por otra parte, los productos de la reacción que catalizan las TyDC's, además de servir como intermediarios en la ruta de biosíntesis de los ABI's en plantas que los producen, pueden también ser sustrato de otras enzimas relacionadas con respuestas de defensa. Por ejemplo, en tabaco la

tiramina puede generar compuestos tóxicos como respuesta a heridas, en combinación con la actividad de las polifenol oxidasas (PPO's; Negrel et al., 1993).

1.1.12. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LAS TIROSINASAS O POLIFENOLOXIDASAS (PPO's)

A las enzimas responsables del oscurecimiento en frutos se les conoce como polifenoloxidasas, fenolasas o tirosinasas (PPO's; EC 1.14.18.1). Este último nombre se da cuando la tirosina es el principal sustrato. Sin embargo, estas enzimas pueden utilizar otros sustratos como los intermediarios tempranos de la síntesis de los ABI's (tiramina, DOPA y dopamina) así como, p-cresol, ácido cafeico y otros fenoles. Las PPO's tienen dos actividades, una es la hidroxilación de monofenoles ("cresolasa") y la otra es la oxidación de difenoles a quinonas ("catecolasa"). Dependiendo de la fuente, la actividad "cresolasa" es mayor o menor, incluso inexistente en algunos casos. En cambio, todas las enzimas tienen actividad "catecolasa" (Vaughn et al., 1988). Estas enzimas catalizan dos reacciones porque en su estado nativo se encuentran en dos formas distintas; la llamada met-tirosinasa, que es activa solamente sobre monofenoles, y la oxi-tirosinasa. Estas formas se interconvierten entre sí de manera acoplada al desarrollo de las reacciones que catalizan. Su característica estructural más importante es la presencia en su centro activo con dos átomos de cobre, unidos cada uno de ellos a tres residuos de histidina. Dicho dominio parece ser el único conservado, entre diferentes organismos (Fig. 1.10) y en su entorno se sitúan una serie de aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos, que también son importantes para su actividad, interviniendo en la unión de los sustratos (Hunt et al., 1993; Newman et al., 1993; van Gelder et al., 1997).

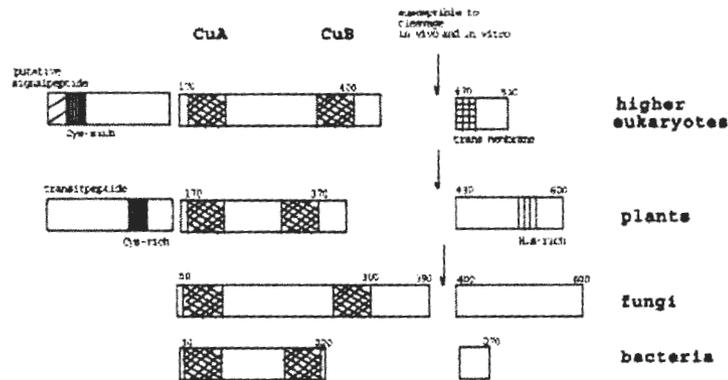


Figura 1.10. Dominios conservados entre las tirosinasas de diferentes grupos. Los sitios de unión a cobre conservados (CuA y CuB) están representados por las áreas marcadas con líneas cruzadas, las flechas indican un sitio susceptible al corte de la enzima (Tomado de Seo et al. 2003).

Estas enzimas son codificadas por genes nucleares (Lax et al., 1984), que ya han sido clonados y secuenciados en muchas plantas, incluyendo papa (Thyngesen et al. 1995), trigo (Demeke & Morris, 2002), plátano (Gooding et al. 2001), albaricoco (Chevalier et al., 1999) y caña de azúcar (Bucheli et al, 1996), entre otros. Los genes de las PPO's de plantas codifican un péptido de aproximadamente 67 kDa, pero la eliminación del péptido de tránsito, localizado en el extremo N Terminal y que es responsable de dirigir a la proteína a su destino final en los cloroplastos, libera una proteína madura de 60 kDa aproximadamente (Cary et al., 1992; Robinson & Dry, 1992; Hunt et al., 1993, Newman et al., 1993). La mayoría de los genes que codifican para PPO's no contienen intrones (Dry & Robinson, 1994; Thyngesen et al. 1995) y en la mayoría de plantas esta enzima es codificada por una familia génica con expresión temporal y tejido específicos (Thyngesen et al., 1995).

1.1.13. EFECTOS DE LA INDUCCIÓN DE LA TyDC Y DE LA PPO EN DIFERENTES ESPECIES

La cinética de la inducción de los genes de la TyDC en cultivos de *P. somniferum* en respuesta al jasmonato de metilo (MeJa) es similar a la observada en los cultivos tratados con homogenados fúngicos. Sin embargo, a diferencia de éstos, la exposición a MeJa no produce un

incremento en la producción de sanguinarina (Facchini et al., 1996a). Por otra parte, este alcaloide sí se acumula en cultivos de *E. californica* en presencia del mismo inductor (Ditrich & Kutchan, 1991) y esta inducción se asociada con un incremento en la expresión de la BBE, pero no se evaluó su efecto sobre los genes de la TyDC. Los jasmonatos también son capaces de inducir a las PPO's. Por ejemplo, en plantas de tomate, la aplicación de MeJa resulta en una inducción de 2.2 veces de una de las PPO (Thipyapong & Steffens, 1997). Frecuentemente, se ha sugerido que las PPO's juegan un papel importante en las interacciones planta-patógeno y que, como genes de defensa, poseen modos de expresión constitutivos e inducibles (Mayer & Harel, 1979; Yu et al., 1992). La inducción sistémica de la PPO podría actuar como una línea de defensa adicional para proteger las partes crecientes de la planta contra futuros ataques de patógeno e insectos. La PPO también ha sido involucrada en la resistencia a enfermedades, debido al efecto bacteriostático de las o-quinonas que producen (Mayer & Harel, 1979). Sin embargo, la función fisiológica de estas enzimas aún permanece sin definir completamente.

La sanguinarina es considerada el compuesto más citotóxico entre las benzofenantridinas (Weiss et al. 2006). Este alcaloide tiene un efecto inhibitorio sobre la infección de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* y su síntesis se correlaciona con la acumulación de los mensajeros de la TyDC en respuesta a inductores fúngicos (Facchini et al., 1996a). Más aún, en suspensiones celulares de *P. somniferum* retadas con un inductor fúngico el incremento en el contenido de sanguinarina está acompañado de un incremento en la actividad de las PPO. De este modo, tanto la TyDC como la PPO, parecen estar relacionadas con los mecanismos de defensa de la planta.

En breve, se ha reportado que ambas enzimas son inducidas por heridas (Constabel et al., 2000, Fig. 1.11A; Park et al., 1999, Fig. 1.11B), además de por inductores fúngicos y químicos como el MeJa (Constabel et al., 1995; Sang-Un et al., 1999). Sin embargo, estos reportes se han hecho en diferentes especies, y no se han analizado en un mismo modelo la respuesta de la TyDC y de la PPO a un inductor determinado. Debido a que tanto la TyDC como la PPO, también están involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios, diferentes a los ABI's (Kawalleck et al. 1993;

Mayer & Harel, 1979), consideramos importante realizar un estudio profundo de su regulación.

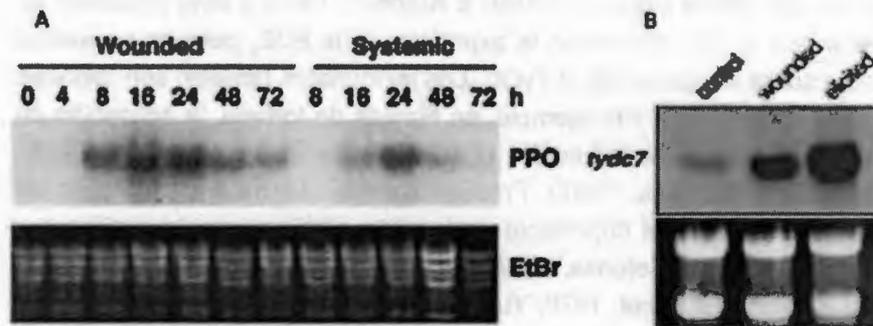


Figura 1.11. Inducción de la expresión de la TyDC y la PPO/tirosinasa. (A) Análisis northern blot de la acumulación del ARNm de PPO en hojas heridas y no heridas (sistémicas) de un híbrido de *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*, a diferentes tiempos después de haber sido sometidas al estrés (Tomada de Constabell et al. 2000). (B) Análisis northern blot de la acumulación del ARNm en suspensiones celulares de *Papaver somniferum* después de haber sido heridas o tratadas con un inductor (Tomada de Park et al, 1999).

1.1.14. RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES

De la revisión anterior se puede destacar que *A. mexicana* es una planta medicinal muy utilizada en nuestro país, que pertenece a la familia de las papaveraceas y que produce alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's). Estos alcaloides son un grupo particular de metabolitos secundarios, en el cual existe un interés creciente, debido a sus posibles aplicaciones en el tratamiento de diversas afecciones. La ruta de biosíntesis de estos alcaloides se ha estudiado en un grupo reducido de especies y aún se conoce poco acerca de su regulación. Sin embargo, se ha observado que hay ciertas diferencias en la expresión tejido específico, y la inducción transcripcional de los genes de esta ruta, entre las diferentes especies (Facchini & Park, 2003; Samanani et al., 2005; Figura 1.8.). Esto indica que los mecanismos de regulación entre especies pueden no ser los mismos.

La biosíntesis de los ABI's se realiza a partir de dos moléculas de tirosina, las cuales se transforman en dopamina y 4-hidroxifenilacetaldehído

mediante una serie de reacciones en las que participa una TyDC y posiblemente una tirosinasa o PPO. Estas moléculas se condensan para formar la norcoclaurina, el primer precursor común de la ruta (Fig. 1.4). Después de una serie de reacciones, esta ruta se divide en tres grupos: los alcaloides tipo benzofenantridina, los tipo protoberberina y los tipo morfinaños (Fig. 1.6 y Fig. 1.7). Cabe mencionar que este último grupo es producido exclusivamente en *P. somniferum*. Por su parte, *A. mexicana* es capaz de producir sanguinarina, un alcaloide tipo benzofenantridina que podría ser utilizado para tratar la leucemia. También produce berberina, un alcaloide tipo protoberberina que se usa en el tratamiento de las cataratas y otras afecciones oculares. La amplia distribución de *Argemone* en nuestro país, hace de esta especie, un buen modelo para el estudio de esta ruta. El análisis a nivel molecular de las primeras enzimas que participan en la ruta representa un inicio. Recientemente se aislaron los genes de la NCS y la BBE de esta especie (Rublo-Piña, 2009), reportándose dos copias de cada gen.

En este trabajo se llevó a cabo la caracterización molecular de la TyDC y la PPO de *A. mexicana*, así como el análisis de su expresión en cultivos celulares en respuesta a diferentes inductores. En paralelo, se analizó la expresión de la NCS y la BBE con fin de determinar si existe una relación entre la acumulación de alcaloides y la inducción de estos genes.

...

...

1.2. JUSTIFICACIÓN

Argemone mexicana es una especie con un buen potencial para la obtención de metabolitos bioactivos. Sin embargo, se dispone de información escasa acerca de los genes involucrados en la síntesis de los alcaloides que produce. Estos alcaloides se sintetizan a partir de la tirosina y por ello, el estudio a nivel molecular de la tirosina descarboxilasa (TyDC) y la tirosinasa/polifenol oxidasa (PPO), representa un primer paso en esa dirección. De igual forma, el análisis de la expresión de estos genes, en paralelo con los correspondientes a NCS y BBE, que están involucradas en reacciones posteriores y representan puntos regulatorios, permitirá un análisis más detallado del proceso regulatorio que controla la acumulación de alcaloides.

1.3. HIPOTESIS

La transformación de dos moléculas de tirosina en intermediarios biosintéticos de los alcaloides bencilisoquinolínicos puede ser un punto importante en la regulación de esta ruta. Estas reacciones son catalizadas por la TyDC y por la PPO/tirosinasa, ambas utilizan tirosina como sustrato y sus productos pueden dirigirse a la síntesis de diferentes compuestos. Por lo tanto, es probable que exista una correlación entre la inducción de los genes correspondientes a estas enzimas y la producción de alcaloides de *A. mexicana*.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

- Caracterizar molecularmente a la tirosina descarboxilasa (TyDC) y a la tirosinasa o polifenoloxidasa (PPO) en plantas de *Argemone mexicana* L, y analizar su expresión en paralelo con la de otros genes involucrados en la síntesis de ABI's, como la norcoclaurina sintasa (NCS) y la enzima del puente de berberina (BBE), en suspensiones celulares expuestas a condiciones de inducción del metabolismo secundario.

1.4.2. Objetivos específicos

- Aislar y secuenciar los ADNc correspondientes a la TyDC y a la PPO de *A. mexicana*.
- Determinar la redundancia génica de la TyDC y la PPO de *A. mexicana*.
- Analizar el patrón de expresión de la TyDC y de las PPO en los diferentes tejidos de la planta.
- Establecer un modelo de inducción de alcaloides bencilisoquinolínicos en suspensiones celulares de *A. mexicana*.
- Analizar la acumulación de los transcritos de la TyDC y la PPO, en paralelo con los de la NCS y la BBE, en las suspensiones celulares de *A. mexicana*, sometidas a diferentes inductores del metabolismo secundario.

1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se esquematiza en la Figura 1.12 y consiste en lo siguiente:

- Obtención de los ADNc correspondientes a TyDC y PPO de *A. mexicana* y su secuenciación completa.
- Caracterización molecular de la TyDC y PPO de *A. mexicana*. En esto se incluye el análisis de las secuencias, la determinación del número de copias mediante Southern blots, así como el patrón de expresión tisular.
- Establecimiento de un modelo de inducción del metabolismo secundario. Se evaluará el efecto de la aplicación independiente de MeJa, AS y extracto de levadura (SIGMA) a cultivos celulares de *A. mexicana*, así como del efecto de combinar los tres inductores mediante dos estrategias, la aplicación simultánea y la aplicación secuencial.
- Evaluación de la expresión de los transcritos de la TyDC, la PPO, la NCS y la BBE para analizar la posible correlación entre el aumento de sanguinarina y la inducción de estos genes en los cultivos celulares de *A. mexicana*.

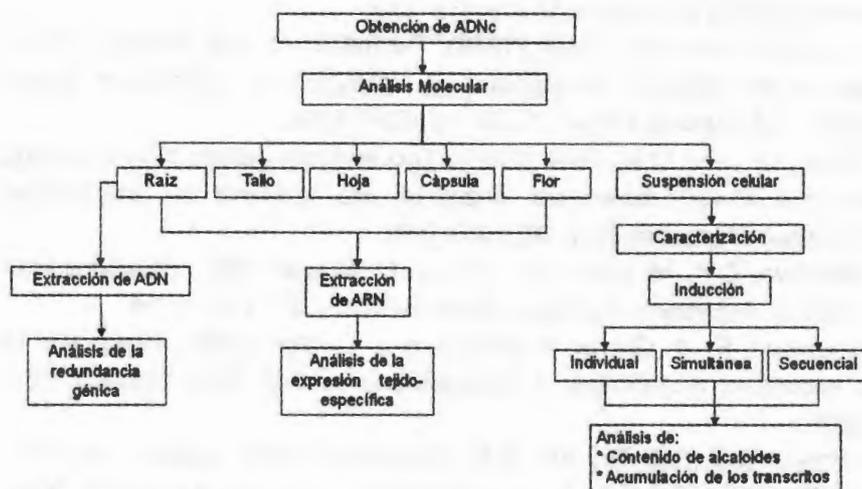


Figura 1.12. Esquema de la estrategia experimental utilizada.

1.6. REFERENCIAS

Ahmad, N., S. Gupta, M.M. Husain, K.M. Heiskanen and H. Mukhtar (2000). Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research*, 6, 1524–1528.

Amman, M., G. Wanner and M.H. Zenk (1986). Intracellular compartmentation of two enzymes of berberine biosynthesis in plant cell cultures. *Planta*, 167, 310-320.

Argueta, A., L. Cano and M.E. Rodarte (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Primera edición. México D.F. pp. 399–401.

Balažová, A., F. Bilka, V. Blanárikova and M. Psenák (2002). Effect of a fungal elicitor on levels of sanguinarine and polyphenoloxidase activity in a suspension culture of *Papaver somniferum* L. *Ceska Slov Farm.* 51(4), 182-185.

Bashmakova, N., S. Kutovyy, V Yashchuk, D. Hovorun, M Losytsky and L. Zaika (2009) Optical spectroscopy studies of the interaction between a

number of plant alkaloids and the DNA double helix in an aqueous solution. Ukrainian Journal of Physics. 54 (5), 471- 470.

Bauer, W. and M.H. Zenk (1989). Formation of both methylenedioxy groups in the alkaloid (S)-stylophine is catalyzed by cytochrome P-450 enzymes. Tetrahedron Letters Vol.30, pp. 5257-5260.

Bauer, W. and M.H. Zenk (1991). Two methylenedioxy bridge forming cytochrome P-450 dependent enzymes are involved in (s)-stylophine biosynthesis. Phytochemistry. 30, 2953-2961.

Bhardwaj, D.K., M. Bisht, J.K. Jain and M. Munjal (1982). Phenolics from the seeds of *Argemone mexicana*. Phytochemistry, 21, 2154-2156.

Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi and E. Gontier (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161, 839–851.

Bucheli, C.S., I.B. Dry and S.M. Robinson (1996). Isolation of a full-length cDNA encoding polyphenol oxidase from sugarcane a C4 grass. Plant Molecular Biology, 31, 1233-1238.

Capasso, A., R. Aquino, N. De Tomáis, S. Piacente, L. Rastrelli, and C. Pizza. (2002). Neuropharmacology activity of alkaloids from South American Medicinal Plants. Curr. Med. Chem.- Central Nervous Systems Agents, 2, 1-15,

Constabel, C.P., D.R. Bergey and C.A. Ryan (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. Proceedings of the National Academic of Science, 92, 407-411.

Constabel, C.P., L. Yip, J.J. Patton and M.E. Christopher (2000). Polyphenol oxidase from hybrid poplar, cloning and expression in response to wounding and herbivory. Plant Physiology, 124, 285-295.

Cary, J.W., A.R. Lax and W.H. Flurey (1992) Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. Plant Molecular Biology, 20, 245-253

Chevalier, T., D. De Rigal, D. Mbéguié-A-Mbéguié, F. Gaillard, F. Richard-Forget and B.R. Fils-Lycaon (1999). Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. Plant Physiology, 119, 1261-1269.

Chou, W.M. and T.M. Kutchan (1998). Enzymatic oxidation in the biosynthesis of complex alkaloids. Plant Journal, 15, 289-300

De-Eknamkul, W. and M.H. Zenk (1992). Purification and properties of 1,2-dehydroreticuline reductases from *Papaver somniferum* seedling. *Phytochemistry*, 31, 813-821.

De Luca, V., C. Marineau and N. Brisson (1989) Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase. Comparison with animal dopa decarboxylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86, 2582-2586.

Demeke, T. and C.F. Morris (2002). Molecular characterization of wheat polyphenol oxidase (PPO). *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 813-818.

Dittrich, H. and T.M. Kutchan (1991). Molecular cloning, expression and induction of berberine bridge enzyme, and enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogen attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88, 9969-9973.

Dixon, R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843-847.

Dry, J.B. and S.P. Robinson (1994). Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology*, 26, 495-502.

Facchini, P.J. and D.A. Bird (1998) Developmental regulation of bezylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plants and tissue cultures. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 34, 69-79.

Facchini, P.J. and V. De Luca (1994). Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 26684-26690.

Facchini, P.J. and V. De Luca (1995a). Expression in *Escherichia coli* and partial characterization of two tyrosine/DOPA decarboxylases from opium poppy. *Phytochemistry*, 38 (5), 1119-1126.

Facchini, P.J. and V. De Luca (1995b). Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell*, 7, 1811-1821.

Facchini, P.J., A.G. Johnson, J. Poupart and V. De Luca (1996a). Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiology*, 111, 687-697.

Facchini, P.J., C. Penzes, A.G. Jonson and D. Bull (1996b). Molecular characterization of berberine bridge enzymes genes from opium poppy. *Plant Physiology*, 112, 1669-1677.

Facchini, P.J., C. Penzes-Yost, N. Samanani and B. Kowalchuk (1998). Expression patterns conferred by tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase promoters from opium poppy are conserved in transgenic tobacco. *Plant Physiology*, 118, 69-81.

Facchini, P.J. (1998). Temporal correlation of tyramine metabolism with alkaloid and amide biosynthesis in elicited opium poppy cell cultures. *Phytochemistry*, 49 (2), 481-490,

Facchini, P.J. (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52, 29-66.

Facchini, P.J., S.U. Park, D.A. Bird and N. Samanani (2000). Toward the metabolic engineering of benylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy and related species. *Recent research developments in phytochemistry* , 4, 31-47.

Facchini, P.J. and S-U. Park (2003). Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 64, 177-186.

Fernandez, J.A. and V. De Luca (1994) Ubiquitin-mediated degradation of tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 36, 1123-1128.

Fiehn, O. and W. Weckwerth (2003) Deciphering metabolic networks. *European Journal of Biochemistry*, 270, 579-588

Gandía-Herrero, F., J. Escribano and F. García-Carmona (2005). Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiology Preview*, 138 (1), 1-12.

Gerardy, R. and M.H. Zenk (1993). Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 32, 79-86.

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

Gooding, P.S., C. Bird and S.P. Robinson (2001). Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, 213, 748-757.

Guillet, G., J. Poupart, J. Basurco and V. De Luca (2000). Expression of tryptophan decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. *Plant Physiology*, 122, 933–943.

Guillet, G. and V. De Luca (2005). Wound-inducible biosynthesis of phytoalexin hydroxycinnamic acid amides of tyramine in tryptophan and tyrosine decarboxylase transgenic tobacco lines. *Plant Physiology*, 137, 692-699.

Hahlbrock, K. and D. Scheel (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 347-369.

Harborne, J.B. (1999). Classes and functions of secondary products, in: N.J. Walton, D.E. Brown (Eds.), *Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products*, Imperial College Press, pp. 1–25.

Harbone, J.B. and C.A. Williams (1983). Flavonoids in the seeds of *Argemone mexicana*: a reappraisal. *Phytochemistry*, 22, 1520-1983.

Hashimoto, T. and Y. Yamada (1994). Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 527-585.

Herrmann, K.M. and L.M. Weaver (1999) The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 473-503.

Hunt, M.D., N.T. Eanneta, H. Yu, S.M. Newmann and J.C. Steffens (1993). cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology*, 21, 59-68.

Hussain, S.F., S. Nakkady, L. Khan and M. Shamma (1983). Oxihydrastinine, an isoquinoline alkaloid from the Papaveraceae. *Phytochemistry*, 22, 319.

Kawalleck, P., H. Keller, K. Hahlbrock, D. Scheel and I.E.J. Somssich (1993). A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 2189-2194.

Kutchan, T.M. and M.H. Zenk (1993). Enzymology and molecular biology of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Journal of Plant Research*, 3, 165-173.

Kutchan, T.M. (1995). Alkaloid Biosynthesis -The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell*, 7, 1059-1070.

- Kutchan, T.M. (2001). Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*, 155, 58-60.
- Lavania, M., P.S. Chauhan, S.V.S. Chauhan, H.B. Singh and C.S. Nautiya (2006). Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Current Microbiology*, 52 (5), 363-368
- Lax, A.R., K.C. Vaughn and G.E. Templeton (1984). Nuclear inheritance of polyphenol oxidase in *Nicotiana*. *Journal of Heredity*, 75, 285-287.
- Lenz, R. and M.H. Zenk (1995). Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from *Papaver somniferum* cell cultures and differentiated plants. *European Journal of Biochemistry*, 233, 132-139.
- Liscombe, D.K. and P.J. Facchini (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 173.
- Lovkova, M.Y., G.N. Buzuk, S.M. Sokolova and N.I. Kliment'eva (2001). Chemical features of medicinal plants (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37 (3) 229-237.
- Lozoya, X. and M. Lozoya (1982). Flora medicinal de México. Plantas indígenas. Primera parte. Instituto mexicano del Seguro Social. pp. 148-173.
- Maldonado-Mendoza, I.E., M. López-Meyer, J.R. Gales, R.J. Burnett and C.L. Nessler (1996). Molecular analysis of a new member of the opium poppy tyrosine/3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase gene family. *Plant Physiology*, 110, 43-49.
- Marques, I.A. and P.E. Brodelius (1988a). Elicitor-induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. I. Induction and purification. *Plant Physiology*, 88, 46-51.
- Marques, I.A. and P.E. Brodelius (1988b), Elicitor-induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. II. Partial characterization. *Plant Physiology*, 88, 52-55.
- Mason, H.S. (1948), The chemistry of melanin, III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 173, 83-99.
- Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plant and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67, 2318-2331.
- Mayer, A.M. and E. Harel (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*. 18, 193-215.

Méndez, M. and R. Durán (2009). Plantas medicinales yucatecas, un saber subvalorado. *Ciencia Conocimiento Tecnología*, 89, 73-75.

Nakazawa, A., M. Nozue, H. Yasuda, G. Takeba and H. Kubo (2001). Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Research*, 114, 323-328.

Negrel, J., F. Javelle and M. Paynot (1993). Biochemical basis of resistance of tobacco callus tissue cultures to hydroxyphenylethylamines. *Plant Physiology*, 103, 329-334.

Negrel, J., J.C. Vallee and C. Martín (1984). Ornithine decarboxylase activity and the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 23, 2747-2752.

Newmann, S.M., N.T. Ennetta, H. Yu, J.P. Prince, C.M. De Vicente, S.D. Tanksley and J.C. Steffens (1993). Organization of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Molecular Biology*, 21, 1035-1051.

Noe, W., C. Mollenschott and J. Berlin (1984). Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein. *Journal of Plant Molecular Biology*, 3, 281-288.

Park, S.U., A.G. Johnson, C. Penzes-Yost and P.J. Facchini (1999). Analysis of promoters from tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberine bridge enzyme genes involved in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Molecular Biology*, 40, 121-131.

Pasquali, G., O.J.M. Goddijn, A. De Waal, R. Verpoorte, R.A. Schilperoort, J.H.C. Hoge and J. Memelink (1992). Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Molecular Biology*, 18, 1121-1131.

Pauli, H.H. and T.M. Kutchan (1998). Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant Journal*, 13, 793-801.

Roberts, M.F. (1971). Polyphenolases in the 1000g fraction of *Papaver somniferum* latex. *Phytochemistry*, 10 (12), 3021-3027.

Roberts, M.F. and M. Wink (1988). *Alkaloids biochemistry, ecology and medicinal applications*, Plenum Press, New York. pp. 1-3, 452-456.

Roberts, M.F., D. McCarthy, T.M. Kutchan and C.J. Coscia (1983). Localization of enzymes and alkaloidal metabolites in *Papaver* latex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 15 (222), 599-609.

Robinson, S.P. and I.B. Dry (1992). Broad Bean leaf polyphenol oxidase is a 60 kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiology*, 99, 317-323.

Rubio-Piña, J.A. (2009). Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

Rueffer, M., M. Amman and M.H. Zenk (1981). (S)-Norlaudanosoline synthase: the first enzyme in the benzyloisoquinoline biosynthetic pathway. *FEBS. Letters*. 129 (1), 5-9.

Rueffer, M., and M.H. Zenk (1987). Distant precursors of benzyloisoquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Zeitschrift für Naturforschung*. 42c, 319-332.

Rueffer, M, G. Zumstein and M.H. Zenk. (1990) Partial purification and properties of S-adenosyl-L-methionine: (S)-tetrahydropotoberberine-cis-N-methyltransferase from suspension cultures of *Eschscholzia* and *Corydalis*. *Phytochemistry*, 29, 3727- 3733.

Samanani, N. and P.J. Facchini (2001). Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy. *Planta*, 213, 898-906.

Samanani N, S-U. Park and P.J. Facchini (2005). Cell type-specific localization of transcripts encoding enzymes catalyzing nine consecutive steps in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell*, 17, 915-926.

Sato, F., N. Takeshita, J.H. Fitch, H. Fujiwara and Y. Yamada (1993). S-adenosyl-L-methionine: scoulerine-9-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, 32, 659-664.

Sato, F., T. Tsujita, Y. Katagiri, S. Yoshida and Y. Yamada (1994). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: nonclaurine 6-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *European Journal of Biochemistry*. 225, 125-131.

Schmeller, T., B. Latz-Brüning and M. Wink (1997). Biochemical activities of berberine, palmitine and sanguinarine mediating chemical

defense against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*, 44, 257-266.

Schumacher, H.M. and M.H. Zenk (1988). Partial purification and characterization of dihydrobenzophenanthridine oxidase from *Eschscholzia californica* cell suspension cultures. *Plant Cell*, 6, 410-413.

Selinheimo, E., D. NiEidhin, C. Steffensen, J. Nielsen, A. Lomascolo, S. Halaoui, E. Record, D. O'Beirne, J. Buchert and K. Kruus (2007). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *Journal of Biotechnology*, 130, 471-480.

Seo, S.Y., V.K. Sharma and N. Sharma (2003). Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2837-2853.

Siddiqui, A., I. Sayeed, K.S. Zafar and F. Islam. (2002) *Argemone* oil augmented oxidative stress in discrete areas of rat brain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 69, 734-740.

Solomon, E.I., U.M. Sundaram and T.E. Machonkin (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, 2563-2605.

Stadler, R., T.M. Kutchan and M.H. Zenk (1989). Norcoclaurine synthase is the central intermediate in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 28, 1083-1086.

Stadler, R. and M.H.A. Zenk (1990). Revision of the generally accepted pathway for the biosynthesis of the benzyltetrahydroisoquinoline alkaloid reticuline. *Liebigs Annalen der Chemie*, 6, 555-562.

Steffens, P., N. Nagakura, M.H. Zenk (1985) Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures. *Phytochemistry*, 24, 2577-2583.

Steiner, U., W. Schliemann, H. Böhm and D. Strack (1999). Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, 208, 114-124.

Takeshita, N., H. Fujiwara, H. Mimura, J.H. Fitch, Y. Yamada and F. Sato (1995). Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-L-methionine: scoulerine-9-O-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiology*, 36, 29-39.

Tanahashi, T. and M.H. Zenk (1990). Elicitor induction and characterization of microsomal protopine-6-hydroxylase, the central enzyme in benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 29, 1113-1122.

Thyngensen, P.W., I.B. Dry and S.P. Robinson (1995). Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiology*, 109, 525-531.

Thpiyapong, P. and J.C. Steffens (1997). Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology*, 115, 409-418.

Tocher, R.D. and C.E. Tocher (1972). DOPA decarboxylase in *Cytisus scoparius*. *Phytochemistry*, 11, 1661-1667.

Trezzini, G.F., A. Horrichs and I.E. Sommsich (1993). Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Molecular Biology*, 21, 385-389.

Unterlinner, B., R. Lenz and T.M. Kutchan (1999). Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *Plant Journal*, 18, 465-475.

van der Fits, L and J. Memelink (2000). ORCA 3 a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 289, 295-297.

van Gelder, C.W.G., W.H. Flurkey and H.J. Wichers (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45 1309-1323.

Vaughn, K.C. and S.O. Duke (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 60, 106-112.

Vaughn, K.C., A.R. Lax and S.O. Duke (1988). Polyphenol oxidase: the chloroplast enzyme with no established function. *Physiologia Plantarum*, 72, 659-665.

Verpoorte, R., R. Van der Heijden, H.J.G. TenHoopen and J. Memelink (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21, 467-479.

Verpoorte, R., R. Van der Heijden, J.H.C Hoge and H.J.G. TenHoopen (1994). Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 2307-2310.

Waller, G.R. and O.C. Dermer (1981). Secondary plant products In: Conn, E. E., (ed) *The biochemistry of plants*. Vol. 7. pp. 317-373. Academic Press New York.

Weiss, D., A. Baumert, M. Vogel and W. Roos (2006). Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant Cell and Environment*, 29, 291-302.

Wink, M. (1998) A short history of alkaloids. In: *Alkaloid. Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*, M.F. Roberts and M. Wink (ed). Plenum Press, New York. pp. 11-44.

Wink, M. (1999). Plant secondary metabolites from hinger plants: in *Biochemistry of plant secondary metabolism, Annual Plant Reviews*, ed M. Wink, 2: 1-16. Sheffield: Sheffield Academic.

Yoruk, R. and M.R. Marshall, (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27. 361-422.

Yu, M. and P.J. Facchini (1999). Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA. tyramine N-(hydroxycinnamoyl) transferase from opium poppy. *Planta*, 209, 33-44.

Yu, H, S.P. Kowalki and J.C. Steffens (1992). Comparison of polyphenoloxidase expression in glandular trichomes of *Solanum* and *Lycopersicon* species. *Plant Physiology*, 100, 1885-1890.

Capítulo 2

Caracterización molecular de la tirosina descarboxilasa (TyDC) y de la tirosinasa/polifenoloxidasas (PPO) de *Argemone mexicana*

2.1. INTRODUCCIÓN

La tirosina descarboxilasa (TyDC) es una enzima codificada por una familia multigénica. Actúa en la interfase entre el metabolismo primario y secundario debido a que cataliza la descarboxilación de la tirosina y su producto es precursor de una clase ubicua de metabolitos secundarios (Guillet et al., 2000). En varias especies, esta enzima tiene actividad tanto sobre la tirosina como sobre su derivado hidroxilado, la dihidroxifenilalanina (DOPA) (Marques & Brodelius, 1988b), formando sus correspondientes aminas; tiramina y dopamina que son intermediarios de la ruta de biosíntesis de los ABI's. Sin embargo, los productos de esta enzima también pueden dirigirse a la síntesis de amidas del ácido hidroxicinámico, que se depositan en la pared celular, creando una barrera contra los patógenos. Estas amidas son formadas mediante la transferencia de los ácidos hidroxicinámicos de los ésteres de hidroxicinamóil-CoA (como el coumaróil y feruloil-CoA), a las hidroxifenetilaminas, como la tiramina, producida mediante la descarboxilación de tirosina por acción de la TyDC (Yu & Facchini, 1999; Guillet & De Luca, 2005).

Por su parte, las tirosinasas/polifenoloxidasas (PPO's) son enzimas que también se han relacionado con las respuestas de defensa de las plantas. Éstas utilizan varios sustratos, que incluyen a la tirosina, tiramina, *p*-cresol, ácido cafeico y otros fenoles (Yoruk & Marshall, 2003; Mayer, 2006). De esta manera, al catalizar la hidroxilación de tirosina y tiramina, formando DOPA y dopamina, respectivamente, y siendo estos intermediarios de la ruta de los ABI's, en plantas productoras de estos alcaloides, la PPO pudiera estar involucrada en el aumento de los ABI's relacionado con la respuesta de defensa. No obstante, debe considerarse que por su doble actividad los productos de la hidroxilación pueden ser sustrato de una siguiente oxidación catalizada por la misma enzima, dando lugar a la formación de quinonas (Solomon et al., 1996). Estos compuestos son tóxicos, se acumulan en respuesta a heridas en diferentes tejidos y pueden polimerizarse formando melanina, un compuesto de color oscuro (Yoruk & Marshall, 2003).

Lo anterior sugiere que tanto la TyDC como la PPO tienen múltiples funciones en las respuestas de defensa, incluyendo su posible participación en la síntesis de los ABI's, mediante la formación de la dopamina. Como un primer paso en el estudio de la estructura, regulación y función de estas enzimas, se realizó la caracterización molecular de estos genes, los cuales fueron identificados y aislados de una biblioteca de ADNc, preparada a partir de callos de *A. mexicana* (Carrillo-Pech, 2006). Esta caracterización consistió en la obtención de las secuencias completas y su análisis comparativo con otras secuencias previamente reportadas, la determinación del número de copias en el genoma y la expresión tejido específica.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Plantas completas de *A. mexicana*, con flores y cápsulas fueron colectadas en el mes de abril en poblaciones silvestres localizadas en la periferia de la ciudad de Mérida. Las colectas se realizaron alrededor de las 10:00 hrs y las plantas se transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno, conservadas en hielo. En el laboratorio las plantas se lavaron con agua jabonosa, se enjuagaron, primero con agua corriente y después con agua desionizada y después de secarse con toallas de papel absorbente, se separaron los diferentes tejidos (raíz, tallo, hoja, cápsula y flor). Los tejidos aislados fueron pesados y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80° C hasta su uso.

2.2.2. AISLAMIENTO DE LOS ADNc CORRESPONDIENTES A LA TyDC Y LA PPO DE *Argemone mexicana*

En un trabajo previo se obtuvo una biblioteca de ADNc a partir de callos de *Argemone mexicana* de cinco días de edad productores de sanguinarina (Carrillo-Pech, 2006). El escrutinio de una colección de 5000 EST (Expressed Sequence Tags), obtenidos de esta biblioteca (realizado en colaboración con el Dr. Peter Facchini, Universidad de Calgary, Canadá), arrojó una presunta clona de TyDC y otra de PPO. Para confirmar las identidades, los ADNc, ya insertos en el plásmido pBluescript II, fueron secuenciados por ambos extremos utilizando los oligonucleótidos universales T3 y T7, y con oligonucleótidos específicos

(Cuadro 2.1; Figura 2.1) para obtener la secuencia interna hasta completarla en ambos sentidos, para ambas clonas.

Cuadro 2.1. Oligonucleótidos específicos diseñados para la secuenciación de las clonas aisladas. T o P en la tercera posición de la clave indica los oligonucleótidos utilizados para TyDC o PPO, respectivamente. Mientras que F o R en la cuarta posición indica si la secuencia corre en sentido o antisentido, respectivamente. Los numerales señalan la proximidad a los extremos de las secuencias.

Clave	Secuencia (5'→3')	Tm
AmTF1	GTT GAA CCA GGT TAT TTA CG	52° C
AmTF2	GCT GCT ACA GAA CTT GAA AG	53° C
AmTF3	GAG GTT GCG AAA GAA TAC	56° C
AmTF4	CAA TTT GAA GGT TTA ATT ATT GC	53° C
AmTR1	CCA ACC ACG GCA TGA GTC	61° C
AmTR2	CGT ATT CTT TCG CAA CCT C	56° C
AmTR3	TGT AGC AGC AGG TGA AGA C	55° C
AmTR4	AAG ACT ACC CAT GTC TGG	50° C
AmPF1	TTT TTG ATG GAA CAT GGG	55° C
AmPF2	CGT CAA GCT ATT ATG CAC	50° C
AmPF3	GGT TTT GGT TGT TTA TGG	51° C
AmPF4	GTA CCA CCG AAG ATT GCT CG	61° C
AmPR1	CCA TAA ACA ACC AAA ACC	51° C
AmPR2	CCG GAT CTT CGA TTG CTG	60° C
AmPR3	ATG GGT TCT AAT GAT TCA CG	55° C
AmPR4	AAG CAA AAT TCT CAT CAC C	53° C

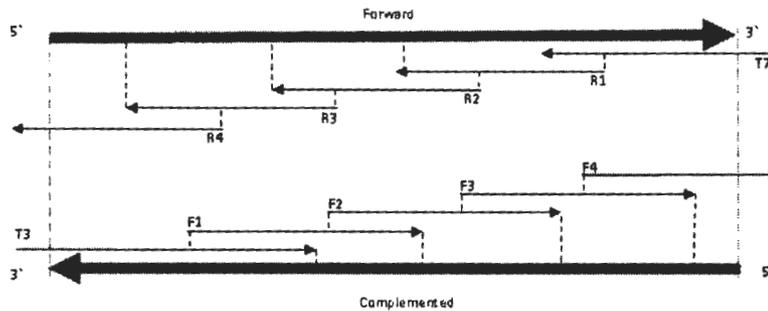


Figura 2.1. Esquema de la secuenciación de las clonas. Para su inicio se emplearon oligos universales (T3 y T7) y posteriormente se diseñaron oligos específicos sobre los fragmentos secuenciados en cada paso (F1-4 y R1-4).

2.2.3. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Las secuencias obtenidas de la TyDC y la PPO de *A. mexicana*, denominadas AmTyDC y AmPPO respectivamente, fueron depositadas en el GenBank con los números de accesoión EU881888 para AmTyDC y EU881892 para AmPPO. Ambas secuencias fueron comparadas con ya las depositadas en GenBank, utilizando el paquete BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Para el análisis de dominios se utilizó el paquete SMART (Simple Modular Architecture Research Tool; <http://smart.embl-heidelberg.de/>), y para la comparación múltiple de las secuencias de ADN se utilizaron los programas Multialin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) y CLC Main Workbench (CLCBio Software). Este último programa también se empleó para el análisis filogenético y la construcción del árbol se realizó utilizando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). La robustez de los árboles construidos se evaluó por bootstrap, utilizando 1000 repeticiones. Las secuencias utilizadas en los alineamientos, comparación y análisis filogenético se encuentran en el Cuadro 2.2.

Cuadro 2.2. Relación de secuencias utilizadas en los análisis de comparación y filogenéticos.

Clave	No. De accesión	Especie
AmTyDC	EU881888	<i>Argemone mexicana</i>
EcTyDC	EU882976.1	<i>Eschscholzia californica</i>
PsTyDC1	U08597.1	<i>Papaver somniferum</i>
PsTyDC2	U08598.1	<i>Papaver somniferum</i>
PsTyDC5	U16804.1	<i>Papaver somniferum</i>
TfTyDC1	AF314150	<i>Thalictrum flavum</i>
PcTyDC2	M96070	<i>Petroselinum crispum</i>
PcTyDC4	M95685	<i>Petroselinum crispum</i>
AtTyDCp	NM_179668	<i>Arabidopsis thaliana</i>
RrTyDCp	DQ431472	<i>Rhodiola rosea</i>
RsTyDC	DQ471943	<i>Rhodiola sachalinensis</i>
AcTyDC	DQ986331	<i>Aristolochia contorta</i>
CrTDC	CTRTPDC	<i>Catharanthus roseus</i>
BnSerDC	AB014076	<i>Brassica napus</i>
MdArgDC	AB181854	<i>Malus x domestica</i>
RhAaaDC	AB305071	<i>Rosa hybrida cv Hoh-Jun</i>
AmPPO	EU881892	<i>Argemone mexicana</i>
PsPPO	EU330225	<i>Papaver somniferum</i>
AcPPO	DQ990911	<i>Annona cherimola</i>
PbPPO	AY665682	<i>Populus balsamifera</i>
TpPPO	EF183483	<i>Trifolium pratense</i>
VfPPO	Z11702	<i>Vicia faba</i>
LePPO	S40548	<i>Lycopersicon esculentum</i>
NtPPO	Y12501.1	<i>Nicotiana tabacum</i>
OsPPO	DQ532396	<i>Oryza sativa</i>
AcoPPO	AF261957	<i>Ananas comosus</i>
ToPPO2	FM178478	<i>Taraxacum officinale</i>
PtPPO5	XM_002331757	<i>Populus trichocarpa</i>
RcPPO	XM_002518970	<i>Ricinus communis</i>
StPPO	U22921	<i>Solanum tuberosum</i>
SmPPO	GQ149349	<i>Solanum melongena</i>
CnPPO	FJ597757	<i>Camellia nitidissima</i>
CsPPO	GQ214317	<i>Camellia sinensis</i>
LtPPO	AY370019	<i>Larrea tridentata</i>

2.2.4. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.2.4.1. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de acuerdo a Lin et al (2001). Se tomaron 100 mg de tejido congelado y se molieron con nitrógeno líquido en presencia de 1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Se adicionaron 600 µl de amortiguador de extracción (100 mM de tris-HCl pH 8, 50 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, 2% de SDS, 2% de β-mercaptoetanol). Después de homogenizar la mezcla, ésta se incubó a 65°C durante 15 minutos, se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al que se adicionaron 2 µl de una solución de RNAsa A (10 mg/ml), incubándose de nuevo a 37° C durante 10 minutos. Se adicionó un volumen igual de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y se mezcló suavemente por inversión. La mezcla se centrifugó a 12,000 g durante 3 minutos y se recuperó la fase superior en un tubo limpio que se extrajo de nuevo de la misma manera. Finalmente el ADN se precipitó adicionando 0.6 volúmenes de isopropanol frío e incubando a -70° C durante una hora. El ADN así precipitado se centrifugó a 12,000 g durante 10 minutos a 4° C, se eliminó el sobrenadante, y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió con 50 µl de agua estéril y se almacenó a -20° C hasta su uso (Lin et al., 2001).

2.2.4.2. Extracción de ARN total

Se realizaron extracciones de los diferentes tejidos de acuerdo a Rubio-Piña y Vázquez-Flota (2008). El tejido congelado (1.0 g) se maceró en presencia de N₂ líquido y 250 mg de PVPP hasta obtener un polvo fino. Se adicionaron 5 ml del amortiguador de extracción (Trizol), y una vez que la mezcla se descongeló, se transfirió a tubos de centrifuga estériles, incubando a temperatura ambiente por 10 min. La mezcla se centrifugó 10 min a 14,000 g a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante que se transfirió a un nuevo tubo al que se le agregó 1 ml de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1). El tubo se agitó vigorosamente durante 15 seg y se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Las fases se separaron centrifugando durante 10 min a 14,000 g a 4° C, y la fase acuosa se transfirió a un tubo estéril, repitiéndose la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico y recuperando de nuevo la fase acuosa que se mezcló con 0.625 volúmenes de LiCl 8 M . Después de incubar durante 3 h a 4° C, la mezcla se centrifugó a 17,000 g

durante 30 min a 4° C, y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante. La pastilla de ARN se lavó, primero con 3 ml de LiCl 3 M y luego con etanol al 70%, centrifugando las muestras a 17,000g durante 10 min a 4° C. El sobrenadante se desechó y la pastilla fue resuspendida en 300 µl de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC).

2.2.5. ANÁLISIS TIPO SOUTHERN

El número de genes que codifican para la TyDC y la PPO en *A. mexicana* se estimó por hibridación tipo Southern utilizando quimioluminiscencia. Para ello, el ADN genómico fue digerido de manera independiente con enzimas de restricción (EcoRI, EcoRV, BamHI, HindIII, KpnI y XhoI). El ADN digerido (10 µg) se fraccionó en un gel de agarosa al 0.8 % en el amortiguador TAE (Tris-acetato 40mM, Na₂EDTA.2H₂O 2mM). Después de la separación, el gel se incubó con HCl 0.2 M, por 20 min, se neutralizó con NaOH 0.4 M por un tiempo igual y se transfirió por capilaridad toda la noche a una membrana de nylon N⁺ (Amersham) utilizando SSC 20 X (SSC 20 X es NaCl 3M, citrato de sodio 0.3M pH 7), como solución de transferencia. El ADN se fijó a la membrana por radiación ultravioleta (120 mJ/cm², SPECTROLINKER, XL-1000 UV CROSSLINKER) (Stratalinker UV Crosslinker 2400). Como sondas se emplearon fragmentos de las clonas AmTyDC y AmPPO (ver Figuras 2.6 y 2.14), marcadas con digoxigenina de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Roche Applied Science). Para ello se utilizaron los iniciadores AmTF1 y AmTR1 para TyDC, y el par AmPF1 y AmPR1 para PPO (ver Figura S1, datos complementarios). Las condiciones de hibridación empleadas fueron de 41° C durante 24 h en una solución Dig easy hyb de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Roche Applied Science). Después de la incubación, la membrana se lavó con soluciones de baja (2X SSC con 0.1 % de SDS, dos veces de a 5 min a temperatura ambiente) y alta (0.5X SSC con 0.1 % de SDS, 2 veces de a 15 min a 60° C) astringencia, y con un amortiguador de lavado (2 min con 0.1 M de ácido maleico, 0.15 M de NaCl pH 7.5 y 0.3% de Tween20). La detección se realizó utilizando Dig luminescent detection kit (Roche Applied Science) según las instrucciones del fabricante.

2.2.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA TyDC Y LA PPO A PARTIR DE RETROTRANSCRITOS (RT-PCR)

Los transcritos correspondientes a la TyDC y la PPO se detectaron por northern reverso. Para ello, se amplificaron los retrotranscritos por PCR (RT-PCR). Para la obtención del ADNc de los diferentes tejidos de *A. mexicana*, en cada caso se preparó una mezcla de reacción que contenía 1 μ L de oligo dT (500 μ g/ml), 1 μ L de dNTP's (10 mM), y 5 μ g de ARN llevando a un volumen de 20 μ L con agua destilada estéril tratada con DEPC. La mezcla se incubó a 65° C durante 5 min y después en hielo por 1 min. Se centrifugó por 5 seg e inmediatamente se adicionaron 4 μ L del First-strand buffer (5X), 2 μ L de DTT 0.1 M y 1 μ L de RNaseOUT (40 unidades/ μ L). Después de agitar gentilmente con la pipeta, la mezcla se preincubó a 37° C por dos minutos, antes de añadir 1 μ L de la transcriptasa reversa M-MLV, e incubar a 25° C durante 10 min y una hora a 37° C. La reacción se detuvo calentando a 70° C durante 15 min. Para verificar la integridad del ADNc se amplificaron fragmentos de un gen constitutivo (actina). Para amplificar los retrotranscritos de interés se utilizaron oligonucleótidos específicos (AmTF1 y AmTR2 para TyDC; AmPF2 y AmPR1 para PPO) La reacción de amplificación para la TyDC consistió en: 30 ciclos de 1 minuto a 94° C para la desnaturalización del ADN; 1 minuto a 53° C para alineación de los oligonucleótidos cebadores; 1 minuto a 72° C para la amplificación, mientras que para la PPO, consistió en 30 ciclos de 1 minuto a 94° C para la desnaturalización del ADN; 1 minuto a 50° C para alineación de los oligonucleótidos cebadores; 1 minuto a 72° C para la amplificación. En ambos casos se incluyó un ciclo inicial de 3 minutos a 94° C y uno final de 10 minutos a 72° C. Los amplicones obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1.0% en TAE (Tris-acetato-EDTA). El ADNc se transfirió del gel a una membrana de nylon (Amersham) por capilaridad utilizando SSC 20X como solución de transferencia. La membrana se fijó como se describió anteriormente y se incubó con 20 ml de amortiguador de hibridación, conteniendo la sonda previamente marcada con digoxigenina (ver figura S2, datos complementarios) durante 24 h. La sonda incluía el fragmento de los nucleótidos 397 al 1,076 del ADNc de la TyDC y del 713 al 1,711 del ADNc de la PPO. Después de la incubación, la membrana se lavó con soluciones de baja (2X SSC con 0.1 % de SDS, 2 veces a temperatura ambiente) y alta

(0.1X SSC con 0.1 % de SDS, 3 veces a 60° C) astringencia, y una vez con un amortiguador (0.1 M de ácido maleico, 0.15 M de NaCl pH 7.5 y 0.3% de Tween20) para eliminar el exceso de sonda. La detección se realizó utilizando Dig luminescent detection kit (Roche Applied Science), según las instrucciones del fabricante.

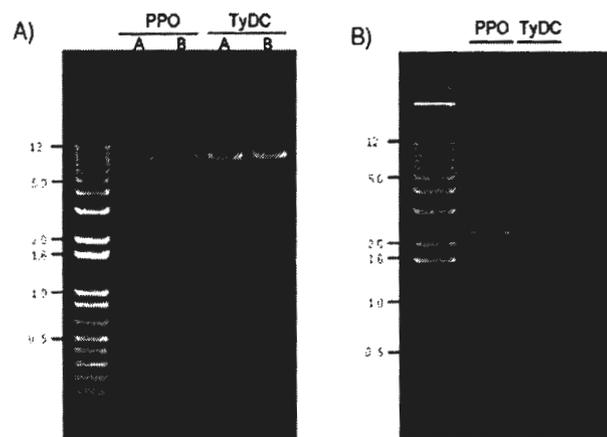
Cuadro 2.3. Cebadores empleados para la amplificación del ADNc parcial de la TyDC y la PPO de tejidos de plantas de *Argemone mexicana*.

Cebador	Secuencias 5'→ 3'	Producto (pb)
AmTyDC	F-GTTGAACCAGGTTATTTACG R- CGTATTCTTTGCAACCTC	679
AmPPO	F-CGTCAAGCTATTATGCAC R- CCATAAACAACCAAAACC	998
ACT	F-CACIACTACTGCTAAACGGGAAA R-ACATCTGCTGGAAGGTGCTG	467

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. OBTENCIÓN DE LAS CLONAS DE TyDC Y PPO DE *Argemone mexicana*

El análisis de 5000 EST, obtenidos de una biblioteca de ADNc preparada a partir de callos productores de sanguinarina, reveló secuencias para presuntas TyDC y PPO. Este análisis se llevó a cabo en la Universidad de Calgary, en colaboración con el Dr. Peter Facchini. La línea celular de *Argemone* se indujo a partir de hojas jóvenes en 1998 (Carrillo Pech, 2006). Puesto que la biblioteca original está construida en un vector bacteriófago (Uni-ZAP XR; ZAP-cDNA Síntesis Kit; Stratagene), los plásmidos (pBluescript), conteniendo los insertos, fueron recuperados por escisión *in vivo*. Los plásmidos se almacenaron en seco en membranas (Whatman clonesaver card) para su transporte, posteriormente fueron eluidos a conveniencia y se utilizaron para transformar a la cepa JM-109 de *E. coli*. Después de multiplicar los plásmidos con las clonas AmTyDC y AmPPO, éstos se extrajeron (Figura 2.2.A) y seguidamente se hizo una PCR con los oligonucleótidos universales (T3 y T7) para confirmar la presencia de los insertos (Figura 2.2.B), ambas clonas tuvieron un tamaño aproximado de 2,100pb, el cual fue precisado mediante su secuenciación completa.



2.3.2.1. ANÁLISIS DE LA CLONA DE TyDC DE *Argemone mexicana*

La secuenciación confirmada por ambas hebras reveló que el ADNc correspondiente a la TyDC de *A. mexicana* (AmTyDC) es de un tamaño de 2,072 nucleótidos, con un marco de lectura abierto de 1,614 nt, flanqueado por secuencias no traducibles de 235 y 223 pb en los extremos 5' y 3', respectivamente. La secuencia de aminoácidos deducida de la AmTyDC es de 538 aminoácidos y en ésta se identificó el dominio de unión al piridoxal, característico de todas las descarboxilasas de aminoácidos (Figura 2.3), y no se observó ningún dominio transmembranal, ni presuntos péptidos señal (ver Figura S3, datos complementarios), lo que sugiere que es una proteína citoplasmática. Estas características concuerdan con los reportes que se tienen hasta el momento. Más aún, su tamaño es similar al de la TyDC2 de *P. somniferum* (1.9 Kb), la cual tiene un marco de lectura de 1,593 pb que codifica para una proteína de 59.3 kDa (Facchini & De Luca, 1994).

236 atggttagcttcttaactctgaagctgtctctgaaataatcacagct
 N G S L N T E D V L E W N T A
 291 cttggagtaacaaatocattgaaccagaagaattcagaaaacaa
 F G V T M P L E P E E F R K Q
 326 ggccatagcataattgatttcttagctgattattatagagatata
 G H M I I D F L A D Y Y R D I
 371 gaaastaccagcttagaagctcaagctgaccaggttatttcgt
 E K Y P V R S Q V E E G Y L S
 416 aaagattaccagaacagcaccatataatcctgaatcaatggaa
 K R L P E T A P Y N P E S M E
 461 tcaattctggaagatgttcaaaatgaaattatcccagggaataaca
 S I L E D V Q N E I Y F G I T
 506 cattggcaaaagccctaattattttgcttattttccatcaagtggt
 H W Q S P N Y F A Y F P S S G
 551 tctattgcagggttttcttggagaatgttaagtagctggttttaast
 S T A G F L G E M L S T G F N
 596 gtttaggggttttaattgagatgtcttcacctgctgctacagaactt
 V V G F N W M S S E A A T E I
 641 gaaagttattggtatggattggcttgtaaaatgcttaaaacttctc
 E S I V M D W L G K M L K L P
 686 aaatcattcttattttctggaatgggtggtggttttacaagga
 K S F L F S G N G G G V L Q G
 731 actactgtgaaagcaattctatgtacattaacagctgcaagagat
 T T C E A T I L C T L T A A R D
 776 agaatgctaaacaaataggtcgtgaaatattggaagattagta
 R N I N K Y G E E N Y G R I V
 821 gtttatggatctgatcaaacccattgtgcatcaaaaagctgct
 V Y G S D O T H C A L O K A A
 866 caaatgctggtattaaccttaaaaattttcgtgctgcttcaaat
 O I A G I N P K N F R A V O T
 911 tttaagctcattcttttgattatcagcagataccttaagaag
 F K A H S E G L S A D T L R K
 956 gtaattaggctctgagctggaagctggtttgatcccacttttktg
 V Y R S D V E A G L I P L F V
 1001 tgtcctactgtcggaaactacttcatcgacagcagtagatccaat
 C P T V G T T S S T A V D P I
 1046 ggaccatttgcgaggttgcgaaagaatcgaatgctgggtacac
 G P I C E V A K E Y E M W V H
 1091 gtagatgctgcttacgcaggaagtgcatgtatttgcacctgaatt
 V D A A Y A G R A C I C P E F
 1136 agacatttcattgagtgagttgagaatgctgattcatttagctt
 R H F I D G V E N A D S F S L
 1181 aatgcacataaatgggtttttcacaacttttagattgttgttctt
 N A H K N F F T T L D C C C L
 1226 tgggttaagatccaagtgccctagttaaagccctatcaacaaat
 W Y R D P S A L V K A L S T N
 1271 cctgaaatatttaagaataaagctactgaaatcaaaacaagttgtt
 P E Y L R N K A T E S K Q V V
 1316 gattataagatggcaaatcgcgttgagtcgacgatttcgatcc
 D Y K D W Q I A L S R R F R S
 1361 atgaaactttggatggttttacgtaattatggtggttgcataatta
 M K L W M V L R N Y G V A N L
 1406 agaastttcttaagaagtcatggttaaaatggctaaagcaattgaa
 R N F L R S H V K M A K Q P E
 1451 ggtttaattgctagtgataantagattgaaatttgttccctagg
 G L I A S D N R F E I C V P R
 1496 acctttgctatggtctggttttgcacttttaccaccaaaatcgaca
 T F A M V C F R L L P P K S T
 1541 cgtgataatcgtgtacgcgaagaagacgggttattcgtttctggg
 R D N R V R E E D G L F V S G
 1631 gttctgcttaataaactcaatcaaatctatttagaggaaggtcaat
 V V A N K L W Q I Y L E K V N
 1676 gcaactggaaagcttttatagactcatgcccgtggttggaggtatt
 A T G S L Y M T H A V V G G I
 1721 tatattgattcggctcgcagctcgggtcaaaagttaaaccgaagaacgt
 Y M I R F A V G S T L T E E R
 1766 cacattactcatgcatggaaggttttgcagaagcagatgctgatacg
 H I T H A W K V L Q S S A D T
 1811 attcctgtagcttcaattttagccgatttttctggttaa 1849
 I L G T F N L A D F S C *

Figura 2.3. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del marco de lectura abierto de AmTyDC de A. mexicana. Los aminoácidos subrayados corresponden al dominio de unión a piridoxal.

El análisis BLAST (Altschul et al., 1997) de la secuencia de AmTyDC reveló que tiene una identidad cercana al 86% con la TyDC de *E. californica* (Ac: EU882976.1). No obstante, esta última presenta un marco de lectura de menor tamaño, en comparación con otras TyDC's. De hecho, la secuencia de aminoácidos deducida de ésta es de 226 residuos, menos de la mitad de la correspondiente al de AmTyDC (Figura 2.4). La identidad también fue alta con TyDC's de *P. somniferum*, principalmente la TyDC2 (Ac: U08598.1) con la que comparte un 82% de identidad. Esto no es de extrañar, pues ambas especies pertenecen a la familia Papaveraceae, y por lo tanto, podrían compartir un ancestro común. AmTyDC también mostró una identidad alta con la TyDC de *T. flavum* (Ac: AF314150.1, del 75%), una especie productora de ABI's de la familia de las Ranunculaceas. No obstante, el análisis también reveló altas identidades con las TyDC de especies no productora de ABI's, como la de *Petroselinum crispum* (Ac: M95685.1, perejil), cercano al 71%.

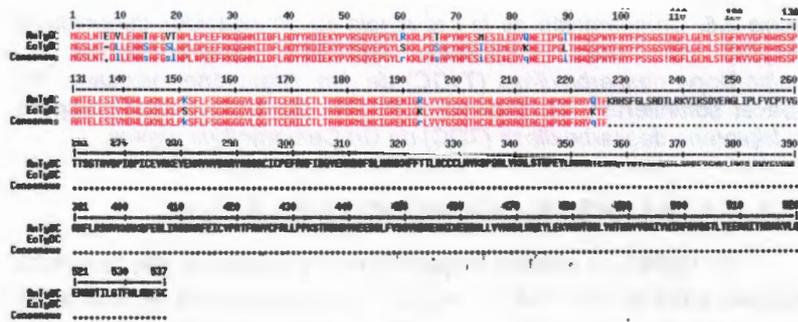


Figura 2.4. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de AmTyDC con una supuesta tirosina/Dopa descarboxilasas (TyDC) reportada para *Escholtzia californica*.

La similitud entre las TyDC se hace más notoria al comparar las secuencias de aminoácidos. En la Figura 2.5 se presenta un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la AmTyDC con las correspondientes a las ya mencionadas anteriormente e incluyendo la triptofano descarboxilasa (TDC) de *Catharanthus roseus*, una enzima que cataliza la misma reacción, pero empleando triptofano como sustrato y que está involucrada en la biosíntesis de otro tipo de

alcaloides (monoterpen-indólicos); pero que, sin embargo, comparte un porcentaje de identidad del 70% con AmTyDC.

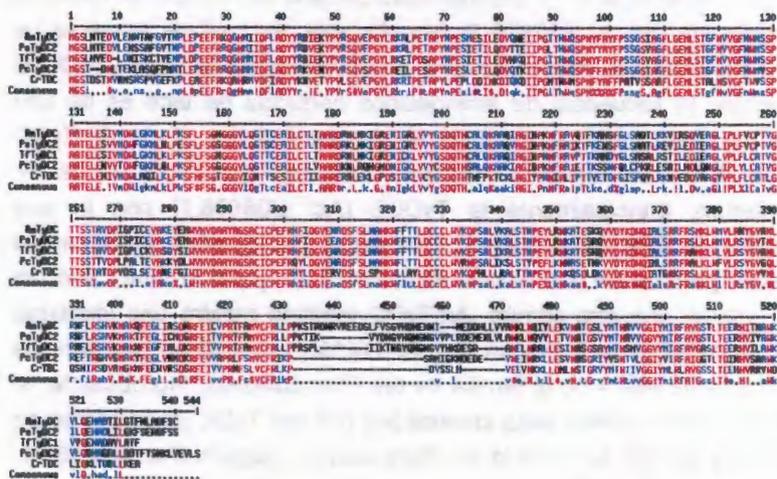


Figura 2.5. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de AmTyDC con otras aminoácido aromático descarboxilasas. La tirosina/Dopa descarboxilasa (TyDC) de *Am. Argemone mexicana*. *Ps*: *Papaver somniferum*. *Tf*: *Thalictrum flavum*, *Pc*: *Petroselinum crispum*, y la triptofano descarboxilasa (TDC) de *Cr*: *Catharanthus roseus*.

2.3.2.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA TYDC

Se realizó un análisis filogenético para determinar las distancias genéticas entre la TyDC de *A. mexicana* y las secuencias reportadas en otras especies productoras de ABI's, como *P. somniferum* y *E. californica*, entre otras. Esta información es útil para conocer las similitudes que pueden conservarse en cuando al proceso de síntesis de alcaloides en plantas que se han desarrollado en ambientes y condiciones diferentes. El análisis se realizó con base en la secuencia de nucleótidos del ADNc, considerando sólo los marcos de lectura abiertos de todas las secuencias incluidas (Fig. 2.6.). El árbol filogenético se desarrolló usando 16 secuencias que incluyen las TyDC de tanto especies productoras como no productoras de ABI's, y de enzimas que catalizan la descarboxilación de otros aminoácidos tales como triptofano (Trp), serina (Ser) y arginina (Arg).

Tomando en cuenta que la familia de genes que codifican para la TyDC de *P. somniferum*, de acuerdo a la similitud entre sus

secuencias, puede dividirse en dos clases (representadas en este análisis por PsTyDC1, Ac:U08597.1 y PsTyDC2, Ac: U08598.1) (Facchini & De Luca, 1994) y dejando fuera a la TyDC5 (PsTyDC5, Ac:U16804.1) que tiene menor relación con cualquiera de ellas (Maldonado-Mendoza et al., 1996), es interesante observar que la TyDC de *A. mexicana* (AmTyDC) muestra una mayor relación con la TyDC2 (Ac: U08598.1) y que éstas, a su vez, tienen una relación mas estrecha con la de *T. flavum* (TfTyDC, Ac: AF314150.1) que con otros miembros de la familia de *P. somniferum*. No obstante, la agrupación de estas cinco secuencias en un mismo clado, sugiere que tienen un origen monofilético.

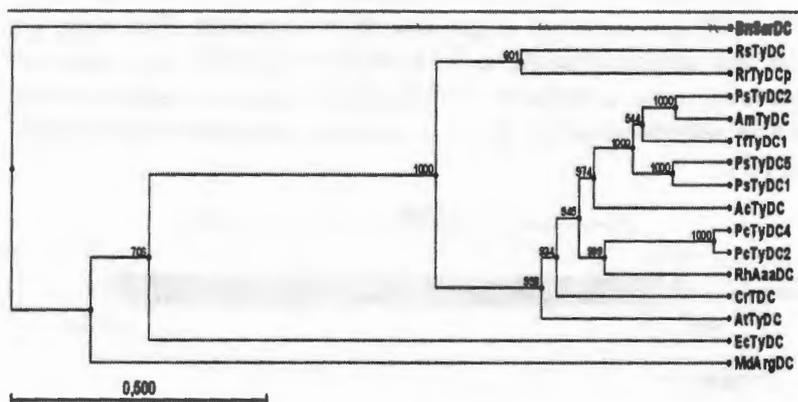


Figura 2.6. Relación filogenética entre la TyDC de *A. mexicana* y las aminoácido descarboxilasas de plantas. Para el análisis se aplico el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) utilizando las secuencias de nucleótidos codificantes (Ver abreviaturas y lista de accesoión en el cuadro 2.2.). Los números internos indican el soporte Bootstrap de cada clado.

Sandmeier y colaboradores (1994) realizó un análisis similar en el que reportó que la TDC de *C. roseus* (CrTDC, Ac: CTRTPDC) se agrupa dentro del clado de las TyDC's, lo que sugiere un ancestro común para estas enzimas. La comparación de las descarboxilasas de aminoácidos dependientes de piridoxal, se agruparon en cuatro clases distintas, quedando TDC y TyDC en el grupo II (Sandmeier et al., 1994).. Es interesante notar que dentro del mismo clado, la supuesta TyDC de *E. californica* (EcTyDC, Ac: EU882976.1), a pesar de tener un alto porcentaje de identidad con AmTyDC, está muy alejada de las TyDC's

de las especies productoras de ABI's en comparación con la TyDC de *Aristolochia contorta* (AcTyDC, Ac: DQ986331), una especie que no produce este tipo de alcaloides, e incluso que la TDC de *C. roseus* (CrTDC, Ac: CTRTPDC), que emplea un sustrato diferente. Este resultado posiblemente se deba a la penalización que introduce el algoritmo como consecuencia del menor marco de lectura abierto de EcTyDC, en comparación con las demás secuencias. Sin embargo, la interpretación de este dato debe tomarse con cautela.

2.3.2.3. REDUNDANCIA GÉNICA DE LA TyDC DE *A. mexicana*

Se realizó un Southern blot para determinar el número de copias de la TyDC presentes en el genoma de *A. mexicana*. Para esto, se utilizó una sonda un fragmento de 1316 pb de AmTyDC que incluye el dominio de unión a piridoxal. Un análisis de restricción reveló que las enzimas seleccionadas no cortan el fragmento empleado como sonda (Fig. 2.7).

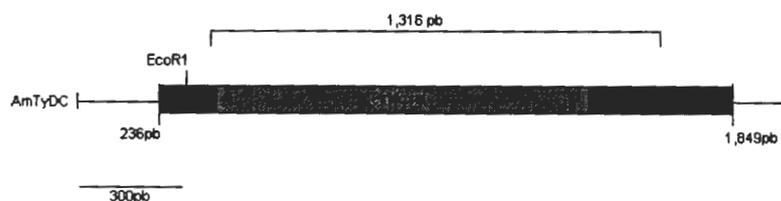


Figura 2.7. Análisis de restricción del ADNc de la TyDC (AmTyDC) de *A. mexicana*. El corchete indica el fragmento utilizado como sonda para el análisis tipo Southern blot.

El patrón de hibridación sugiere un bajo número de copias para la TyDC en *A. mexicana* (Fig. 2.8), con la sonda empleada se observaron entre cuatro y seis bandas en los diferentes carriles. Analizando detenidamente cada carril se observa que KpnI y XhoI generaron un patrón similar, debido a que comparten una banda de 4 kb y una de aproximadamente 2.1 kb, pero a diferencia de KpnI, que presenta una banda de aproximadamente 3.7 kb, con XhoI se presentó una banda intensa, ligeramente menor, de 3 kb y un fragmento de aproximadamente 550 pb. Por otro lado, con HindIII se presentó una banda tenue de 8 kb, seguida de tres bandas intensas de 5,1, 4.2 y 2.9 kb aproximadamente, comparte con KpnI y XhoI la banda tenue de

aproximadamente 2.1 kb y también se observó el fragmento de 550 pb, similar al de XhoI.

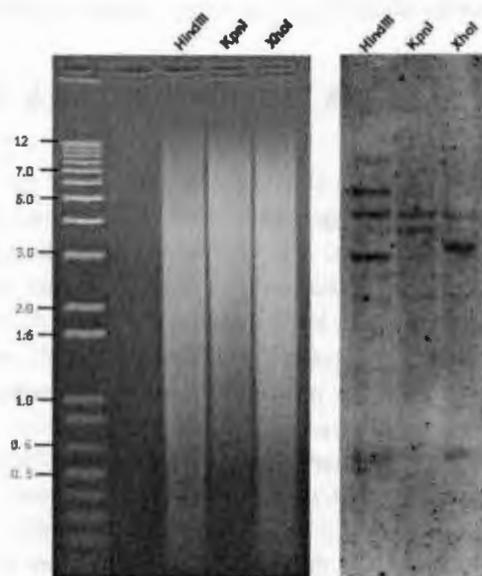


Figura 2.8. Análisis tipo Southern blot de la TyDC de *A. mexicana*. El ADN genómico (10 μ g) fue digerido con HindIII, KpnI y XhoI. Como sonda se empleó un fragmento de 1,316 pb de la clona previamente obtenida la cual fue marcada con dogoxigenina. Los números de la izquierda indican el marcador molecular en kilobases (kb).

A excepción de una supuesta TyDC de *A. thaliana*, todas las TyDC's y en general las AADC's de plantas reportadas hasta el momento, carecen de intrones (Facchini et al., 2000). De este modo, es poco probable que en *A. mexicana* se presente esta característica. Considerando lo anterior, y puesto que AmTyDC es mayor de 2 kb, sin sitios de restricción para las enzimas empleadas, las bandas de 550 pb podrían corresponder a fragmentos de un segundo gen, que a diferencia del representado por AmTyDC, sí posea un sitio de restricción para estas enzimas. Por lo tanto, este resultado abre la posibilidad de la presencia de más de una copia de TyDC de *A. mexicana*. Sin embargo, esta familia de genes parece ser pequeña, como ocurre de plantas no productoras de ABI's como perejil, (cuatro copias Kawalleck et al., 1993), y *A. thaliana* (una copia; Trezzini et al., 1993). Por el contrario, en

P. somniferum, esta enzima es codificada por una familia multigénica de entre 10 y 14 miembros (Facchini et al., 1994). No obstante, debe tomarse en consideración que, a diferencia de esta especie, *A. mexicana* es una planta silvestre que no ha sido sujeta a selección.

2.3.2.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA TyDC EN TEJIDOS DE *A. mexicana*

A. mexicana produce dos de los tres tipos de alcaloides bencilisoquinolínicos, la sanguinarina, una benzofenantridina y la berberina, una protoberberina. Es interesante resaltar que de las especies estudiadas hasta el momento ninguna es capaz de sintetizar ambos alcaloides, por ejemplo, las Papaveraceas como *E. californica* y *P. somniferum*, producen sanguinarina y al igual que *A. mexicana* la acumulan en la raíz, pero no producen berberina, mientras que *T. flavum* (Ranunculaceae) es capaz de acumular berberina en toda la planta pero no produce sanguinarina (Ziegler & Facchini, 2008; Facchini, 2001). En estas especies se ha reportado que la TyDC tiene un patrón de expresión tejido específico, y los miembros de la familia multigénica que la codifican se expresan diferencialmente (Facchini & De Luca, 1994). Sin embargo, este parece no ser el caso de *A. mexicana*, ya que el northern reverse reveló que los transcritos de la TyDC son expresados en todos los tejidos analizados y en un mismo nivel (fig. 2.9), a pesar que la acumulación de los dos tipos de ABI's, varía en los diferentes tejidos de la planta madura (ver figura S5, datos complementarios), ya que la sanguinarina se acumula únicamente en la raíz y cápsula, mientras que la berberina se detecta en todos los tejidos de la planta aunque a diferentes niveles.



Figura 2.9. Northern reverse de la TyDC de *A. mexicana*. El análisis de la expresión de los mensajeros de la TyDC se realizó por northern reverse. Como sonda se utilizó la clona AmTyDC marcada con digoxigenina empleando los oligos de la RT-PCR. La actina se utilizó

como control de carga y amplificación. Abreviaturas: R, raíz; T, tallo; H, hoja; C, cápsula; F, flor.

Cabe señalar que la expresión constante de la TyDC se asemeja a lo observado para la NCS y la BBE de *A. mexicana*, que están involucrados en etapas posteriores de biosíntesis de ABI's (Fig. 1.5 y Fig. 1.7 del capítulo 1; Rubio-Piña, 2009). En esta especie se han aislado dos copias de cada uno de estos genes y ambas se expresan en todos los tejidos, y el nivel de expresión varía muy poco entre los tejidos (Rubio-Piña, 2009). Debido a que la inducción transcripcional de los genes de la síntesis de ABI's ha sido relacionada con las respuestas de defensa, no es de extrañarse que la TyDC, la NCS y la BBE estén presentes en todos los tejidos, pues todos ellos acumulan al menos uno, sino es que ambos tipos de alcaloides (figura S5). Esto puede deberse a la naturaleza silvestre de esta planta, ya que al estar constantemente expuesta a patógenos o herbívoros, deriva en la necesidad de la planta de mantener esta ruta activa produciendo estos alcaloides a concentraciones en el orden de magnitud de mg g^{-1} de peso seco.

2.3.3.1 ANÁLISIS DE LA CLONA DE PPO DE *Argemone mexicana*

La clona de PPO de *A. mexicana* (AmPPO) tiene un tamaño de 2,117 nt. Su marco de lectura abierto comienza en la posición 252 y tiene un largo de 1,770 nt y está seguido de una región no traducida de 96 nt con una cola poliadenilada (Fig. 2.10). La secuencia deducida de aminoácidos es de 589 residuos y contiene dos dominios de unión a Cu, lo que es una característica de este tipo de enzimas (Seo et al. 2003). Estos dominios están señalados en la Figura 2.10 y las estrellas indican cuales son las histidinas responsables de la unión a este elemento. En esta secuencia también se identificó un péptido de tránsito de 28 aminoácidos en su extremo N-terminal y un dominio transmembranal (ver figura S4, datos complementarios) lo que sugiere su localización en un compartimento celular. De esta manera, esta secuencia tiene las características PPO's reportados hasta el momento, por ejemplo, Thyngsen y colaboradores (1995) aislaron dos genes que codifican para PPO de *Solanum tuberosum* uno de ellos tiene un tamaño de 1,958 pb y contiene un marco de lectura abierto de 1,791 pb que codifica para un péptido de 599 a.a, mientras que el otro es de un tamaño de 1,943 pb, su marco de lectura es de 1,797 pb que codifica para una secuencia de 599 a.a. y ambos poseen un péptido de tránsito que es responsable

de su localización en el lumen tilacoidal, ubicación que podría ser la misma para la PPO de *A. mexicana*.

```

252  gaaacaaagagatgggtctctttgatcttcttggctttcaac
257  ttaactgtatctatctccagatctattctctacagatccacagaa
342  caaatgaaccccatttcttcataagggatctaaagaaacatc
357  ctccgaattcttctgagagagatgggttcaatggaaacccatg
432  agtagtagtcaagtgagagagaaacccatcaatctgagctca
479  agtctaatctaaccaattgtctcaatctctctctgagctgat
522  cgtccagattcaatgggtcccaacaaagctgaatctagaaacc
567  atctatgattctcaatcccaacatctctctcaatctgagct
612  agaaacaaagctcaatctgagagagatctctctctctctct
657  aacaaagctatgagctctgaaatctctctctctctctctct
702  cgtcaatctatagctcaagctcaatctgagctgagctctct
747  ggtctctttatctcagaacatcaaatctctctctcaaatct
792  agatctcggatctctctctctctctctctctctctctctct
837  catgaaagattctcggagcttcaatctgagctgagctctct
892  ttaacatctgaaatgggtctctctctctctctctctctct
927  gatactgattcaacagatctgagctgagctgagctgagct
972  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1017  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1062  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1107  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1152  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1197  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1242  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1287  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1332  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1377  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1422  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1467  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1512  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1557  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1602  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1647  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1692  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1737  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1782  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1827  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1872  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1917  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
1962  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct
2007  caaatctctcaatctcaatctgagctgagctgagctgagct

```

Figura 2.10. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del marco de lectura abierto de AmPPO de *A. mexicana*. Los aminoácidos subrayados con la línea gruesa corresponden al péptido de tránsito, y los subrayados con líneas delgadas son los dominios de unión a Cu A y B. Las estrellas indican las histidinas que se unen al Cu en cada dominio.

En general, hay un bajo nivel de similitud entre las secuencias de PPO's de diferentes especies. El nivel más alto se encuentra en los sitios de unión a cobre que son bastante conservados incluso entre diferentes organismos (Mayer, 2006 Selinheimo et al., 2007). Sin embargo, el análisis con el programa BLAST (Altschul et al., 1997) reveló que la secuencia de la PPO de *A. mexicana* tiene un alto porcentaje de identidad con la secuencia parcial de la PPO de *P. somniferum* (74%) pero debe tomarse en cuenta que el fragmento reportado incluye solo la parte central del gen que abarca los dominios de unión a cobre de esta enzima. No obstante, las secuencias de PPO's de especies no productoras de ABI's también comparten un porcentaje alto de identidad. Por ejemplo, con la de *Vicia faba* éste es del 76%, (Acc: Z11702) con la de *Trifolium pratense* (Acc: EF183483), del 66 % con la de *Annona cherimola* (Acc: DQ990911), del 63%, entre otras. La Figura 2.11 presenta una comparación de los dominios de unión a cobre de algunas de estas secuencias para ilustrar mejor esta similitud y en ella se puede observar que las histidinas involucradas se conservan entre las especies.



Figura 2.11. Comparación de la secuencia de aminoácidos de los dominios de unión a cobre de la polifenol oxidasa (PPO) de *A. mexicana* con los dominios de las PPO's de diferentes especies. Am: Argemone mexicana. Ps: Papaver somniferum. Ac: Annona cherimola; Pb: Populus balsamifera; Tp: Trifolium pratense y Vf: Vicia faba

2.3.3.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA PPO

Se realizó un análisis filogenético con base en la secuencia de nucleótidos del ADNc de la tirosinasa/PPO, considerando los marcos de lectura abiertos completos de todas las secuencias incluidas para el análisis. Por ello, se excluyó la secuencia parcial de la PPO de *P. somniferum* en este análisis. El árbol filogenético se desarrolló con 17

secuencias de PPO's que tienen un alto porcentaje de identidad con AmPPO. Entre ellas se encuentran las secuencias de las PPO de arbustos como *Ricinus comunis* (RcPPO; Acc: XM_002518970), de árboles como *Polulus balsamifera* (PbPPO; Acc: AY665682), de plantas trepadoras como *Vicia faba* (VfPPO; Acc: Z11702), entre otras. Si bien estas especies pertenecen a familias poco relacionadas con plantas productoras de ABI's, estas secuencias se incluyeron debido a que, con excepción de la secuencia parcial de PPO de *P. somniferum*, no se encontraron secuencias de PPO en plantas productoras de este tipo de alcaloides. La PPO de *A. mexicana* (AmPPO) está distanciada de la mayoría de las secuencias analizadas (Fig. 2.12), y se ubicó dentro de un clado formado por otras nueve secuencias. El diagrama reveló que algunas de las especies de la misma familia, tales como *V. faba* (VfPPO) y *Trifolium pratense* (TpPPO) se asociaron en un mismo clado, mientras que otras como *P. balsamifera* (PbPPO) y *P. trichocarpa* (PtPPO), de la familia Salicaceae, tuvieron una relación estrecha con *Ricinus comunis* (RcPPO) que pertenece a la familia Euphobiaceae. Este resultado revela muy poca información respecto al origen y evolución de la PPO de *A. mexicana*, y por el momento no se puede dar una conclusión certera, debido a la escasa información con que se cuenta.



Figura 2.12. Relación filogenética entre la PPO de *A. mexicana* y las secuencias reportadas para diferentes especies de plantas. Para el análisis se aplicó el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) utilizando las secuencias de nucleótidos codificantes (Ver abreviaturas y lista de accesión en el cuadro 2.2.). Los números internos indican el soporte Bootstrap de cada clado.

2.3.3.3. REDUNDANCIA GÉNICA DE LA PPO

Para determinar el número de copias de la PPO presente en el genoma de *Argemone mexicana* se realizó un Southern blot empleando una sonda de 1,318pb de AmPPO con los dos dominios de unión a cobre (CuA y CuB; Fig. 2.13). Estos son los sitios más conservados entre este tipo de enzimas (Seo et al. 2003). El análisis de restricción muestra que de las enzimas utilizadas en este análisis, BamHI y HindIII no cortan el fragmento donde hibrida la sonda, mientras que EcoRI y EcoRV tienen cada una, un sitio de corte dentro de la secuencia aislada (Fig.2.13)

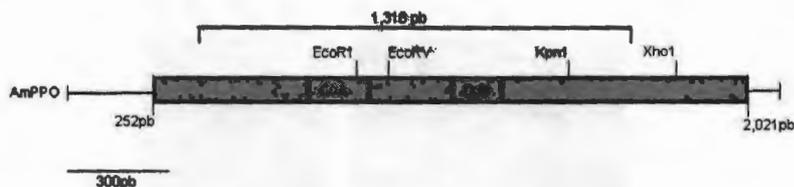


Figura 2.13. Análisis de restricción del ADNc de la TyDC (AmTyDC) de *A. mexicana*. El corchete indica el fragmento utilizado como sonda para el análisis tipo Southern blot.

El patrón de hibridación sugiere que la PPO de *Argemone mexicana* podría ser codificada por una familia pequeña de genes (Fig 2.14) formada posiblemente por 2 ó 4 miembros. Así, en el ADN digerido con EcoRI se observan ocho bandas, el doble de lo observado con HindIII (Fig. 2.14). Esto era de esperarse debido a que EcoRI tiene un sitio de corte en el fragmento donde hibrida la sonda, mientras que HindIII no tiene ninguno (Fig. 2.13). Por otra parte, aunque BamHI no corta la secuencia de hibridación, tiene un mayor número de bandas en comparación con HindIII (Fig. 2.14). Esto puede deberse a la presencia de un intrón, como ocurre en una copia de las PPO's de *Musa cavendishii* (Gooding et al., 2001). No obstante, la presencia de secuencias no transcribibles dentro de estos genes es algo inusual (Mayer, 2006). De esta manera, la presencia de otra copia de PPO en el genoma de *A. mexicana*, podría ser la explicación. Finalmente, el ADN digerido con EcoRV mostró una banda de 5 kDa aproximadamente, y otra más ancha de 4 kDa (Fig. 2.14). Esto puede deberse a la presencia de dos fragmentos de tamaño muy similar,

En plantas las PPO generalmente están codificadas por familias multigénicas, tal es el caso de *Solanum tuberosum* (papa) en la que ocurren seis copias (Thyngsen et al., 1995), y en *Solanum*

lycopersicum (tomate) en que la PPO es codificada por una familia de siete genes (Thipyapong & Steffens 1997). Otros ejemplos son *Malus sylvestris* (Boss et al., 1995), *Vicia faba* (Cary et al., 1992) y *Trifolium pratense* (Sullivan et al., 2004) en la que existen tres copias. Esta es una familia pequeña al igual que la encontrada en *A. mexicana*. Desafortunadamente, se han realizado muy pocos estudios con relación a estas enzimas en especies productoras de ABI's, por lo que no tenemos una referencia más cercana del número de copias presente en este tipo de plantas, por lo que este trabajo, representa uno de los primeros estudios con relación a este tema.

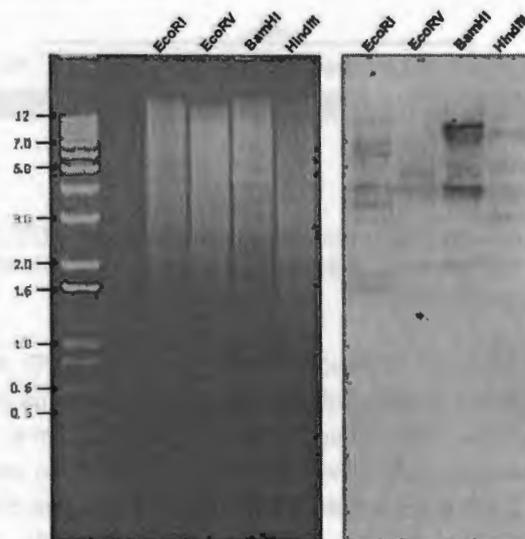


Figura 2.14. Análisis tipo Southern blot de la PPO de *A. mexicana*. El ADN genómico (10 µg) fue digerido con *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* y *HindIII*. Como sonda se empleó un fragmento de 1,318 pb de la clona previamente obtenida la cual fue marcada con digoxigenina. Los números de la izquierda indican el tamaño de las bandas en kilobases (*Invitrogen 1Kb Plus DNA Ladder*).

2.3.3.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PPO EN TEJIDOS DE *A. mexicana*.

La mayoría de las investigaciones realizadas con relación a las PPO's le han dado un papel potencial en los mecanismos de defensa y se ha descubierto que los genes que las codifican tienen un control tejido específico y de desarrollo particular para cada especie (Mayer, 2006). En *A. mexicana* la expresión de la PPO se detectó en todos los

tejidos, aunque en diferentes niveles (Fig. 2.15). La mayor acumulación se observó en raíz, hoja y cápsula, en comparación con lo detectado en tallo y flor (Fig. 2.15). Aunque la RT-PCR reveló una sola banda para cada tejido, el northern reverse, reveló otra banda de un tamaño ligeramente mayor (Fig. 2.15). Esta banda se detectó en todos los tejidos, con excepción del tallo (Fig. 2.15) y posiblemente corresponda a otro miembro de esta familia, con un nivel menor de expresión. En comparación con la acumulación de transcritos de la TyDC (Fig. 2.9), NCS y BBE (Rubio Piña, 2009), podemos ver que los niveles correspondientes a la expresión de la PPO son más variables en los diferentes tejidos (Fig. 2.15). Además, tampoco parece tener una relación directa con la acumulación de alcaloides en la planta (ver figura S5, datos complementarios). Por lo tanto, la mayor expresión de la PPO en la hoja, la cápsula y la raíz, podría deberse a la participación de esta enzima en otro proceso metabólico, diferente a la producción de alcaloides.

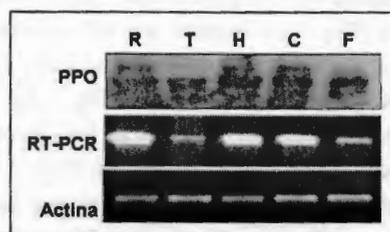


Figura 2.15. Northern reverse de la PPO de *A. mexicana*. El análisis de la expresión de los mensajeros de la PPO se realizó por northern reverse. Como sonda se utilizó la clona AmPPO marcada con digoxigenina empleando los oligos de la RT-PCR. La actina se utilizó como control de carga y amplificación. Abreviaturas: R, raíz; T, tallo; H, hoja; C, cápsula; F, flor.

La expresión de los genes correspondientes a la PPO es variable. Por ejemplo, en *Musa cavendishii* (banana), la actividad de PPO se detecta en todos los tejidos (Gooding et al., 2001). Sin embargo, los transcritos correspondientes sólo están presentes en la flor, el tallo, la raíz y las hojas no expandidas, pero no en las hojas desarrolladas. De igual forma, las diferentes PPO's en *T. pratense* se expresan de manera diferencial, siendo mayor en las flores y las hojas no expandidas y no detectable en las hojas maduras y en los tallos (Sullivan et al., 2004).

Por otro lado, en *S. tuberosum* la expresión es alta en la raíz mientras que en las flores es muy baja, y está ausente en las hojas (Thyngsen et al., 1995). De esta manera, las PPO's en estas especies no se expresan en las hojas maduras, lo cual contrasta con lo observado en *A. mexicana*, en la que éste es el tejido que mostró la mayor expresión.

2.3.4 CONCLUSIONES

Los resultados anteriores muestran que el genoma de *A. mexicana* tiene un bajo número de copias para la TyDC y la PPO (Fig. 2.8 y Fig. 2.14). Estos genes tienen una alta expresión en todos los tejidos analizados (Fig. 2.9 y Fig. 2.15), lo cual podría indicar que tienen un papel importante en la planta, ya que ésta requiere su presencia constante para la síntesis *de novo* de las enzimas. Sin embargo, la acumulación de los transcritos no mostró una relación estrecha con la acumulación de los alcaloides en los diferentes tejidos (Fig. S5, datos complementarios). En cuanto a las secuencias aisladas, la TyDC de *A. mexicana*, presentó todas las características de una descarboxilasa de aminoácido aromático (Fig. 2.3). Mostró una alta similitud con la TyDC2 de *P. somniferum*, y el análisis filogenético reveló que ambas tienen una estrecha relación con la TyDC de *T. flavum* (Fig. 2.6). Por otro lado, se confirmó que la secuencia de PPO contiene los dominios de unión a cobre que caracterizan a este tipo de enzimas (Fig. 2.10). Al igual que con la TyDC, la secuencia de PPO de *A. mexicana* presentó la mayor similitud con la secuencia parcial de la PPO de la especie *P. somniferum*, lo cual era de esperarse debido a que ésta es la única secuencia de PPO de una especie productora de ABI's reportada hasta el momento, y por lo tanto esta especie es la más cercana a *A. mexicana*. Finalmente, teniendo caracterizadas estas secuencias, están disponibles para realizar análisis sobre la participación de las enzimas que representan en condiciones que promueven la acumulación de alcaloides.

2.4. REFERENCIAS

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.

Carrillo-Pech, M.R. (2006). Regulación de la síntesis de los alcaloides en cultivos *in vitro* de *Argemone mexicana*. Centro de

Investigación Científica de Yucatán A.C. Tesis de Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas.

Facchini, P.J. (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 29-66.

Facchini, P.J. and V. De Luca (1994) Differential and tissue-specific expresión of a gene family for tyrosine/dopa decarboxilasa in opium poppy. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 26684-26690.

Facchini J.F., and S.-U. Park (2003). Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 64, 177-186.

Facchini, P.J., S.-U. Park, D.A. Bird and N. Samanani (2000). Toward the metabolic engineering of benylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy and related species. Recent research developments in phytochemistry, 4, 31-47.

Facchini, P.J., M. Yu and C. Penzes-Yost (1999). Decreased cell wall digestibility in canola transformed with chimeric tyrosine decarboxylase genes from opium poppy. *Plant Physiology* 120 (3), 653-664.

Goddgin, O.J.M., E.J.M. Pennings, P. van der Helm, R.A. Schilperoort, R. Verpoorte and J.H.C. Hoge (1995). Overexpression of a tryptophan decarboxylase cDNA in *Catharanthus roseus* crown gall calluses results in increased tryptamine levels but not in increased terpenoid indole alkaloid production. *Transgenic Research*, 4, 315-323.

Gooding, P.S., C. Bird and S.P. Robinson (2001). Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, 213, 748-757.

Guillet, G. and V. De Luca (2005). Wound-inducible biosynthesis of phytoalexin hydroxycinnamic acid amides of tyramine in triptophan and tyrosine ecarboxilase transgenic tobacco lines. *Plant Physiology*, 137, 692-699.

Guillet, G., J. Poupard, J. Basurco and V. De Luca (2000). Expression of tryptophan decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. *Plant Physiology*, 122, 933-943.

Kawalleck, P., H. Keller, K. Hahlbrock, D. Scheel y I.E. Somssich (1993). A pathogen-responsive gene of parsley tyrosine decarboxilase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (3) 2189-2194.

Lin, R.C., Z.S. Ding, L.B. Li and T.Y. Kuang (2001). A rapid and efficient DNA minipreparation suitable for screening transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 379a-379e.

Maldonado-Mendoza, I.E., M. López-Meyer, J.R. Gales, R.J. Burnett and C.L. Nessler (1996). Molecular analysis of a new member of the opium poppy tyrosine/3,4-dihydroxyphenilalanine decarboxylase gene family. *Plant Physiology*, 110, 43-49.

Marques, I.A. and P.E. Brodelius (1998). Elicitor-induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. II. Partial characterization. *Plant Physiology*, 88, 52-55.

Mayer, A.M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67, 2318-2331.

Rubio-Piña, J.A. (2009). Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisquinolínicos de *Argemone mexicana*. Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

Samanani, N., S.-U. Park and P.J. Facchini (2005). Cell type-specific localization of transcripts encoding enzymes catalyzing nine consecutive steps in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell* 17, 915-926.

Seo, S.Y., V.K. Sharma and N. Sharma (2003). Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2837-2853.

Solomon, E.I., U.M. Sundaram and T.E. Machonkin (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, 2563-2605.

Songstad, D.D., V. De Luca, N. Brisson, W.G.W. Kurz and N.C. Nessler (1990). High levels of tryptamine accumulation in transgenic tobacco expressing tryptophan decarboxylase. *Plant Physiology*, 94, 1410-1413.

Sullivan, M.L., R.D. Hatfield, A.L. Thoma and D.A. Samac (2004). Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNA's and expression of active protein in *escherichia coli* and transgenic alfalfa. *Plant Physiology*, 136, 3234-3244.

Thyngsen P.W, I.B. Dry, and S.P. Robinson (1995). Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiology*, 109, 525-531.

Thipyapong P. and J.C. Steffens (1997). Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiol*, 115, 409-418.

Trezzini G.F., A. Horrichs and I.E. Somssich (1993). Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant molecular biology*, 21 (2) 385-389.

Yoruk R. and M.R. Marshall (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361-422.

Yu M. and P.J. Facchini (1999) Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transferase from opium poppy. *Planta*, 209, 33-44.

Ziegler J. and P.J. Facchini (2008). Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 735-769.

Thomas, G.F., A. Hildreth and B. Gornall (1955) Isolation of
 a gene for resistance to infection from *Arabidopsis thaliana* and
 its inheritance in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Molecular Biology*, 7, 15-
 24.

Yano, K. and M.J. Marshall (2007) Phylogenetic analysis and
 function of plant peroxidase oxidase a review. *Journal of Food
 Microbiology*, 17, 581-622.

Yano, K. and P. L. Fiedler (1993) Purification, characterization, and
 amino acid sequence of phytoalexin oxidase (PO) from *Phaseolus
 vulgaris*. *Journal of Molecular Biology*, 228, 23-46.

Yano, K. and P. L. Fiedler (1995) Amino acid sequence
 homology between animal peroxidase and plant peroxidase
 199.

Capítulo 3

Inducción de alcaloides bencilisoquinolínicos en cultivos celulares de *Argemone mexicana*.

3.1. INTRODUCCIÓN

Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's) son un grupo de metabolitos secundarios de gran valor debido a que tienen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas (Capasso et al., 2002; Shaukat et al., 2002). Ejemplos de este tipo de alcaloides son la morfina y la codeína, de amplia aplicación en la medicina (Armstrong and Cozza, 2003), así como la sanguinarina, cuya aplicación en el tratamiento de la leucemia está siendo evaluada (Ahmad et al., 2000). Debido a la complejidad de sus moléculas, la síntesis química de estos alcaloides no es muy factible y, por lo tanto, las plantas continúan siendo las únicas fuentes de obtención. Esto ha provocado un creciente interés en la aplicación de la ingeniería metabólica para obtener materiales con una producción deseable de estos compuestos (Larkin et al., 2007). Sin embargo, para esto se requiere de un buen entendimiento de la bioquímica y biología celular de la ruta de síntesis de estos compuestos, el cual es aún bastante limitado.

Los cultivos celulares han sido un sistema útil en el estudio del metabolismo de este tipo de alcaloides, particularmente aquellos que responden al tratamiento con inductores mediante la activación transcripcional de los genes involucrados en la ruta, como sucede en *P. somniferum* y *E. californica* retados con un inductor fúngico y extracto de levadura, respectivamente (Facchini & Park, 2003; Ross et al., 2006). La respuesta de estos cultivos se basa en que la síntesis de los alcaloides forma parte de las reacciones de defensa y que las condiciones de inducción simulan el ataque por patógenos. Además de los homogenados fúngicos y el extracto de levadura, se han utilizado compuestos involucrados en la mediación de la respuesta como inductores.

El mecanismo de la regulación transcripcional de la biosíntesis de los ABI's aún no está del todo claro. En *C. japonica* se identificó un regulador transcripcional de la biosíntesis de berberina tipo WRKY, la novena mayor familia de factores transcripcionales (Kato et al., 2007). Genes para proteínas WRKY también se encuentran en *A. thaliana*, y son

un punto de convergencia para la integración de eventos de señalización en respuesta a patógenos, mediados por ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (AJ) (Li et al., 2006). Así, en *Arabidopsis*, la transducción de señales activada en respuesta a la infección patogénica se define de acuerdo al estilo de vida propio del patógeno. Los organismos biotróficos inducen respuestas vía SA (McDowell & Dangl, 2000), mientras que la infección con patógenos necrotróficos los cuales requieren la muerte celular para obtener nutrientes, activan las respuestas dependientes de ácido jasmónico (Glazebrook, 2005). Generalmente, la activación de una ruta impide el funcionamiento de la otra y la coordinación de ambas rutas depende de proteínas tipo WRKY (Li et al., 2006). El SA puede ser producido por la vía de los fenilpropanoides (Ribnicky et al., 1998) o por la vía del isocorismato (Coquoz et al., 1998). Por su parte el AJ, se sintetiza a partir del ácido linolénico por acción de lipoxigenasas (Feussner & Wasternack, 2002). Tanto el SA como el AJ han sido utilizados de manera independiente o en combinación para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares (Khosroushahi et al., 2006). En especies productoras de ABI's, como *S. canadienses*, la actividad de la DBOX, una enzima que participa en la formación de las benzofenantridinas, se incrementa varias veces en presencia de SA o MeJa (Ignatov et al., 1996). En *P. somniferum*, MeJa provoca la acumulación de transcritos para TyDC (Facchini et al., 1996a) y BBE (Facchini et al., 1996b), que participan en las primeras reacciones. Por lo tanto, estas moléculas señalizadoras, además de los inductores fúngicos, son útiles para estudios de la regulación de esta vía.

Por su parte, la aplicación del extracto de levadura a cultivos celulares productores de ABI's, ha sido una estrategia empleada para estudiar la biosíntesis de estos alcaloides en la especie *E. californica*, pues induce de manera importante la acumulación de benzofenantridinas como la sanguinarina y la dihidrosanguinarina. Al evaluar de manera independiente el efecto de varios oligosacáridos presentes en el extracto de levadura comercial, incluyendo la quitina, el β -glucano, el ergosterol, la N-acetilglucosamina, un glucopéptido y la coronatina, se descubrió que la quitina por sí sola, produce un incremento en la acumulación de sanguinarina, mientras que los otros componentes producen una acumulación de su precursor inmediato, la dihidrosanguinarina (Cho et al.,

2008a). Por lo tanto, la quitina parece ser el componente que activa el último paso en la producción de este alcaloide (ver Fig. 1.7). De manera general, el incremento en la producción de estos alcaloides resulta de una activación transcripcional (Cho et al., 2008a,b; Alcantara et al., 2005; Samanani et al., 2005; Facchini & Park, 2003).

Los estudios sobre la biosíntesis de estos alcaloides se han basado en un número limitado de especies y de manera general se ha visto que el incremento en la producción de estos alcaloides resulta de una activación transcripcional (Alcantara et al., 2005; Facchini & Park, 2003). Una buena candidata para el estudio de la biosíntesis y regulación de los ABI's es *A. mexicana*, una Papaveracea muy abundante en nuestro país, que ha sido utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de algunas afecciones. Esta especie ha sido poco estudiada, por lo que hasta el momento solo se han identificado los genes que codifican para tres enzimas que intervienen en las etapas tempranas de la ruta de biosíntesis de los ABI's; la tirosina descarboxilasa (TyDC, Capítulo 2), la norcoclaurina sintasa (dos copias: NCS1 y NCS2) y la enzima del puente de berberina (dos copias: BBE1 y BBE2) (Rubio-Piña, 2009). La Figura 3.1 muestra la ruta condensada de la síntesis de ABI's.

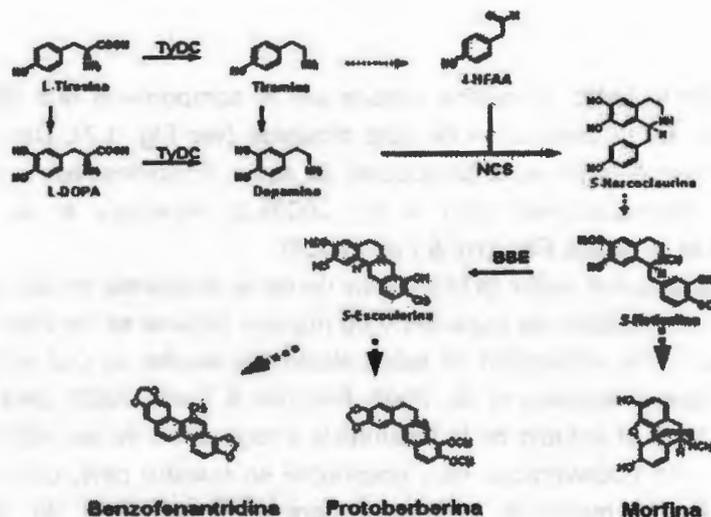


Figura 3.1. Ruta condensada de la biosíntesis de los alcaloides benzilisoquinólicos. TyDC: Tirosina descarboxilasa, NCS: Norcoclaurina sintasa, BBE: Enzima formadora del puente de berberina. 4-HFAA: 4-hidroxifenilacetaldehído. Las flechas punteadas indican varios pasos involucrados en la formación del producto.

Estas tres enzimas catalizan reacciones tempranas que son comunes para los dos tipos de alcaloides presentes en esta planta; benzofenantridinas y protoberberinas, y se ha sugerido que podrían tener funciones reguladoras clave (Facchini et al., 1996; Samanani & Facchini, 2002; Dittrich & Kutchan, 1991). También se ha identificado un gen que codifica para una polifenol oxidasa (PPO, Capítulo 2), una enzima relacionada con respuestas de defensa en diversas plantas y cuya posible participación en la ruta se ha sugerido debido a su capacidad de catalizar la hidroxilación de tirosina o tiramina formando DOPA o dopamina, respectivamente (Bilková et al., 2005; Balažová et al., 2002). Sin embargo, estas enzimas también pueden catalizar la oxidación de estos productos formando quinonas indólicas que, al polimerizarse, forman compuestos tipo melanina. Estos compuestos son tóxicos, de color oscuro y constituyen un mecanismo de defensa diferente al de la producción de ABI's (Negrel et al., 1993).

Para analizar si hay una correlación entre la inducción del metabolismo secundario y la activación transcripcional de estos genes que sugiera su participación como puntos de regulación para la vía, se

emplearon suspensiones celulares generadas a partir de callos obtenidos de hojas jóvenes de esta especie (Carrillo-Pech, 2006). Con el fin de incrementar el proceso de síntesis de ABI's de los cultivos de *A. mexicana*, éstos fueron sometidos a diferentes estrategias de inducción, que incluyeron la aplicación individual, simultánea y secuencial de tres inductores: el jasmonato de metilo (MeJa), el ácido salicílico (SA) y el extracto de levadura (YE). Estos tratamientos modificaron la producción de sanguinarina (un ABI tipo benzofenantridina), afectando de manera diferencial la expresión de algunos de los transcritos evaluados.

3.2. METODOLOGÍAS

3.2.1. CULTIVOS *in vitro* DE *Argemone mexicana*

En el laboratorio se cuenta con un cultivo de callos inducidos a partir de hojas de *A. mexicana* que se han mantenido en el medio de Phillips y Collins (PC) pH 5.5, adicionado con 25 g/L de sacarosa y 1.5 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) y 0.5 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP) (Carrillo-Pech, 2006). A partir de estos cultivos, se indujeron las suspensiones celulares en medio líquido PC pH 5.8, con las mismas concentraciones de sacarosa y reguladores del crecimiento. Tanto las suspensiones como los callos se han mantenido en el cuarto de cultivo a 25 °C y bajo luz continua de entre 40 y 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lámparas fluorescentes de 39 W), en agitación continua a 100 rpm.

3.2.2. DOSIS-RESPUESTA CON INDUCTORES QUÍMICOS.

Matraces con aproximadamente 1.5 g de células (5 ml de la suspensión celular) en 50 mL de medio se incubaron durante 10 días como ya se describió antes de ser expuestos a los inductores probados; MeJa o AS, en diferentes concentraciones (0, 100, 250 y 500 μM). Los cultivos se expusieron durante 24 h a los inductores, antes de cosechar tres matraces de cada tratamiento (ver Figura S6, datos complementarios). Como testigos se tuvieron los cultivos sin inducir y aquellos únicamente recibieron el disolvente en el que preparó el inductor (etanol para MeJa o agua para AS). Estos experimentos permitieron seleccionar las dosis de los diferentes inductores para los subsiguientes experimentos.

3.2.3. CURSO TEMPORAL CON INDUCTORES QUÍMICOS.

Inducción individual. Una vez elegida la concentración de los inductores, se evaluó su efecto sobre la suspensión celular en un curso temporal. Para ello, se emplearon cultivos de 10 días a los cuales se adicionaron MeJa, AS o extracto de levadura (200 mg/l). Se cosecharon cinco matraces después 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h de exposición y se evaluó la producción de ABI's y la acumulación de los transcritos de interés.

Además de estas inducciones individuales, se evaluó el efecto que producen al mezclarse en las mismas dosis en un mismo cultivo mediante dos estrategias, la inducción simultánea y la inducción secuencial. La inducción simultánea consistió en la aplicación de los tres inductores (MeJa, SA y extracto de levadura) al mismo tiempo. Todas las demás condiciones, incluyendo los tiempos de exposición, fueron idénticas a las del experimento anterior. Por su parte, la inducción secuencial consistió en la aplicación de los inductores con 24 h de diferencia entre cada uno, comenzando con MeJa, seguido por el SA y finalmente el extracto de levadura. Se evaluó su efecto sobre la producción de alcaloides y la expresión de los genes de interés, a lo largo de un curso temporal de 120 h posteriores a la aplicación del primer inductor.

3.2.4. EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES.

Para la extracción de alcaloides se pesaron 200 mg de tejido liofilizado y se agregaron 10 ml de ácido clorhídrico 0.5% en metanol (v/v) que se mezclaron utilizando el politrón. La mezcla se incubó durante 2 h a 50° C, se centrifugó para eliminar los restos de tejido y el extracto, en volúmenes de 1.5 mL, se distribuyó entre tres tubos de microcentrífuga que se centrifugaron durante 20 min a 15,000 x g, se separó el sobrenadante y se redujo a sequedad en el evaporador con vacío a 50° C. El residuo se suspendió en 100 µl de metanol grado HPLC.

La separación de los alcaloides se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD) usando placas de gel de sílice con un sistema benceno: etanol (9:1) aplicando de 1 a 2 µl del extracto. Los alcaloides se detectaron por autofluorescencia y para su identificación se utilizaron estándares comerciales. La cuantificación se realizó por autofluorescencia

in situ, mediante el método del estándar externo y utilizando un densitómetro Shimadzu CS-930 equipado con un graficador DR-2.

3.2.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A PCR (RT-PCR).

Los análisis de expresión de la TyDC y la PPO se realizaron mediante la amplificación de los ADNc por PCR (RT-PCR). La obtención de ADNc de cadena sencilla se llevó a cabo a partir de 5 µg de ARN total, utilizando 10 µM de oligo-d(T) y 10 U/µL de transcriptasa reversa (M.MLV; invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para amplificar los retrotranscritos de interés se utilizaron oligonucleótidos iniciadores específicos (Cuadro 3.1). Para la TyDC, la reacción de amplificación consistió en 30 ciclos de un min cada uno a 94 °C para la desnaturalización del ADN; a 53 °C para alineación de los cebadores y a 72 °C para la amplificación. Para la PPO la reacción consistió en 30 ciclos de un minuto cada uno a 94 °C para la desnaturalización del ADN; a 50 °C para alineación de los cebadores; y a 72 °C para la amplificación. Finalmente para NCS y BBE, el programa consistió en 30 ciclos, de 30 segundos cada uno, a 94 °C para la desnaturalización del ADN, a 65 °C para alineación de los cebadores y de un minuto a 72 °C para la amplificación. En todos los casos se incluyó un ciclo inicial de 3 minutos a 94 °C y uno final de 10 minutos a 72 °C. Los amplicones obtenidos se separaron por electroforesis en geles de 1.0% agarosa en TAE. Para verificar la integridad del ADNc, y como control para la amplificación, se amplificaron fragmentos de un gen de expresión constitutiva (actina).

3.2.6. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

La localización de los sitios de acumulación de los alcaloides en las células *in vitro*, se realizó por microscopía de luz visible utilizando un aparato Axioplan II y la autofluorescencia de los alcaloides tipo benzofenantridina fue detectada con filtros Zeiss Filter (Exc. 470 nm, Em. 520). Las fotomicrografías se capturaron con la cámara AxioCam Mod. MRm y las imágenes fueron procesadas con el paquete Axiovisión 3.1, asociado a la cámara.

Cuadro 3.1. Cebadores empleados para la amplificación del ADNc parcial de los genes en estudio en suspensiones celulares de Argemone mexicana.

Cebador	Secuencias 5' → 3'	Producto (pb)
AmTyDC	F-GTTGAACCAGGTTATTTACG	679
	R-CGTATTCTTTGCAACCTC	
AmNCS1	F-GAGGGCAATGGTGGTGTGG	423
	R-GTAGTACATGGAATTACCTGGATGGG	
AmNCS2	F-GTTGAACCAGGTTATTTACG	541
	R-CAGTAAACCTCCGAGAATAACCAAAC	
AmBBE1	F-CATCTTTGTTTCATCATCATCTTCTTCTTCT	561
	R-ATCGGCTGCGAGACCGTATTT	
AmBBE2	F-CTCATCTTTGTTTCATCTTCTTTTCTGTGC	549
	R-ATCGGCTGCGAGACCGTATTT	
AmPPO	F-CGTCAAGCTATTATGCAC	998
	R- CCATAAACAACCAAACC	
ACT	F-CACIACTACTGCTAAACGGGAAA	467
	R-ACATCTGCTGGAAGGTGCTG	

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR DE *A. mexicana*.

En cultivos de *E. californica* y *P. somniferum*, los transcritos correspondientes a la TyDC, BBE y CYP80B1 se acumulan en respuesta al tratamiento con inductores del metabolismo secundario. Esta inducción coincide con la acumulación de sanguinarina (Facchini et al., 1996; Park et al., 1999; Huang & Kutchan, 2000). Hasta el momento únicamente se dispone de los ADNc correspondientes a cuatro enzimas involucradas en la síntesis de ABI's de *A. mexicana*; TyDC, NCS, BBE y PPO. La naturaleza silvestre y estacional de esta especie limita la disponibilidad de material biológico además de que no permite el mantenimiento en condiciones controladas de las plantas. Por ello, se decidió iniciar el estudio de la posible regulación transcripcional de estos genes empleando suspensiones celulares *in vitro*. Para esto, se generó una suspensión a partir de callos obtenidos de hojas jóvenes de *A. mexicana*. Esta línea, denominada AmMv fue caracterizada en cuanto a su crecimiento y producción de alcaloides a lo largo de un ciclo de cultivo de 32 días (Fig. 3.2).

El cultivo alcanzó su fase de crecimiento lineal después de 10 días, con una máxima acumulación de peso fresco de aproximadamente 20 g, equivalente a un índice de crecimiento de 12.3 (Fig. 3.2A). Si bien la fase estacionaria comenzó a los 22 días (Fig. 3.2), la acumulación de biomasa, estimadas como materia seca, ocurrió solamente hasta los 16 días (datos complementarios Fig. S7). De este modo, es posible que a partir de ese día las células hayan crecido principalmente debido a la toma de agua.

La línea AmMv es productora de sanguinarina, una benzofenantridina, siendo éste el alcaloide mayoritario (Fig. 3.2.B). Cantidades significativas de este alcaloide se observaron a lo largo de todo el ciclo de cultivo, lo que difiere de lo reportado en cultivos *in vitro* de otras especies como *E. californica* o *P. somniferum* en las que este alcaloide no se produce en condiciones basales y únicamente se acumula en respuesta a algún tipo de estrés (Roos et al., 2006, Alcántara et al., 2005).

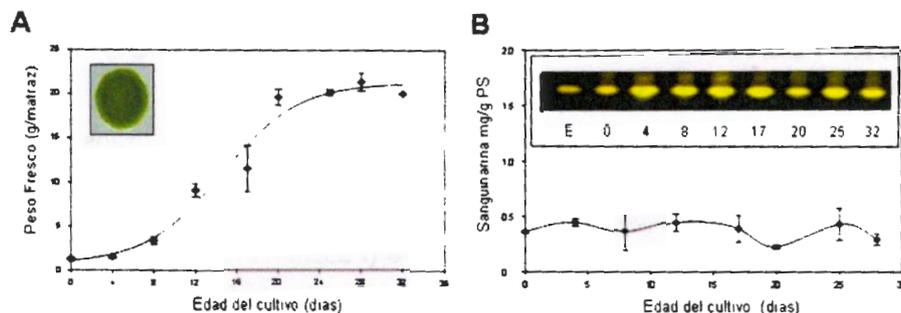


Figura 3.2. Caracterización de la suspensión celular AmMv. A) Crecimiento del cultivo medido en peso fresco (g/matraz) B) Producción de sanguinarina, un alcaloide bencilisoquinolínico del tipo benzofenantridina, detectado durante todo el ciclo de cultivo. Promedio de tres repeticiones con la desviación estándar.

Debido a que la línea AmMv, produce este alcaloide en condiciones normales de mantenimiento, se evaluaron varios métodos de inducción con el fin de aumentar estos niveles, y así establecer un sistema de contraste. Para esto se emplearon tres inductores y se evaluó su efecto sobre el cultivo mediante tres estrategias, la inducción individual, simultánea y secuencial (Cho et al., 2008b).

3.3.2. INDUCCIÓN INDIVIDUAL.

Esta estrategia consiste en retar a los cultivos celulares con un inductor a la vez, a lo largo de un curso temporal de 120 h. Se utilizaron MeJa y SA, ambos en una concentración de 100 μ M, y extracto de levadura (Sigma) en un concentración de 0.2 g/L. La Figura 3.3 muestra el efecto de los diferentes inductores sobre la acumulación de sanguinarina, así como el aspecto de los cultivos expuestos a los diferentes tratamientos al finalizar el curso temporal.

En *Taxus canadensis* (Hefner et al., 1998), *Catharanthus roseus* (Lee-Parsons et al., 2004) y *E. californica* (Färber et al., 2003) la exposición a MeJa induce genes de defensa, así como la acumulación de metabolitos secundarios. Sin embargo, en la línea AmMv tratada con este inductor, el contenido de sanguinarina solo aumentó de manera ligera en comparación con los controles (Fig. 3.3A). Esto difiere de en otras especies, en las que

este tratamiento resulta en incrementos mayores a 10 veces (Farber et al., 2003).

Por su parte, en los cultivos de *A. mexicana* expuestos al ácido salicílico (SA) se observó el desarrollo de una coloración café (Fig 3.3B). No obstante, el contenido de sanguinarina fue similar al encontrado en los testigos (Fig. 3.3A). De este modo, es probable que el SA induzca una respuesta de defensa, diferente a la acumulación de alcaloides, lo que provocó los cambios en la apariencia del cultivo. Finalmente, el extracto de levadura (YE: por los términos en inglés *yeast extract*) también provocó cambios visibles en los cultivos, los cuales paulatinamente adquirieron una coloración rojiza. Esta coloración probablemente estuvo asociada con la producción de benzofenantridinas, pues se observó un incremento gradual en el contenido de sanguinarina que alcanzó valores de 108 mg/l de cultivo después de 120 h de exposición (Fig. 3.3A). Este resultado es similar al observado en cultivos de *E. californica* sometidos al mismo tratamiento (Cho et al., 2008a). De este modo, este último inductor resultó ser el más efectivo. Sin embargo, se debe considerar que, a diferencia del MeJa y el SA que son compuestos puros, el extracto de levadura contiene una mezcla de diferentes compuestos. En *E. californica* se ha evaluado de manera independiente el efecto de algunos componentes del extracto de levadura. De éstos, únicamente la quitina indujo la acumulación de sanguinarina, mientras que los demás solo inducen la acumulación de los intermediarios previos como la dihidrosanguinarina (Cho et al., 2008a).

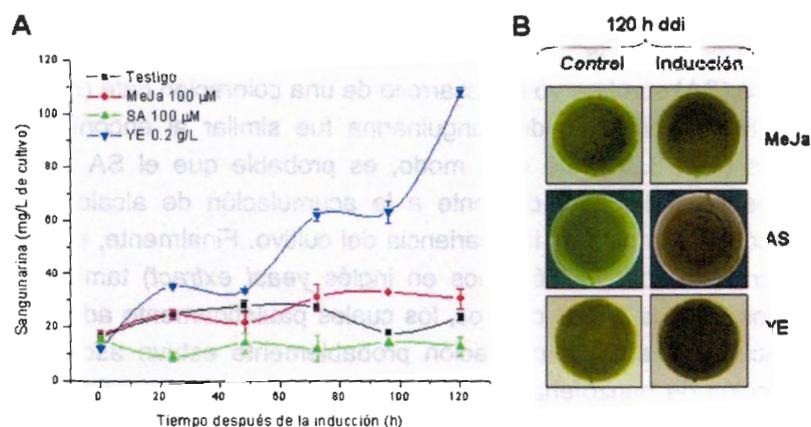


Figura 3.3. Respuesta de los cultivos a la Inducción individual. A) Efecto de los inductores sobre la producción de sanguinarina en los cultivos celulares de *A. mexicana*. Promedio de tres repeticiones con la desviación estándar. B) Cambios observados en la apariencia de los cultivos en respuesta a los inductores aplicados. MeJa, Jasmonato de metilo; AS, ácido salicílico; YE, extracto de levadura.

Se debe hacer notar que, si bien la aplicación de MeJa solo produjo un ligero aumento en la acumulación de sanguinarina, la vía de síntesis de este compuesto se mantuvo activa en presencia del inductor, manteniéndose el aspecto de los cultivos similar al de los testigos. Esto contrasta con lo observado en los cultivos tratados con SA, en los que se detectó un oscurecimiento, posiblemente debido a la acumulación de melaninas, las cuales pueden formarse a partir de varios fenoles, entre ellos, la tirosina, DOPA, dopamina y tiramina que son intermediarios de la biosíntesis de los ABI's. En este caso, el tratamiento con SA podría favorecer la desviación de intermediarios comunes en la síntesis de alcaloides y de fenoles hacia la formación de quinonas. En general, el SA dispara la expresión de genes relacionados a la patogénesis (PR) (Heil & Bostock 2002), pero también induce la expresión de las polifenol oxidasas (PPO's; Thipyapong & Steffens, 1997), enzimas que aunque pueden catalizar la formación de DOPA y dopamina (Gandia-Herrero et al., 2005), también pueden participar en su oxidación, debido a su doble actividad, formando quinonas que se polimerizan para formar melanina (Negrel et al.,

1993). En este sentido, de manera general estas enzimas se asocian con el oscurecimiento de tejidos vegetales (Mayer, 2006; Selinheimo et al., 2007). Sin embargo, dado que la actividad de PPO es necesaria para la síntesis de ABI's, el análisis de su expresión en paralelo con la de TyDC, NCS y BBE en los cultivos inducidos podría revelar alguna relación entre la activación de estos genes y su efecto sobre la biosíntesis de los ABI's.

3.3.2.1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON MeJa, SA Y YE.

La expresión de algunos de los genes involucrados en la síntesis de los ABI's se monitoreó mediante RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos iniciadores indicados en el Cuadro 3.1. Además de la expresión de la TyDC y la PPO, se siguió la acumulación de los transcritos correspondientes a las dos isoformas de la NCS y de la BBE (Rubio-Piña, 2009). Como control de la amplificación se incluyó actina, un gen de expresión constitutiva. Los resultados se muestran en la Figura 3.4.

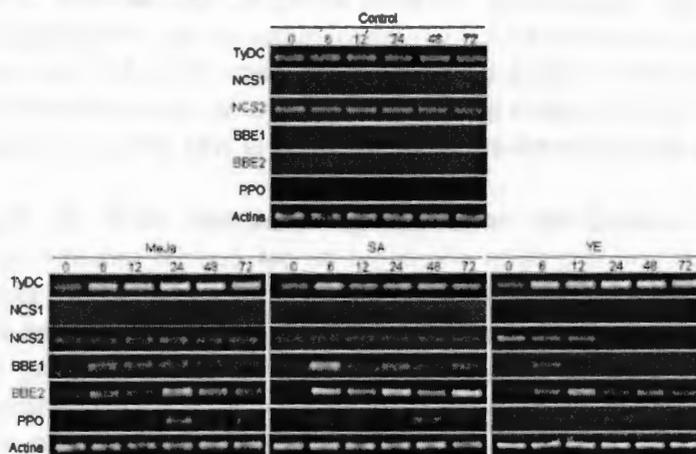


Figura 3.4. Efecto de la inducción individual sobre la expresión de los transcritos. Control: Cultivos sin tratamiento, MeJa: Cultivos expuestos a 100 μ M de metil jasmonato, SA: Cultivos expuestos a 100 μ M de ácido salicílico, YE: Cultivos expuestos a 0.2 g/L de extracto de levadura (yeast extract, SIGMA). TyDC: tirosina descarboxilasa NCS: norcoclaurina sintasa, BBE: enzima formadora del puente de berberina, PPO: polifenol oxidasa. La expresión se evaluó durante las primeras 72 h del curso temporal. La actina se usó como control de carga y amplificación.

De manera general, es de llamar la atención que el patrón de acumulación de los transcritos analizados en las suspensiones celulares retadas con los diferentes inductores, es muy parecido a pesar de las diferencias en la acumulación de alcaloides que dichos tratamientos ocasionaron (Figs. 3.3; 3.4). Solamente los transcritos correspondientes a la TyDC se pudieron detectar a lo largo del todo el experimento, independientemente de la condición del cultivo (Fig. 3.4). No obstante, la exposición a cualquiera de los inductores resultó en un ligero aumento en los niveles, que se pudo observar dentro de las primeras seis horas de exposición (Fig. 3.4), independientemente del efecto sobre la acumulación de alcaloides (Fig. 3.3). Posteriormente, solamente en los tratamientos con MeJa y YE se mantuvieron estos niveles de expresión hasta el final del experimento (Fig. 3.4). Por su lado, la expresión de la PPO (que podría utilizar a la tirosina como sustrato) se mantuvo debajo de los límites de la detección en los cultivos control y ninguno de los tratamientos tuvo un efecto importante (Fig. 3.4). Se debe hacer notar que la baja expresión de la PPO en las suspensiones celulares contrasta con los altos niveles de transcritos observados en los diferentes tejidos de las plantas (Capítulo 2). Aunque el papel de estas enzimas en la producción de ABI's ha sido poco estudiado, se ha sugerido que podrían participar en la formación de DOPA y dopamina, dos intermediarios tempranos de la ruta (Bilková & Bezáková, 2005).

Es interesante notar que las presuntas NCS de *Argemone* presentaron una expresión diferencial en los cultivos mantenidos en las condiciones control, ya que mientras la NCS1 no se detectó a lo largo de todo el experimento, niveles bajos, pero constantes, se pudieron observar para NCS2 (Fig. 3.4). De los tratamientos aplicados, ninguno logró la inducción de NCS1, mientras que la expresión de NCS2 se mantuvo en los mismos niveles que en los cultivos no expuestos, tanto con MeJa como con SA (Fig. 3.4). Sin embargo, la exposición al extracto de levadura, que produjo la máxima acumulación de alcaloides, ocasionó la desaparición del transcrito después de 24 h (Fig. 3.4).

En cuanto a las distintas BBE, ninguna de las dos presuntas isoformas se acumularon en niveles detectables en los cultivos no expuestos (Fig. 3.4). El tratamiento con MeJa provocó un incremento de la expresión de BBE1 entre 6 y 24 h de exposición, disminuyendo después, al

igual que lo observado en los cultivos expuestos a SA (Fig. 3.4). Por su parte, la expresión de la BBE2 se indujo más lentamente, pero a niveles mayores que la BBE1, alcanzando un máximo a las 24 h para luego disminuir, pero siempre en niveles detectables (Fig. 3.4). Finalmente, en los cultivos expuestos al extracto de levadura, en los que se presentó la máxima acumulación de alcaloides (Fig. 3.3), los transcritos correspondientes a las BBE aumentaron ligeramente y de manera transitoria (Fig. 3.4).

En suspensiones de *P. somniferum* la expresión de ambas familias génicas de la TYDC (TYDC1 y TYDC2) aumentó en respuesta a la aplicación de homogenados de *Botrytis cinerea* y de MeJa. No obstante, aunque la acumulación de los transcritos siguió el mismo patrón, el tratamiento con MeJa no provocó la acumulación de sanguinarina, a diferencia del homogenado fúngico (Facchini et al., 1996). El aumento de sanguinarina en respuesta a un homogenado fúngico, también coincidió con un notable incremento en la actividad de la PPO (Balažová et al., 2002). Sin embargo, no se analizó el efecto del homogenado sobre la expresión génica de estas enzimas. Conviene mencionar que este trabajo constituye uno de los primeros estudios a nivel transcripcional sobre las PPO's en plantas productoras de ABI's.

Los bajos niveles de transcritos para las NCS de *Argemone*, aún en las condiciones que aumentaron la producción de sanguinarina, como la exposición al extracto de levadura (Fig. 3.3 y 3.4), sugieren que estos niveles son suficientes para sostener la síntesis de este alcaloide y abren la posibilidad de la participación de un mecanismo de regulación post-transcripcional. Se ha reportado que la forma activa de la NCS en *T. flavum* es un dímero que puede estar constituido por un mismo tipo de polipéptido o bien, por dos distintos (Samanani & Facchini., 2002). De este modo, la formación del dímero activo podría representar un punto de regulación, como ocurre para la TDC de *C. roseus* (Fernández et al., 1989). Más aún, la dopamina, uno de los sustratos de esta enzima, está localizada en la vacuola (Kutchan et al., 1986), mientras que la enzima está unida al lumen del retículo endoplásmico (Samanani et al., 2004). Esto sugiere que el tráfico subcelular de la dopamina podría representar un nivel de regulación adicional. Estas observaciones, en conjunto con los resultados obtenidos, hacen posible sugerir que la regulación de la formación de la norcoclaurina

ocurra a un nivel diferente del transcripcional, posiblemente post-transcripcional, traduccional o post-traduccional.

Por otro lado, la inducción de la BBE1 y TyDC en respuesta al mismo estímulo también se observó en cultivos de *P. somniferum* expuestos a un homogenado fúngico. No obstante, en éstos tanto TyDC como BBE presentaron incrementos en la misma magnitud (Facchini & Park, 2003), a diferencia de lo observado en *Argemone* (Fig. 3.4). La exposición a MeJa también indujo la acumulación de transcritos correspondientes a la BBE en *P. somniferum*, que alcanzaron un máximo entre las 10 y 30 h de tratamiento (Facchini et al., 1996). Este patrón se asemeja a lo observado en los cultivos de *A. mexicana* (Fig. 3.4). Finalmente, se debe hacer notar que a diferencia del menor efecto del AS sobre la expresión de la TyDC, este inductor provocó un mayor efecto sobre la expresión de los genes de ambas BBE (Fig. 3.4).

La exposición de los cultivos a esta clase de estímulos se ha desarrollado para simular el ataque de patógenos a las células vegetales que, en una respuesta de defensa, podrían incrementar la producción de los ABI's (Kutchan, 2001). Parte de esta respuesta involucra la participación de moléculas señalizadoras. Existen al menos dos principales rutas de señalización; en una de ellas participan los jasmonatos, que disparan respuestas contra herbívoros, mientras que en la otra participa el SA, que está involucrado en la resistencia contra patógenos (Heil & Bostock, 2002). La aplicación exógena de MeJa se ha empleado en varios estudios relacionados con la biosíntesis de los ABI's (Facchini et al., 1996a,b), provocando la inducción de algunos genes involucrados en la ruta. Por otro lado, se conoce relativamente poco acerca del efecto de los salicilatos sobre la biosíntesis de fitoalexinas y particularmente sobre la producción de los ABI's. En células de *S. canadensis* tratadas con ácido acetil salicílico (ASA) se observó un incremento en la actividad específica de la dihidrobenzofenantridina oxidasa (DHBP), que cataliza el último paso en la biosíntesis de sanguinarina sin que la actividad total se viera alterada (Ignatov et al., 1996). Esto sugiere que este compuesto no está involucrado en la activación de esta enzima. Sin embargo, en los cultivos de *A. mexicana*, la exposición a SA provocó un incremento en la acumulación de los transcritos de la BBE, lo cual sugiere una posible participación, si bien no es posible establecer a que nivel.

Por otra parte, el extracto de levadura se ha empleado de manera exitosa para inducir el metabolismo secundario en *E. californica* en los que provocó la acumulación de algunas proteínas, como la 6OMT, NMT, 4'OMT, BBE y DBOX (Cho et al., 2008a). Cabe mencionar que la respuesta de la BBE de *A. mexicana* comparte algunas similitudes con la respuesta en *E. californica*. En los cultivos de *A. mexicana* retados con extracto de levadura se observó un incremento en los mensajeros de esta enzima entre las 6 y 12 h, que disminuyó a las 24 h. Algo similar se ha observado en cultivos de *E. californica*, en los que el aumento del nivel de los transcritos antecede a la acumulación de la proteína (Cho et al., 2008a). De esta manera, es posible sugerir que algo similar ocurrirá en los cultivos de *Argemone*.

3.3.3. INDUCCIÓN SIMULTÁNEA.

La respuesta a la exposición al extracto de levadura fue significativamente mayor que la observada con MeJa o SA (Fig. 3.3). No obstante, en otras especies, como *E. californica* (Cho et al., 2008) y *P. somniferum* (Facchini et al., 1996) el nivel de inducción es aún mayor que la registrada en *Argemone*. Con el fin de aumentar el nivel de la inducción, los estímulos se aplicaron de manera simultánea. Para esto, los cultivos de *A. mexicana* se expusieron a una mezcla con los tres compuestos; MeJa, SA y YE, en las mismas concentraciones (Fig. 3.3). MeJa y el SA regulan de manera independiente y paralela distintas respuestas de defensa que, no obstante, pueden converger en ciertos puntos (Heil & Bostock et al., 2002). Por ello, en ocasiones el empleo combinado de estos inductores produce un efecto sinérgico que podría aún incrementarse con la adición de un tercer inductor, como el extracto de levadura. Este agente, contiene varios compuestos que parecen actuar en diferentes niveles en la ruta de síntesis de los ABI's (Cho et al., 2008a).

El tratamiento simultáneo produjo un incremento considerable en la producción de sanguinarina, respecto al control (Fig. 3.5A). Sin embargo, éste fue menor que con la inducción individual con el extracto de levadura (79 vs 108 mg/l de cultivo; Fig. 3.3 y 3.5A), posiblemente debido al fuerte estrés que representa para el cultivo este tipo de tratamiento. Este resultado difiere de lo que ocurre en cultivos de *S. tuberosum* en los que el uso de múltiples inductores (homogenados fúngicos, con ciclodextrina o MeJa más ciclodextrina) llevó a un incremento en la producción de fitoalexinas

sesquiterpénicas (Komaraiah et al., 2003). No obstante, en *Taxus baccata*, la aplicación individual de MeJa o de citrato de amonio, sí indujo la acumulación de taxol, mientras que la aplicación de ambos no tuvo este efecto (Yuan et al., 2002).

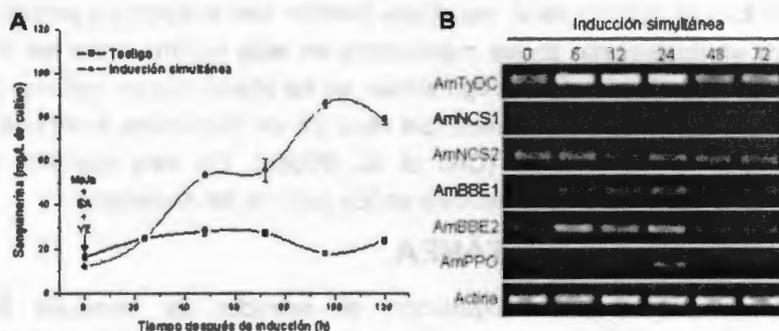


Figura 3.5. Respuesta de los cultivos a la Inducción simultánea. A) Efecto de la aplicación simultánea de MeJa, SA y YE sobre la producción de sanguinarina en cultivos celulares de *A. mexicana*. Promedio de tres repeticiones con desviación estándar. B) Efecto de la aplicación simultánea de MeJa, SA y YE sobre la expresión de los transcritos. TyDC: tirosina descarboxilasa NCS: Norcoclaurina sintasa, BBE: Enzima formadora del puente de berberina, PPO: Polifenol oxidasa. La expresión se evaluó durante las primeras 72 h del curso temporal. La actina se uso como control de carga y amplificación.

El análisis de los transcritos en este experimento se muestra en la Figura 3.5B. Los transcritos correspondientes a la TyDC se acumularon entre las 6 y 24 h de exposición (Fig, 3.5B). Esta respuesta fue menos prolongada que la observada en los cultivos expuestos a MeJa o extracto de levadura, aunque de mayor duración que en aquellos tratados con SA (Fig. 3.4). Por su parte, al igual que las inducciones individuales, este tratamiento no alteró de manera importante la expresión de la NCS y de la PPO (Fig. 3.5B). Los transcritos de la NCS1 no se detectaron a lo largo del experimento, mientras que los correspondientes a la NCS2 se mantuvieron constantes, a excepción de una ligera disminución después las 12 h de exposición (Fig. 3.5B). Por su parte, el perfil de acumulación de los transcritos de la PPO en los cultivos expuestos a este tratamiento fue similar

al observado en aquéllos expuestos individualmente a MeJa o extracto de levadura, ya que solamente se observaron después de 24 h (Fig. 3.5B).

La acumulación de transcritos para la BBE1 fue menor que la de la BBE2, de manera similar a lo observado con las inducciones individuales (Fig. 3.4 y 3.5A). Más aún, en este caso la acumulación de los transcritos correspondientes a ambas BBE ocurrió de manera coordinada (Fig. 3.5B), a diferencia de los tratamientos individuales, en que ésta ocurrió de manera desfasada (Fig. 3.4).

En conjunto, estos resultados sugieren que la inducción simultánea expuso a los cultivos a condiciones muy drásticas, que podrían limitar los recursos que potencialmente se canalizarían a la síntesis de alcaloides. Es interesante hacer notar el efecto diferencial sobre la expresión de los genes analizados. Mientras que TyDC y BBE, aun resultaron sensibles al tratamiento, los transcritos correspondientes a NCS y la PPO se mantuvieron prácticamente en los mismos niveles que en los cultivos no expuestos (Fig. 3.5B).

3.3.4. INDUCCIÓN SECUENCIAL.

La inducción secuencial consiste en la aplicación de varios inductores en intervalos determinados. De esta manera los cultivos de *A. mexicana* fueron retados con MeJa, SA y YE aplicándolos en ese orden con intervalos de 24 h entre cada uno. Las concentraciones utilizadas fueron iguales a las anteriores (Fig. 3.6). Esta estrategia ha sido utilizada en cultivos de *E. californica* (Cho et al., 2008b), después que tratamientos individuales con MeJa y SA, no incrementaron la producción de sanguinarina, pero sí la de su precursor inmediato, la dihidrosanguinarina, mientras que la aplicación del extracto de levadura promovió la conversión de ésta a sanguinarina (Cho et al., 2008a,b).

En *Argemone* este tratamiento ocasionó una respuesta similar a la observada en *E. californica*. La aplicación de MeJa y SA con un intervalo de 24 h modificó ligeramente la producción de sanguinarina, respecto al control (Fig. 3.6). Sin embargo, la aplicación del extracto de levadura 24 h más tarde (esto es 48 h después de la aplicación de MeJa, el primer inductor), disparó la producción de este alcaloide, alcanzando una concentración máxima (190 mg/L de cultivo) a las 96 h de tratamiento (Fig. 3.6). Esto representa un aumento de casi 10 veces el contenido de la sanguinarina en

los cultivos en condiciones de mantenimiento. De este modo, la inducción secuencial de los cultivos de *A. mexicana* representa la mejor estrategia de inducción y podría ser una útil herramienta para el estudio de la regulación de esta ruta de síntesis.

En general, este tratamiento indujo la acumulación de los transcritos correspondientes a la TyDC, BBE y PPO, así como un descenso temporal de la expresión de la NCS2 (Fig. 3.6B). Así, 6 h después de la aplicación de MeJa, esto es antes de la exposición a los otros inductores, se observó una acumulación de los transcritos de la TyDC que se mantuvo hasta las 48 h (Fig. 3.6B). La aplicación del extracto de levadura ocasionó una acumulación mayor de los transcritos a las 6 h (esto es 54 h después de haber iniciado el experimento), que se mantuvo hasta las 72 h (Fig. 3.6B). Al igual que lo previamente observado, no se detectó la acumulación de los transcritos correspondientes a la NCS1, en contraste con la NCS2, cuyos transcritos se observaron en niveles constantes a lo largo del experimento (Fig. 3.6B). Por su parte, la acumulación de los transcritos de la PPO presentó fluctuaciones a lo largo del experimento pero manteniéndose siempre en niveles bajos (Fig. 3.6B). Por su parte, los transcritos correspondientes a la BBE1 también se detectaron en niveles bajos y hacia el final del experimento (Fig. 3.6B). Es interesante notar que tanto en las inducciones individuales (Fig. 3.4), como en el tratamiento múltiple (Fig. 3.5B), siempre se observaron niveles bajos de expresión de BBE1, lo que contrasta con la expresión de BBE2, que aumentó en respuesta al tratamiento secuencial, pero sin mostrar un patrón definido a lo largo del experimento, a diferencia de los tratamientos individuales (Fig. 3.4) o múltiple simultáneo (Fig. 3.5B).

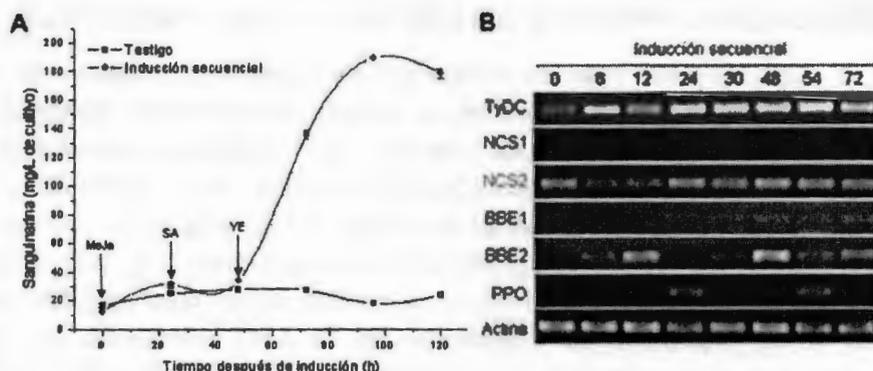


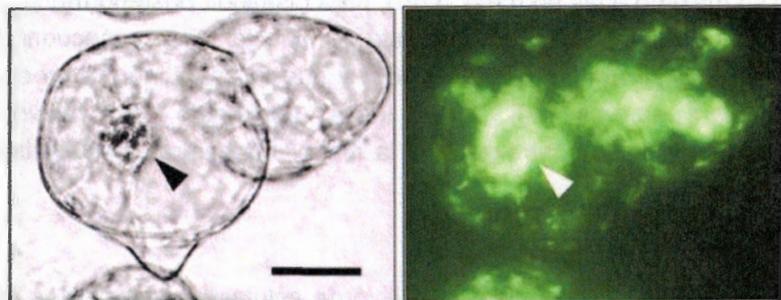
Figura 3.6. Respuesta de los cultivos a la inducción secuencial. A) Efecto de la aplicación secuencial de MeJa, SA y YE sobre la producción de sanguinarina en cultivos celulares de *A. mexicana*. Promedio de tres repeticiones con desviación estándar B) Efecto de la aplicación secuencial de MeJa, SA y YE sobre la expresión de los transcritos. TyDC: tirosina descarboxilasa NCS: Norcoclaurina sintasa, BBE: Enzima formadora del puente de berberina, PPO: Polifenol oxidasa. La expresión se evaluó durante las primeras 72 h del curso temporal. La actina se uso como control de carga y amplificación.

En cultivos de *E. californica* sometidos a una inducción secuencial, la acumulación de la proteína BBE aumentó ligeramente durante las 72 h de exposición (Cho et al., 2008). Al no evaluar la respuesta de los cultivos a nivel de proteínas, solo podemos sugerir que las fluctuaciones de los transcritos para la BBE en *A. mexicana* se relacionan con un recambio de éstos, posterior a su traducción en proteínas.

En conjunto estos datos muestran que, a pesar del efecto positivo de la aplicación secuencial de los inductores sobre la acumulación de sanguinarina, la respuesta a nivel transcripcional (Fig. 3.6) no fue muy distinta en magnitud a la de los cultivos sometidos a las anteriores estrategias (Figs. 3.4 y 3.5). La inducción transcripcional de TyDC y BBE, sugieren su participación como puntos de regulación; sin embargo, debido a su posición en la ruta de síntesis, distante a la última etapa de la formación de sanguinarina (Fig 1.5 y 1.7), es probable que existan otros puntos de regulación, cuya inducción provoque el resultado observado.

3.3.5. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE BENZOFENANTRIDINAS EN LOS CULTIVOS CELULARES.

Los ABI's son potentes toxinas que participan en la defensa contra patógenos y herbívoros. No obstante, su carácter tóxico también representa un riesgo para las células que los producen, por lo que éstas necesitan de un mecanismo de detoxificación (Deus-Neumann & Zenk, 1984). En *A. mexicana* la inducción secuencial con MeJa, SA y extracto de levadura provocó un incremento en la producción de sanguinarina (Fig. 3.6). Este alcaloide es una benzofenantridina de estructura planar, cuya toxicidad se debe a su capacidad de intercalarse en el ADN, inhibiendo así la transcripción y la replicación (Bashmakova et al., 2009). Más aun, este alcaloide puede reaccionar con grupos SH, interfiriendo con un gran número de proteínas citosólicas y membranales (Weiss et al., 2006). Estas moléculas presentan una fluorescencia típica debido a la presencia de átomos de nitrógeno que pueden ser protonados (Janovská et al., 2009). Esta característica permite su localización intracelular por microscopia, utilizando las combinaciones de filtros apropiadas (excitación 470 nm/emisión 520 nm). Por ello, se analizó la distribución de la fluorescencia de este alcaloide en cultivos de *A. mexicana* en condiciones de inducción (Fig. 3.7). Las imágenes muestran zonas de fluorescencia rodeando el núcleo, que resaltan sobre un fondo verde. Esto sugiere que estos alcaloides posiblemente están presentes en el retículo endoplásmico, rodeando al núcleo en su totalidad (Fig. 3.7), de manera similar a lo que se ha observado en cultivos de *P. somniferum*. En estos cultivos, las proteínas de la BBE y CYP80B1 (enzima que cataliza una reacción previa a la BBE), sedimentan junto con la sanguinarina, en fracciones subcelulares que corresponden al retículo endoplásmico (Alcantara et al., 2005), que es el sitio probable donde termina el proceso de síntesis de este alcaloide.



Luz visible

Exc. 470 nm / Em. 520 nm

Figura 3.7. Localización a nivel celular de los alcaloides tipo benzofenantridina. Se emplearon cultivos celulares de *A. mexicana* sometidos a la inducción secuencial. Izquierda: Células observadas bajo luz visible. Derecha: Autofluorescencia de alcaloides tipo benzofenantridina detectada con filtros Zeiss Filter (Exc. BP = 470/40 nm, FT = 510 nm, Em. LP = 520 nm). Cabeza de flecha: núcleo. Barra: 25 μ m.

También se detectaron pequeñas zonas discretas, dispersas en el citoplasma (Fig. 3.7), que podrían corresponder a vesículas membranosas, que forman parte de un mecanismo de aislamiento y expulsión de los alcaloides (Sirikantaramas et al., 2008). Es conveniente mencionar que de la máxima producción de sanguinarina en estos cultivos (190 mg/l de cultivo), alrededor del 11 % se recupera del medio de cultivo. De este modo, es posible que un mecanismo de compartimentación y excreción de los alcaloides esté operando en los cultivos de *A. mexicana* expuestos a condiciones de inducción.

No obstante, además del transporte vesicular y excreción, las células emplean diversas estrategias para evitar los efectos tóxicos de los compuestos que ella misma produce. Algunos de estos mecanismos incluyen que las etapas finales de la biosíntesis ocurran en el espacio extracelular, el almacenamiento en la vacuola, la acumulación de formas no tóxicas y la detoxificación enzimática (Sirikantaramas et al., 2008). Este último mecanismo es, al parecer común en cultivos de *E. californica*, los cuales toman rápidamente la sanguinarina adicionada al medio de cultivo para transformarla en dihidrosanguinarina (Weiss et al., 2006). En la suspensión celular de *A. mexicana* sometida a la inducción secuencial, se observó un rápido incremento en el contenido de sanguinarina, el cual

alcanzó su máximo a las 96 h (fig. 3.6A), para disminuir posteriormente (Fig. 3.6A). De este modo, es posible que esta disminución sea consecuencia de un mecanismo similar de detoxificación, y que la sanguinarina producida durante las primeras 96 h se haya convertido de nuevo en dihidrosanguinarina, lo cual explicaría la menor concentración detectada a las 120 h (Fig. 3.6A).

3.3.6. CONCLUSIONES

Se obtuvo y caracterizó un cultivo de células en suspensión de *A. mexicana*, con capacidad para producir alcaloides bencilisoquinolínicos del tipo benzofenantridina (Fig. 3.2.). Debido a que este cultivo respondió a estímulos externos modificando su producción de alcaloides representa una herramienta útil para el estudio de esta ruta.

Los cultivos respondieron de manera diferente, dependiendo de la forma en que se aplicaron los inductores (Fig. 3.4; 3.5 y 3.6). La aplicación individual produjo la activación transcripcional de algunos genes involucrados en la primera etapa de la biosíntesis de los ABI's (Figs. 3.4; 3.5 y 3.6). Si bien ésta parece una respuesta general a los diferentes estímulos, no en todos los casos se tradujo en un aumento en la acumulación de estos alcaloides, ya que únicamente el extracto de levadura logró incrementarla de manera considerable (Fig. 3.4). El patrón de acumulación de los transcritos de la TyDC en respuesta al tratamiento con el MeJa fue similar al observada en los cultivos tratados con extracto de levadura, aún cuando el primero no provocó un incremento en la producción de sanguinarina (Fig. 3.4). Esto sugiere la participación de los jasmonatos en la señalización de las respuestas de defensa provocadas por extractos fúngicos. Por su parte, los transcritos de la BBE también se acumularon en respuesta a los diferentes estímulos, aunque siguiendo una cinética diferente para cada uno de ellos (Fig. 3.4). La activación transcripcional de la BBE en respuesta al SA representa el primer estudio del efecto de los salicilatos sobre la regulación de la síntesis de los ABI's a este nivel y sugiere que la participación de éstos en la inducción de esta ruta. Por otra parte, los tres inductores provocaron un ligero incremento en la acumulación de los transcritos de la PPO (Fig. 3.4). De esta manera, al no detectarse una correlación entre el cambio de coloración del cultivo retado con SA y la acumulación de los transcritos correspondientes a la PPO, no es posible

establecer alguna relación entre el oscurecimiento de los cultivos y la activación de la PPO. Sin embargo, la acumulación de los transcritos de la PPO, aunque ligera, podría relacionarse con un mecanismo de defensa activado por los mismos estímulos que la biosíntesis de los ABI's. Los factores que determinan la participación de estas enzimas en la formación de los intermediarios para la síntesis de alcaloides o de otros productos, como quinonas, no ha sido identificado.

Finalmente, ninguna de las dos NCS de *A. mexicana*, resultó activada a nivel transcripcional (Figs. 3.4; 3.5 y 3.6). Sin embargo, debido a que las enzimas codificadas por estos genes, catalizan la formación de los primeros intermediarios de la ruta, es probable que sean susceptibles a otro tipo de regulación (regulación post-transcripcional, traduccional y post-traduccional).

Por su parte, en los cultivos expuestos a la inducción simultánea, revelaron que aún cuando el SA produjo la mayor acumulación de transcritos de la BBE, mientras que MeJa lo hizo con la TyDC, la aplicación de estos dos inductores al mismo tiempo que el extracto de levadura provocó un incremento en la acumulación de alcaloides similar al observado con la inducción individual con levadura (Fig. 3.5). Sin embargo, la inducción secuencial, demostró que estos inductores pueden tener un efecto sinérgico sobre la producción de sanguinarina, cuando son aplicados en intervalos adecuados (Fig. 3.6). El mecanismo por el cual la preincubación de los cultivos con MeJa y SA, seguida de la aplicación del extracto de levadura, potencia la acumulación de sanguinarina, aún no se conoce. Sin embargo, estos inductores al parecer activan pasos iniciales de la ruta de síntesis que permiten la acumulación de los precursores, los cuales al estar disponibles, son rápidamente convertidos en sanguinarina en presencia del extracto de levadura (Cho et al., 2008). El análisis de la expresión en los cultivos sometidos a estas dos últimas estrategias reveló que, a pesar de que la inducción secuencial provocó un mayor incremento en la producción de sanguinarina, el efecto sobre la acumulación de los transcritos fue similar a los tratamientos que llevaron a una menor acumulación (Figs. 3.4; 3.5 y 3.6). Esto sugiere que el sinergismo provocado por los inductores no se basa en la inducción de estos genes.

Finalmente, el análisis microscópico de las células del cultivo sometido a la inducción secuencial sugiere la acumulación de sanguinarina

en el retículo endoplásmico y en pequeñas vesículas dispersas en el citoplasma que podrían formar parte del mecanismo por el cual, las células expulsan estos alcaloides al medio de cultivo.

3.4. REFERENCIAS

Alcantara J., D.A. Bird, R.F. Vincent and P.J. Facchini (2005). Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiology*, 138, 173-183.

Ahmad, N., S. Gupta, M.M. Husain, K.M. Heiskanen and H. Mukhtar (2000) Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research*, 6, 1524–1528.

Armstrong S.C. and K.L. Cozza (2003), *Pharmacokinetic Drug Interactions of Morphine, Codeine, and Their Derivatives: Theory and Clinical Reality, Part I. Psychosomatics Vol. 44*, pp.167-171.

Balažová, A., F. Bilka, V. Blanárikova and M. Psenák (2002). Effect of a fungal elicitor on levels of sanguinarine and polyphenoloxidase activity in a suspension culture of *Papaver somniferum* L. *Česká Slovenská Farmacie*, 51 (4) 182-185.

Bashmakova, N., S. Kutovyy, V. Yashchul, D. Hovorun, M. Losytskyy and L. Zaika (2009). Optical spectroscopy studies of the interaction between a number of plant alkaloids and the DNA double helix in an aqueous solution. *Ukrainian Journal of Physics*, 54 (5) 471-479.

Bilková, A., F. Bilka and L. Bezáková (2005). Enzymology of production of benzyloquinoline alkaloids. *Česká Slovenská Farmacie*, 54, 17-22.

Capasso, A., R. Aquino, N. De Tomáis. S. Piacente, L. Rastrelli and C. Pizza (2002). Neuropharmacology activity of alkaloids from South American medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry - Central Nervous Systems Agents*, 2, 1-15.

Carrillo-Pech, M.R. (2006). Regulación de la síntesis de los alcaloides en cultivos in Vitro de *Argemone mexicana*. Centro de Investigación científica de Yucatán A.C. Tesis de Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas.

Cho, H.Y., H.S. Rhee, S.Y. Yoon, J.M. Park (2008a). Differential induction of protein expression and benzophenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholtzia californica* suspension cultures by methyl jasmonate and yeast extract. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 18 (2), 255–262.

Cho, H.Y., S.Y. Son, H.S. Rhee, S.Y. Yoon, C.W. Lee-Parsons and J.M. Park (2008b). Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 135, 117-122.

Coquoz, J.L., A. Buchala and J.P. Métraux (1998). The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiology*, 117, 1095-1101.

Deus-Neumann, B. and M.H. Zenk (1984). A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta*, 162, 250-260.

Dittrich, H. and T.M. Kutchan (1991). Molecular cloning, expression and induction of berberine bridge enzyme, and enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogen attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 9969-9973.

Facchini, J.F. and Park S.U (2003). Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 64, 177-186.

Facchini, P.J., A.G. Johnson, J. Poupart and V. De Luca (1996a). Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiology*, 111, 687-697.

Facchini, P.J., C. Penzes, A.G. Johnson and D. Bull (1996b). Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiology*, 112, 1669-1677.

Färber, K., B. Schumann, O. Miersch and W. Roos (2003). Selective desensitization of jasmonate and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholtzia californica*. *Phytochemistry*, 62, 491-500.

Fernández, J.A., W.G.W. Kurz and V. De Luca (1989). Conformation-dependent inactivation of tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus*. *Biochem Cell Biology*, 67, 730-734.

Feussner I. and C. Wasternack (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 275-297.

Gandía-Herrero, F., J. Escribano and F. García-Carmona (2005). Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiology Preview*, 138 (1) 1-12.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.

Hefner, J, R.E.B. Ketchum and R. Croteau (1998). Cloning and functional expression of a cDNA encoding a geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 360, 62-74.

Heil, M. and R.M. Bostock (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89, 503-512.

Huang, F.C. and T.M. Kutchan (2000). Distribution of morphinan and benzophenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 53, 555–564.

Ignatov, A, W.G. Clark, S.D. Cline, M. Psenak, R.J. Krueger and C.J. Coscia (1996). Elicitation of dihydrobenzophenanthridine oxidase in *Sanguinaria canadensis* cell cultures. *Phytochemistry*, 43 (6) 1141-1144.

Janovská, M, M. Kubala and V. Šimánek (2009). Fluorescence of sanguinarine: Fundamental characteristics and analysis of interconversion between various forms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 235-240.

Kato, N., E. Dubouzet, Y. Kokabu, S. Yoshida, Y. Taniguchi, J.G. Dubouzet, K. Yazaki, and F. Sato (2007). Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis Japonica*. *Plant Cell Physiology*, 48 (1), 8-18.

Khosroushasi, A.Y., M. Valizadeh, A. Ghasempour, M. Khosrowshahli, H. Naghdebadi, M.R. Dadpour and Y. Omid (2006). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*, 30, 262-269.

Komaraiah, P., G.V. Reddy, P.S. Reddy, A.S. Raghavendra, S.V. Ramakrishna and P. Reddanna (2003). Enhanced production of antimicrobial sesquiterpenes and lipoxygenase metabolites in elicitor-treated hairy root cultures of *Solanum tuberosum*. *Biotechnology Letters*, 25, 593-597.

Kutchan, T.M. (2001). Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*, 125, 58-60.

Kutchan, T.M., M. Rush and C.J. Coscia (1986). Subcellular localization of alkaloids and dopamine in different vacuolar compartments of *Papaver bracteatum*. *Plant physiology*, 81, 161-166.

Larkin, P.J., J.A. Miller, R.S. Allen, J.A. Chitty, W.L. Gerlach, S. Frick, T.M. Kutchan and A.J. Fisk (2007). Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 26-37.

Lee-Parson, C.W.T., S. Ertürk and J. Tengtrakool (2004). Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation. *Biotechnology Letters*. 26, 1595-1599.

Li, J., G. Brader, T. Kariola and T. Palva (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant Journal*, 46, 477-491.

Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plant and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67, 2318-2331.

McDowell, J.M. and J.L. Dangi (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Science*, 25, 79-82.

Monforte-González, M., M.R. Carrillo-Pech, F. Vázquez-Flota, Berberine and sanguinarine quantitation by TLC-in situ Fluorography on TLC chromatography plates (En preparación para *J. Liq. Chromatograph and Rel Technol*) 2010.

Negrel, J., F. Javelle and M. Paynot (1993). Biochemical basis of resistance of tobacco callus tissue cultures to hydroxyphenylethylamines. *Plant Physiology*, 103, 329-334.

Park, S.-U., A.G. Johnson, C. Penzes-Yost, and P.J. Facchini (1999). Analysis of promoters from tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase and berberine bridge enzyme genes involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Molecular Biology*, 40, 121-131.

Philips, G.C. and G.B Collins (1979). *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*, 19, 59-64.

Ribnicky, D.M., V.V. Shulaev and I.I. Raskin (1998). Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 118, 565-572.

Roos, W., K. Viehweger, B. Dordschbal, B. Schumann, S. Evers, J. Steighardt and W. Schwartze (2006). Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways - The case of *Eschscholzia californica*. *Journal of Plant Physiology*, 163, 369-381.

Rubio-Piña, J.A. (2009). Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas.

Samanani, N, D.K. Liscombe and P.J. Facchini (2004). Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*, 40, 302-313.

Samanani, N., S.-U. Park and P.J. Facchini (2005) Cell type-specific localization of transcripts encoding enzymes catalyzing nine consecutive steps in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell*, 17, 915-926.

Samanani, N. and P.J. Facchini (2002). Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (37) 33878-33883.

Selinheimo, E., D. NiEidhin, C. Steffensen, J. Nielsen, A. Lomascolo, S. Halaouli, E. Record, D. O'Beirne, J. Buchert and K. Kruus (2007). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *Journal of Biotechnology*, 130, 471-480.

Shaukat, S.S., I.A. Siddiqui, G.H. Khan and M.J. Zaki (2002) Nematicidal and allelopathic potencial of *A. mexicana*, a tropical weed. *Plant and Soil*, 245, 239-247.

Sirikantaramas, S., M. Yamazaki, and K. Saito (2008). Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochemistry Reviews*, 7, 467-477, doi: 10.1007/s11101-007-9080-2.

Stephane, G., B. Pierre, A. Pascaline and J.A: Marie (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 1370-1373.

Thpiyapong, P. and J.C. Steffens (1997). Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiol*, 115, 409-418.

Weiss, D., A. Baumert, M. Vogel and W. Roos (2006). Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant, Cell and Environment*, 29, 291-302.

Yuan, Y.-J., Z.-J. Wei, Z.-Q. Miao and J.-C. Wu (2002). Acting paths of elicitors on taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 77-83. 2002.

Zhao, J., L.C. Davis, and R. Verpoorte (2005), Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites . *Bioitechnology Advances*, 23, 283-333.

Zulak, K.G., A. Cornish, T.E. Daskalchuk, M.K. Deyholos. D.B. Goodenowe. P.M.K. Gordon, D. Klassen L.E. Pelcher, C.W. Sensen and P.J. Facchini (2007). Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta*, 225, 1085-1106.

Capítulo 4

Discusión general y perspectivas

Las plantas producen aproximadamente 12,000 diferentes alcaloides que pueden ser organizados en grupos de acuerdo a su estructura (Ziegler & Facchini, 2008). Se ha estimado que aproximadamente el 20% de las plantas superiores producen alcaloides y, debido a su potente actividad biológica, se sugiere que son compuestos de defensa (Liscombe & Facchini, 2008). Los alcaloides son derivados de un número reducido de aminoácidos, sin embargo, presentan una gran diversidad estructural (Buchanan et al., 2000). Un ejemplo de estos son los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's), derivados de la tirosina que son cerca de 2,500 (Facchini, 2001). Irónicamente, se tiene una mejor comprensión de las aplicaciones medicinales y de los efectos farmacológicos de estos metabolitos en animales y humanos que de su función en las plantas que los producen (Liscombe & Facchini, 2008). La capacidad de producir este tipo de alcaloides representa un rasgo que ha sido sujeto a una selección natural a través de la evolución (Wink, 2003). Los estudios sobre la biosíntesis de los ABI se han enfocado sobre un número limitado de especies como *Coptis japonica* y *Thalictrum flavum* (Ranunculaceas), nativas de Japón y Europa respectivamente y en donde principalmente se distribuyen. Otras plantas estudiadas en este sentido son *Eschscholzia californica* y *Papaver somniferum* (Papaveraceas) que crecen en América del norte y Europa respectivamente (Liscombe & Facchini, 2008). En estas especies se han aislado y caracterizado varias de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de estos alcaloides, así como algunos de los ADNc correspondientes (Facchini, 2001). Sin embargo, aún se conoce poco acerca de la regulación y de los mecanismos que controlan el inicio de la biosíntesis de los ABI's. *A. mexicana* es una Papaveracea ampliamente distribuida en nuestro país, que produce algunos ABI's con posibles aplicaciones médicas, incluyendo la sanguinarina (Siddiqui et al., 2002; Capasso et al., 2002; Ahmad et al., 2000). Debido a esto, esta planta representa un candidato para la aplicación de métodos biotecnológicos orientados hacia la producción de alcaloides. Para esto, y como primer paso se deben generar las herramientas necesarias. Sin embargo, debido a su naturaleza silvestre, y a que es una planta estacional, se propuso el empleo

de cultivos *in vitro*, como alternativa para obtener un suministro constante de material vegetal, libre de patógenos.

De esta manera, el propósito del este trabajo fue ampliar el conocimiento que se tiene respecto al metabolismo secundario de esta especie, enfocándose en los genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de los alcaloides que produce.

La caracterización molecular de la TyDC de *A. mexicana* revela que este gen presenta todas las características de las AADC's.

Los aminoácidos aromáticos dan origen a un enorme número de metabolitos secundarios. En muchos casos, las reacciones que canalizan estos compuestos hacia la síntesis de metabolitos involucran la participación de descarboxilasas (Guillet et al., 2000). De este modo, estas enzimas actúan en la interfase entre el metabolismo primario y secundario, de manera equivalente a la fenilalanina amonio liasa (PAL), y la triptofano descarboxilasa (TDC). La TyDC también podría tener funciones reguladoras importantes en las plantas que producen alcaloides derivados de tirosina (Guillet et al., 2000). De hecho, estos genes han sido utilizados en otras especies para alterar las rutas metabólicas derivadas de estos aminoácidos (Facchini et al., 2000). Sin embargo, varios de estos esfuerzos han producido resultados inesperados, como la acumulación de diferentes compuestos a los deseados (Goddijn et al., 1995; Facchini et al., 1999). Esto se relaciona con el limitado entendimiento de la arquitectura compleja de las redes metabólicas. El uso de plantas transgénicas con elevados niveles de TyDC representa una poderosa herramienta que se podría emplear para entender su papel fisiológico en *A. mexicana*. De este modo, y como primer paso, se llevó a cabo la caracterización molecular de esta enzima. El ADNc de la TyDC de *A. mexicana* (AmTyDC) presentó todas las características típicas de las descarboxilasas de aminoácidos aromáticos (Facchini et al., 2000), incluyendo su tamaño, es una proteína de 538 residuos, de localización citoplasmática, (no tiene dominios transmembranales, ni péptido señal; datos complementarios, figura S3) y presenta un dominio de unión a piridoxal (Fig. 2.3). Al igual que las TyDC de otras especies, la de *A. mexicana* parece no contener intrones. AmTyDC presentó gran similitud (mayor al 80%) con TyDC de otras Papaveraceae,

como *P. somniferum* (Ac: U08598.1) y *E. californica* (Ac: EU882976.1). Sin embargo, también mostró un alto porcentaje de identidad con la de *T. flavum* (75%), de las Ranunculaceas (Ac: AF314150.1). De hecho, el análisis filogenético sugirió que estas secuencias tienen un origen monofilético debido a que todas se agruparon en un mismo clado (Fig. 2.6). La presencia en plantas que no producen ABI's, de estos genes, así como de otros presuntamente involucrados en biosíntesis de estos metabolitos, incluyendo NCS, BBE y algunas *N*-metiltransferasas (Liscombe et al., 2005), sugiere que pudo haber una alteración de las rutas biosintéticas que condujeron a las diferentes especies a la producción de diversos metabolitos derivados del mismo aminoácido.

El Southern blot de la TyDC confirma la presencia de un bajo número de copias de esta enzima en el genoma de *A. mexicana*.

El empleo del ADNc de la TyDC de *A. mexicana* como sonda para determinar la redundancia genética, sugirió la presencia de un bajo número de copias de este gen (Fig. 2.8), posiblemente dos, como ocurre en plantas no productoras de ABI's, tales como perejil (cuatro copias; Kawalleck et al., 1993), y *A. thaliana* (unicopia; Trezzini et al., 1993), pero en contraste con *P. somniferum*, con la que comparte una mayor relación filogenética (Facchini & De Luca, 1994). En esta especie la TyDC es codificada por una familia multigénica que comprende entre 10 y 14 genes (Facchini y De Luca, 1994). No obstante lo anterior, debe considerarse que, a pesar de que ambas especies pertenecen a la misma familia, se han desarrollado en hábitats diferentes y que *A. mexicana* es una planta silvestre originaria de América que no ha sido sometida a un proceso de selección y mejoramiento como *P. somniferum* que, además, es nativa del medio oriente (Wink, 1998). Los análisis tipo Southern blot para la TyDC de *A. mexicana* fueron similares a los obtenidos para la NCS y la BBE (Rubio-Piña, 2009) y sugieren que todas estas enzimas, que participan en etapas tempranas de la biosíntesis de los ABI's, presentan una baja redundancia genética.

Estudio de la expresión tejido específica de la TyDC

El análisis de la expresión de la TyDC en plantas adultas reveló que, en contraste con la expresión diferencial típica de *P. somniferum*

(Facchini y De Luca, 1994), en *A. mexicana* los transcritos se acumularon en niveles similares en los diferentes tejidos evaluados (Fig. 2.9.). Sin embargo, este tipo de distribución tisular, coincide con las detectadas para NCS y la BBE de la misma especie (Rubio-Piña, 2009), ya que los transcritos pudieron ser detectados en todos los tejidos de la planta madura, aunque variaciones mínimas. De este modo, y debido a la naturaleza silvestre de esta planta, es posible que la permanente exposición a patógenos y herbívoros, requiera que, al menos la primera parte de la ruta de síntesis de los alcaloides, se mantenga activa de manera permanente. Esto permitiría, el rápido suministro de precursores para la formación de los alcaloides de defensa, como la berberina, que se detectó en todos los tejidos, y la sanguinarina que se encontró en raíz y cápsula (datos complementarios, Fig. S5).

La caracterización molecular de la PPO de *A. mexicana* revela la presencia de dominios característicos de las PPO's en esta secuencia.

Frecuentemente se ha propuesto que estas enzimas tienen un papel en la defensa durante la interacción planta patógeno (Constabel et al. 1995; Thipyapong et al., 1995). Las PPO's, como genes de defensa se expresan tanto de manera constitutiva como inducible (Yoruk y Marshall, 2003). Genes completos para estas enzimas han sido aislados y secuenciados en diferentes especies (Thygesen et al., 1995; Shahar et al., 1992; Cary et al., 1992). Sin embargo, entre éstos no incluyen ningún caso de plantas productoras de ABI's. El ADNc para la PPO de *A. mexicana* contiene las principales características de este tipo de enzimas (Mayer, 2006). Produce una proteína de 598 residuos, con un presunto péptido de tránsito y dos dominios de unión a cobre (Cu) que incluyen histidinas responsables de la unión de este metal (Fig. 2.10.). En general, a excepción de estos dominios de unión a Cu, altamente conservados (Fig. 2.11), las PPO de diferentes especies presentan un bajo porcentaje de identidad (Altschul et al., 1997). No obstante, es interesante notar que la PPO de *A. mexicana* presentó una similitud del 74% con una secuencia parcial de la de *P. somniferum*, la única secuencia de este tipo reportada en especies productoras de ABI's (Ac: EU330225). Desafortunadamente el análisis filogenético realizado con las secuencias de PPO disponibles en el

GenBank arrojó resultados limitados (Fig. 2.12), debido a que estas secuencias provienen de especies poco relacionadas con *A. mexicana* y no productoras de ABI's.

Más aún, además de sus secuencias, las PPO's son diversas en cuanto a sus propiedades, distribución y localización celular (Mayer, 2006) y se les han atribuido varias funciones, tales como su participación en la biosíntesis de betalainas (Steiner et al., 1999; Gandía-Herrero et al., 2005), catalizando la hidroxilación de tiramina para formar dopamina que, en presencia de ácido betalámico, da lugar a la síntesis de dopamina-betaxantina. También pueden participar en la biosíntesis de auxinas (Shaw et al., 1991) y, debido a su localización en los tilacoides, se ha sugerido que podrían tener un papel en la fotosíntesis (Vaughn et al., 1988; Koussevitzky et al., 2004). No obstante, a pesar de que estas enzimas pueden catalizar la formación de intermediarios tempranos de la biosíntesis de los ABI's, (DOPA y dopamina), aún no se cuenta con evidencia que respalde su posible papel en este proceso.

El Southern blot de la PPO sugiere la presencia de una pequeña familia multigénica en *A. mexicana*.

El análisis de la redundancia genética de la PPO en *A. mexicana*, sugirió un pequeña familia, de entre 2 a 4 miembros (Fig. 2.14). Este resultado se asemeja a lo observado en *Trifolium pratense* (trébol tojo) en el que sólo se encontraron tres copias (Sullivan et al., 2004). No obstante, en muchas especies, incluyendo *Vicia faba* (Cary et al., 1992), manzana (Boss et al., 1995), tomate (Newman et al., 1993) y papa (Thyngensen et al., 1995), estas enzimas son codificadas por familias multigénicas, lo cual se refleja en su gran versatilidad. Sin embargo, esto no siempre se cumple, ya que en la uva (Dry et al., 1994), al igual que en trigo, la PPO se presenta como un gen unicopia, a pesar de que se han encontrado hasta 12 isoformas (Demeke y Morris, 2002).

Estudio de la expresión tejido específica de la PPO de *A. mexicana*

En general, la PPO despliega una expresión tejido-específica (Gooding et al., 2001; Thyngensen et al., 1995) y temporal (Goldman et al., 1998; Sullivan et al., 2004) muy variable. En *A. mexicana*, se observó una

acumulación importante de los transcritos para la PPO en los diferentes tejidos (Fig. 2.15), lo cual, debido a la naturaleza silvestre de la planta, podría sugerir que estas enzimas participan en mecanismos de defensa. Sin embargo, no siempre hay una correlación entre la presencia de los transcritos y de la enzima. De hecho, en *Prunus armeniaca* se pueden detectar altos niveles de actividad de PPO con niveles bajos de expresión (Chevalier et al., 1999). Por otro lado, *A. mexicana* produce diversos compuestos fenólicos con potencial alelopático, incluyendo los ácidos p-hidroxibenzoico y vainillico (Siddiqui et al., 2002), que son posibles sustratos para las PPO's. Más aún, si bien estas enzimas pueden catalizar la hidroxilación de monofenoles como la tirosina y tiramina, generando DOPA y dopamina, como ocurre en *Glottiphyllum oligocarpum*, estos compuestos, además de su papel en la síntesis de ABI's también, pueden ser sustratos para la actividad difenolasa que los convertiría en las quinonas correspondientes (Solomon et al., 1996).

Cultivos celulares de *A. mexicana* como modelo para el estudio de los ABI's.

Los cultivos *in vitro*, son una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos con aplicaciones en la biotecnología vegetal. Estos sistemas ofrecen una serie de modelos ideales para la investigación bioquímica y genética de rutas metabólicas relacionadas con la producción de metabolitos secundarios (Vázquez-Flota y Loyola-Vargas, 2003). Sin embargo, los bajos niveles de producción de metabolitos secundarios en estos sistemas representa un problema importante (Loyola-Vargas et al., 1994; Ignatov et al., 1996; Cho et al., 2008). En este trabajo se desarrolló y caracterizó una suspensión celular de *A. mexicana* capaz de producir en condiciones de mantenimiento cantidades significativas de sanguinarina (alrededor de 0.5 mg.g^{-1} de PS Fig.3.2.), un alcaloide que se acumula en las raíces y cápsulas de la planta (datos complementarios, Fig. S5). Sin embargo, este cultivo, perdió la capacidad de formar berberina, que se encuentra en todos los tejidos de la planta (datos complementarios, Fig. S5). Esta pérdida de la capacidad biosintética en cultivos *in vitro* es una característica frecuente. Por ejemplo, células en suspensión de *C. roseus* y de *P. somniferum*, no son capaces de producir vindolina y morfina respectivamente (Facchini, 2001), aunque son alcaloides que se acumulan

en los diferentes tejidos de las plantas. Las bases de este fenómeno se relacionan con la desdiferenciación de las células en los cultivos, ya que la formación de muchos metabolitos, requieren cierto grado de organización celular y especialización bioquímica (Ziegler y Facchini, 2008). Sin embargo, al mantener su capacidad para producir sanguinarina, la suspensión celular de *A. mexicana*, al igual que los cultivos de *E. californica* (Cho et al., 2008), pueden utilizarse para observar la respuesta a nivel del metabolismo secundario de las células cuando son expuestas a diferentes estímulos.

La suspensión celular de *A. mexicana*, responde de manera diferencial a los inductores evaluados.

El uso de inductores para promover el metabolismo secundario en cultivos *in vitro* ha sido una práctica común, basada en la participación de éstos en mecanismos inducibles de defensa. La exposición de los cultivos a mediadores químicos involucrados en las respuestas a dichos estímulos, tales como jasmonatos, salicilatos y etileno, han sido empleados con éxito en varias especies (Ignatov et al., 1996; Cho et al., 2008; Vázquez-Flota et al., 2009). De igual forma, la exposición a preparaciones fúngicas estimula la acumulación de alcaloides (Eilert et al., 1985; Facchini et al., 1996; Cho et al., 2008). Algunos de estos inductores fueron empleados para promover el metabolismo secundario de la suspensión celular de *A. mexicana* (Fig. 3.3). No obstante, la exposición a MeJa y SA no modificaron de manera significativa la producción de sanguinarina, en comparación con la exposición al extracto de levadura (Fig. 3.3.A). Este último provocó un enrojecimiento de las células que correlaciona con el incremento de sanguinarina, que alcanzó un nivel cinco veces mayor que en los controles (Fig. 3.3.A y B). Sin embargo, mientras que el ácido salicílico no aumentó la producción de sanguinarina, también ocasionó un cambio drástico en la coloración de las células, que aparentemente no se relacionó con la producción de ABI's (Fig. 3.3.B).

Todos los inductores empleados provocaron algunas variaciones en la acumulación de los transcritos analizados (Fig 3.4). Es de llamar la atención que los patrones de expresión de algunos transcritos fueron muy similares en los cultivos expuestos a MeJa y al extracto de levadura (Fig. 3.4.), aún cuando el primero, no modificó de manera importante la producción de

sanguinarina, en comparación con el segundo (Fig. 3.3.). En cultivos de *P. somniferum* (Facchini et al., 1996), los mensajeros de la TyDC se acumularon siguiendo patrones temporales similares en respuesta tanto a la exposición a MeJa como a inductores fúngicos (*Fusarium oxysporum* y *Phythium aphanidermatum*). Sin embargo, la exposición a jasmonato no alteró la acumulación de sanguinarina, a diferencia de la respuesta observada con los homogenados (Facchini et al., 1996). De este modo, es posible que existan mecanismos de respuesta similar en ambas especies. En cultivos celulares de *C. roseus* la aplicación de extracto de levadura también produjo un incremento en el contenido alcaloides monoterpénicos en las primeras 3 h de exposición. Dicho incremento fue precedido por la acumulación de jasmonato (Menke et al., 1999). El aumento de las cantidades intracelulares de jasmonato activa transcripcionalmente los genes a la triptofano descarboxilasa (TDC) y la estrictosidina sintasa (STR), dos enzimas que catalizan reacciones tempranas de la ruta de biosíntesis de los AMI's, equivalentes a las reacciones catalizadas por la TyDC y la NCS respectivamente. De este modo, los jasmonatos parecen participar en la señalización de las respuestas de defensa activadas por el extracto de levadura (Menke et al., 1999). Algo similar podría ocurrir en especies productoras de ABI's con los jasmonatos acumulándose en respuesta al extracto de levadura, lo que activaría a los genes involucrados en las reacciones tempranas de la síntesis de estos alcaloides. Esto podría explicar la similitud de los patrones de expresión observada en los cultivos expuestos al extracto de levadura y a MeJa (Fig. 4.1).

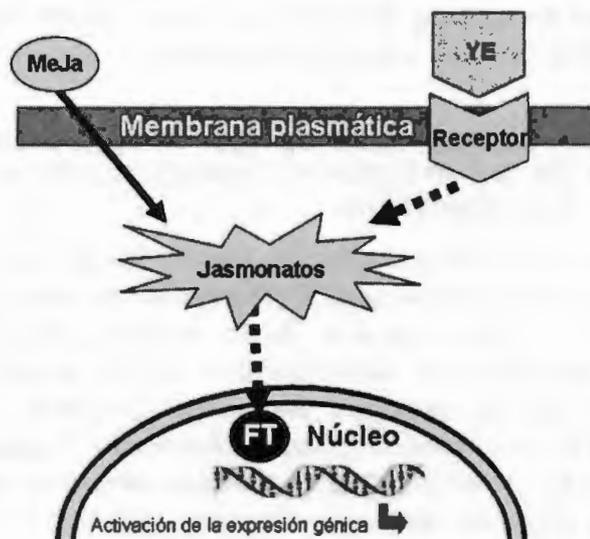


Figura 4.1. Esquema de la transducción de señales que da lugar a la activación de genes involucrados en la biosíntesis de los ABI's. MeJa: metil jasmonato, YE: extracto de levadura por sus siglas en inglés, FT: factor de transcripción.

En el modelo propuesto en la Figura 4.1, la unión de algún componente del extracto de levadura (YE) se une a un receptor en la membrana lo que provoca la acumulación de jasmonatos en el interior de la célula, mediante la activación de la ruta de los octadecanoides. Una vez que esto sucede, los jasmonatos desencadenarían una serie de eventos bioquímicos que concluyen con la participación de un factor de transcripción que active la expresión de los genes analizados (TyDC y BBE). Por su parte, la adición exógena del MeJa a los cultivos de *A. mexicana* proporciona un atajo a esta cascada de señalización, pues al ser tomado por las células, se produce un incremento directo en la concentración de jasmonatos que conduce a la activación transcripcional. Esto explica la similitud en el patrón de expresión observado entre ambos tratamientos (Fig. 3.4). Sin embargo, es probable que alguno de los componentes del extracto de levadura tenga efecto sobre otro punto clave de regulación de la biosíntesis de sanguinarina, distinto a la acumulación de jasmonatos. Por

ello, y aunque ambas estrategias de inducción aumentan la expresión transcripcional de las enzimas mencionadas, solo el extracto de levadura provocó un incremento en la producción del alcaloide.

La respuesta de los cultivos de *A. mexicana* a la combinación de los inductores depende de la estrategia empleada para su aplicación.

La combinación de inductores del metabolismo secundario se ha empleado en diferentes cultivos con el fin de potenciar el nivel de respuesta (Khosroushahi et al., 2006; Cho et al., 2008b). En las suspensiones de *A. mexicana* se emplearon dos estrategias para evaluar el efecto de la combinación de los tres inductores previamente utilizados de manera individual (Fig. 3.3). Estas consistieron en la aplicación simultánea (Fig. 3.5) y en la aplicación secuencial (Fig. 3.6). La aplicación simultánea, provocó un incremento en la producción de sanguinarina que alcanzó un máximo de 79 mg/l de cultivo al final del ciclo de cultivo (Fig. 3.5). Estos valores fueron incluso menores a los alcanzados en los cultivos tratados únicamente con extracto de levadura (108 mg/l de cultivo). Sin embargo, los mismos inductores aplicados de manera secuencial, comenzando por el MeJa y terminando con el extracto de levadura, tuvieron un efecto sinérgico sobre la producción de sanguinarina, incrementando los valores hasta 190 mg/l (Fig. 3.6). De esta forma, la respuesta de las suspensiones de *A. mexicana* fue muy similar a la de *E. californica* (Cho et al., 2008). En ambos casos la aplicación secuencial tuvo un efecto retardado, en comparación con la aplicación simultánea, la cual presentó un incremento gradual (Fig. 4.2; Cho et al., 2008). Sin embargo, la acumulación de este alcaloide se disparó justo después de haber aplicado el tercer inductor (a las 48 h del inicio), y después de 24 h adicionales, la producción de sanguinarina superó notablemente la detectada en los cultivos sometidos a la inducción simultánea (Fig. 4.2).

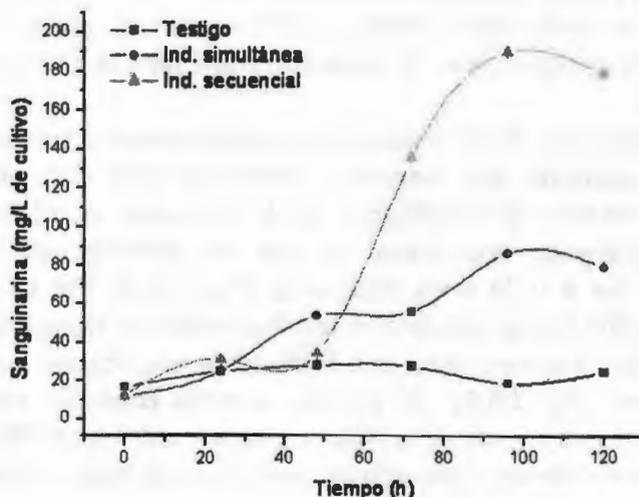


Figura 4.2. Comparación del efecto de dos estrategias de inducción utilizadas para evaluar la respuesta de los cultivos de *A. mexicana* a la mezcla de elicitores. Testigo: producción de sanguinarina en los cultivos sin inducción. Ind. simultánea: producción de sanguinarina provocada por la aplicación de MeJa, ácido salicílico y extracto de levadura al tiempo cero. Ind. secuencial producción de sanguinarina provocada por la aplicación de los 3 mismos inductores en el orden mencionado pero a intervalos de 24 h entre cada aplicación.

Si bien en cultivos de *E. californica* el MeJa y el ácido salicílico no tienen un efecto directo sobre la acumulación de sanguinarina, sí pueden inducir la acumulación de dihidrosanguinarina, el precursor inmediato de la sanguinarina (Cho et al., 2008). Por otro lado, en cultivos de *Sanguinaria canadensis*, los salicilatos incrementan la actividad específica de la dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX), que cataliza el último paso en la formación de sanguinarina (Fig. 1.7; Ignatov et al., 1996). En este sentido, es interesante mencionar que en cultivos de *E. californica*, el extracto de levadura produjo una acumulación de varias proteínas involucradas en la biosíntesis de los ABI's, incluyendo la DBOX (Cho et al., 2008). Lo anterior sugiere que el efecto sinérgico sobre la producción de sanguinarina,

provocado por la preincubación de los cultivos celulares con MeJa y SA, previo a la aplicación del extracto de levadura, se basa en la activación ordenada de una serie de etapas necesarias para la biosíntesis de este alcaloide. Por lo tanto, esta estrategia, podría ser de utilidad en la determinación de ciertos puntos de regulación clave para la biosíntesis de estos alcaloides.

La acumulación de los mensajeros correspondientes a la TyDC y ambas BBE, mostraron una respuesta diferencial para cada inductor (Fig.3.4). No obstante, al combinarlos en la inducción simultánea, se observó una activación coordinada, ya que se presentó una mayor expresión entre las 6 y 24 h de tratamiento (Fig. 3.5.B). Por otro lado, durante la inducción secuencial se notó una fluctuación en la expresión de la TyDC y BBE que fue consistente con el efecto de la aplicación individual de los inductores (Fig. 3.6.B). En general, ninguna condición afectó la acumulación de los transcritos de la NCS (1 y 2), así como de la PPO (Fig. 3.4.). Esto no necesariamente descarta la participación de estas enzimas en las respuestas de defensa. Varios pasos del procesamiento afectan de manera cuantitativa o cualitativa la población de un determinado ARNm (Fiehn and Weckwerth, 2003). Además, la observación simple del transcriptoma, no provee de un panorama completo de la respuesta del cultivo. Las enzimas, pueden tener muchos puntos probables de regulación que incluyen niveles transcripcional (Thipyapong y Steffens., 1997), post-transcripcional, traduccional post-traduccional y todas las formas de control bioquímico tales como la regulación alostérica y por retro alimentación (Fiehn and Weckwerth, 2003). En el caso de las PPO's, incluso cambios conformacionales, se involucran para definir el tipo de reacción que catalizan; como mono o difenolasa (Yoruk y Marshall., 2003). Además, la falta de correlación entre la acumulación de sanguinarina, y la inducción transcripcional de estos genes puede deberse a su ubicación en la ruta de biosíntesis de este alcaloide, pues son enzimas que participan en las primeras etapas (Fig. 3.1), y quizá la activación de los últimos pasos de la biosíntesis de estos alcaloides sean los más afectados.

Recapitulación final.

Si bien la producción de ABI's está restringida a ciertas familias, los distintos grupos de éstos alcaloides (benzofenantridina, protoberberina o morfinanos), son producidos exclusivamente por algunas de estas especies o en ocasiones, solo una (Facchini, 2000). *A. mexicana*, produce dos de estos tres tipos de alcaloides (datos complementarios, Fig. S5), la sanguinarina una benzofenantridina que también es producida por *P. somniferum*, pero no por *T. flavum*; y la berberina, una protoberberina que se detecta en *T. flavum* pero no en *P. somniferum* (Facchini et al., 1996; Samanani et al., 2002). Debido al interés en la aplicación médica de este tipo de alcaloides (Roberts y Wink, 1988; Ahmad et al., 2000), consideramos importante, comprender mejor su biosíntesis, así como los procesos regulatorios para la futura aplicación de la ingeniería metabólica. La importancia de esta base queda de manifiesto cuando la alteración genética de rutas metabólicas, mediante la sobreexpresión de algunos genes, arroja resultados inesperados, como la acumulación de metabolitos diferentes a los esperados (Facchini et al., 2000). *A. mexicana*, es una planta muy apreciada en la medicina tradicional de nuestro país con una amplia distribución nacional. Por ello, podría ser fuente adecuada para la obtención de metabolitos bioactivos. Sin embargo, sigue siendo una planta silvestre de cuyo metabolismo secundario se conoce poco.

Recientemente, en nuestro grupo iniciamos los primeros estudios a nivel molecular de esta especie, lográndose aislar y caracterizar ADNc correspondiente a la NCS y la BBE (Rubio-Piña, 2009). Además, se está desarrollando metodologías de transformación genética (Godoy-Hernández et al., 2008).

Continuando con estos estudios, el presente trabajo se enfocó en dos enzimas que pueden utilizar como sustrato la tirosina o algunos de los primeros intermediarios biosintéticos. Los resultados obtenidos indican la presencia de un bajo número de copias para los genes de la TyDC (Fig. 2.7) y la PPO (Fig. 2.15). Los transcritos para ambas enzimas se acumularon de manera importante en los diferentes tejidos (Figs. 2.8 y 2.16). Sin embargo, no se detectó una relación directa entre la alta expresión de estos genes y la acumulación de alcaloides en la planta.

Por su parte, las PPO's son enzimas muy versátiles cuya redundancia genética, así como su expresión tejido específica es muy variable entre las diferentes plantas que se han analizado (Thyngensen et al., 1995; Thipyapong y Steffens 1997; Sullivan et al., 2004; Mayer, 2006). Dado que este trabajo representa una de los primeros estudios en plantas productoras de ABI's, es difícil establecer el aporte de su participación en el proceso. Respecto a la TyDC los datos obtenidos difieren de lo observado en *P. somniferum*, en la cual esta enzima es codificada por una familia multigénica cuyos integrantes presentan una expresión tejido-específica (Facchini et al., 1994; Facchini et al., 1996).

La inducción de cultivos *in vitro* ha sido una estrategia muy empleada, tanto el estudio de rutas metabólicas, como para la obtención de metabolitos bioactivos (Facchini and Park, 2003; Ross et al., 2006; Cho et al.; 2008). Por este motivo y con el fin de tener un suministro constante de material vegetal, se generaron y caracterizaron cultivos de células en suspensión que fueron sometidos a diferentes tratamientos, buscando incrementar la producción de sanguinarina. Las diferentes estrategias de inducción permitieron analizar la respuesta de algunos genes involucrados en el metabolismo secundario de esta especie. Con esto, se determinó que la TyDC y la BBE posiblemente estén reguladas a nivel transcripcional, pues su expresión varía en respuesta a los diferentes tratamientos, mientras que los transcritos de la NCS y la PPO, prácticamente no se vieron afectados en ninguna de las condiciones evaluadas. De los diferentes tratamientos, la aplicación secuencial de MeJa, SA y extracto de levadura (Fig.3.5A) condujo a la máxima producción de sanguinarina, de manera similar a lo que ocurre en cultivos de *E. californica* (Papaveraceae; Cho et al., 2008). Por lo tanto, se logró optimizar la producción de sanguinarina en los cultivos de *A. mexicana*, lo cual brinda un buen modelo para el estudio de la regulación de esta ruta.

Perspectivas

La biosíntesis de alcaloides es altamente regulada y su control involucra diferentes células, tejidos, desarrollo y condiciones ambientales (Facchini, 2001). Actualmente se tienen progresos en la elucidación de estas rutas metabólicas, pero aunque ya se han generado nuevas técnicas de secuenciación que pueden generar grandes bases de datos en tiempos

muy cortos, éstas están limitadas a plantas cuyos genomas han sido secuenciados, tales como *Arabidopsis* y arroz (Ziegler y Facchini, 2008), pues estos tienen un genoma más pequeño en comparación con las plantas productoras de alcaloides (7.4 Gpb de *P. somniferum* contra 1 Gpb de arroz). Si bien el presente trabajo representa un aporte al conocimiento de nuevos genes involucrados en el metabolismo secundario, aún quedan muchos aspectos por abarcar. Por ejemplo, la presunta función de las enzimas que son codificadas por los genes aislados y caracterizados debe ser confirmada *in vivo*, ya sea por expresión heteróloga o bien en la propia planta. Para esto se han desarrollado nuevas tecnologías para la transformación genética de plantas productoras de alcaloides como *P. somniferum* (Hileman et al., 2005) y *E. californica* (Wege et al., 2007) y recientemente *A. mexicana* (Godoy-Hernández et al., 2008).

La disponibilidad de las secuencias completas de la TyDC y PPO de esta especie, pueden utilizarse para la obtención de las proteínas recombinantes que pueden emplearse como antígenos para la generación de anticuerpos que permitan la localización de estas enzimas dentro de los tejidos de la planta por inmunocitoquímica, o para detectar la acumulación de estas proteínas en respuesta a diferentes estímulos en los cultivos de células en suspensión por medio de ensayos de inmunoblots. Además, la expresión heteróloga de estos genes permitiría obtener proteínas puras a las que se puede determinar sus parámetros cinéticos, así como su especificidad para distintos sustratos.

Por su parte, los modelos de inducción de las suspensiones celulares podrían ser utilizados en estudios de la regulación de futuros genes y enzimas que sean identificados en esta especie; así como, para determinar si las respuestas de defensa de esta especie, que son activadas por levadura, son mediadas por los jasmonatos. Además, debido a la elevada producción de sanguinarina en los cultivos sometidos a la inducción secuencial, estas células podrían ser empleados en el estudio de los mecanismos de detoxificación de esta especie, analizando las variaciones en el contenido intracelular de este alcaloide por medio de microscopía de fluorescencia. Finalmente gracias a que se logró optimizar la producción de sanguinarina de los cultivos de *A. mexicana*, mediante la aplicación secuencial de los inductores, éstos pueden ser una buena fuente para la

obtención del alcaloide, para los ensayos de las posibles aplicaciones médicas que se han propuesto para este metabolito.

4.1. Referencias

Ahmad, N., S. Gupta, M.M. Husain, K.M. Heiskanen and H. Mukhtar (2000). Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research*, 6, 1524–1528.

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.

Boss, P.K., R.C. Gardener, B.J. Janssen and G.S. Ross (1995). An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Molecular Biology*, 27, 429-433.

Buchanan, B., W. Gruissem and RE Jones (2002). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, U.S.A.

Capasso, A., R. Aquino, N. De Tomáis, S. Piacente, L. Rastrelli and C. Pizza (2002). Neuropharmacology activity of alkaloids from South American medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry. Central Nervous Systems Agents*, 2, 1-15.

Cary, J.W., A.R. Lax and W.H. Flurey (1992). Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology* 20, 245-253.

Constabel C.P., D.R. Bergey and C.A. Ryan (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 92, 407-411.

Cho, H.Y., H.S. Rhee, S.Y. Yoon, J.M. Park (2008a). Differential induction of protein expression and benzophenanthridine alkaloid accumulation in *Eschscholtzia californica* suspension cultures by methyl jasmonate and yeast extract. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 18 (2), 255–262.

Cho, H.Y., S.Y. Son, H.S. Rhee, S.Y. Yoon, C.W. Lee-Parsons and J.M. Park (2008b). Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and protein expression in *Eschscholtzia californica* suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 135, 117-122.

Demeke, T. and C.F. Morris (2002). Molecular characterization of wheat polyphenol oxidase (PPO). *Theoretical and Applied Genetics* 104, 813-818.

Dry, J.B. and S.P. Robinson (1994). Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology* 26, 495-502.

Eilert, U., W.G.W. Kurz and F. Constabel (1985). Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *Journal of Plant Physiology* 119, 65-76.

Facchini, P.J., A.G. Johnson, J. Poupart and V. De Luca (1996). Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiology* 111, 687-697.

Facchini, P.J., M. Yu and C. Penzes-Yost (1999). Decreased cell wall digestibility in canola transformed with chimeric tyrosine decarboxylase genes from opium poppy. *Plant Physiology* 120 (3), 653-664.

Facchini, P.J., S.U. Park, D.A. Bird and N. Samanani (2000). Toward the metabolic engineering of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy and related species. *Recent Research Developments in Phytochemistry*. 4, 31-47.

Fernandez, J.A. and V. De Luca (1994). Ubiquitin-mediated degradation of tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 36, 1123-1128.

Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 29-66.

Fiehn, O. and W. Weckwerth (2003). Deciphering metabolic networks. *European Journal of Biochemistry*, 270, 579-588.

Gandía-Herrero, F., J. Escribano and F. García-Carmona (2005). Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiology*, 138 (1), 421-432.

Goddgin, O.J.M., E.J.M. Pennings, P. van der Helm, R.A. Schilperoort, R. Verpoorte and J.H.C. Hoge (1995). Overexpression of a tryptophan decarboxylase cDNA in *Catharanthus roseus* crown gall calluses results in increased tryptamine levels but not in increased terpenoid indole alkaloid production. *Transgenic Research*, 4, 315-323.

Godoy-Hernández, G., E. Avilés-Berzunza, M. Carrillo-Pech, F. Vázquez-Flota (2008). *Agrobacterium*-mediated transient transformation of Mexican prickly poppy (*Argemone mexicana* L.). *Electronic Journal of Biotechnology* 11 (1): 1-5 (DOI 10.2225/vol11-issue1-fulltext-3).

Goldman, M.H.S., J. Seurinck, M. Marins, G.H. Goldman and C.M. Mariani (1998). A tobacco flower-specific gene encodes a polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology*. 36, 479-485.

Gooding, P.S, C. Bird and S. P. Robinson (2001). Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, 213, 748-757.

Guillet, G., J. Poupard, J. Basurco and V. De Luca (2000). Expression of tryptophan Decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. *Plant Physiology*, 122, 933–943.

Ignatov, A., W.G. Clark, S.D. Cline, M. Psenak, R.J. Krueger and C.J. Coscia (1996). Elicitation of dihydrobenzophenanthridine oxidase in *Sanguinaria canadensis* cell cultures. *Phytochemistry*, 43 (6) 1141-1144.

Kawalleck, P., H. Keller, K. Hahlbrock, D. Scheel, I.E.Somssich (1993), A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 2189-2194.

Khosroushasi, A.Y., M. Valizadeh, A. Ghasempour, M. Khosrowshahli, H. Naghdebadi, M.R. Dadpour and Y. Omidi (2006). Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*, 30 (3), 262-269.

Koussevitzky, S., E. Ne'eman and E. Harel (2004). Import of polyphenoloxidase by chloroplast is enhanced by methyl jasmonate. *Planta*, 219, 412-419.

Liscombe, D.K. and P.J. Facchini (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 173-180.

Liscombe, D.K., B.P. Macleod, N. Loukanina, O. Nandy and P.J. Facchini (2005). Evidence for the monophyletic evolution of

benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry*, 66, 1374-1393.

Loyola-Vargas, V.M., M.L. Robert, J. Coello, M. Méndez, M. Monforte-Gonzalez, M.L. Robles, S. Angel, C. Oropeza, J. Reyes (1994). Tissue culture and tumor induction in *Catharanthus roseus*. In: International Congress of Plant Tissue Culture of Tropical Species. Bogotá: CIAT. W. Roca, G. Tovar, M.D. Gómez, D. Castro, eds.

Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plant and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67, 2318-2331.

Menke, F.L.H., S. Parchmann, M.J. Mueller, J.W. Kijne and J. Memelink (1999). Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*, 119, 1289-1296.

Newmann, S.M., N.T. Ennetta, H. Yu, J.P. Prince, C.M. de Vicente, S.D. Tanksley, J.C. Steffens (1993). Organization of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Molecular Biology*, 21, 1035-1051.

Roberts, M.F. and M. Wink (1988). *Alkaloids biochemistry, ecology and medicinal applications*. Plenum Press 233 Spring Street, New York. pp. 1-3, 452-456.

Rubio-Piña, J.A. (2009) Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

Samanani, N. and P.J. Facchini (2002). Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (37), 33878-33883.

Shahar, T., N. Henning, T. Gutfinger, D. Hareven and E. Lifschitz (1992). The tomato 66.3 kD polyphenoloxidase gene: Molecular identification and developmental expression. *The Plant Cell*, 4, 135-147.

Shaw, J., L. Chao and M. Chen (1991). Isoenzymes of papaya polyphenol oxidase. *Botanical Bulletin of Academia-Sinica*. 32, 259-263.

Siddiqui, I.A., S.S. Shaukat, G.H. Khan and M.J. Zaki (2002). Evaluation of *Argemone mexicana* for control of root-infecting fungi in tomato. *Journal of Phytopathology*, 150, 321-329.

Solomon, E.I., U.M. Sundaram and T.E. Machonkin (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, 2563-2605.

Steiner, U., W. Schliemann, H. Böhm and D. Strack (1999). Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, 208, 114-124.

Sullivan, M.L., R.D. Hatfield, A.L. Thoma and D.A. Samac (2004). Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNA's and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa. *Plant Physiology*, 136, 3234-3244.

Thyapong, P., M.D. Hunt and J.C. Steffens (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 40, 673-676.

Thyapong, P. and J.C. Steffens (1997). Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology*, 115, 409-418.

Thyngsen, P.W., I.B. Dry and S.P. Robinson (1995). Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiology*, 109, 525-531.

Trezzini, G.F., A. Horrichs and I.E. Somssich (1993). Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Molecular Biology*, 21, 385-389.

Vaughn, K.C., A.R. Lax and S.O. Duke (1988). Polyphenol oxidase: the chloroplast enzyme with no established function. *Physiologia Plantarum*, 72, 659-665.

Vázquez-Flota, F.A. and V.M. Loyola-Vargas (2003). *In vitro* plant cell culture as the basis for the development of a research instituto in México: Centro de Investigación Científica de Yucatán. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39: 250-258.

Vázquez-Flota, F.A., E. Hernández-Domínguez, M.L. Miranda-Ham and M. Monforte-González (2009). A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus* *in vitro* cultures. *Biotechnology Letters*, 31, 591-595.

Wink, M. (1998) A short history of alkaloids. In: *Alkaloid. Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*, Roberts, M.F. and Wink M. (ed). Plenum Press, New York. pp. 11-44.

Wink, M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.

Yoruk, R. and M.R. Marshall (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361-422.

Ziegler, J. and P.J. Facchini (2008). Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 735- 769.

Yam, P. and M. R. Martin (2003) Psychosocial predictors and
health in great apes: a review. *Journal of Food Security*
1, 20-32.

Yam, P. and P. A. Leonard (2005) Altered digestive metabolism
and feeding. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 735-758.

DATOS COMPLEMENTARIOS

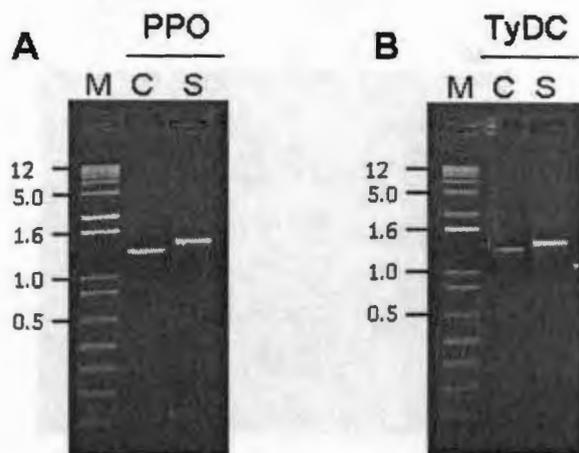


Figura S1: Marcaje de sondas para Southern blot con digoxigenina (Roche Applied Science). A) Sonda marcada por PCR utilizando como template la clona de TyDC de *A. mexicana*, y los oligonucleótidos iniciadores AmTF1 y AmTR1. B) Sonda marcada por PCR utilizando como template la clona de PPO de *A. mexicana* y los oligonucleótidos iniciadores AmPF1 y AmPR1. M: Marcador molecular 1Kb plus, S: Sonda marcada, C: Control de PCR, TyDC: tirosina descarboxilasa, PPO: polifenol oxidasa/tirosinasa..

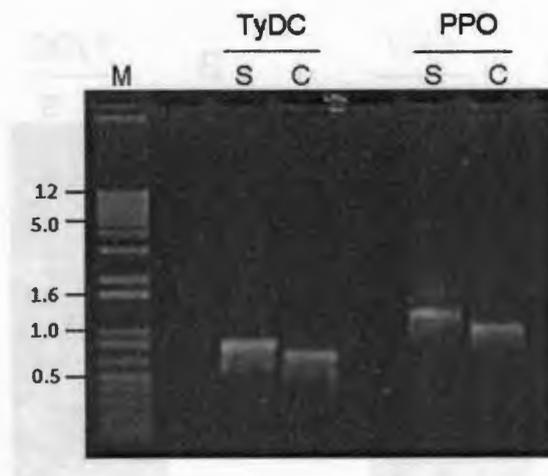
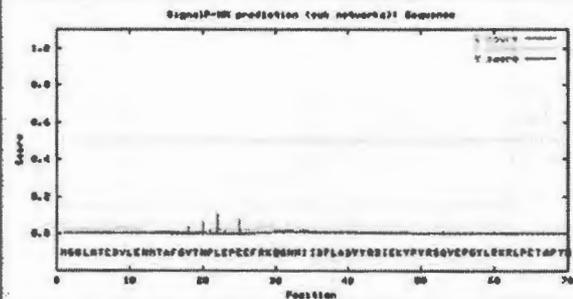


Figura S2: Marcaje de sondas para Northern reverse con digoxigenina (Roche Applied Science).

A) Sonda marcada por PCR utilizando como template la clona de TyDC de *A. mexicana*, B) Sonda marcada por PCR utilizando como template la clona de PPO de *A. mexicana*. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados se muestran en el cuadro 2.3. M: Marcador molecular 1Kb plus, S: Sonda marcada, C: Control de PCR, TyDC: tirosina descarboxilasa, PPO: polifenol oxidasa/tirosinasa.

Using neural networks (NN) and hidden Markov models (HMM) trained on eukaryotes

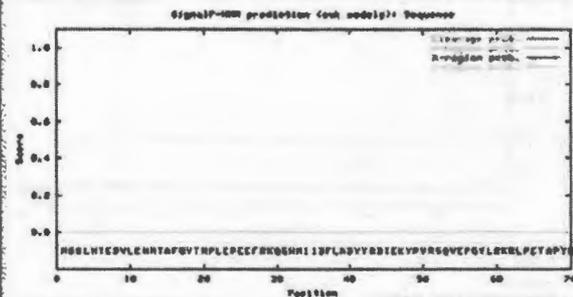
SignalP-NN result:



> CLS16

```
>Sequence
>Sequence Position Value Cutoff signal peptide
max. C 32 0.210 0.32 NO
max. Y 32 0.016 0.23 NO
max. S 29 0.090 0.27 NO
max. S 1-31 0.019 0.28 NO
D 1-31 0.017 0.23 NO
```

SignalP-HMM result:



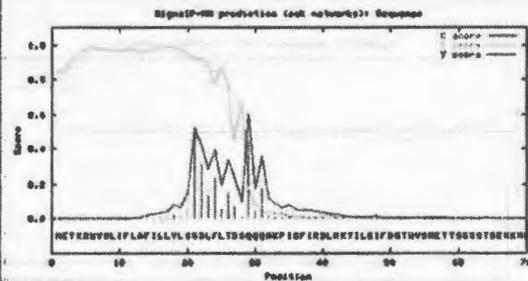
> CLS16

```
>Sequence
Prediction: Non-secretory protein
Signal peptide probability: 0.000
Signal anchor probability: 0.000
Max cleavage site probability: 0.000 between pos. -1 and 0
```

Figura S3. Análisis de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la clona de TyDC de *A. mexicana*, para la detección de dominios transmembranales y péptidos señal. SignalP 3.0 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Using neural networks (NN) and hidden Markov models (HMM) trained on eukaryotes

SignalP-NN result:



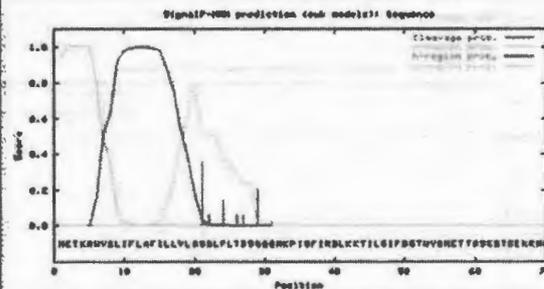
Sequence

length = 79

Measure	Position	Value	Cutoff	Signal peptide?
max. C	25	0.528	0.39	YES
max. Y	28	0.626	0.53	YES
max. S	3	0.992	0.87	YES
max. S	2-28	0.960	0.68	YES
D	2-28	0.788	0.43	YES

Most likely cleavage site between pos. 28 and 29: TDG-QG

SignalP-HMM result:



Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 0.927

Signal anchor probability: 0.008

Max cleavage site probability: 0.960 between pos. 28 and 29

Figura S4. Análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de la clona de la tirosinasa/PPO de *A. mexicana*, para la detección de dominios transmembranales y péptidos señal. SignalP 3.0 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

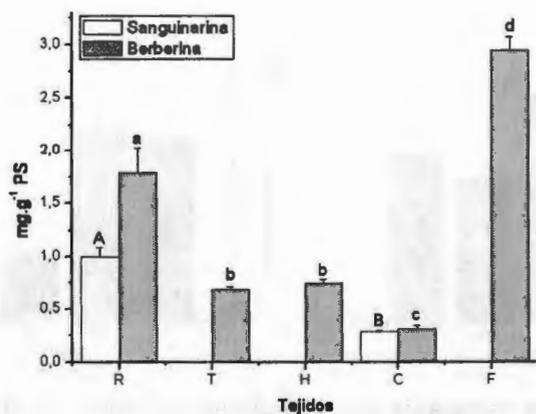


Figura S5. Contenido de ABI's en diferentes tejidos de plantas de la especie *A. mexicana*. R: raíz, T: tallo, H: hoja, C: cápsula, F: flor. Las barras representan las medias \pm DE de tres experimentos independientes. Las letras (Mayúsculas: sanguinarina; minúsculas: berberina) señalan diferencias significativas entre medias (ANOVA < 0.001).

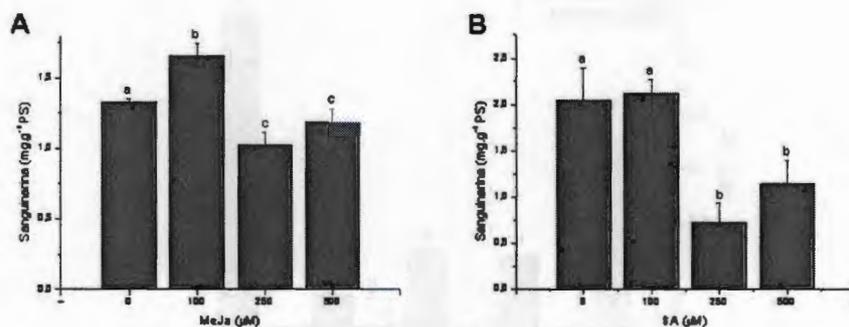


Figura S6. Dosis respuesta con inductores químicos. A) Acumulación de sanguinarina en cultivos celulares de *A. mexicana* retados con diferentes concentraciones de MeJa. B) Acumulación de sanguinarina en cultivos celulares de *A. mexicana* retados con diferentes concentraciones de SA. Las barras representan las medias \pm DE de tres experimentos independientes. Las letras (minúsculas: sanguinarina) señalan diferencias significativas entre medias (ANOVA < 0.001).

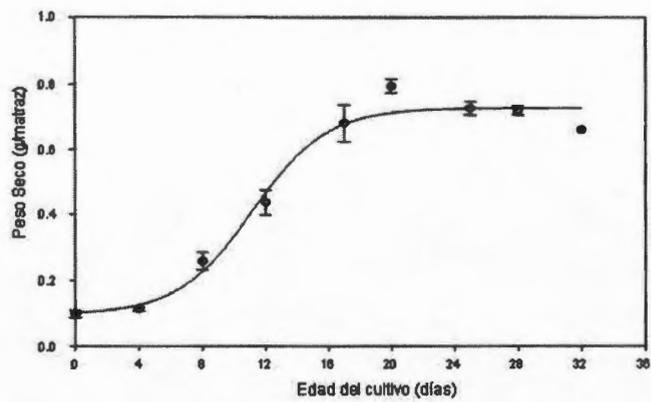


Figura S7. Caracterización del crecimiento de la suspensión celular de *A. mexicana* por peso seco. Promedio de tres repeticiones con la desviación estándar.

Fusarium oxysporum homogenates and jasmonate induce limited sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures

Karen Trujillo-Villanueva · Jorge Rubio-Piña ·
Miriam Monforte-González · Felipe Vázquez-Flota

Received: 18 February 2010 / Accepted: 11 March 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract In vitro cultures of *Argemone mexicana* (Papaveraceae) were induced from leaves of mature plants. Sanguinarine, a benzophenanthridine, was the main alkaloid in the cultures, even in the absence of inducers of secondary metabolism. The accumulation of this metabolite was increased by adding methyl jasmonate and fungal elicitors, although in a limited fashion in comparison to other sanguinarine-producing species. Evidence of a transport mechanism, which may be related to the magnitude of the response, was obtained based on the fluorescent properties of bezophenanthridines in the elicited cultures.

Keywords *Argemone mexicana* · Benzophenanthridine · Sanguinarine

Introduction

Argemone mexicana L. belongs to the Papaveraceae family. Although originating in the central and southwestern regions of North America, it is widespread in southeastern USA, Mexico, India and Australia, where it grows as a weed in meadows, abandoned agricultural lands and roadsides. *A. mexicana* has been used for a long time in Mexican traditional medicine. The presence of benzylisoquinoline alkaloids (BIA), such as alocriptopine, berberine, coptisine, chelerythrine, dihydrochelerythrine, protopine, and sanguinarine, may explain some of the *Argemone* alleged medical properties (Chang et al. 2003). We are interested in developing biotechnological tools for the study of this remarkable plant. Recently, we established in vitro cultures of *A. mexicana* with the ability to produce and accumulate sanguinarine, a benzophenanthridine-type BIA with antimicrobial properties (Ziegler and Facchini 2008). Interestingly, sanguinarine levels in these cultures were comparable to those in plant tissues, suggesting that the sanguinarine biosynthetic capacity was not severely affected by tissue dedifferentiation, as it frequently occurs (Vázquez-Flota and Loyola-Vargas 2003). Furthermore, the application of commonly used inducers of secondary metabolism, such as fungal homogenates and jasmonate, resulted in a limited increase in sanguinarine accumulation, in comparison to other species (Ziegler and Facchini 2008). This limited response was apparently

Karen Trujillo-Villanueva and Jorge Rubio-Piña contributed equally to this work.

K. Trujillo-Villanueva · J. Rubio-Piña ·
M. Monforte-González · F. Vázquez-Flota (✉)
Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas
and Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas,
Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43
No. 130 Chuburna, 97200 Mérida, Yucatán, Mexico
e-mail: felipe@ciicy.mx

Published online: 28 March 2010

Springer

related to a mechanism to avoid the sanguinarine toxic effects on cells. In here, we report our findings.

Materials and methods

Biological materials

Argemone mexicana calli (AM-1 line) has been maintained for over 2 years in $0.5 \text{ mg } 6\text{-benzylaminopurine (BAP)} \text{ l}^{-1}$ and $1.5 \text{ mg naphthalenacetic acid (NAA)} \text{ l}^{-1}$. Cell suspensions were induced by transferring friable AM-1 calli (ca 1 g fresh weight) to liquid PC media (Phillips and Collins 1979) pH 5.8, supplemented with $25 \text{ g sucrose l}^{-1}$ and the same growth regulators. Cultures were incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under continuous light (photon flux density of $40\text{--}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), and shaking at 100 rpm. Suspensions were transferred biweekly to fresh media.

Induction of alkaloid biosynthesis

Ten-day old *A. mexicana* cell suspension cultures (linear growth phase) were used for all experiments. Elicitor treatments were initiated by adding 1 ml of either methyl jasmonate (MeJa), salicylic acid (SA), or the fungal homogenate to 55 ml cell suspension. MeJa and SA were diluted in ethanol and water respectively, and added to cell cultures to the concentrations of shown in the Figures. Fungal elicitor (*Fusarium oxysporum*) was prepared as previously described (Eilert et al. 1985). Briefly, sections of mycelium (1 cm^2), grown on potato/dextrose/agar were used to inoculate 50 ml PC media and then incubated at 22°C in the dark, at 120 rpm for 6 days. Mycelia and medium were homogenized with a polytron (Janke-Kunkel, T2), autoclaved (1 kg cm^{-2}) for 20 min, and subsequently centrifuged under sterile conditions with the supernatant serving as elicitor. In all cases, samples were collected by vacuum filtration. Control cultures received 1 ml solvent instead of the elicitation treatment. Samples in triplicate were collected every 5 days and fresh weight was registered previous to freezing with liquid nitrogen. Frozen samples were stored at -20°C until analysis. For dry weight determination, tissues were freeze-dried.

Analytical procedures

Alkaloids were extracted from freeze-dried tissues with methanol, prior to chromatographic separation. Chromatographic plates were separated using a mixture of *n*-butanol/acetic acid/water (7:1:2, by vol.) and then quantified by TLC densitometry using a Shimadzu CS-930 dual wavelength chromatoscanner, equipped with a DR 2 data collector (Kyoto Japan).

Microscopic observations

Autofluorescence of samples, 1 ml of either control cells or elicited cell suspensions, was examined using an epifluorescence microscope. The presence of dihydrobenzophenanthridine and benzophenanthridine alkaloids was detected using Zeiss filter sets (Exc. BP = 365/12 nm, FT = 395 nm, Em. LP = 397 nm for dihydrobenzophenanthridines; Exc. BP = 470/40 nm, FT = 510 nm, Em. LP = 520 nm for benzophenanthridines; Weiss et al. 2006). Images were obtained with a microscope-coupled digital camera and processed by Axiovision v.3.0 software.

Results and discussion

A. mexicana cell suspensions produced mainly sanguinarine which was present throughout the entire culture period at between 0.5 and 0.8 mg g DW^{-1} . These values are comparable to those we have found in roots and leaves of entire plants growing in the area (between 1 and 2 mg g DW^{-1}). Interestingly, such amounts were higher than those found in other species, such as *Eschscholzia californica* or *Papaver somniferum*, where sanguinarine does only accumulate in response to induction treatments (Alcántara et al. 2005; Roos et al. 2006). No berberine could be detected.

The exposure of plant cell cultures to MeJa or SA to promote secondary metabolism is commonly used. Secondary metabolism in *A. mexicana* culture responded to MeJa exposure but not to SA (Fig. 1). However, maximal sanguinarine accumulation in MeJa-treated cultures only doubled that of the unexposed ones (Fig. 1). This level of induction was unexpectedly low in comparison with those recorded for other cultures, such as *P. somniferum* or

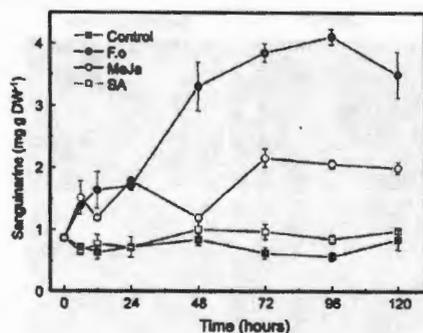


Fig. 1 Effect of fungal homogenates (*F. oxysporum*, closed circles), 100 μ M methyl-jasmonate (MeJa, open circles) or 100 μ M salicylic acid (SA, open squares) on sanguinarine accumulation. Control (closed squares) received no treatment. Average of triplicates with standard deviation

E. californica, where the elicitation response was over one order of magnitude higher (Ziegler and Facchini 2008). Even though SA treatment did not promote alkaloid accumulation, it did not inhibit it either, suggesting that this compound may not have any role in regulating secondary metabolism in *A. mexicana* cell cultures. Differential roles of these compounds in cell responses to the same type of stress have been frequently documented (Li et al. 2006). Nevertheless, the participation of SA in modifying secondary metabolism should not be discarded since responses to these stress hormones may depend on the type of exposed tissue (Vázquez-Flota et al. 2009).

Contrastingly, exposure to *F. oxysporum* homogenates produced a significant increase in sanguinarine accumulation in cell cultures after 96 h (Fig. 1). Sanguinarine values in these cultures were 4 mg g DW⁻¹, which were comparable to those found in elicited *E. californica*, *P. somniferum* and *Sanguinaria canadensis* cell cultures (Cho et al. 2007; Ziegler and Facchini 2008). Nevertheless, prior to elicitation, sanguinarine levels in *A. mexicana* cultures were noticeably higher than in the above mentioned non-elicited cell cultures. Therefore, the results suggest that the *Argemone* cultures have active alkaloid synthesis and that any further increase would be limited. Furthermore, sanguinarine is a highly toxic alkaloid which, due to its planar structure,

allows it to be intercalated into DNA. In addition, its cationic nature allows it to bind to negatively-charged membranes and it also has reactivity towards thiol groups present in a number of cytosolic enzymes and other proteins (Weiss et al. 2006). Hence, an uncontrolled increase could lead to cell damage and death.

To avoid cell damage, plants that synthesize alkaloids have developed different strategies of protection, such as vacuolar compartmentation. This latter mechanism is found in *C. roseus* cells that produce ajmalicine. Ajmalicine can freely cross the tonoplast and, once inside the vacuole, it is oxidised into serpentine, its tetrahydro-derivative, by a peroxidase (Blom et al. 1991; Loyola-Vargas et al. 1992). However, benzophenanthridines are not accumulated in vacuoles, instead they are located in the extracellular space formed between the plasmatic membrane and the cell wall (Weiss et al. 2006). Then, a different mechanism should be in operation. In *E. californica* cell cultures a detoxification mechanism involving the enzymatic conversion of sanguinarine to dihydrosanguinarine, its less toxic reduced form, has been described (Weiss et al. 2006). Interestingly, although both sanguinarine and its dihydro-derivative display a bright fluorescence, it is possible to discern one or the other given their different spectral properties (Janovská et al. 2009). Therefore, the accumulation of sanguinarine and its reduced form in response to the elicitation treatments can be monitored by fluorescence microscopy, either as a green or a blue emission, using the proper combination of optical filters (Roos et al. 2006; see Methods).

After a 24 h exposure, cultures treated with *F. oxysporum* homogenates (Fig. 2i–l) and MeJa (Fig. 2e–h), displayed a dispersed and brighter fluorescence compared to the unexposed ones (Fig. 2a–d). At this time, elicited cultures have nearly doubled their sanguinarine levels (Fig. 1). In general, sanguinarine distribution (green fluorescence) followed a similar pattern in both elicited and untreated cultures (Fig. 2b, f, j). However, dihydrosanguinarine (blue fluorescence) was located toward the cell periphery as a consequence of elicitation (Fig. 2c, g, k). This effect was clearly evident in cells exposed to fungal elicitors (Fig. 2k). Differences between sanguinarine and dihydrosanguinarine distribution in the cells can be better seen in the superimposed image (Fig. 2d, h and l). In these images, sanguinarine appears as the green regions in the cell,

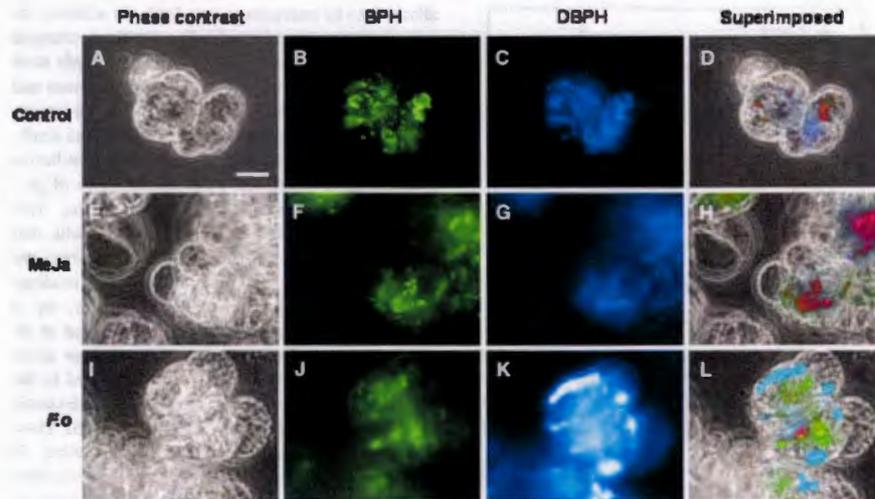


Fig. 2 Autofluorescence of control and elicitor-treated in cell suspension cultures of *A. mexicana*. Control (a–d), MeJa (e–h), *F. oxysporum* elicitor (*F. o*) preparation (i–l). BPH,

benzophenanthridine; DBPH, dihydrobenzophenanthridine. Scale bar in a = 25 μ m and is the same in all images

whereas the blue ones correspond to the dihydro form. Red areas correspond to those where both sanguinarine and the dihydro form colocalize. It is important to note that, in the cultures exposed to MeJa, in which alkaloid accumulation increased in a limited fashion (Fig. 1), both sanguinarine and the dihydro form were located in the same region; i.e. in the central area of the cell (Fig. 2d and h). Exposure to *F. oxysporum* homogenates, which induced a more pronounced response (Fig. 1), resulted in the localization of blue fluorescence as well defined areas towards the cell periphery (Fig. 2k and l). This suggests that under conditions leading to limited alkaloid accumulation, such as MeJa treatment, both sanguinarine and the dihydro form are present in the inner regions of the cell. However, when a stronger response is elicited, such as the one observed in the *F. oxysporum* treated cells, sanguinarine could be reduced to its less toxic dihydro form that is then mobilized to the periphery, pointing to a possible excretion mechanism.

The occurrence of a detoxification mechanism involving the excretion of sanguinarine and/or its reduction to dihydrosanguinarine that then could

undergo further biosynthetic reactions, has been described in *E. californica* (Weiss et al. 2006). Sanguinarine accumulates in the vacuole or it is first excreted to the extracellular space and then into the culture medium (Cho et al. 2007). This can be correlated with the limited distribution of green fluorescence (benzophenanthridine alkaloids) found in the *A. mexicana* cells. Furthermore, the involvement of a transport system associated with the endoplasmic reticulum and vesicular transport has been reported in *P. somniferum* (Alcántara et al. 2005). Since subcellular trafficking of intermediates also creates an important level of regulation (Alcántara et al. 2005; Weiss et al. 2006), transport and recycling of benzophenanthridines in these cells should be further characterized.

In brief, in the *Argemone* suspensions, sanguinarine levels were not affected by SA, but they increased after exposure to fungal homogenates and, in a lesser extent, to MeJa (Fig. 1). *Argemone* cultures behaved differently to those of other Papaveraceae plants since they accumulated considerable amounts of alkaloids at basal conditions, and even when alkaloid synthesis was inducible, it occurred in a limited way. Evidence

of a possible detoxification process, involving the subcellular trafficking of the end products could be recorded. In this way, these cultures may be used as model to study this process.

Acknowledgements This work was supported by the National Council for Science and Technology (CONACYT, México) grant for researcher consolidation SNI-52062. The authors wish to thank to Dr. ML Miranda-Ham for the critical review of the manuscript and Dr. JE Ramírez-Bentéz for technical support.

References

- Alcántara J, Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ (2005) Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiol* 138:73–183
- Blom TJM, Sierra M, van Vliet TB, Franks-vanDijk MEI, de Koning P, van Iren E, Verpoorte R, Libbenga KR (1991) Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and its conversion into serpentine. *Planta* 183:170–177
- Chang Y-C, Chang F-R, Khalil AT, Hsieh P-W, Wu Y-C (2003) Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. *Z Naturforsch* 58c:521–526
- Cho HY, Lee-Parsons SY, Yoon SYH, Rhee HS, Park JM (2007) Enhanced benzophenanthridine alkaloid production and protein expression with combined elicitor in *Eschscholzia californica* suspension cultures. *Biotechnol Lett* 29:2001–2005
- Eiler U, Kurz WGW, Constabel F (1985) Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *J Plant Physiol* 119:65–76
- Janovská M, Kubala M, Šimánek V (2009) Fluorescence of sanguinarine: fundamental characteristics and analysis of interconversion between various forms. *Anal Bioanal Chem* 395:235–240
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* 46:477–491
- Loyola-Vargas VM, Méndez-Zeal M, Monforte-González M, Miranda-Ham ML (1992) Serpentine accumulation during greening in normal and tumor tissues of *Catharanthus roseus*. *J Plant Physiol* 140:213–217
- Phillips GC, Collins GB (1979) In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci* 19:59–64
- Roos W, Viehweger K, Dordschbal B, Schumann B, Evers S, Steighardt J, Schwartze W (2006) Intracellular pH signal in the induction of secondary pathway. The case of *Eschscholzia californica*. *J Plant Physiol* 163:369–381
- Vázquez-Plata FA, Loyola-Vargas VM (2003) In vitro Plant cell culture as the basis for the development of a research institute in Mexico: Centro de Investigación Científica de Yucatán. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 39:250–258
- Vázquez-Plata F, Hernández-Domínguez E, Miranda-Ham ML, Monforte-González M (2009) A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus* in vitro cultures. *Biotechnol Lett* 31:591–595
- Weiss D, Baumert AA, Vogel M, Roos W (2006) Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant Cell Environ* 29:291–302
- Ziegler J, Facchini P (2008) Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Ann Rev Plant Biol* 59:735–769

