



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado Doctorado en Biotecnología

‘Estudios sobre la biosíntesis del metabolito secundario verbascósido en cultivos en suspensión de *Buddleja cordata*’

TESIS

Para obtener el grado de

**Doctora en Biotecnología**

PRESENTA

**Hypatia Arano Varela**

Matrícula: 2131800123

**DIRECTOR** Dr. Francisco José Fernández Perrino

**ASESORES** Dr. Francisco Cruz Sosa

Dra. María Elena Estrada Zúñiga

**JURADO**

Presidente Dr. Francisco Cruz Sosa

Secretaria Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Vocal Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Vocal Dr. Ulises Carrasco Navarro

Iztapalapa, CDMX, 06 DICIEMBRE 2021

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios así como en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, ambos del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco José Fernández Perrino y con la asesoría del Dr. Francisco Cruz Sosa y la Dra. María Elena Estrada Zúñiga.

'No one yet understands the mysterious intelligence within plants or the implications of the idea that nature communicates in a basic chemical language that is unconscious but profound'

'Nadie comprende todavía la misteriosa inteligencia que hay en el seno de las plantas, o el alcance de la idea de que la naturaleza comunica, en un lenguaje básicamente químico, lo que es inconsciente pero profundo'

-Terrence McKenna

## ***Agradecimientos***

Al ***Dr. Francisco José Fernández Perrino***, por admitirme en su equipo y por todas las enseñanzas y facilidades otorgadas durante el desarrollo de este trabajo. Por todo su apoyo, confianza, cariño, paciencia y por las oportunidades concedidas. Pero sobre todo por permitirme ser y hacer.

Al ***Dr. Francisco Cruz Sosa***, por su apoyo, asesoría, e inestimable disposición para proveer las condiciones para el desarrollo de este y otros proyectos a lo largo de mi formación académica.

A la ***Dra. María Elena Estrada Zúñiga***, por sus valiosas enseñanzas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto. Por compartir extraordinariamente su conocimiento y sobre todo por contagiar las ganas de ver e ir siempre más allá. 'Male', gracias por tu cariño y amistad.

A los doctores, ***Dra. María Elena Estrada Zúñiga, Dra. Laura Josefina Pérez Flores, Dr. Francisco Cruz Sosa y Dr. Ulises Carrasco Navarro*** por su amable atención y sobre todo por sus valiosos comentarios para enriquecer esta tesis.

A la ***Dra. Beatríz Xoconostle Cázares*** y al ***Dr. Roberto Ruiz Medrano*** del CINVESTAV Unidad Zacatenco por tan amable atención, asesoría y por todas las facilidades concedidas durante la realización de los procesos de silenciamiento génico.

Al ***Dr. José Alberto Mendoza Espinoza*** de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México Plantel Casa Libertad, por tan valiosa asesoría respecto al análisis de resultados de cromatografía de masas.

Al ***Dr. Hector Hugo León Santiesteban*** 'Hugo López', por sus valiosos comentarios y asesoría durante los procedimientos de cromatografía de líquidos HPLC.

Al ***Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)*** por la beca concedida para el desarrollo de este trabajo.

A ***mi familia*** por todo su apoyo y sobre todo por su amor incondicional. También, a quienes no están más en este plano terrenal pero cuyo recuerdo permanece latente en mi corazón.

A mis pilares, quienes siempre han estado y sé permanecerán. Por nunca dejar de confiar en mí y sobre todo por tanto amor **Leticia Varela Medina** y **Enrique Arano Lugo**.

A mis hermanos por ser y por estar, indistintamente **Baltazar Enrique Arano Varela**, **Miriam Lucerito Arano Varela** y **Thalia Arano Varela**.

A **Gabriel**, a pesar de que ahora nuestras vidas han tomado cauces diferentes, no puedo dejar de agradecer el amor, apoyo, compañía y complicidad durante el desarrollo de una parte significativa de este proyecto. Gracias por todo lo que me enseñaste.

A mis compañeros de laboratorio Aurelio, Hugo, Moi, Ulises, Lalo, Aarón, Kenia, Marisol, Tere, Osmar, Esmeralda, María Fernanda, Wyma, Leyda, Arturo por compartirse, apoyarme y crear un ambiente de trabajo agradable.

A quienes de alguna u otra forma contribuyeron durante el desarrollo y culminación de este proyecto.

*I passed through dark and storms,  
I looked for the road to light,  
To a rich creative life...  
And I have found it! Remember that!*

*Atravesé la oscuridad y las tormentas,  
Busqué el camino a la luz,  
A una rica vida creativa...  
¡Y la he encontrado! ¡Recuérdalo!*

Olga Skorokhodova

***Ha sido un largo recorrido pero, encontré algo que no sabía estaba buscando: a mí misma***

# ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
.....	
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
.....	
<b>2.1 Metabolismo vegetal especializado</b>	<b>6</b>
.....	
<b>2.1.1 Metabolismo secundario</b>	<b>7</b>
.....	
<b>2.1.1.1 Clasificación de los metabolitos secundarios</b>	<b>12</b>
.....	
<b>2.1.1.1.1 Terpenoides</b>	<b>12</b>
.....	
<b>2.1.1.1.2 Compuestos que contienen nitrógeno: alcaloides</b>	<b>15</b>
.....	
<b>2.1.1.1.3 Compuestos fenólicos</b>	<b>17</b>
.....	
<b>2.1.1.2 Métodos analíticos para la identificación de metabolitos secundarios</b>	<b>22</b>
.....	
<b>2.1.1.3 Importancia económica de los metabolitos secundarios</b>	<b>24</b>
.....	
<b>2.1.1.4 Estrategias para la producción de metabolitos secundarios</b>	<b>27</b>
.....	
<b>2.1.1.4.1 Síntesis química</b>	<b>27</b>
.....	
<b>2.1.1.4.2 Expresión heteróloga</b>	<b>27</b>
.....	

<b>2.1.1.4.3 Cultivo de tejidos vegetales</b>	<b>29</b>
.....	
<b>2.1.1.4.3.1 Cultivos celulares y suspensiones celulares vegetales para la producción de metabolitos secundarios</b>	<b>32</b>
.....	
<b>2.1.1.4.3.1.1 Estrategias para optimizar la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares vegetales</b>	<b>34</b>
.....	
<b>2.1.1.4.3.1.1.1 Elicitores</b>	<b>34</b>
.....	
<b>2.1.1.4.3.1.1.2 Alimentación con precursores</b>	<b>37</b>
.....	
<b>2.2 Verbascósido, un fenilpropanoide de importancia farmacológica</b>	<b>38</b>
.....	
<b>2.2.1 Feniletanoide glicósidos</b>	<b>41</b>
.....	
<b>2.2.1.1 Verbascósido</b>	<b>43</b>
.....	
<b>2.2.1.1.1 Distribución biológica</b>	<b>44</b>
.....	
<b>2.2.1.1.1.1 <i>Buddleja cordata</i> Kunth, planta medicinal productora de verbascósido</b>	<b>44</b>
.....	
<b>2.2.1.1.1.1.1 Usos e importancia para la población de México</b>	<b>45</b>
.....	
<b>2.2.1.1.1.1.2 Fitoquímica</b>	<b>45</b>
.....	
<b>2.2.1.1.2 Estructura</b>	<b>46</b>
.....	
<b>2.2.1.1.3 Actividades biológicas</b>	

.....	47
2.2.1.1.4 Síntesis y biosíntesis del verbascósido	
.....	48
2.2.1.1.5 Producción biotecnológica de verbascósido	
.....	51
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	
.....	53
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	
.....	55
<b>V. OBJETIVOS</b>	
.....	56
<b>VI. MATERIALES</b>	
.....	57
6.1 Material vegetal.	
.....	57
6.2 Cepas microbianas	
.....	54
6.3 Vectores de clonación	
.....	57
<b>VII. MÉTODOS</b>	
.....	58
7.1 Cultivos celulares en suspensión de <i>B. cordata</i>	
.....	58
7.1.1 Establecimiento de cultivos en suspensión	
.....	58
7.1.2 Cinéticas de crecimiento	
.....	58
7.2 Incremento en la producción de verbascósido	
.....	59
7.2.1 Alimentación de los cultivos con L-fenilalanina como precursor	
.....	60



<b>7.2.2 Elicitación con metil jasmonato</b>	
.....	<b>60</b>
<b>7.2.3 Efecto combinado de L-fenilalanina y metil jasmonato</b>	
.....	<b>60</b>
<b>7.3 Dilucidación de enzimas involucradas en la síntesis de verbascósido mediante el uso de inhibidores</b>	
.....	<b>61</b>
<b>7.3.1 Ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, inhibidor de la enzima fenilalanina amonio liasa [PAL, EC 4.3.1.24])</b>	
.....	<b>61</b>
<b>7.3.2 Metil tirosina (AMPT, Sigma-Aldrich Co., USA, un inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa, EC 1.14.16.1)</b>	
.....	<b>61</b>
<b>7.3.3 Benserazida (Sigma-Aldrich Co., USA, inhibidor de la enzima DOPA decarboxilasa, EC 4.1.1.28)</b>	
.....	<b>61</b>
<b>7.4 Procedimientos analíticos</b>	
.....	<b>62</b>
<b>7.4.1 Extracción de fenilpropanoides y preparación de estándares</b>	
.....	<b>62</b>
<b>7.4.2 Cuantificación de metabolitos por HPLC</b>	
.....	<b>62</b>
<b>7.4.3 Velocidad específica de producción y productividad</b>	
.....	<b>63</b>
<b>7.4.4 Análisis estadístico</b>	
.....	<b>63</b>
<b>7.5 Análisis metabólico</b>	
.....	<b>63</b>
<b>7.5.1 Análisis de perfiles metabólicos</b>	
.....	<b>64</b>

<b>7.5.1.1 Extracción de metabolitos</b>	
.....	<b>64</b>
<b>7.5.1.2 Espectrometría de masas</b>	
.....	<b>64</b>
<b>7.5.1.2.1 Instrumento y condiciones analíticas</b>	
.....	<b>64</b>
<b>7.5.1.2.2 Adquisición y análisis de datos</b>	
.....	<b>65</b>
<b>7.6 Dilucidación de enzimas involucradas en la síntesis de verbascósido mediante procedimientos moleculares</b>	
.....	<b>65</b>
<b>7.6.1 Extracción de ADN genómico (ADNg)</b>	
.....	<b>65</b>
<b>7.6.2 Extracción de ARN mensajero (ARNm)</b>	
.....	<b>66</b>
<b>7.6.3 Obtención de ADN complementario (ADNc)</b>	
.....	<b>67</b>
<b>7.6.4 Clonación del gen PAL de <i>Buddleja cordata</i> (BcPAL)</b>	
.....	<b>68</b>
<b>7.6.5 Clonación de los productos de PCR en el vector pGEM y transformación de <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	
.....	<b>70</b>
<b>7.6.6 TENS-Mini Prep</b>	
.....	<b>70</b>
<b>7.6.7 Análisis de secuencias amplificadas</b>	
.....	<b>71</b>

7.7 Silenciamiento del gen fenilalanina amonio liasa ' <i>pal</i> ' en cultivos en suspensión de <i>Buddleja cordata</i>	71
7.7.1 Construcción del vector de silenciamiento para el gen fenilalanina amonio liasa ( <i>pal</i> ) de <i>Buddleja cordata</i> ( <i>Bcpal</i> )	71
7.7.2 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	73
7.7.3 Inoculación, co-cultivo y selección de transformantes	74
<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	75
8.1 La línea celular de <i>B. cordata</i> reestablecida en suspensión mantuvo la capacidad de crecer rápidamente, así como de producir en alta concentración verbascósido	75
8.2 La producción de verbascósido en cultivos en suspensión de <i>B. cordata</i> aumentó al emplear estrategias biotecnológicas	85
8.2.1 Alimentación de los cultivos con L-fenilalanina (L-Phe) como precursor	85
8.2.2 Elicitación de los cultivos con metil jasmonato (MeJa)	93
8.3 Dilucidación de las enzimas que participan en la síntesis de verbascósido en <i>B. cordata</i> : residuos de ácido caféico e hidroxitirosol	103

8.3.1 La inhibición de la fenilalanina amonio liasa ( <i>PAL</i> , EC 4.3.1.24) disminuyó la producción de verbascósido	103
8.3.2 La inhibición de enzimas involucradas en la síntesis de hidroxitirosol disminuyó la producción de verbascósido	108
8.3.2.1 Metil tirosina (AMPT), inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa (tirosinasa, EC 1.14.16.2)	110
8.3.2.2 Benserazida, inhibidor de la enzima DOPA decarboxilasa, (DOPA-dec, EC 4.1.1.28)	113
8.3.3 Perfil metabolómico putativo de células en suspensión de <i>B. cordata</i>	119
8.4 Clonación del gen <i>PAL</i> de <i>Buddleja cordata</i> ( <i>BcPAL</i> )	142
8.5 Caracterización de la proteína BcPal1 putativa	156
8.6 Silenciamiento del gen fenilalanina amonio liasa ' <i>pal</i> ' en cultivos en suspensión de <i>Buddleja cordata</i>	167
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>176</b>
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	<b>179</b>
<b>XI. REFERENCIAS</b>	<b>181</b>
<b>ANEXO</b>	<b>200</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Algunos metabolitos secundarios de origen vegetal aprobados para uso terapéutico durante los últimos 30 años (Wilson y Roberts, 2012; Atanasov *et al.*, 2015).

..... 25

**Tabla 2.** Clasificación de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y sus principales representantes en la naturaleza y sus análogos sintéticos. Basada en Jamwal *et al.*, 2017.

..... 31

**Tabla 3.** Clasificación de elicitores para la producción de metabolitos secundarios.  
\*\*\* Datos de Namdeo, 2007; Vasconsuelo y Boland 2007; Ramírez-Estrada *et al.*, 2016; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018.

..... 35

**Tabla 4.** Parámetros de crecimiento de la primera y de la segunda determinación de la línea de *B. cordata* en suspensión. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS.

..... 77

**Tabla 5.** Comparación de la extensión de las fases de crecimiento entre la primera y la segunda determinación de la línea de *B. cordata* restablecida como sistema en suspensión.

..... 77

**Tabla 6.** Comparación entre los datos de productividad de la línea celular de *B. cordata* durante la primera y segunda determinación, así como los valores de la línea original (2009).

..... 80

**Tabla 7.** Comparación de los rendimientos de producción de PhGs y/o verbascósido cuya biosíntesis fue mejorada *vía* diversas estrategias biotecnológicas en diferentes sistemas vegetales cultivados *in vitro*.

..... 100

**Tabla 8.** Principales rutas metabólicas de células de *B. cordata* afectadas por el tratamiento con **a)** L-fenilalanina (L-Phe), **b)** metil jasmonato (MeJa), **c)** benserazida y **d)** ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP). Los resultados fueron obtenidos mediante análisis de enriquecimiento de picos de rutas metabólicas en modo positivo y negativo en la plataforma MetaboAnalist 5.0. Los números indican la cantidad de compuestos putativamente representados de cada ruta en cada tratamiento.                   \*\*\*                   ND,                   no                   detectado

..... 127

**Tabla 9.** Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la ruta biosintética de los fenilpropanoides

..... 133

<b>Tabla 10.</b> Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la ruta biosintética de flavonoides, flavonas y flavonoles. .....	<b>134</b>
<b>Tabla 11.</b> Compuestos putativamente identificados pertenecientes a las vías de síntesis de precursores de catecolaminas, indol-alcaloides y alcaloides isoquinolina. .....	<b>135</b>
<b>Tabla 12.</b> Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la vía de síntesis de estructuras terpénicas. .....	<b>135</b>
<b>Tabla 13.</b> Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la vía de síntesis de terpenos ubiquinona y tocoferoles. .....	<b>136</b>
<b>Tabla 14.</b> Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la vía de síntesis de diterpenos/giberelinas. .....	<b>137</b>
<b>Tabla 15.</b> Abundancias relativas de los iones precursores de los compuestos verbascósido, equinacósido, cumarina, ácido siríngico y ácido cumárico obtenidas por espectrometría de masas en cada uno de los tratamientos probados en células de <i>B. cordata</i> , benserazida, AIP, L-Phe y MeJa. .....	<b>139</b>
<b>Tabla 16.</b> Comparación de la composición de la estructura secundaria deducida de una proteína fenilalanina amonio liasa de <i>Buddleja cordata</i> (Bcpal1) y algunas especies cercanas pertenecientes al Orden Lamiales ( <i>Cistanche deserticola</i> , GU451308.1; <i>Rehmannia glutinosa</i> , AAK84225.1, <i>Picrorhiza kurrooa</i> , AGA84059.1 y <i>Digitalis lanata</i> , CAA05251.1). Los datos fueron obtenidos con los recursos en línea ProtParam ( <a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a> ), para calcular el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular de las proteínas, y SOPMA ( <a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html">https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html</a> ), para determinar la estructura secundaria de las proteínas. .....	<b>157</b>
<b>Tabla 17.</b> Comparación de la composición de aminoácidos deducida para una proteína fenilalanina amonio liasa de <i>Buddleja cordata</i> (Bcpal1) y algunas especies cercanas pertenecientes al Orden Lamiales ( <i>Cistanche deserticola</i> , GU451308.1; <i>Rehmannia glutinosa</i> , AAK84225.1, <i>Picrorhiza kurrooa</i> , AGA84059.1 y <i>Digitalis lanata</i> , CAA05251.1). Los datos fueron obtenidos con el recurso en línea ProtParam ( <a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a> ). .....	<b>161</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Clasificación funcional de productos orgánicos de bajo peso molecular producidos por las plantas. En algunos casos su designación es difícil: muchos metabolitos secundarios pueden ejercer diversas actividades más allá de las que facultan la interacción planta-ambiente.  
\*\* Tomada y modificada de Erb y Kliebenstein, 2020.

..... 1

**Figura 2.** Representación esquemática de las principales vías metabólicas implicadas en la biosíntesis de los compuestos fenólicos (flavonoides y no-flavonoides: ácidos hidroxicinámicos, ácidos benzóicos, cumarinas, estilbenos, curcuminas y ligninas). PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, trans-cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumaroil-CoA ligasa (Cheynier *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2015 y Kumar y Goel, 2019).

..... 21

**Figura 3.** La cascada 'ómica' comprende conjuntos de datos complejos a diferentes niveles que, como entidad, describen de manera exhaustiva la respuesta de los sistemas biológicos a enfermedades, perturbaciones genéticas y ambientales. Dentro de estas bases de datos, el metaboloma es el más predictivo del fenotipo. Dettmer *et al.*, 2007.

..... 22

**Figura 4.** Estructura central de los feniletanoide glicósidos. Consisten de un elemento hidroxifeniletil (verde) unido a una  $\beta$ -glucopiranososa (azul) mediante un enlace glucosídico (rojo). A esta estructura se unen usualmente múltiples sustituyentes, como ácidos hidroxicinámicos y/u otros azúcares (R4-7).

\*Modificada de Xue y Yang, 2016.

..... 42

**Figura 5.** Estructura química del metabolito verbascósido. Está compuesto por cuatro elementos: una molécula de glucosa como compuesto central a la cual se une una molécula de ramnosa; mediante un enlace éster se une una molécula de ácido caféico y una molécula de hidroxitirosol se une mediante un enlace glicosídico.

..... 47

**Figura 6.** Propuestas de ruta de biosíntesis de verbascósido, **a)** Figura 1 en Zhou *et al.*, 2020 y **b)** Figura 2 en Park *et al.*, 2020.

..... 50

**Figura 7.** Morfología celular de *B. cordata* células cultivadas en suspensión. Cadenas integradas por aproximadamente 2 a 8 células principalmente **a.** alargadas o en **b.** forma redonda. Las observaciones fueron realizadas a 100X. La tinción se llevó a cabo con colorante azul de Evans, para determinar la viabilidad celular (las células azules son inviables).

..... 75

**Figura 8.** Perfiles de crecimiento (azul) y de producción de verbascósido (rojo) de la línea celular restablecida en suspensión de *B. cordata*. **a.** primera determinación; **b.** segunda determinación. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS.

..... 78

**Figura 9.** Perfil cromatográfico (HPLC, detector DAD 330 nm) de un extracto metanólico de una muestra de un cultivo de células en suspensión de *B. cordata*. Señalado en el cromatograma, (A) verbascósido, (B) cumarina, (C) estándar interno.

..... 79

**Figura 10.** Perfiles de **a.** producción de biomasa (línea azul, corresponde al control) y **b.** verbascósido (línea azul corresponde al control) de la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* después de adicionar L-Phe (600  $\mu$ M) en el día 0 de cultivo ( $t_0$ ). Las células fueron colectadas cada dos días después de la alimentación con el precursor. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control

..... 87

**Figura 11.** Perfiles de **a.** producción de biomasa (línea azul corresponde al control) y **b.** verbascósido (línea azul corresponde al control) de la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* después de adicionar L-Phe (600  $\mu$ M) en el día 9 de cultivo ( $t_9$ ). Las células fueron colectadas cada dos días después de la alimentación con el precursor. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

..... 88

**Figura 12.** Perfiles de **a.** producción de biomasa y **b.** verbascósido de la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* después de adicionar L-Phe en el día 3 de cultivo ( $t_3$ ). Azul-control; rojo-200  $\mu$ M; verde-400  $\mu$ M; morado-600  $\mu$ M. Las células fueron colectadas cada dos días después de la alimentación con el precursor. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

..... 90

**Figura 13.** Efecto de metil jasmonato (0, 50, 100 y 200  $\mu$ M) sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto en el día 0 de cultivo ( $t_0$ ). Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

..... 95

**Figura 14.** Efecto de Metil jasmonato (0, 50, 100 y 200  $\mu$ M) sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto en el día 9 de cultivo ( $t_9$ ). Los resultados son la media de tres réplicas



± DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

..... 95

**Figura 15.** Efecto del inhibidor ácido 2-aminoindan-2-fosfónico, (AIP, 0, 10, 40 y 100  $\mu\text{M}$ ) sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto al momento de la inoculación ( $t_0$ ). Los resultados son la media de tres réplicas ± DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

..... 107

**Figura 16.** Rutas de biosíntesis del compuesto hidroxitirosol en *Olea europaea* L (Saimaru y Orihara, 2010). La ruta principal parte del aminoácido tirosina, el cual es hidroxilado por la enzima tirosina hidroxilasa (TH, cuya acción es inhibida por Metil tirosina 'AMPT') para formar DOPA, el cual a su vez es descarboxilado por la enzima DOPA-decarboxilasa (DOPA-dec, cuya acción es inhibida por benserazida) generando dopamina y ésta a su vez hidroxitirosol.

..... 109

**Figura 17.** Efecto de la adición del inhibidor Metil tirosina (AMPT, 0.5, 1.0 y 2.0 mM) después de 15 días de exposición sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto al  $t_{15}$  de cultivo. Los resultados son la media de tres réplicas ± DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

..... 110

**Figura 18.** Efecto de la adición del inhibidor benserazida (0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mM) después de 15 días de exposición sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto al  $t_{15}$  de cultivo. Los resultados son la media de tres réplicas ± DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

..... 113

**Figura 19.** Rutas de biosíntesis asociadas a la producción de hidroxitirosol, salidrósido, catecolaminas y alcaloides benzilisoquinolina. Esquema integrado con datos de Kulma y Szopa 2007; Torrens-Spence *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020 y Lichman, 2021. Las flechas verdes indican los posibles sustratos de la enzima Tir/DopaDC (tirosina/DOPA descarboxilasa). Las flechas azules indican los posibles sustratos de la enzima PPO (polifenol oxidasa).

..... 118

**Figura 20.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con L-

fenilalanina 600  $\mu\text{M}$ , y su control correspondiente (Control), adicionada al  $t_9$  y colectada después de 10 días de exposición.

..... 120

**Figura 21.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con metil jasmonato MeJa, 50  $\mu\text{M}$ , y su control (células sin tratamiento), adicionado al  $t_9$  y colectada después de 48 horas de exposición.

..... 121

**Figura 22.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con benserazida (inhibidor de Tir/DOPA-dec, EC 4.1.1.25, 3.0 mM), y su control correspondiente (Control), adicionado a los quince días de cultivo  $t_{15}$  y colectadas después de 15 días de exposición (benserazida).

..... 121

**Figura 23.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con AIP (Ácido 2-aminoindan-2-fosfónico, inhibidor de la enzima fenilalanina amonio liasa [PAL, EC 4.3.1.24, 100  $\mu\text{M}$ ]), y su control correspondiente (Control), adicionado al momento de la inoculación  $t_0$  y colectadas después de 21 días de exposición (AIP)

..... 122

**Figura 24.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* en diferentes momentos de crecimiento: a los días 11, 19, 21 y 30 de cultivo.

..... 122

**Figura 25.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo positivo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con L-fenilalanina 600  $\mu\text{M}$ , adicionada al  $t_9$  y colectada después de 10 días de exposición (L-Phe) y su control correspondiente (Control).

..... 123

**Figura 26.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) de células de *B. cordata* con fuente de ionización electroespray modo positivo del extracto metanólico tratadas con metil jasmonato MeJa, 50  $\mu\text{M}$ , adicionado al ( $t_9$ ) y colectada después de 48 horas de exposición y células sin tratamiento (Control).

..... 124

**Figura 27.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo positivo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con

benserazida (inhibidor de Tir/DOPA-dec, EC 4.1.1.25, 3.0 mM) adicionado a los quince días de cultivo  $t_{15}$  y colectadas después de 15 días de exposición (benserazida) y su control correspondiente (Control).

..... 124

**Figura 28.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo positivo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con AIP (Ácido 2-aminoindan-2-fosfónico, inhibidor de la enzima fenilalanina amonio liasa [PAL, EC 4.3.1.24, 100  $\mu$ M]) adicionado al momento de la inoculación  $t_0$  y colectadas después de 21 días de exposición (AIP) y su control correspondiente (Control).

..... 125

**Figura 29.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo positivo del extracto metanólico de células de *B. cordata* en diferentes momentos de crecimiento: a los días 11, 19, 21 y 30 de cultivo.

..... 125

**Figura 30.** Principales rutas del metabolismo primario afectadas por el tratamiento con L-fenilalanina (L-Phe, azul), metil jasmonato (MeJa, rojo), benserazida (verde) y ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, morado) de células de *B. cordata*. Los resultados fueron obtenidos mediante análisis enriquecimiento de rutas metabólicas de picos en **a)** modo positivo y **b)** modo negativo.

..... 128

**Figura 31.** Principales rutas del metabolismo de ácidos grasos afectadas por el tratamiento con L-fenilalanina (L-Phe, azul), metil jasmonato (MeJa, rojo), benserazida (verde) y ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, morado) de células de *B. cordata*. Los resultados fueron obtenidos mediante análisis enriquecimiento de rutas metabólicas de picos en **a)** modo positivo y **b)** modo negativo.

..... 129

**Figura 32.** Principales rutas del metabolismo secundario afectadas por el tratamiento con L-fenilalanina (L-Phe, azul), metil jasmonato (MeJa, rojo), benserazida (verde) y ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, morado) de células de *B. cordata*. Los resultados fueron obtenidos mediante análisis enriquecimiento de rutas metabólicas de picos en **a)** modo positivo y **b)** modo negativo.

..... 130

**Figura 33.** Perfil de elución **a.** en modo positivo y **b.** en modo negativo de compuestos presentes es en células en suspensión de *B. cordata* basado en el análisis de enriquecimiento de rutas (MetaboAnalyst).

..... 131

**Figura 34. Comparación de abundancias** relativas de los iones precursores de los compuestos **a.** verbascósido y **b.** equinacósido, cumarina, ácido siríngico y ácido cumárico obtenidas por espectrometría de masas en cada uno de los tratamientos probados en células de *B. cordata*, benserazida, AIP, L-Phe y MeJa.

..... 140

**Figura 35.** Esquema de reacción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Hyun *et al.*, 2011).

..... 143

**Figura 36.** Alineamiento múltiple de secuencias conocidas de nucleótidos del gen fenilalanina amonio liasa 'PAL' de especies pertenecientes al orden Lamiales (GeneBank) así como su secuencia consenso: *Solenostemon scutellarioides* (JQ975419), *Scutellaria baicalensis* (HM062776.1), *Melissa officinalis* (FN665700.1), *Agastache rugosa* (AF326116.1), *Pogostemon cablin* (KJ768874.1), *Prunella vulgaris* (KJ010815.1), *Salvia miltiorrhiza* (DQ408636.1), *Perilla frutescens* (JQ277717.1), *Cistanche deserticola* (GU451308.1), *Olea europea* (KJ511867.1).

..... 146

**Figura 37.** Alineamiento múltiple de secuencias conocidas de aminoácidos de la proteína fenilalanina amonio liasa 'PAL' de especies pertenecientes al orden Lamiales (GeneBank) así como su secuencia consenso: *Solenostemon scutellarioides* (AFZ94859.1), *Scutellaria baicalensis* (ADN32767.1), *Melissa officinalis* (CBJ23826.1), *Agastache rugose* (AAK15640.1), *Pogostemon cablin* (AJ053273.1), *Prunella vulgaris* (AHY94892.1), *Salvia miltiorrhiza* (ABD73282.1), *Perilla frutescens* (AEZ67457.1), *Cistanche deserticola* (ADD12041.1), *Olea europea* (AHZ31605.1).

..... 148

**Figura 38.** Electroforesis de ARN total en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes. Visualización de las tres bandas de ARN: 28S, 18S y sn (small nuclear). Cada carril contiene 1 µg de ARN total extraído de células en suspensión de *B. cordata*.

..... 148

**Figura 39.** Secuencia de nucleótidos de un fragmento de ARN mensajero de un gen *pal* de *Buddleja cordata*, producto de una PCR anidada con los primers F2nes-R2nes. (Secuenciación con primer F2nes).

..... 150

**Figura 40.** Secuencia de nucleótidos de un fragmento de ARN mensajero de un gen *pal* de *Buddleja cordata*, producto de una PCR anidada con los primers F2nes-R2nes. (Secuenciación con primer R2nes).

..... 151

**Figura 41.** Resultado del análisis tipo BLASTn (nucleótidos, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de las secuencias de nucleótidos obtenidas (Figuras 24 y 25), **a)** descripción de los resultados de secuencias con el mayor parecido a las secuencias analizadas, **b)** taxonomía de los organismos a los cuales pertenecen las secuencias resultantes.

..... 152

**Figura 42.** Secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos putativa del gen *Bcpal1* de *Buddleja cordata*. El codón de paro (TAG) está en negritas y subrayado. El sitio de *splicing* GT/AG está sombreado. La secuencia consenso del sitio activo de la enzima (PS00488) está dentro de un rectángulo. Se desconoce la región 5' del primer exón, así como la región 3' de la secuencia intrónica.

..... 154

**Figura 43.** Motivo rúbrica de las fenilalanina e histidina amonio liasa. **a)** secuencia del motivo PS00488 en la base de datos Prosite (<https://prosite.expasy.org/>), **b)** motivo rúbrica en la secuencia de aminoácidos de la proteína putativa BcPal1 (resaltado en amarillo).

..... 155

**Figura 44.** Estructura secundaria deducida de una isoforma de la proteína PAL de *Buddleja cordata* (BcPal1) y de otras proteínas PAL vegetales pertenecientes al Orden Lamiales, *Cistanche deserticola* (GU451308.1, Hu *et al.*, 2011), *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), *Picrorhiza kurrooa* (AGA84059.1) y *Digitalis lanata* (CAA05251.1).  $\alpha$ -hélice (azul), Giros  $\beta$  (verde), hebras extendidas (rojo), enrollamientos al azar (amarillo). Los datos fueron obtenidos con el recurso en línea SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html))

..... 157

**Figura 45.** Estructura 3D deducida de una isoforma de la proteína PAL de *Buddleja cordata* y estructura 3D de otras proteínas PAL vegetales pertenecientes al Orden Lamiales, *Cistanche deserticola* (GU451308.1, Hu *et al.*, 2011), *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), *Picrorhiza kurrooa* (AGA84059.1) y *Digitalis lanata* (Acceso, CAA05251.1). Los modelos fueron obtenidos con Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>).

..... 159

**Figura 46.** Estructura 3D deducida de una isoforma de la proteína PAL de *Buddleja cordata* y estructura 3D de la proteína PAL de *Cistanche deserticola* (Hu *et al.*, 2011). Con círculos amarillos se indica la región faltante de la proteína (la región 5' en el gen *Bcpal1*). Los modelos fueron obtenidos con Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>).

..... 160

**Figura 47.** Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de una isoforma de la proteína PAL de *Buddleja cordata* con secuencias consenso de otras proteínas PAL vegetales.

**Consenso A**, Secuencias aminoacídicas de PAL de perejil, papa, frijol, soya, alfalfa, tomate, tabaco y papa dulce (Appert *et al.*, 1994). **Consenso B**, Secuencias aminoacídicas de PAL de especies cercanas a *B. cordata*, pertenecientes al Orden Lamiales, *Cistanche deserticola* (GU451308.1, Hu *et al.*, 2011), *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), *Picrorhiza kurrooa* (AGA84059.1), *Digitalis lanata* (Acceso, CAA05251.1), *Sesamum indicum* (XP\_011077338.1), *Handroanthus impetiginosus* (PIM98440.1), *Perilla frutescens* (AEZ67457.1), *Plectranthus scutellarioides* (AFZ94859.1), *Erythranthe guttata* (XP\_012836017.1), *Scutellaria baicalensis* (PAL2, ADN32768.1).

..... 162

**Figura 48.** Comparación de la secuencia de nucleótidos de una isoforma del gen *pal* de *Buddleja cordata* con secuencias *pal* especies cercanas a *B. cordata*, pertenecientes al Orden Lamiales, *Cistanche deserticola* (GU451308.1, Hu *et al.*, 2011), *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), *Picrorhiza kurrooa* (AGA84059.1), *Digitalis lanata* (Acceso, CAA05251.1), *Sesamum indicum* (XP\_011077338.1), *Handroanthus impetiginosus* (PIM98440.1), *Perilla frutescens* (AEZ67457.1), *Plectranthus scutellarioides* (AFZ94859.1), *Erythranthe guttata* (XP\_012836017.1), *Scutellaria baicalensis* (PAL2, ADN32768.1).

..... 162

**Figura 49.** Comparación de la secuencia de aminoácidos de cuatro isoformas de la proteína PAL de **a)** *Petroselinum crispum* (perejil) (Appert *et al.*, 1994) y **b)** *Arabidopsis thaliana* (AAP59438.1, Pal1; AAP59439.1, Pal2; AAS18574.1, Pal3; AAP59440.1, Pal4).

..... 163

**Figura 50.** Alineamiento de un segmento de nucleótidos de tres isoformas del gen *pal* de *Buddleja cordata*.

..... 164

**Figura 51.** Alineamiento de un segmento de aminoácidos deducidos de tres isoformas de la proteína Pal de *Buddleja cordata*.

..... 164

**Figura 52.** Alineamiento de aminoácidos deducidos de fragmentos de tres isoformas (BcPal1, BcPal2 y BcPal3) de la proteína PAL de *Buddleja cordata*.

..... 165

**Figura 53.** Mapa del vector de entrada BcPalTOPO empleado para la construcción del vector de expresión BcPalGW80. El vector contiene el origen de replicación 'ori', el promotor T7, las secuencias de terminación transcripcional *rrnB* T1 y T2. Un fragmento del gen *BcPal2*, flanqueado por los primers SilR y SilR. Los sitios de recombinación attL1 y attL2. Además el gen de resistencia a estreptomicina 'SmR' como marcador de selección.

..... 168

**Figura 54.** Mapa del vector de silenciamiento BcPalGW80. El vector contiene el origen de replicación 'ori', el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 'CaMV35S', el terminador del gen nopalina sintasa 'NOS', dos fragmentos del gen *BcPal2*, cada uno flanqueado por los primers SilR y SilR. Los sitios de recombinación attB1 y attB2, el gen de resistencia a neomicina/kanamicina/geneticina 'NeoR/KanR' con el promotor NOS y además el gen de resistencia a estreptomicina 'SmR' como marcadores de selección.

..... 169

**Figura 55.** Comparación entre fragmentos de secuencias del gen *BcPal1* y *BcPal2*. La secuencia del gen *BcPal2* fue empleada para construir el vector de silenciamiento BcPalGW80.

..... 171

## **ANEXO**

<b>Medio basal Murashige y Skoog (MS)</b> .....	<b>200</b>
<b>Medio de inducción</b> .....	<b>201</b>
<b>Buffer de lisis pH 7.8 (modificado de Al-Samarrai y Schmid, 2000)</b> .....	<b>201</b>
<b>Medio Luria-Bertani (LB)</b> .....	<b>201</b>
<b>Medio YEB</b> .....	<b>201</b>
<b>Buffer TENS</b> .....	<b>202</b>
<b>Otras secuencias amplificadas con primers degenerados</b> .....	<b>202</b>
<b>Anexo. Figura 1.</b> Gradiente programado para la fase móvil en el análisis de espectrometría de masas de células de <i>B. cordata</i> . .....	<b>206</b>
<b>Anexo. Figura 2.</b> Parámetros empleados para la colección de datos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de <i>B. cordata</i> . .....	<b>207</b>
<b>Anexo. Figura 3.</b> Parámetros empleados para la detección de picos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de <i>B. cordata</i> . .....	<b>207</b>
<b>Anexo. Figura 4.</b> Parámetros empleados para la deconvolución MS2 con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de <i>B. cordata</i> . .....	<b>208</b>
<b>Anexo. Figura 5.</b> Parámetros empleados para la identificación de picos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de <i>B. cordata</i> . .....	<b>208</b>
<b>Anexo. Figura 6.</b> Parámetros empleados para la detección de aductos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de <i>B. cordata</i> . .....	<b>209</b>



<b>Anexo. Figura 7.</b> Parámetros empleados para la alineación de picos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de <i>B. cordata</i> .	209
.....	
<b>Anexo. Figura 8.</b> Efecto de la adición del inhibidor Bensereazida (1.0 mM) después de 3, 6, 9 y 12 horas sobre <b>a.</b> producción de biomasa y <b>b.</b> producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de <i>B. cordata</i> al adicionar el compuesto al $t_{15}$ de cultivo. Los resultados son la media de tres réplicas $\pm$ DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas $P \leq 0.05$ en comparación con el control (barras negras).	210
.....	
<b>Anexo. Figura 9.</b> Secuencia de nucleótidos de un fragmento de la isoforma 1 del gen <i>pal</i> de <i>Buddleja cordata</i> .	211
.....	
<b>Anexo. Figura 10.</b> Secuencia de nucleótidos de un fragmento de la isoforma 2 del gen <i>pal</i> de <i>Buddleja cordata</i> .	212
.....	
<b>Anexo. Figura 11.</b> Secuencia de nucleótidos de un fragmento de la isoforma 3 del gen <i>pal</i> de <i>Buddleja cordata</i> .	213
.....	
<b>Anexo. Figura 12.</b> Ruta biosintética de los fenilpropanoides mapa 00940 en KEGG ( <a href="https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00940">https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00940</a> ). Los puntos verdes representan los compuestos putativos identificados en muestras celulares de <i>B. cordata</i> .	214
.....	
<b>Anexo. Figura 13.</b> Biosíntesis de flavonoides, flavonas y flavonoles. Figura estructurada con datos de KEGG sobre biosíntesis de flavonoides ( <a href="https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ath00941">https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ath00941</a> ) y flavonas y flavonoles ( <a href="https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&amp;map=map00944&amp;keyword=Acacetin">https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&amp;map=map00944&amp;keyword=Acacetin</a> ).	215
.....	
<b>Anexo. Figura 14.</b> Biosíntesis de indol-alcaloides. Figura estructurada con datos de KEGG sobre biosíntesis de indol-alcaloides ( <a href="https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+map00901">https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+map00901</a> ) y Tetali <i>et al.</i> , 2019.	216
.....	
<b>Anexo. Figura 15.</b> Principales precursores de diversos alcaloides, benzilisoquinolina y tocoferoles. * Figura estructurada con datos de Facchini y De Luca (1994) y Araji <i>et al.</i> , (2014)	217
.....	
<b>Anexo. Figura 16.</b> Biosíntesis de terpenoides, esteroides, giberelinas, ubiquinonas, clorofilas, carotenoides y tocoferoles. Imagen modificada de Tetali <i>et al.</i> , 2019.	218
.....	

## ABREVIATURAS

[m/z]	Relación masa/carga
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3,4-DHPAA	L-dihidroxifenil ácido acético
4-HPAA	4-hidroxifenilacetaldehído
4-HPP	4-hidroxifenilpiruvato
5-HTP	5-hidroxi-L-triptofano
AAADs	L-aminoácido aromático descarboxilasa
AIP	Ácido 2-aminoindan-2-fosfónico
AMPT	$\alpha$ -metil tirosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN codificante
ADNg	ADN genómico
ADN-T	ADN de transferencia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BcPAL	Proteína fenilalanina amonio liasa de <i>B. cordata</i>
<i>Bcpal</i>	Gen fenilalanina amonio liasa de <i>B. cordata</i>
DOPA-dec	DOPA-descarboxilasa
DS	Desviación estándar
EC	Enzyme Commission
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HAL	L-histidina amonio liasa
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (por sus siglas en inglés, High-Pressure Liquid Chromatography)
<i>IC</i>	Índice de crecimiento
KIN	Cinetina
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenil-L-alanina
L-Phe	L-fenilalanina
L-Tir	L-tirosina

LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
MS	Espectrometría de masas
MeJa	Metil jasmonato
MWD	Detector de longitud de onda múltiple (por sus siglas en inglés ,Multiple Wavelength Detector)
PAL	Fenilalanina amonio-liasa (por sus siglas en inglés, Phenylalanine Ammonia Lyase)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction)
PF	Peso fresco
PhGs	Feniletanoide glicósidos (por sus siglas en inglés, Phenylethanoid glycosides)
pI	Punto isoeléctrico
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PPO	Polifenol oxidasa
PS	Peso seco
PTAL	Fenilalanina/tirosina amonio-liasa (por sus siglas en inglés Phenylalanine/Tyrosine Ammonia Lyase)
qp	Velocidad específica de producción
RCVs	Reguladores de crecimiento vegetal
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	PCR tras transcripción reversa
<i>td</i>	Tiempo de duplicación
TAT	Tirosina aminotransferasa
TDC	L-triptófano descarboxilasas
TH	Tirosina hidroxilasa
TIC	Cromatograma de iones totales (por sus siglas en inglés, Total Ion Chromatogram)
Tir/DopaDC	Tirosina/DOPA descarboxilasas
TR	Tiempo de retención

## RESUMEN

*Buddleja cordata* Kunth ‘tepozán’ es una especie ampliamente distribuida en el territorio mexicano donde sus hojas, corteza y raíces son empleadas por la medicina tradicional contra diversos malestares y padecimientos. Sus propiedades terapéuticas han sido atribuidas a compuestos de naturaleza fenólica, incluyendo al metabolito verbascósido.

Diversos estudios relacionados con las acciones biológicas y farmacológicas del verbascósido han demostrado que posee una gran cantidad de propiedades considerables desde el punto de vista industrial. La síntesis química del compuesto ha sido lograda pero no resulta costosa; además, su biosíntesis no ha sido completamente dilucidada.

Previamente, se establecieron cultivos de callo y de células en suspensión de *B. cordata*. Sin embargo, las concentraciones de producto obtenidas son insuficientes para satisfacer las necesidades farmacológicas e industriales del compuesto. En este trabajo, mediante un par de estrategias biotecnológicas: elicitación de cultivos celulares con metil jasmonato y alimentando los cultivos con L-fenilalanina como precursor, se incrementó la producción del compuesto. Posteriormente, se generó información química y molecular sobre algunas de las enzimas clave implicadas en la ruta biosintética del verbascósido incluyendo fenilalanina amonio liasa ‘PAL’, polifenol oxidasa ‘PPO’ y Tirosina/Dopa decarboxilasa ‘Tir/DopaDC’. Finalmente, se obtuvieron perfiles metabolómicos de cultivos tratados con metil jasmonato, L-fenilalanina e inhibidores enzimáticos.

Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron aumentar la producción de verbascósido a nivel de matraz y, por otro lado, aportaron información valiosa sobre la biosíntesis del compuesto. Además, el estudio metabolómico permitió identificar los compuestos equinacósido, cumarina y ácido siríngico, ninguno de los cuales ha sido previamente reportado en *B. cordata*.

## ABSTRACT

*Buddleja cordata* Kunth 'tepozan' is a species widely distributed in México where its leaves, barks and roots are used in traditional medicine to treat a wide variety of ailments. Its therapeutic properties have been attributed to phenolic compounds including verbascoside.

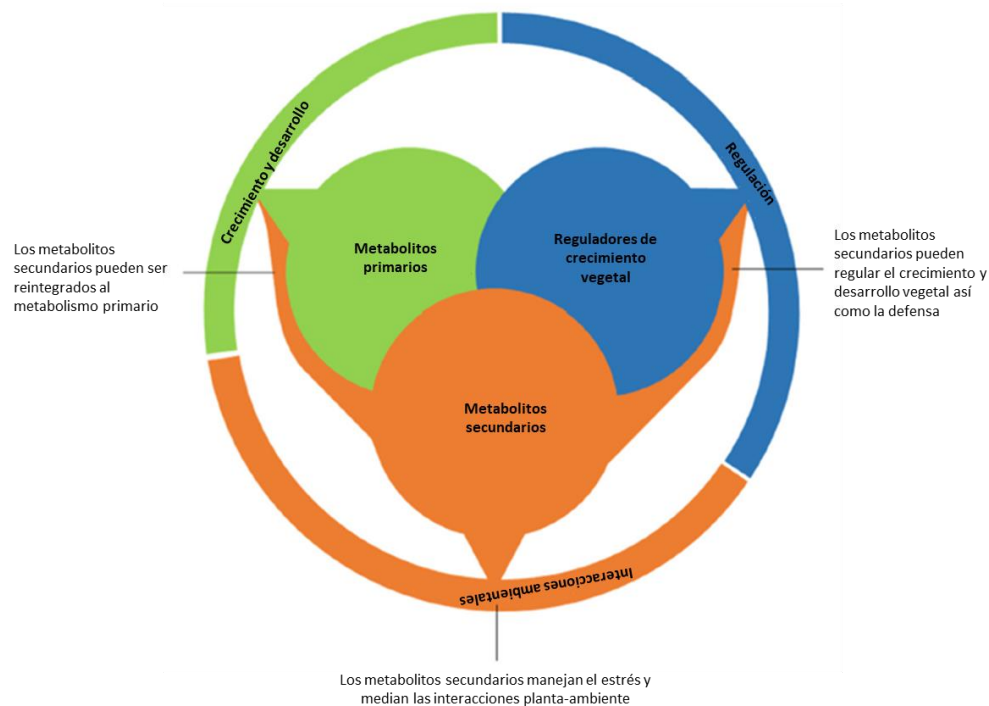
Numerous studies related to the biological and pharmacological attributes of verbascoside, reinforces its significance for its industrial application. The chemical synthesis of the compound has been achieved but is not affordable; additionally, its biosynthesis has not been fully elucidated.

Previously, callus and cell suspension cultures of *B. cordata* were established. However, product concentrations obtained are insufficient to satisfy verbascoside pharmacological and industrial demands. In this work, verbascoside production was increased through two biotechnological strategies: eliciting cell cultures with methyl jasmonate and feeding cultures with L-phenylalanine as a precursor. Subsequently, chemical and molecular information was generated on some key enzymes involved in verbascoside biosynthetic pathway. Finally, metabolomic profiles of cultures treated with methyl jasmonate, L-phenylalanine and enzyme inhibitors were obtained.

Results obtained in this thesis allowed to increase the production of verbascoside at the flask level; besides, molecular and chemical experiments let the identification of phenylalanine ammonia lyase, polyphenol oxidase and tyrosine/dopamine decarboxylase, all of them enzymes involved in the biosynthesis of verbascoside. Also, metabolomic analysis enabled the identification of echinacoside, coumarin, and syringic acid none of which have been previously reported in *B. cordata*.

# I. INTRODUCCIÓN

Las plantas vasculares (superiores) fabrican una gran diversidad de productos orgánicos de bajo peso molecular a partir de simples precursores inorgánicos, muchos más que los producidos por otros organismos en la naturaleza. Esta capacidad de síntesis ha sido esencial para la colonización de diferentes y en muchas ocasiones adversos ambientes. Aunque en algunos casos su designación es difícil, los términos 'metabolito primario', 'metabolito secundario' y 'reguladores de crecimiento vegetal' (RCV) son comúnmente empleados en la fisiología vegetal (Kessler y Kalske, 2018; Fang *et al.*, 2019; Erb y Kliebenstein, 2020).



**Figura 1.** Clasificación funcional de productos orgánicos de bajo peso molecular producidos por las plantas. En algunos casos su designación es difícil: muchos metabolitos secundarios pueden ejercer diversas actividades más allá de las que facultan la interacción planta-ambiente.

\*\* Tomada y modificada de Erb y Kliebenstein, 2020.

Los metabolitos secundarios (también llamados metabolitos especializados, fitoquímicos o productos naturales) son complejos compuestos bioactivos de bajo peso molecular. Aunque su rol no ha quedado bien establecido, sobresale su especial importancia para la adaptación y supervivencia de las plantas en su ambiente (por ejemplo, sus actividades antibióticas e insecticidas son efectivas para bloquear el ataque de herbívoros) (Oksman-Caldentey and Inze, 2004; Kessler y Kalske, 2018). Actualmente, una gran cantidad de estudios moleculares, funcionales y ecológicos han demostrado que en realidad los metabolitos secundarios son responsables de múltiples actividades que van más allá de su definición clásica: pueden actuar como metabolitos primarios (siendo aprovechados como nutrientes para herbívoros) y/o como reguladores de crecimiento vegetal (regulan el crecimiento, desarrollo y las respuestas de defensa vegetal) (**Figura 1**) (Erb y Kliebenstein, 2020). La mayor parte de estos compuestos están presentes a menudo en muy bajas concentraciones en la planta (menos del 1% del peso seco), cantidades que dependen en gran medida de la etapa fisiológica y del desarrollo en que se encuentre la planta, así como de las condiciones ambientales; además, se sabe que a pesar de que muchos compuestos y clases de compuestos son ampliamente expresados en diferentes phyla vegetales, cada planta tiene su 'set' característico de compuestos, esto es, los metabolitos secundarios son especie-específicos (lo que implica la posibilidad de una quimiotaxonomía). Las estimaciones actuales de su número oscilan entre 5, 000 y decenas de miles (Oksman-Caldentey and Inze, 2004; Kessler y Kalske, 2018; Fang *et al.*, 2019; Erb y Kliebenstein, 2020).

Por siglos, los metabolitos secundarios han sido de gran interés para el ser humano debido a su valor nutricional, a sus aplicaciones industriales (sabores, fragancias, tintes, colorantes e insecticidas, entre otros) y, sobre todo, a sus importantes actividades biológicas para el ser humano (Oksman-Caldentey e Inze, 2004; Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016; Marchev *et al.*, 2020). Como resultado de su actividad farmacológica, estas moléculas son útiles para el tratamiento de enfermedades humanas, por lo que no es de sorprender su empleo como poderosos medicamentos a lo largo de la historia (Kolewe *et al.*, 2008; Yue *et al.*, 2016; Kessler y Kalske, 2018). Más del 30% de nuestros fármacos tienen su principio en extractos de plantas o sus derivados (Fang *et al.*, 2019).

Además de la baja o total ausencia de toxicidad y el amplio espectro de actividad, otra ventaja importante de los fármacos derivados de plantas es el 'parecido con metabolitos': los productos naturales no sólo son biológicamente activos, sino que además son sustratos

preferidos de sistemas de transporte celular que normalmente distribuyen moléculas a su sitio de actividad intracelular (Marchev *et al.*, 2020). Por esta razón, una cuarta parte de todos los medicamentos actualmente aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) son obtenidos directamente de las plantas (Isah, 2019; Marchev *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, estos compuestos químicos son obtenidos de plantas cultivadas naturalmente. No obstante, problemas asociados con restricciones ambientales y/o regionales o bien el hecho de que algunas plantas están en peligro de extinción debido a su excesiva cosecha, han limitado en gran medida su producción comercial (Yue *et al.*, 2016; Isah, 2019). Por otro lado, la síntesis química de estos compuestos ha sido exitosa únicamente para moléculas cuya estructura química no es compleja o cuyos costos de síntesis química son rentables. Distinto, la aplicación de técnicas biotecnológicas referentes al cultivo de tejidos y células vegetales *in vitro* ha facilitado la obtención de algunos de estos metabolitos (Oksman-Caldentey e Inze, 2004; Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016; Isah, 2019; Marchev *et al.*, 2020).

El cultivo de tejidos y células vegetales en medios semisólidos y líquidos representa un sistema modelo alternativo para fines biotecnológicos, pero también de investigación básica. Estos sistemas de cultivo *in vitro* son una tecnología viable para la producción de metabolitos secundarios, aún a pesar de los bajos rendimientos de producción (en la gran mayoría de los casos), situación que ha sido determinante para su síntesis a gran escala (Yue *et al.*, 2016; Marchev *et al.*, 2020). Con miras a incrementar los rendimientos de producción, se han practicado diferentes estrategias. Por ejemplo, mediante variaciones en la composición del medio de cultivo, la selección de líneas altamente productoras, así como la optimización de parámetros físicos (luz, temperatura, pH, agitación, aireación, etc.). Por otro lado, procedimientos como el tratamiento de los cultivos con elicitadores o inductores tales como metil jasmonato, ácido salicílico, quitosano, metales pesados; la adición de precursores biosintéticos o la permeabilización e inmovilización de células también han sido empleados (Dörnenburg y Knorr 1995; Kolewe *et al.*, 2008; Wilson y Roberts, 2012; Murthy *et al.*, 2014; Yue *et al.*, 2016; Isah, 2019; Marchev *et al.*, 2020). En algunos casos, técnicas moleculares como la ingeniería metabólica han sido aplicadas para aumentar las actividades celulares, mediante la manipulación de enzimas biosintéticas reguladoras (Murthy *et al.*, 2014; Marchev



*et al.*, 2020). No obstante, su empleo ha sido limitado debido a la falta de información completamente definida concerniente a genes involucrados en las rutas biosintéticas y a su regulación para la mayoría de las especies vegetales (Wilson y Roberts, 2012). Recientemente, la integración de sistemas *in vitro* vegetales con tecnologías 'ómicas' (tales como la genómica, proteómica, trascríptómica y metabolómica) han permitido explorar la diversidad del metabolismo vegetal, así como los mecanismos moleculares subyacentes por los cuales las células vegetales controlan su propia composición química en respuesta a estímulos ambientales. Esto podría orientar a la optimización de bioprocesos para la obtención de metabolitos secundarios a nivel laboratorio o a nivel industrial (Fang *et al.*, 2019; Marchev *et al.*, 2020).

*Buddleja cordata* Kunth (Scrophulariaceae, anteriormente Lamiaceae), comúnmente conocida como 'tepozán', es un árbol ampliamente distribuido en México, con una vasta densidad poblacional en las sierras centrales mexicanas (Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2006). Sus hojas, corteza y raíces han sido muy empleadas por la medicina tradicional contra heridas o enfermedades de la piel, infecciones gastrointestinales, trastornos del hígado, hemorragias nasales, calambres musculares, reumatismo, dolores de cabeza, como diurético y para tratamientos del riñón (Martínez, 1989). Sus propiedades terapéuticas han sido atribuidas a los compuestos mayoritarios pertenecientes a la ruta de los metabolitos secundarios de tipo fenilpropanoide, los cuales han sido aislados de las partes aéreas de la planta. Esos fenilpropanoides incluyen al verbascósido, la linarina y a los ácidos hidroxicinámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009).

Entre las diversas actividades biológicas y farmacéuticas que se le han reportado al metabolito verbascósido se incluyen actividad antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana, antiviral, neuro-, hepato- y hematoprotectora; actividad sedativa, citotóxica, inmunomodulatoria, inmunosupresiva, antihipertensiva y analgésica, entre otras (referencias en: Ghisalberti, 1994; He *et al.*, 2011, Alipieva *et al.*, 2014). La síntesis química del compuesto ha sido lograda, aunque implica diversas series de reacciones y su producción no resulta costosa (Kawada *et al.*, 1999); por otra parte, a pesar de los avances durante los últimos años, su ruta de biosíntesis no ha sido completamente dilucidada (Zhou *et al.*, 2020).

Como parte de la solución a la gran demanda de este importante metabolito, y con el propósito de evitar la extenuación de los recursos naturales, se han establecido cultivos de callo y en suspensión de diversas especies vegetales, entre ellas *B. cordata* (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009). Sin embargo, las concentraciones de producto obtenidas hasta la fecha no son

suficientes para satisfacer las necesidades farmacológicas e industriales de dicho compuesto. Por ello, en este trabajo se planteó como primera estrategia incrementar la producción de verbascosido mediante la elicitación, por un lado, de cultivos en suspensión de *B. cordata* con metil jasmonato y, por otro, alimentando los cultivos con L-fenilalanina como precursor. Como segunda estrategia, se exploró la identificación y clonación de algunas enzimas clave implicadas en la ruta biosintética de los fenilpropanoides, las cuales podrían estar involucradas en la síntesis de verbascósido (en principio mediante el uso de inhibidores enzimáticos). Finalizando con el análisis de los perfiles metabolómicos generados por los cultivos tratados con metil jasmonato, L-fenilalanina e inhibidores.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Metabolismo vegetal especializado

Se estima que en la Tierra habitan aproximadamente 400, 000 especies de plantas vasculares, las cuales son fuente de cientos de miles de productos metabólicos, cuya estructura, función y utilidad se ha estudiado solo parcialmente. A diferencia de otros organismos, las plantas y los hongos exhiben una gran diversidad metabólica: en la literatura se menciona que el Reino vegetal produce entre 200, 000 y 1 millón de metabolitos (Kessler y Kalske, 2018; Fang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019b).

Desde que las plantas terrestres aparecieron, en el Periodo Devónico (las primeras plantas surgieron hace aproximadamente 420 millones de años en el Silúrico, pero se hicieron más comunes en el Devónico, hace 416-359 millones de años), tuvieron que lidiar con organismos que trataban de alimentarse con ellas (herbívoros) y con microorganismos infecciosos (bacterias y hongos). A pesar de la obiedad, es importante señalar que las plantas no pueden huir cuando son desafiadas por un herbívoro ni poseen un sistema inmune complejo para combatir infecciones (Wink, 2008, 2020). En cambio, al igual que otros organismos sésiles, las plantas evolucionaron la producción de metabolitos especializados (metabolitos secundarios) como mecanismo adaptativo para ajustarse a los constantes cambios en sus condiciones de crecimiento (Wink, 2008; Kliebenstein y Osbourn, 2012; Isah, 2019).

En la gran mayoría de las especies vegetales, el metabolismo primario central es muy similar al de las especies no-vegetales. Sin embargo, los hongos y las plantas tienen la capacidad adicional de sintetizar un amplio catálogo de compuestos especializados, los cuales constituyen el grueso de sus metabolomas (Wang *et al.*, 2019b). Y ha sido precisamente este arsenal de compuestos el que ha provisto a estos organismos sésiles con las herramientas necesarias para combatir los factores bióticos y abióticos que deben enfrentar a lo largo de su vida, y que finalmente son vitales para su adaptación y desarrollo, incrementando su 'fitness' (la selección natural favorece a los individuos que tienen mayor fitness) (Kessler y Kalske, 2018; Fang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019b).

### 2.1.1 Metabolismo secundario

Sólo recientemente han sido reconocidos los roles que juegan los metabolitos secundarios, tanto en las propias plantas como a nivel ecológico. A principios del siglo XX se consideraba a los metabolitos secundarios como productos de destoxificación o de desecho del metabolismo primario sin aparente utilidad, o con alguna, pero sólo de forma incidental (Wink, 2008; Kessler y Kalske, 2018). Posteriormente, se pensó que no estaban directamente implicados en la generación de energía, crecimiento y desarrollo u otras funciones primarias de las plantas (Yang *et al.*, 2012). Actualmente, una gran cantidad de estudios moleculares, funcionales y ecológicos han demostrado que en realidad los metabolitos secundarios son fundamentales para el desarrollo de la vida de las plantas en la Tierra, pero también son indispensables para la existencia de la biosfera terrestre, influyendo en la dinámica y resultado de los procesos ecológicos y evolutivos: que forman parte de diversos procesos importantes en diferentes niveles ecológicos, desde el nivel celular y de organismo hasta el nivel de población y de comunidad (Korkina, 2007; Wink, 2008; Isah, 2019; Erb y Kliebenstein, 2020; Scossa y Fernie, 2020).

Por mencionar algunos ejemplos:

#### Planta-ambiente

- Facultan a las plantas ante presiones de naturaleza abiótica (*ver* Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Kessler y Kalske 2018).

Por ejemplo:

Temperatura: calor, frío (escarcha, heladas)

Salinidad: sal

Agua: humedad, sequía, inundaciones

Radiación: luz visible, radiación UV, radiación ionizante

Estrés químico: nutrientes, minerales, gases tóxicos, contaminantes  
(metales pesados, pesticidas, herbicidas y aerosoles)

Estrés mecánico: viento, movimiento del suelo, hundimiento.

- Son fundamentales en los procesos y composición del suelo (por ejemplo, en la descomposición y reciclaje de materia orgánica) (*ver* Cheynier *et al.*, 2013; Chomel *et al.*, 2016).

- Afectan la composición atmosférica (por ejemplo, las plantas de ambientes marinos y terrestres liberan compuestos orgánicos volátiles a la atmósfera) (ver Maffei *et al.*, 2011).

### ***In planta***

- Desempeñan funciones regulatorias (por ejemplo, regulan el crecimiento, desarrollo y las respuestas de defensa vegetal) (ver Maffei *et al.*, 2011; Erb y Kliebenstein, 2020).

- Están implicados en importantes procesos fisiológicos (por ejemplo, en la fotosíntesis, en el transporte de agua y nutrientes, en la regulación del potencial redox y en la actividad antioxidante) (ver Maffei *et al.*, 2011; Le Roy *et al.*, 2016; Tetali, 2019, Wink, 2020).

- Son importantes en la composición celular (por ejemplo, están relacionados con la estructura membranal de los tilacoides y la integridad de las paredes celulares) (ver Maffei *et al.*, 2011; Le Roy *et al.*, 2016; Tetali, 2019).

- Funcionan como reservorio de nutrientes (por ejemplo, como compuestos de almacenamiento de nitrógeno) (ver Wink 2008, 2020).

- Confieren propiedades organolépticas (por ejemplo, determinan el aroma, color, sabor de frutos y vegetales, así como el color y la fragancia de las flores) (ver Maffei *et al.*, 2011; Grotewold, 2006; Pott *et al.*, 2019).

### **Planta-planta**

- Influyen en la competencia intra- e interespecífica entre plantas (por ejemplo, controlan los mecanismos de alelopatía [fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos químicos que afectan el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos]) (ver Chomel *et al.*, 2016, Wink, 2020).

- Actúan como señales de comunicación entre plantas (por ejemplo, alertando a las plantas vecinas de la presencia de herbívoros) (ver Heil y Karban 2010; Maffei *et al.*, 2011; Tetali, 2019).

### **Planta-microorganismos/insectos/mamíferos**

- Median las interacciones con organismos antagonistas (por ejemplo, herbívoros y patógenos tales como insectos, hongos, bacterias, micoplasmas y virus) (ver Kessler y Kalske 2018 y Scossa y Fernie 2020).

- Concilian las interacciones con organismos mutualistas (por ejemplo, hongos micorrízicos arbusculares, protistas, bacterias del género *Rhizobium* y depredadores/parásitos de herbívoros) (ver Cheynier *et al.*, 2013; Kessler y Kalske 2018; Korenblum y Aharoni, 2019; Xiong *et al.*, 2020).
- Son importantes para atraer o disuadir a polinizadores y dispersores de semillas (por ejemplo, su presencia en los nectarios florales favorece el proceso de polinización y/o para proteger a los polinizadores; emiten olores que indican a los mamíferos [así como a ciertas aves y murciélagos] si un fruto está o no maduro) (ver Maffei *et al.*, 2011; Stevenson *et al.*, 2017; Wink, 2020).
- Actúan como precursores de metabolitos primarios (por ejemplo, son fuente de nutrientes para herbívoros) (ver Erb y Kliebenstein, 2020).

### **Planta-Hombre**

- Son una fuente de nutrientes y nutraceuticos (por ejemplo, algunos compuestos además de aportar valor nutricional a los frutos y vegetales, poseen propiedades bioactivas) (ver Pott *et al.*, 2019).
- Actúan como ingredientes prebióticos (por ejemplo, además de mejorar la actividad y composición de la microbiota gastrointestinal, la asimilación de lignanos por microorganismos 'probióticos' genera metabolitos valiosos para la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas, como cáncer, esclerosis múltiple remitente-recurrente y afecciones cardiovasculares) (ver De Silva y Alcorn, 2019; Cady *et al.*, 2020).
- Son empleados para la prevención y tratamiento de diversos padecimientos, infecciones y enfermedades (por ejemplo, son la base de la medicina tradicional en diversas culturas, además de ser la principal fuente de fármacos de la medicina alópata) (ver Isah, 2019; Marchev *et al.*, 2020).
- El potencial antioxidante de estos compuestos ha recibido mucha atención, dado que el incremento en los niveles de estrés oxidativo ha sido identificado como el principal factor en la etiología, desarrollo y progresión de enfermedades potencialmente mortales (incluyendo aquellas relacionadas con el envejecimiento) (ver Kasote *et al.*, 2015; Forni *et al.*, 2019).
- Ejercen efectos en el cerebro (por ejemplo, los compuestos psicodélicos [alucinógenos como dimetilriptamina 'DMT', mescalina y psilocibina] producen

experiencias místicas, generan cambios en la cognición y pueden alterar el comportamiento humano. Las áreas de psiquiatría y neurociencia han planteado su potencial uso para el tratamiento de adicciones y desórdenes psiquiátricos como depresión y ansiedad) (ver Kyzar *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2019).

Algunas de las mencionadas actividades de los metabolitos secundarios complican en cierto grado delimitar su diferencia funcional con la de los metabolitos primarios y la de los reguladores de crecimiento vegetal (**Figura 1**) (Erb y Kliebenstein, 2020). Sin embargo, los metabolitos secundarios -como grupo- mantienen algunas características distintivas: son compuestos orgánicos de bajo peso molecular con una enorme diversidad química y la gran mayoría posee una estructura compleja y única (Scossa y Fernie 2020). Aunque algunos de estos compuestos se producen en forma constitutiva, lo más común es que su síntesis sea inducida en condiciones de estrés por factores bióticos y abióticos. Su producción frecuentemente es baja (menos del 1% del peso seco) (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Wink 2008). Los metabolitos solubles en agua usualmente son almacenados dentro de las vacuolas celulares, frecuentemente en las células epidérmicas, mientras que los compuestos lipofílicos más bien son secretados dentro de células oleosas, laticíferas, tricomas, células muertas o se almacenan en la cutícula (Wink, 2020).

La relación de los metabolitos secundarios con el ambiente biótico confiere una presión evolutiva sobre las plantas para crear nuevos metabolitos secundarios, la mayoría de los cuales son especie-específicos. Como regla, un grupo particular de metabolitos secundarios predomina dentro de un taxón determinado (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Korkina, 2007; Wink, 2008; Kliebenstein y Osbourn, 2012).

En conjunto, el patrón de producción espacial y temporal de metabolitos secundarios en una planta es complejo: exhiben una marcada variación cualitativa y cuantitativa entre tejidos y órganos. Regularmente, las diferencias se aprecian entre las distintas etapas fisiológicas y del desarrollo en que se encuentre la planta (por ejemplo, órganos importantes para la supervivencia y la reproducción tienen mayor cantidad y más potentes compuestos), entre individuos de una misma especie (lo cual puede deberse a variaciones genéticas y ambientales) y también entre poblaciones de especies y phyla diferentes. En algunas ocasiones son empleados como característica taxonómica para la clasificación de plantas (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Wink, 2008 y 2020; Scossa y Fernie 2020).

En las plantas superiores, el metabolismo primario y el metabolismo secundario están estrechamente relacionados. A menudo los metabolitos secundarios pueden ser fabricados a partir de modificaciones en las rutas biosintéticas del metabolismo primario (central), o bien pueden ser sintetizados a partir de precursores provenientes del metabolismo primario (por ejemplo, aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos o acetyl-CoA) (Korkina, 2007; Kabera *et al.*, 2014).

Las rutas biosintéticas básicas del metabolismo central (por ejemplo, glicólisis, ciclo de Krebs y la ruta del shikimato) se encuentran muy conservadas en el reino vegetal: es posible encontrar la mayor parte de los metabolitos primarios prácticamente en cualquier tipo celular, de hecho, la cantidad y estructura de los metabolitos primarios está ampliamente conservada en todo el árbol de la vida (Wang *et al.*, 2019b; Scossa y Fernie, 2020). La conservación de este núcleo metabólico central condujo a la aparición de un limitado número de esqueletos metabólicos (de carbono) fundamentales; en las plantas hay muchos ejemplos de estas estructuras centrales: compuestos nitrogenados, fenilpropanoides, bencenoides, flavonoides y terpenos. Es precisamente en la modificación de estos armazones químicos (la naturaleza, cantidad y posición de estas modificaciones) en dónde radica la complejidad estructural de los metabolitos secundarios (Korkina, 2007; Wink, 2008; Wang *et al.*, 2019b). Entre las modificaciones más comunes se incluyen las reacciones catalizadas por 'enzimas de confección': glicosilación, acilación, metilación, hidroxilación, oxidación, fosforilación y prenilación, así como modificaciones raras tales como la adición de shikimato o quinol (Korkina, 2007; Wang *et al.*, 2019b).

Los recientes avances tecnológicos en genómica, transcriptómica y metabolómica han facilitado el poder identificar genes involucrados en las rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios (a los cuales se los encuentra agrupados en 'clusters biosintéticos') además de los mecanismos que han guiado su evolución (Kessler y Kalske, 2018; Fang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019b; Scossa y Fernie, 2020). Mientras que en la evolución del metabolismo primario predominaron eventos de endosimbiosis, se considera a la duplicación de genes (considerando el destino de los parálogos resultantes, incluyendo su pérdida) así como a la neofuncionalización (proceso que implica que el gen original conserva su función ancestral, mientras que una nueva función emerge para uno de sus parálogos derivados, la cual puede ser conservada en el genoma debido a una selección positiva [ocurre cuando una mutación es



ventajosa, esto es, que incrementa el 'fitness' del organismo]) como los principales motores en la diversificación del metabolismo secundario (Fang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019b; Scossa y Fernie, 2020).

La duplicación de genes es mucho más común en plantas que en otras especies (probablemente debido a su naturaleza sésil y sobre todo a que las especies vegetales deben ser extremadamente adaptables a su ambiente (Fang *et al.*, 2019). Con frecuencia, dentro de los genomas vegetales los genes duplicados se encuentran como repeticiones en tándem, las cuales conforman los 'clusters biosintéticos' (Wang *et al.*, 2019b).

Muchos de los denominados 'genes rúbrica', los cuales catalizan la formación de los esqueletos básicos de los metabolitos especializados, evolucionaron directa- o indirectamente de genes del metabolismo primario mediante eventos de duplicación de genes y neofuncionalización. Subsecuentemente, se ha propuesto que los 'clusters biosintéticos' se consolidaron mediante el reclutamiento de genes codificantes de 'enzimas de confección' (incluyendo glicosiltransferasas, metiltransferasas y aciltransferasas, las cuales modifican los esqueletos básicos de los metabolitos especializados) (Wang *et al.*, 2019b; Scossa y Fernie, 2020).

#### **2.1.1.1 Clasificación de los metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios son clasificados normalmente con base en su origen biosintético. Generalmente se consideran tres grandes familias (Bourgau *et al.*, 2001; Hussain *et al.*, 2012; Kabera *et al.*, 2014; Dziggel *et al.*, 2017):

- Terpenoides
- Compuestos que contienen nitrógeno
- Compuestos fenólicos

##### **2.1.1.1.1 Terpenoides**

También conocidos como terpenos o isoprenoides, son ubicuos en la naturaleza y son componentes esenciales de todas las células y organismos multicelulares, incluyendo a las bacterias, arqueas, protistas y eucariotas (Tetali, 2019). Hasta la fecha han sido identificados

decenas de miles de este grupo de compuestos, la mayoría de los cuales se encuentra en organismos pertenecientes al reino vegetal, siendo el grupo más extenso de metabolitos especializados, con más de 50, 000 compuestos conocidos. Se los encuentra en prácticamente todas las plantas superiores, su producción normalmente ocurre en tejidos vegetativos, flores y, ocasionalmente, en raíces (Yazaki *et al.*, 2017; Tetali, 2019).

Los terpenos son sintetizados a partir de unidades de cinco carbonos: el 'isopreno' (2-metilbuta-1,3-dieno [C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>]). Durante su formación, unidades de isopreno son unidas una por una en forma de 'cabeza y cola'. La enzima terpeno sintasa (TPS) cataliza la adición de las unidades isopreno según sean requeridas; posteriormente, la estructura resultante es modificada mediante reacciones de hidroxilación, deshidrogenación, acilación, oxidación o glicosilación, catalizadas por 'enzimas de confección', que generan una gran diversidad química de terpenos (Kabera *et al.*, 2014; Yazaki *et al.*, 2017). Este grupo diverso de compuestos es, a su vez, sub-agrupado con base en la cantidad de unidades isopreno en sus esqueletos: hemi- (C<sub>5</sub>), mono- (C<sub>10</sub>), sesqui- (C<sub>15</sub>), di- (C<sub>20</sub>), sester- (C<sub>25</sub>), tri- (C<sub>30</sub>), tetra- (C<sub>40</sub>, carotenoides) y poli-terpenoides (C<sub>>40</sub>) (Yazaki *et al.*, 2017; Tetali, 2019; Belcher *et al.*, 2020).

Todos los terpenos son producidos a partir de los precursores dimetil-alil difosfato (DMAPP) y su isómero isopentenil difosfato (IPP), los cuales son sintetizados por ruta del mevalonato (MVA) en el citosol, o a partir de la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) (por la conocida como vía independiente del mevalonato o ruta del metileritritol fosfato (MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato)) en los cloroplastos. Aunque algunos terpenos son sintetizados preferentemente por alguna de las dos vías (por ejemplo, los hemi-, mono-, di- y triterpenos son sintetizados principalmente por la vía MEP), se ha descrito el intercambio y/o cooperación entre estas dos rutas (Maffei *et al.*, 2011; Tetali, 2019; Belcher *et al.*, 2020).

Los terpenos intervienen tanto en el metabolismo primario como en el metabolismo secundario de las células. Aquellos clasificados como pertenecientes al metabolismo primario son esenciales para la realización de funciones celulares básicas: por ejemplo, el grupo prenilo de las quinonas (ubiquinona y plastoquinona, son importantes en la cadena de transporte de electrones), pigmentos fotosintéticos (cadenas laterales de fitol en pigmentos como clorofilas y carotenoides), esteroides (la mayoría de los cuales son responsables de la estabilidad de las membranas) y proteínas preniladas (la prenilación de proteínas es un tipo de modificación post-traducciona que facilita su asociación con las membranas celulares (Maffei *et al.*, 2011;

Yazaki *et al.*, 2017; Tetali, 2019). Los terpenos que desempeñan roles en respuesta a factores bióticos y abióticos son clasificados como parte del metabolismo secundario. Adicionalmente, algunos reguladores del crecimiento vegetal pertenecen a esta clase de compuestos (giberelinas, ácido abscísico, brasinoesteroides) (Tetali, 2019) *ver* **Tabla 2**.

La importancia biológica y ecológica de muchos de estos compuestos no siempre es comprendida, aunque algunos de ellos son reconocidos por su importancia en la supervivencia, crecimiento y desarrollo y en la polinización y en la protección contra herbívoros y patógenos, entre posiblemente muchas otras funciones desconocidas (Kabera *et al.*, 2014; Yazaki *et al.*, 2017; Tetali, 2019).

Los terpenos superiores (poli-terpenos) generalmente se encuentran en la naturaleza como compuestos no-volátiles y están, directa o indirectamente, relacionados con importantes procesos celulares. Los terpenos volátiles son representados por compuestos miembros de los hemiterpenos, los monoterpenos y los sesquiterpenos, los cuales son los principales constituyentes del volatilo, además de ser los componentes más abundantes de los aceites esenciales (volátiles) de las plantas (Maffey *et al.*, 2011; Yazaki *et al.*, 2017; Tetali, 2019). Los terpenos volátiles desempeñan importantes roles fisiológicos: participan en la señalización involucrada en la comunicación planta-planta, actúan como moléculas señal, atraen polinizadores y dispersores de semillas, repelen depredadores y otros organismos que ponen en riesgo la integridad de las plantas y modifican la composición atmosférica. Al igual que muchos otros metabolitos secundarios, poseen diversas actividades biológicas, las cuales han sido ampliamente aprovechadas para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades (Maffey *et al.*, 2011; Kabera *et al.*, 2014; Yazaki *et al.*, 2017; Tetali, 2019).

Muchos de estos compuestos son usados para fabricar cosméticos, perfumes y aceites esenciales, al igual que en productos alimenticios, nutracéuticos y bebidas (como vitamina A, E, K, coenzima Q10 y compuestos antioxidantes), para el tratamiento contra malaria, infecciones bacterianas, fúngicas y virales, afecciones cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, obesidad, cáncer y otros padecimientos relacionados con el envejecimiento. Además, son una fuente de biocombustibles líquidos y productos de hule. Por otro lado, los compuestos volátiles y aceites esenciales son empleados (por ejemplo, en aromaterapia) debido a su actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, broncodilatadora, expectorante, anticonvulsiva, analgésica y espasmolítica (Maffey *et al.*, 2011; Tetali, 2019; Belcher *et al.*, 2020).

### 2.1.1.1.2 Compuestos que contienen nitrógeno: alcaloides

Dentro del grupo de los compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, los alcaloides son la clase más abundante. En este grupo también se encuentran: aminoácidos no-protéicos, glucosinolatos, glucósidos cianogénicos, aminas y diversos péptidos (lectinas, inhibidores de proteasas y péptidos antimicrobianos) (Wink, 2020).

Los alcaloides contienen uno o muchos átomos de nitrógeno, principalmente en los anillos que conforman sus estructuras, aunque también pueden estar en las cadenas laterales o en cualquier grupo funcional que contenga nitrógeno (Kukula-Koch y Widelski, 2017; Wink, 2020). Adicional al carbono, hidrógeno y nitrógeno, también pueden contener oxígeno, azufre y, raramente, otros elementos como cloro, bromo y fósforo (Kabera *et al.*, 2014).

Al igual que los terpenos, los alcaloides son producidos por una amplia variedad de organismos, tales como bacterias, hongos, animales marinos, mamíferos (incluyendo a los humanos), algas y principalmente plantas, que los sintetizan de forma ubicua (Kabera *et al.*, 2014; Kukula-Koch y Widelski, 2017; Wink, 2020).

Los alcaloides pueden ser clasificados en términos de su estructura química, actividad biológica, de su ruta biosintética, así como si se presentan o no en forma heterocíclica (Kukula-Koch y Widelski, 2017; Wink, 2020). Los alcaloides heterocíclicos contiene a los compuestos más diversos y farmacológicamente activos, los cuales se sabe ejercen diversas actividades biológicas, incluso en muy bajas concentraciones (Kukula-Koch y Widelski, 2017). Su biosíntesis inicia a partir de algunos aminoácidos y con frecuencia son formados después de un proceso de descarboxilación. Se han identificado seis grupos principales de alcaloides dependiendo del aminoácido de origen: fenilalanina/tirosina (alcaloides isoquinolina), triptófano (alcaloides indol, indol monoterpeneo y quinolina), lisina (alcaloides piridina, piperidina y quinolizidina), ornitina/arginina (alcaloides tropánicos y pirrolizidina), histidina (pilocarpina) y glicina/ácido aspártico (alcaloides purina) (Kukula-Koch y Widelski, 2017; Wink, 2020).

Otros alcaloides incluyen a (Kukula-Koch y Widelski, 2017; Wink, 2020):

- Alcaloides derivados de terpenos. Derivan de una molécula de isopreno, pueden ser divididos en tres grupos: alcaloides mono-, di- y tri-terpeno. Los alcaloides diterpeno son el grupo más abundante y contienen estructuras de gran interés médico tales como aconitina, paclitaxel (taxol) y delfinina.
- Alcaloides esteroidales. Son biosintetizados por la inclusión de uno o dos átomos de nitrógeno dentro de una molécula esteroide previamente formada.

Los alcaloides no-heterocíclicos derivan de aminoácidos o de aminas biogénicas. La efedrina y la capsaicina son metabolitos representativos de este grupo (Kukula-Koch y Widelski, 2017).

Muchos alcaloides son tóxicos, algunos actúan como neurotoxinas (frecuentemente simulan la estructura de neurotransmisores tales como la acetilcolina, noradrenalina, adrenalina, serotonina, dopamina o endorfinas), otros son citotóxicos, interfieren con la integridad de las biomembranas, microtúbulos, filamentos de actina, ADN, ARN y enzimas reguladoras del ciclo celular (Kabera *et al.*, 2014; Kukula-Koch y Widelski, 2017; Wink, 2020). Desde un punto de vista ecológico, las plantas ocupan estos compuestos para defenderse contra herbívoros y otros organismos, pero también participan en el proceso de polinización (dando exclusividad a pocos polinizadores para recolectar el néctar de especies particulares). La diversidad en la estructura química de los alcaloides afecta directamente a la variedad de actividades biológicas, las cuales han sido aprovechadas para el tratamiento de diferentes enfermedades (Kukula-Koch y Widelski, 2017; Wink, 2020).

Algunos de estos compuestos son usados como complementos alimenticios y compuestos nutracéuticos (cafeína, teobromina, teofilina), anestésicos locales (aconitina, atropina, escopolamina, cocaína), narcóticos (atropina, morfina, codeína, heroína, cocaína), analgésicos (cafeína, quinina, morfina, cocaína, codeína), estimulantes respiratorios (efedrina, berberina, nicotina, lobelina), vasoconstrictores (efedrina, escopolamina, nicotina), agentes quimioterapéuticos (vincristina, vinblastina, camptotecina, paclitaxel), con actividad antiparasítica y antibiótica (piperina, evonina, berberina, quinina), actividad antiinflamatoria (berberina, sanguinarina, colchicina), entre otras. Finalmente, el consumo de alcaloides como narcóticos y alucinógenos representa uno de los principales problemas sociales (Kukula-Koch y Widelski, 2017; Wink, 2020).

### 2.1.1.1.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (fenoles) son los metabolitos secundarios más numerosos y con mayor distribución en el reino vegetal (los fenólicos de bajo peso molecular son universales en las plantas superiores, aunque el tipo de compuestos presente varíe dependiendo del phylum en estudio). Su síntesis es poco común en bacterias, hongos y algas (Cheynier *et al.*, 2013). Se caracterizan por contener al menos un anillo aromático ( $C_6$ , fenólico) en su estructura química, con por lo menos un grupo hidroxilo unido; sus estructuras pueden variar desde moléculas simples a complejos polímeros con alto peso molecular. El término 'polifenoles' se emplea para definir a aquellos compuestos con más de un anillo fenólico (Cheynier *et al.*, 2013; Durazzo *et al.*, 2019).

El grupo de los compuestos fenólicos abarca una gran colección de sustancias con una diversidad estructural extremadamente amplia: hasta la fecha han sido identificadas decenas de miles de estructuras y el número va en aumento (Cheynier *et al.*, 2013). Su clasificación ha sido un tema controversial. Por ejemplo, pueden ser clasificados con base en sus estructuras básicas:  $C_6$  (fenoles simples, benzoquinonas),  $C_6-C_1$  (ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos) y aldehídos),  $C_6-C_2$  (acetofenonas, ácidos fenilacéticos),  $C_6-C_3$  (ácidos hidroxicinámicos, ácidos fenólicos, 'fenilpropanoides'),  $C_6-C_4$  (naftoquinonas),  $C_6-C_1-C_6$  (xantonas),  $C_6-C_2-C_6$  (estilbenos, antraquinonas),  $C_6-C_3-C_6$  (flavonoides, isoflavonoides, neoflavonoides),  $(C_6-C_3-C_6)_{2,3}$  (bi-, triflavonoides, proantocianidinas diméricas y triméricas),  $(C_6-C_3)_2$  (lignanós, neolignanós),  $(C_6-C_3)_n$  (lignanós),  $(C_6)_n$  (catecol melaninas, florotaninos),  $(C_6-C_3-C_6)_n$  (taninos condensados) (Cheynier *et al.*, 2013; Kabera *et al.*, 2014). En cambio, la clasificación más aceptada implica la subdivisión de los compuestos fenólicos en dos grandes grupos: polifenoles flavonoides y polifenoles no-flavonoides (Kabera *et al.*, 2014; Durazzo *et al.*, 2019). Los polifenoles no-flavonoides incluyen: ácidos fenólicos o fenolcarboxílicos (derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico, 'fenilpropanoides'), curcuminoides, cumarinas, cromonas, xantonas, estilbenos, lignanos y taninos. Por otro lado, los polifenoles flavonoides (el grupo más amplio de polifenoles) incluyen: antocianidinas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas e isoflavonas (Kabera *et al.*, 2014; Durazzo *et al.*, 2019).

Los compuestos fenólicos tienen su origen biosintético en la ruta del shikimato/fenilpropanoide, la cual directamente genera fenilpropanoides (**Figura 2**), o bien en la ruta acetato/malonato (policétido) (Cheynier *et al.*, 2013). Aunque algunos compuestos pueden ser generados por vías alternas, por ejemplo, los ácidos fenólicos pueden ser

subproductos de la ruta del monolignol (biosíntesis de lignanos y lignina) o bien pueden surgir como resultado de la ruptura de polímeros de las paredes celulares como la lignina (Kumar y Goel, 2019). Posteriormente, los fenilpropanoides y otros compuestos fenólicos derivados pueden sufrir modificaciones químicas fundamentales como metilación, acilación y glicosilación. En la naturaleza también se los puede encontrar conjugados con otros compuestos de origen natural, como flavonoides, alcoholes, amidas, ácidos grasos, esteroides y azúcares (Cheynier *et al.*, 2013; Kabera *et al.*, 2014; Kumar y Goel, 2019). Estas modificaciones les confieren propiedades fisicoquímicas distintas a las de los compuestos 'nativos', por ejemplo: cambio de polaridad, volatilidad, estabilidad química dentro de las células, pero también en solución, la capacidad para interactuar con otros compuestos, así como su actividad biológica (Cheynier *et al.*, 2013).

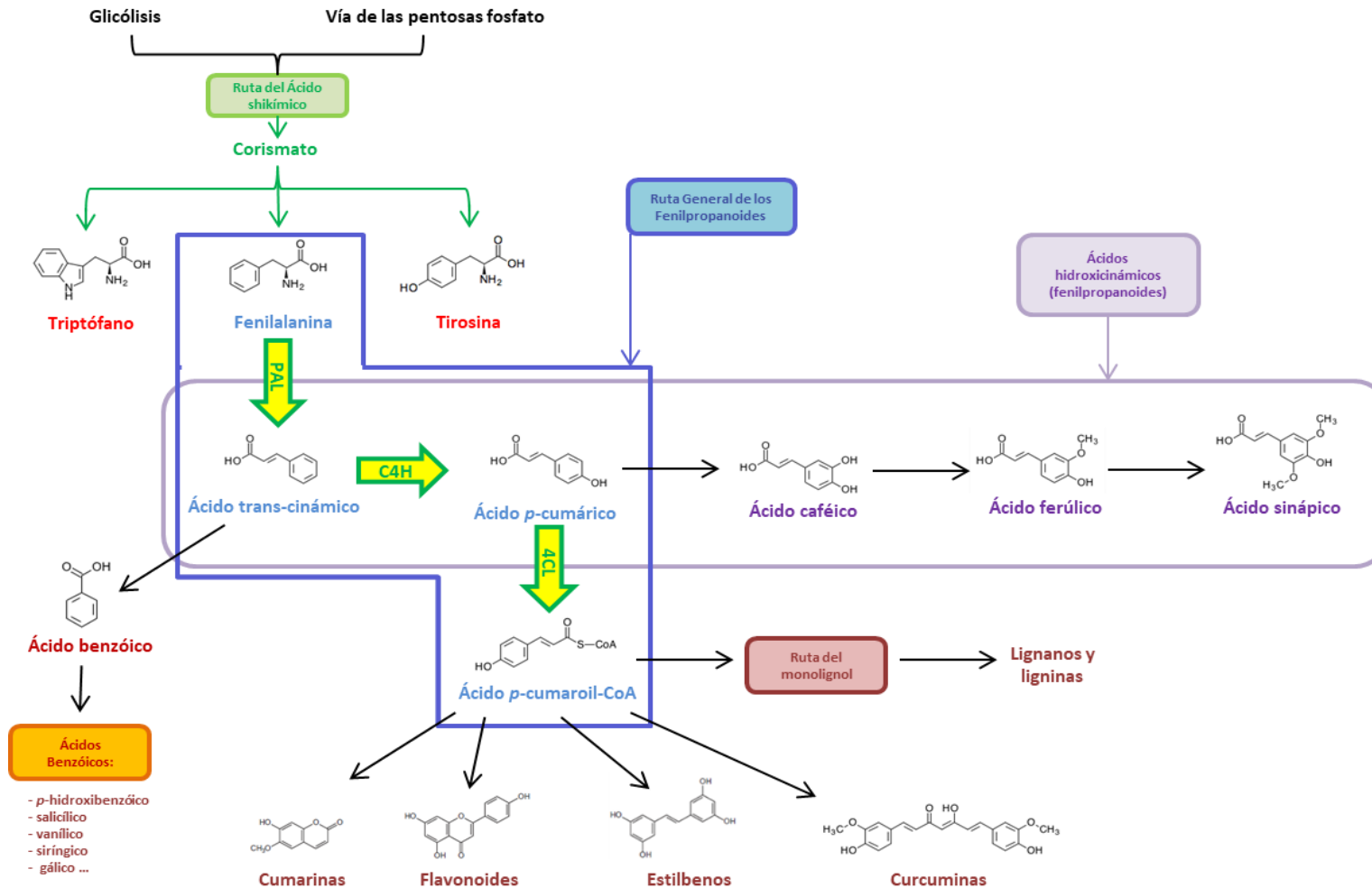
A nivel de organismo los compuestos fenólicos influyen en procesos fisiológicos esenciales para las plantas: regulación transcripcional, transducción de señales, síntesis de proteínas, actividad enzimática, permeabilidad de las membranas celulares, estructura de la pared celular, inducción o inhibición de reacciones oxidativas, regulación de los flujos de respiración y fotosíntesis, reducción de especies reactivas de oxígeno (actividad antioxidante), absorción de nutrientes, regulación de la homeostasis celular así como el tráfico de vesículas. Además, de estar implicados en la esterilidad masculina (desarrollo funcional del polen) (Cheynier *et al.*, 2013; Kumar y Goel, 2019).

Por otro lado, los compuestos fenólicos confieren a las plantas diversas herramientas para sobrevivir y adaptarse a las perturbaciones ambientales: radiación UV, herbivoría, atracción de polinizadores, procesos de alelopatía y simbiosis (asociación con hongos micorrízicos arbusculares), además, de ser muy importantes en la composición físico-química de la rizósfera (Cheynier *et al.*, 2013; Durazzo *et al.*, 2019).

Los compuestos fenólicos abundan en la dieta humana. Son benéficos para la salud, debido sobre todo a su potencial antioxidante (ayudan a evitar el daño celular generado por las reacciones de oxidación de los radicales libres) (Kasote *et al.*, 2015; Forni *et al.*, 2019), además de otras importantes actividades biológicas que han sido explotadas para el tratamiento de diversas infecciones y enfermedades, como afecciones cardiovasculares (incluyendo enfermedades coronarias, fallo cardíaco e hipertensión), diabetes mellitus tipo 2, síndrome

metabólico, cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, de próstata y colorrectal) y usados como antiinflamatorios, antimicrobianos, antivirales, antitrombóticos, antialérgicos y hepatoprotectores. Son importantes para la industria alimentaria (son una fuente importante de compuestos nutraceuticos, como la curcumina y las flavonas) y cosmética (productos para el cuidado de la piel) (Cheynier *et al.*, 2013; Kabera *et al.*, 2014; Durazzo *et al.*, 2019; Kumar y Goel, 2019).

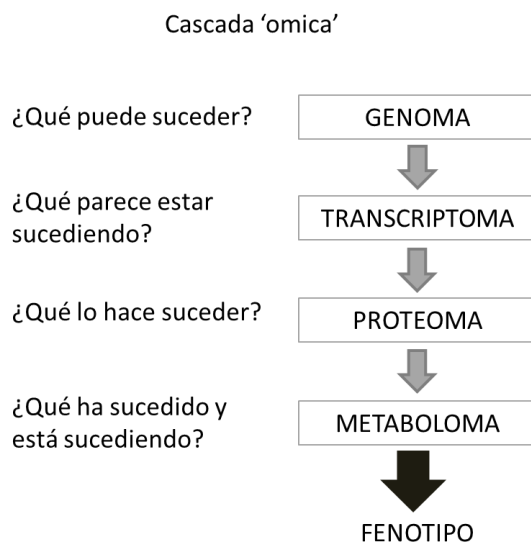




**Figura 2.** Representación esquemática de las principales vías metabólicas implicadas en la biosíntesis de los compuestos fenólicos (flavonoides y no-flavonoides: ácidos hidroxicinámicos, ácidos benzóicos, cumarinas, estilbenos, curcuminas y ligninas). PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, trans-cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumaroil-CoA ligasa (Cheynier *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2015 y Kumar y Goel, 2019).

### 2.1.1.2 Métodos analíticos para la identificación de metabolitos secundarios

El término ‘metaboloma’ fue acuñado a finales de los 90’s por analogía con el de genoma, transcriptoma y proteoma, integrándose a la cascada ómica (**Figura 3**) (Alseekh y Fernie, 2018). El término se emplea para referirse al amplio catálogo de compuestos especializados en una gran variedad de muestras (por ejemplo, medio de cultivo o materiales biológicos como sangre, orina, extractos celulares, de algún tejido u organismo). La metabolómica consiste en adquirir información sobre los metabolitos mediante diversas técnicas analíticas y bioinformáticas para **a)** generar una mayor comprensión sobre su identidad, estructura, función y utilidad; **b)** estudiar perturbaciones metabólicas en respuesta a estímulos internos o externos; **c)** comprender los motivos biológicos detrás de dichas variaciones; **d)** vincular genotipo-fenotipo (por ejemplo, anotación de genes funcionales) (Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016; Ribbenstedt *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019b).



**Figura 3.** La cascada ‘ómica’ comprende conjuntos de datos complejos a diferentes niveles que, como entidad, describen de manera exhaustiva la respuesta de los sistemas biológicos a enfermedades, perturbaciones genéticas y ambientales. Dentro de estas bases de datos, el metaboloma es el más predictivo del fenotipo. Dettmer *et al.*, 2007.

Los péptidos (cadenas cortas de aminoácidos) que constituyen a las proteínas, así como los ácidos nucleicos que conforman genes (ADN) y transcritos (ARN), consisten en polímeros lineales cuya secuencia actualmente puede ser determinada con facilidad. Posteriormente,

mediante análisis *in silico* por comparación con bases de datos, la identidad de genes y proteínas puede ser conocida. En cambio, la anotación de metabolitos es un proceso más complicado, debido sobre todo a la gran diversidad química de estas moléculas, a que su concentración es muy variable y a que, además, en muchas ocasiones se encuentran compartimentados, tanto a nivel celular como subcelular (Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016; Alseekh y Fernie, 2018; Wang *et al.*, 2019b).

Las estrategias actuales de metabolómica de plantas dependen sobre todo de metodologías basadas en espectrometría de masas (MS) (acoplada a cromatografía de líquidos 'LC-MS' o gases 'GC-MS') o resonancia magnética nuclear (RMN), el uso de cada una con ventajas y desventajas sobre las otras. Por ejemplo, las técnicas basadas en MS detectan a nivel molecular, mientras que con las técnicas basadas en RMN es posible hacer detecciones a nivel atómico (aunque únicamente de compuestos muy abundantes), lo cual las hace especialmente útiles para dilucidar estructuras químicas y para llevar a cabo experimentos de rastreo de isótopos (Alseekh y Fernie, 2018). A pesar de esta ventaja, múltiples protocolos de LC-MS y/o GC-MS han sido desarrollados con mayor abundancia en los últimos años y se llevan a cabo con gran frecuencia (O'Shea y Misra, 2020).

En GC-MS, los metabolitos polares son derivatizados y posteriormente separados mediante cromatografía de gases. La ionización electrónica da como resultado patrones de fragmentación excepcionalmente reproducibles, una característica elemental para llevar a cabo experimentos a gran escala. Además, con GC-MS es posible medir de forma rutinaria cientos de analitos (huellas espectrales de masas como relación masa/carga [ $m/z$ ] y tiempo de retención de identidad química conocida o desconocida); tiene la ventaja de ser un procedimiento sensible y robusto. Aun así, actualmente LC-MS ofrece un enfoque más comprensible (Alseekh y Fernie, 2018). A diferencia de GC-MS, en LC-MS las muestras no requieren de algún tratamiento previo y la separación de los compuestos se lleva a cabo en fase líquida. Esta técnica facilita el análisis de diversos metabolitos vegetales, aunque de forma selectiva, ya que la separación de metabolitos con base en sus propiedades químicas es posible mediante la selección de columnas (fase reversa, intercambio iónico, interacción hidrofóbica) junto con el modo de ionización (por ejemplo, ionización por electrospray 'ESI' o ionización química a presión atmosférica 'APCI') que pueda mejorar la detección de ciertas sustancias y reducir la detección de otras (Fernie y Tohge, 2017; Ribbenstedt *et al.*, 2018). La

detección de masas también puede variar, los instrumentos más comunes incluyen: triple cuadrupolo, trampa de iones (cuadrupolo) y tiempo de vuelo 'ToF' (Fernie y Tohge, 2017). El desarrollo en paralelo de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (UHPLC) y de la MS de alta resolución ha extendido los beneficios de la técnica en términos de resolución, sensibilidad y rendimiento. Una gran cantidad de metabolitos novedosos son anotados de forma regular mediante esta técnica (Fernie y Tohge, 2017; Alseekh y Fernie, 2018).

Por otro lado, las estrategias para llevar a cabo estudios metabolómicos son clasificados como 'dirigidas' o 'no-dirigidas'. En general, los experimentos dirigidos implican el análisis y cuantificación de compuestos conocidos (de decenas a miles) (por ejemplo, para evaluar la respuesta de un organismo con respecto a perturbaciones del desarrollo o ambientales como exposición a xenobióticos o patógenos). Por el contrario, los estudios no-dirigidos o generadores de hipótesis, tratan de adquirir tanta información de tantos compuestos diferentes como sea posible, anotarlos y analizar los cambios metabólicos entre muestras. En combinación con estadística de variables múltiples, es posible identificar biomarcadores que distinguen casos problema de grupos control (Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016; Ribbenstedt *et al.*, 2018).

### **2.1.1.3 Importancia económica de los metabolitos secundarios**

Desde el punto de vista económico, los metabolitos secundarios son fundamentales para numerosas ramas de la industria. En términos generales, son empleados como insecticidas, saborizantes, tintes y colorantes, fragancias (para perfumes, cosméticos, aerosoles, detergentes, desodorantes, jabones, cremas, etc.), productos alimenticios y complementos nutritivos, fármacos e inclusive como combustibles (Verpoorte *et al.*, 2002; Wilson y Roberts, 2012; Atanasov *et al.*, 2015; Kukula-Koch y Widelski, 2017; Durazzo *et al.*, 2019; Isah, 2019; Kumar y Goel, 2019; Tetali, 2019; Wink, 2020).

Como consecuencia de su importante actividad biológica, estas moléculas son útiles para el tratamiento de diversas enfermedades humanas, por lo que no es de sorprender su empleo como poderosos fármacos en la medicina tradicional a lo largo de la historia (Kolewe *et al.*, 2008; Wilson y Roberts, 2012; Atanasov *et al.*, 2015; Yue *et al.*, 2016; Kessler y Kalske, 2018). El primer registro escrito sobre el uso de plantas con fines medicinales data de 2600 A.C.; han sido la base de la medicina tradicional de muchas culturas, entre otras de la medicina

tradicional china e india (ayurveda) (Atanasov *et al.*, 2015). Actualmente, más del 30% de nuestros medicamentos tienen su origen en extractos de plantas o sus derivados (Fang *et al.*, 2019).

Además de su amplio espectro de actividades biológicas, se ha observado la baja o total ausencia de toxicidad de los metabolitos secundarios vegetales al ser evaluados como potenciales fármacos (Marchev *et al.*, 2020). Por esta razón, una cuarta parte de todos los medicamentos actualmente aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) son obtenidos directamente de las plantas. En la **Tabla 1** se enlistan algunos metabolitos secundarios de origen vegetal aprobados para uso terapéutico durante los últimos 30 años (Wilson y Roberts, 2012; Atanasov *et al.*, 2015; Isah, 2019; Marchev *et al.*, 2020).

**Tabla 1.** Algunos metabolitos secundarios de origen vegetal aprobados para uso terapéutico durante los últimos 30 años (Wilson y Roberts, 2012; Atanasov *et al.*, 2015)

<b>Uso</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Fuente vegetal</b>
<b>Agente anticancerígeno</b>	Paclitaxel	<i>Taxus brevifolia</i>
	Camptotecina	<i>Camptotheca acuminata</i>
	Vinblastina	<i>Catharanthus roseus</i>
	Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>
	Solamargina	<i>Solanum spp.</i>
	Mepesuccinato de omacetaxina (homoharringtonina)	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>
	Masoprocol	<i>Larrea tridentata</i>
	Arglabin	<i>Artemisia glabella</i>
<b>Analgésico</b>	Morfina	<i>Papaver somniferum</i>
	Codeina	<i>P. somniferum</i>
<b>Tratamiento contra malaria</b>	Artemisina	<i>Artemisia annua</i>
<b>Neuropatía crónica</b>	Dronabinol / Cannabidol	<i>Cannabis sativa</i>
<b>Demencia</b>	Galanthamina	<i>Galanthus caucasicus</i>
<b>Queratosis actínica</b>	Mebutato de ingenol	<i>Euphorbia peplus</i>
<b>Neuralgia posherpética</b>	Capsaicina	<i>Capsicum annum</i>
<b>Gota</b>	Colchicina	<i>Colchicum spp.</i>

Actualmente, muchos metabolitos secundarios farmacológicamente importantes son aislados directamente de plantas silvestres o cultivadas, debido a que en muchos casos su síntesis química no es económicamente factible (debido sobre todo a su gran complejidad estructural). Además, es frecuente que no existan sustitutos sintéticos que posean la misma eficacia y especificidad farmacobiológica para, por ejemplo, una enfermedad en particular (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Atanasov *et al.*, 2015; Marchev *et al.*, 2020). Normalmente, la obtención de metabolitos secundarios directamente de las plantas es un proceso complicado debido a las bajas concentraciones disponibles, a la escasez de las especies (lo cual las pone en muchos casos en peligro de extinción) y a su velocidad de crecimiento, además de que la producción de estos compuestos usualmente está restringida a algunas especies y/o géneros, y puede ser viable solamente bajo ciertas condiciones de crecimiento y desarrollo o sólo cuando ciertas condiciones estacionales o nutricionales ocurren (Verpoorte *et al.*, 2002; Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Kolewe *et al.*, 2008; Wilson y Roberts, 2012).

Además de la accesibilidad a los recursos vegetales y su correcta identificación botánica, importa su calidad y composición química, las cuales pueden variar mucho de una planta a otra, incluso tratándose de la misma especie, puede variar debido a factores presentes en el momento de la cosecha: composición del suelo, temperatura, luz, humedad, altitud, patógenos; durante el procesamiento: durante la extracción los productos pueden sufrir transformaciones y/o ser degradados; así como las condiciones de almacenamiento: muchos compuestos son fotosensibles, es decir que son inestables y susceptibles de degradación por exposición a la luz (Atanasov *et al.*, 2015; Isah, 2019). Aunado a lo anterior, problemas como el cambio climático y otros factores antropogénicos han contribuido a la disminución de especies vegetales y, en muchos casos, incluso a su extinción. El desmesurado uso de las plantas y de los productos derivados de ellas ha resultado en una enorme discrepancia entre su demanda y su disponibilidad, por lo que es importante el desarrollo de mecanismos tanto sustentables como económicamente permisibles para la obtención de estos productos naturales (Kolewe *et al.*, 2008; Atanasov *et al.*, 2015; Marchev *et al.*, 2020).

#### **2.1.1.4 Estrategias para la producción de metabolitos secundarios**

Diferentes estrategias han sido aplicadas para mejorar la producción de los metabolitos secundarios directamente de las plantas, en campo. Por otro lado, se ha generado el desarrollo y aplicación de alternativas químicas y biotecnológicas al aislamiento natural, por ejemplo, síntesis química total o parcial, expresión heteróloga de la ruta biosintética en otros organismos, así como la producción *in situ* mediante técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales. Aun así, con frecuencia no se obtienen los resultados deseados (Wilson y Roberts, 2012; Dziggel *et al.*, 2017; Isah *et al.*, 2018).

##### **2.1.1.4.1 Síntesis química**

Para muchos metabolitos secundarios económicamente importantes de origen vegetal la síntesis química total es posible, pero no rentable. Entre los factores limitantes para la síntesis química de muchos metabolitos secundarios destacan su gran tamaño y, sobre todo, la complejidad de sus estructuras y sus requerimientos estereoquímicos específicos (por ejemplo, complejos anillos aromáticos con arreglos específicos, numerosos sustituyentes oxigenados y múltiples centros quirales) (Wilson y Roberts, 2012; Atanasov *et al.*, 2015; Dziggel *et al.*, 2017; Isah *et al.*, 2018; Marchev *et al.*, 2020). Pocos productos naturales importantes con estructuras químicas simples son producidos vía quimiosíntesis, como es el caso de la aspirina (acetilsalicilato, un derivado del salicilato) (Bourgaud *et al.*, 2001; Yue *et al.*, 2016). Otro ejemplo es la vainillina (un saborizante popular), el metabolito común más sintetizado de forma química, debido a la limitada disponibilidad (menos del 1% de la demanda anual se satisface mediante la extracción a partir de *Vanilla planifolia*) y al coste del compuesto natural. Por tales motivos es elaborado a partir de sustratos tales como el guayacol, eugenol o lignina (Wilson y Roberts, 2012).

##### **2.1.1.4.2 Expresión heteróloga**

La síntesis heteróloga de metabolitos secundarios vegetales ha sido investigada en bacterias, levaduras y especies vegetales alternativas. Durante los últimos años, numerosos genes codificantes de enzimas involucrados en las rutas biosintéticas del metabolismo secundario han sido aislados, clonados y expresados con éxito; no obstante, problemas asociados con la

expresión heteróloga, tales como la baja producción de enzimas de interés o la inactividad de estas, ocurren con frecuencia, lo cual representa una de las principales limitantes para el establecimiento de protocolos exitosos en la mayoría de los casos. La expresión de múltiples enzimas pertenecientes a la misma vía biosintética es una cuestión aún más problemática (Wilson y Roberts, 2012; Dziggel *et al.*, 2017). Aunado a lo anterior, el limitado conocimiento de rutas biosintéticas completamente caracterizadas cuenta como otro de los factores limitantes para la expresión heteróloga (Wilson y Roberts, 2012; Dziggel *et al.*, 2017; Belcher *et al.*, 2020). La biología computacional, en conjunto con la investigación de genomas, transcriptomas, proteomas y metabolomas, así como el silenciamiento de genes, han facilitado y mejorado la actual búsqueda de genes y su función en las rutas metabólicas vegetales. Aunque, bien es cierto, que en muchos casos la información disponible se limita a plantas modelo y se encuentra con frecuencia incompleta (muchos genes aún no han sido identificados) (Dziggel *et al.*, 2017; Belcher *et al.*, 2020).

Las especies que han sido seleccionadas predominantemente como organismo huésped para la producción de metabolitos secundarios vegetales mediante técnicas de ADN recombinante incluyen a la bacteria *Escherichia coli* y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*. Estos organismos son ideales, debido a sus rápidos tiempos de duplicación en comparación con las especies vegetales (minutos vs. días), las fuentes de carbono de bajo costo que utilizan, la facilidad de su modificación genética y a la cantidad de recursos genéticos existentes (vectores, cepas, promotores, etc.), además de las bien establecidas tecnologías de escalamiento (Wilson y Roberts, 2012; Dziggel *et al.*, 2017; Belcher *et al.*, 2020).

Las levaduras han demostrado ser hospederos especialmente ideales para la producción de terpenoides, debido a su ruta MVA endógena (*ver* sección 1.1.1 Terpenoides) además de poseer una amplia gama de herramientas genéticas endógenas para la biosíntesis de esta clase de compuestos (Belcher *et al.*, 2020). En el caso de las rutas de producción microbianas, la síntesis de terpenos (por ejemplo, la artemisinina y paclitaxel) y otros compuestos complejos a través de la transferencia de las rutas completas en *E. coli* está limitada por su dificultad para expresar las enzimas citocromo P450 (CYP450), las cuales catalizan múltiples pasos críticos en la biosíntesis de metabolitos secundarios vegetales, por lo que su expresión es de suma importancia (Wilson y Roberts, 2012; Dziggel *et al.*, 2017; Belcher *et al.*, 2020).



La expresión heteróloga de terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos *vía* microorganismos ha sido reportada (Dziggel *et al.*, 2017; Belcher *et al.*, 2020). Por otro lado, las rutas metabólicas de compuestos tales como el paclitaxel también han sido introducidas en sistemas vegetales como *Arabidopsis thaliana*, tomate y *Physcomitrella patens* (Wilson y Roberts, 2012).

#### **2.1.1.4.3 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales, también referido como ‘cultivo *in vitro*, axénico y estéril de células’ es una herramienta biotecnológica importante para la investigación básica y aplicada, pero que también tiene aplicaciones comerciales (Thorpe, 2007). Efectivamente, el cultivo de tejidos vegetales se refiere al cultivo aséptico de células, tejidos y/o órganos vegetales bajo condiciones físicas y químicas definidas *in vitro* (Thorpe, 2007). En 1902, el botánico australiano Gottlieb Haberlandt fue el primero en llevar a cabo un intento para iniciar cultivos celulares vegetales, describió la formación de ‘callo’ (masa celular desorganizado, en la naturaleza formada en respuesta a heridas) (Haberlandt, 1902). A pesar de la incapacidad para inducir la división celular, logró la primera regeneración de una planta por completo, debido a lo cual es reconocido como el fundador del cultivo de células vegetales, al sentar las bases teóricas para su uso, así como el concepto de totipotencia (Thorpe, 2007; Wilson y Roberts, 2012; Eibl *et al.*, 2018).

Posteriormente, durante los años 30’s del siglo pasado fueron establecidos los primeros cultivos *in vitro* (principalmente cultivos celulares indiferenciados como ‘callos’), seguido por un próspero periodo para el desarrollo de medios de cultivo y métodos entre los años 40’s y 60’s. De hecho, una gran parte de las técnicas empleadas hoy en día fueron desarrolladas en esa época (Dörnenburg y Knorr, 1995; Thorpe, 2007; Wilson y Roberts, 2012). Fue a finales de 1960 cuando la tecnología de cultivo de tejidos vegetales fue introducida como una herramienta con grandes posibilidades para el estudio y producción de metabolitos secundarios, como una alternativa viable para mitigar la sobreexplotación de especies vegetales (Vanisree y Tsay, 2004; Isah *et al.*, 2018). Desde entonces ocurrió un dramático incremento en su aplicación, no sólo para aumentar la producción de estos valiosos compuestos sino también para resolver diversas cuestiones de biología básica, agricultura, horticultura y silvicultura. Algunas áreas en las que impactó esta tecnología fueron:

comportamiento celular, modificación y mejora de especies vegetales, genética funcional, generación de especies libres de patógenos, conservación de germoplasma, propagación clonal (micropropagación), formación de productos (producción heteróloga de metabolitos y proteínas) (Thorpe, 2007; Wilson y Roberts, 2012). Adicionalmente, proliferó el uso de cultivos celulares indiferenciados en suspensión además del desarrollo de cultivos de tejidos diferenciados, como embriones somáticos, raíces adventicias y brotes (Isah *et al.*, 2018).

Actualmente, los cultivos celulares vegetales pueden ser virtualmente creados a partir de prácticamente cualquier planta y de cualquier tejido vegetal en condiciones de esterilidad (Wilson y Roberts, 2012; Isah *et al.*, 2018). Los explantes (el tejido vegetal aislado que dará origen a los cultivos como hojas, tallos, raíces y meristemos) deben ser desinfectados y posteriormente colocados en un medio de cultivo estéril (usualmente enriquecido con nutrientes de naturaleza mineral y orgánica además de RCVs (*ver Tabla 2*) necesarios para guiar los mecanismos de desdiferenciación/diferenciación celular) bajo condiciones físicas de cultivo controladas (por ejemplo, luz y temperatura) (Bourgaud *et al.*, 2001; Hussain *et al.*, 2012).

El uso de cultivos celulares para la obtención de metabolitos secundarios ofrece considerables ventajas sobre el cultivo convencional de plantas (Vanisree y Tsay, 2004; Hussain *et al.*, 2012). Entre otras:

- La producción de compuestos de interés puede ser lograda bajo condiciones controladas, que son independientes de los cambios estacionales, climáticos y/o condiciones del suelo;
- es posible la obtención de cultivos axénicos (libres de microorganismos e insectos que afectan la producción de metabolitos secundarios);
- las células de cualquier especie vegetal pueden ser multiplicadas para la obtención de metabolitos secundarios específicos;
- pueden seleccionarse cultivos con alta producción de metabolitos secundarios;
- obtención de metabolitos secundarios en periodos cortos de cultivo (de 2 a 4 semanas);
- costos de producción reducidos e incremento de productividad.

**Tabla 2.** Clasificación de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y sus principales representantes en la naturaleza y sus análogos sintéticos. Basada en Jamwal *et al.*, 2017.

Clase	Reguladores naturales	Reguladores sintéticos
Auxina	Ácido indol-3-acético (AIA) Indol-3-acetonitrilo (IAN) Indol-3-acetaldehído (IAc) Etil-3-indolacetato Ácido indol-3-pirúvico (IPyA)	Ácido indol-3-butírico (AIB) Ácido indol-3-propiónico (AIP) Ácido indazol-3-acético Ácidos clorofenoxipropiónicos Ácido Naftalenacético (ANA) Ácido fenoxiacético (AFA) Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) Naftaleno acetamida (NAD) Ácido 2-naftoxiacético (NOA) Ácido 2,3,5-triyodobenzóico (TIBA) Ácido tianaftalen-3-propiónico (IPA)
Citocinina	Ribosilzeatina Zeatina Isopenteniladenina Dihidrozeatina	6-bencilaminopurina (BAP) 6-fenilaminopurina (FAP) Cinetina (KIN, 6-furfuril-aminopurina) N-bencil-9-(2-etrahidropiranyl) adenina (PBA) Difenilurea Thidiazurón (Tdz) Benzimidazol Adenina 6-(2-tenilamino) purina
Giberelinas	Ácido giberélico o giberelina (GA <sub>3</sub> ) GA4 GA7	GA GA <sub>3</sub>
Etileno	Etileno	Ácido 2-cloroetilfosfónico (etefón) Ethrel
Brasinoesteroides	Brasinolida Dolicolida 28-homodicolida Castasterona Dolicosterona 28-homodicolicosterona Tifasterol	Análogos de 5-hidroxi-6-cetona
Jasmonatos	Ácido jasmónico	Metil jasmonato (MeJa) Metil dihidrojasmonato Ácido dihidrojasmonico
Estrigolactonas	Estrigol Orobanchol Sogolactona	GR24

No obstante, un conjunto de problemas inherentes al cultivo celular como heterogeneidad fisiológica, lento crecimiento e inestabilidad genotípica y fenotípica de las líneas celulares (las variaciones pueden ser preexistentes o inducidas por el cultivo (variaciones somaclonales)) aunado a la falta de conocimiento básico sobre las rutas de biosíntesis y de los mecanismos moleculares responsables de la producción de estos compuestos (que limita el uso de precursores, procesos de biotransformación, manipulación genética e ingeniería metabólica

para mejorar la acumulación de compuestos de interés) deriva frecuentemente en bajos rendimientos de producción, una de las principales razones por las que sólo un limitado número de compuestos bioactivos son obtenidos a nivel industrial por esta vía (Dörnenburg y Knorr, 1995; Bourgaud *et al.*, 2001; Hussain *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2016).

La generación y mantenimiento de cultivos *in vitro* de órganos diferenciados, como raíces y embriones es también una práctica rutinaria, obteniéndose con frecuencia concentraciones de metabolitos similares a los generados por la planta entera; sin embargo, su aplicación extensiva está limitada por la enorme inversión de recursos implicada en su cultivo a gran escala, además de problemas similares a los observados en los cultivos celulares antes mencionados (Wilson y Roberts, 2012; Isah *et al.*, 2018). Lo anterior impulsó el desarrollo de estrategias para incrementar los rendimientos de producción de los metabolitos secundarios.

#### **2.1.1.4.3.1 Cultivos celulares y suspensiones celulares vegetales para la producción de metabolitos secundarios**

Cualquier célula vegetal es biosintéticamente totipotente, lo cual significa que en las condiciones adecuadas cada una de las células de una planta es capaz de producir compuestos químicos, los cuales son idénticos a los presentes en la planta parental (Yue *et al.*, 2016). Con base en esta premisa, entre 1960 y 1980 muchos estudios fueron llevados a cabo con la finalidad de masificar el cultivo de células vegetales y de desarrollar bioprocesos para la producción de metabolitos secundarios de interés para la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética. Recientemente se ha extendido su uso para la producción de proteínas recombinantes y plantas transgénicas (Wilson y Roberts, 2012; Eibl *et al.*, 2018).

A menudo, el cultivo celular *in vitro* representa la única fuente disponible para proporcionar cantidades ilimitadas de ingredientes activos, normalmente de escasa disponibilidad o difíciles de sintetizar (Wilson y Roberts, 2012). La producción de metabolitos mediante el cultivo de células vegetales es renovable, ambientalmente amigable y se somete a los más estrictos controles desde el punto de vista de procesamiento, una ventaja en lo que respecta a las normas para la producción de alimentos y medicamentos (Kolewe *et al.*, 2007). Un par de hitos importantes en el uso de esta tecnología biotecnológica ocurrieron por parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas

en inglés Food and Agriculture Organization) al proponer desde 1994 el cultivo de células y tejidos vegetales para la producción de sustancias y metabolitos y la posterior aceptación del compuesto anticancerígeno paclitaxel en el año 2000 (Eibl *et al.*, 2018).

Los cultivos celulares tienen un mayor índice metabólico, en comparación con las plantas intactas, debido a que el inicio del crecimiento celular en los cultivos conduce a la rápida proliferación de la masa celular y a ciclos biosintéticos condensados. Esta es la ventaja más importante de los cultivos celulares como sistemas modelo para el estudio de las rutas biosintéticas (Dörnenburg y Knorr, 1995; Vanisree y Tsay, 2004).

A pesar de que la producción biotecnológica en cultivos celulares vegetales es una alternativa atractiva, a la fecha ha tenido un éxito comercial limitado, debido a la naturaleza empírica en la selección de cultivos estables y con altos rendimientos, escalamiento impredecible, además de la falta de entendimiento de ¿cómo es que son sintetizados estos metabolitos? y/o ¿cómo es controlada su síntesis? (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Wilson y Roberts, 2012). Pese a estas limitaciones, muchos metabolitos secundarios de interés farmacológico han encontrado en el cultivo de suspensiones celulares una plataforma biotecnológica alternativa para su producción a nivel comercial (por ejemplo, paclitaxel, resveratrol, artemisina, ginsenósidos y ajmalicina) (para más ejemplos *ver* Tabla 1 en Yue *et al.*, 2016) (Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018).

El cultivo de suspensiones celulares se refiere a células libres o a pequeños grupos de ellas, productoras de metabolitos secundarios que luego de ser establecidas como ‘callo’ son cultivadas en un medio líquido para establecer las suspensiones (Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016). Son un sistema adecuado como modelo de estudio para la investigación básica y con fines biotecnológicos por sus importantes ventajas:

- La producción de compuestos se logra bajo condiciones controladas, que son independientes de las variaciones ambientales (estacionales, geográficas, etc.);
- es considerada como una plataforma de producción estable, lo cual asegura la producción en secuencia de productos con calidad y rendimientos uniformes;
- entre los sistemas vegetales de producción *in vitro* de productos naturales es el que provee una mayor homogeneidad y eficacia en la propagación de células cultivadas;

- es posible que las células cultivadas sintetizen productos *novel* (normalmente no sintetizados por la planta nativa).

Si bien su uso es más extensivo en comparación con el cultivo de órganos vegetales, el uso de suspensiones celulares como práctica cotidiana encuentra obstáculos en problemas inevitables como: la inestabilidad de las líneas celulares, lento crecimiento y problemas de escalamiento que, en conjunto, resultan en la baja producción de metabolitos de interés (Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018).

#### **2.1.1.4.3.1.1 Estrategias para optimizar la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares vegetales**

Tal ha sido el interés en la producción a gran escala de metabolitos secundarios mediante vías económicas y con mayor sustentabilidad, como el cultivo de células vegetales *in vitro*, que desde los últimos 30 años diversas estrategias biotecnológicas han sido desarrolladas y aplicadas para incrementar los rendimientos en su producción. Entre otras, podemos mencionar: la selección de líneas celulares de alto-rendimiento, optimización de las condiciones de cultivo (ambientales y nutritivas), mejora de la línea celular, adición de elicitores, alimentación de los cultivos con precursores, remoción de productos *in situ* y también técnicas de inmovilización e ingeniería metabólica entre otras (Dörnenburg y Knorr, 1995; Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Vanisree y Tsay, 2004; Vasconsuelo and Boland 2007; Wilson y Roberts, 2012; Bourgaud *et al.*, 2001; Hussain *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018).

##### **2.1.1.4.3.1.1.1 Elicitores**

En la naturaleza, las plantas responden a ‘estímulos’ o ‘señales’ ambientales de origen biótico y/o abiótico mediante diversos mecanismos de defensa que incluyen la producción de metabolitos secundarios. En términos generales, se denomina a estos estímulos ‘elicitores’

(Vasconsuelo y Boland 2007; Isah *et al.*, 2018). El término elicitor incluye a estímulos muy heterogéneos, por ejemplo, a compuestos químicos (de naturaleza biótica [exógenos o endógenos] o abiótica) así como a factores físicos que pueden desencadenar una respuesta en organismos vivos (*ver Tabla 3*) (Isah *et al.*, 2018).

**Tabla 3.** Clasificación de elicitores para la producción de metabolitos secundarios.

\*\*\* Datos de Namdeo, 2007; Vasconsuelo y Boland 2007; Ramírez-Estrada *et al.*, 2016; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018.

Compuestos químicos	
Bióticos	Abióticos
Exógenos (origen patógeno)	- Metales pesados
* Directamente obtenidos de microorganismos: enzimas, fragmentos de paredes celulares de bacterias, hongos y levaduras.	- Sales inorgánicas: AgNO <sub>3</sub> , AlCl <sub>3</sub> , CaCl <sub>2</sub> , CdCl <sub>2</sub> , CoCl <sub>2</sub> , CuCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> , KCl, MgSO <sub>4</sub> , NiSO <sub>4</sub> , VOSO <sub>4</sub> así como iones Zn.
* Compuestos microbianos de composición definida: quitosano, alginato, pectinas, quitina, elicinas. Polisacáridos, lípidos y glicoproteínas fúngicas.	- Compuestos tóxicos: con alta afinidad por el ADN, detergentes, fungicidas, herbicidas
* Compuestos microbianos de composición compleja: homogeneizado de hongos, extracto de levadura, esporas fúngicas.	- Componentes no-esenciales en el medio de cultivo: agarosa
Endógenos (producidos por las plantas en respuesta a patógenos)	
* Moléculas señal: ácido jasmónico, metil jasmonato, ácido salicílico, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico	
Factores físicos	
- Luz	
- Radiación UV	
- Temperatura	
- Estrés osmótico	
- Heridas	
- Calidad del aire	

Se ha observado que los cultivos vegetales *in vitro* responden de la misma forma en que lo hacen las plantas *in vivo*: mediante la adición exógena en el medio de cultivo de uno o varios elicitores durante el cultivo de un sistema celular vivo, incluso en bajas concentraciones, los procesos biosintéticos de metabolitos secundarios son iniciados o intensificados (Namdeo,

2007; Vasconsuelo y Boland 2007; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018; Isah, 2019). Ello puede implicar ajustes en la arquitectura de las paredes celulares y/o sistemas membranales, así como alteraciones en el ciclo celular y en las tasas de división, con un efecto sobre el crecimiento para ajustar el metabolismo de compuestos bioactivos (Isah, 2019). Por lo que la elicitación es una valiosa herramienta biotecnológica, ampliamente usada como 'potenciador' para inducir la acumulación de productos de interés (Vasconsuelo y Boland 2007; Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018; Isah, 2019). Además, la elicitación puede ser usada para entender la regulación de las rutas de síntesis de metabolitos secundarios (transducción de señales, expresión de genes, actividad enzimática) mediante estudios de expresión génica diferencial entre cultivos bajos/no acumuladores contra cultivos altamente acumuladores de metabolitos secundarios (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

El mecanismo de acción de las moléculas elicitoras inicia con el reconocimiento del compuesto por receptores específicos unidos a la membrana plasmática vegetal. Posteriormente, el estímulo es transferido a la célula mediante un efectivo sistema de transducción de señales en el citosol, para finalmente estimular cambios dentro de las células que dirijan hacia un aumento efectivo en los procesos metabólicos secundarios. Esto depende, en gran medida, del estatus genético y fisiológico de los cultivos *in vitro* (Ramírez-Estrada *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018).

Cada tipo de elicitor puede inducir, de acuerdo con sus características, respuestas específicas que dependen de la interacción elicitor-cultivo vegetal. Por otro lado, para la aplicación de estrategias de elicitación, es importante tomar en cuenta parámetros como la concentración y selectividad del elicitor, edad de los cultivos, tiempo de exposición, línea celular cultivada y calidad de sus paredes celulares, condiciones de cultivo (composición de nutrientes en el medio de cultivo, etapa de crecimiento, luz, etc.) y regulación del crecimiento (Namdeo, 2007; Vasconsuelo y Boland, 2007; Isah *et al.*, 2018).

Usando como estrategia la elicitación, se han reportado incrementos en la producción de diversos compuestos de interés farmacológico incluyendo terpenoides, flavonoides, alcaloides y fenilpropanoides (Ramírez-Estrada *et al.*, 2016).



#### **2.1.1.4.3.1.1.2 Alimentación con precursores**

La aplicación exógena de precursores biosintéticos en el medio de cultivo al inicio o durante el periodo de cultivo es un procedimiento biotecnológico ampliamente usado para incrementar el rendimiento en la producción de compuestos bioactivos (Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018). Esta propuesta es muy útil sobre todo cuando los precursores son de bajo costo. La estrategia se basa en la premisa de que cualquier compuesto que sea un intermediario en o al principio de la ruta biosintética de un metabolito determinado representa una buena oportunidad para incrementar el rendimiento del producto final ya que puede servir como sustrato adicional (Namdeo *et al.*, 2007; Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018). Entonces, los compuestos endo- o exógenos que son convertidos por las células en cultivo en metabolitos secundarios mediante rutas biosintéticas, son denominados 'precursores' (Isah *et al.*, 2018). Esta metodología es además útil para llevar a cabo investigaciones sobre la biosíntesis de productos de interés, por ejemplo, empleando precursores marcados radioactivamente (Wilson y Roberts, 2012; Isah *et al.*, 2018).

En la biosíntesis de metabolitos secundarios por cultivos celulares vegetales, la alimentación con precursores en concentraciones adecuadas puede promover la acumulación de compuestos de interés. Pero, por otro lado, la inadecuada concentración/tiempo de exposición de los precursores puede causar una inhibición en la ruta metabólica por retroalimentación. También ha sido reportado que algunos precursores en cierta concentración son tóxicos para las células vegetales y pueden inhibir su crecimiento. Por lo tanto, es muy importante determinar la concentración adecuada del precursor, así como el tiempo de exposición en los cultivos (Ouyang *et al.*, 2005a; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018). Otros factores a considerar incluyen el momento de adición a los cultivos (los metabolitos secundarios son sintetizados de manera abundante después de que el crecimiento celular entra en la fase exponencial, por lo que puede ser útil añadir los precursores al medio en esta fase) y la ruta biosintética de la cual formarán parte. Lo anterior supone la necesidad de disponer de los conocimientos adecuados con relación a la biosíntesis del compuesto de interés, un factor limitante en muchos casos (Ouyang *et al.*, 2005a; Isah *et al.*, 2018).

Los intentos de este tipo que se han llevado a cabo para inducir o incrementar la producción de metabolitos secundarios de origen vegetal han sido efectivos en muchos casos, por ejemplo, para alcaloides, terpenos, flavonoides y diversos compuestos fenólicos como feniletanoide glicósidos (Ouyang *et al.*, 2005a; Namdeo *et al.*, 2007; Isah *et al.*, 2018).

## 2.2 Verbascósido, un fenilpropanoide de importancia farmacológica

Los fenilpropanoides (feniletanoides, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) son una clase de compuestos fenólicos cuya estructura consiste en un grupo fenilo (C<sub>6</sub>) unido a una cadena de tres carbonos (propano, C<sub>3</sub>), por ejemplo, los ácidos hidroxicinámicos (sin. hidroxicinamatos) e hidroxicinamalheídos (Korkina, 2007; Le Roy *et al.*, 2016; Durazzo *et al.*, 2019; Vanholme *et al.*, 2019).

En algunas referencias suele usarse el término fenilpropanoides para referirse a la extensa familia de metabolitos secundarios derivados del aminoácido fenilalanina (L-Phe), a partir de la ruta general de los fenilpropanoides; por ejemplo, todos los compuestos fenólicos flavonoides, así como algunos compuestos no-flavonoides como ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos y lignanos. Estrictamente hablando, estos últimos compuestos son más bien producto del metabolismo de los fenilpropanoides, es decir son 'fenilpropanoide-derivados' (Korkina, 2007; Liu *et al.*, 2015).

La ruta del shikimato o ácido shikímico es la vía de entrada a la síntesis de los fenilpropanoides (**Figura 2**). Mediante siete reacciones enzimáticas, esta ruta vincula el metabolismo de carbohidratos con la biosíntesis de compuestos aromáticos: carbohidratos simples (resultantes de la vía de las pentosas fosfato y de la glicólisis) son convertidos en corismato, el precursor universal de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano (Korkina, 2007; Vogt, 2010; Maeda y Dudareva 2012; Kumar y Goel, 2019). Posteriormente, mediante una reacción de desaminación no oxidativa catalizada por la enzima monofuncional fenilalanina amonio- liasa (PAL, por sus siglas en inglés, Phenylalanine Ammonia Lyase) (EC 4.3.1.24) la fenilalanina es convertida en ácido *trans*-cinámico con la liberación de una molécula de amonio. Esta reacción es precisamente el primer paso en la ruta general de los fenilpropanoides, así como en la conversión del metabolismo primario al secundario mediante la redirección del flujo de carbono (Korkina, 2007; Vogt, 2010; Kumar y Goel, 2019; Vanholme *et al.*, 2019). Posteriormente, el anillo aromático del ácido *trans*-cinámico es hidroxilado por la *trans*-cinamato 4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.14.91) formándose

el ácido *p*-cumárico, a partir del cual se forma una molécula de *p*-cumaroil-CoA (4-cumaroil-CoA) mediante la 4-cumaroil-CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12) (Korkina, 2007; Vogt, 2010; Kumar y Goel, 2019; Vanholme *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha descrito la existencia de una enzima PAL bifuncional (PTAL, Phenylalanine/Tyrosine Ammonia Lyase, EC 4.3.1.25) la cual cataliza la formación directa de ácido cumárico usando como sustrato al aminoácido tirosina. En plantas, esta enzima se encuentra restringida únicamente a la familia Poaceae (o Gramineae, pastos monocotiledóneos) (Barros y Dixon, 2020).

Se denomina a los tres primeros pasos en la síntesis de los fenilpropanoides (las reacciones catalizadas por las enzimas PAL, C4H y 4CL) como ruta general o central de los fenilpropanoides, la base biosintética de todos aquellos compuestos ‘fenilpropanoide-derivados’ por lo que su ocurrencia es imperativa y las enzimas que las catalizan muy conservadas en las especies del reino vegetal (Yu y Jez, 2008; Vogt, 2010; Liu *et al.*, 2015). En muchas especies, los genes codificantes de las enzimas involucradas en la ruta general de los fenilpropanoides pertenecen a familias multigénicas, las cuales a su vez son reguladas principalmente por las familias de factores transcripcionales MYB y NAC (Liu *et al.*, 2015; Le Roy *et al.*, 2016).

Probablemente el *p*-coumaroil-CoA sea una de las moléculas más importantes en la formación de múltiples compuestos. Como se observa en la **Figura 2**, es el precursor de: flavonoides, cumarinas, curcuminas y estilbenos; además, es incorporado en la ruta del monolignol (lignanós y ligninas) (Korkina, 2007; Vogt, 2010; Le Roy *et al.*, 2016; Kumar y Goel, 2019; Vanholme *et al.*, 2019).

Por otro lado, el ácido *trans*-cinámico es precursor de los ácidos hidroxicinámicos. Este compuesto es convertido en ácido *p*-cumárico mediante la adición de un grupo hidroxilo por la acción de una monooxigenasa (C4H, *trans*-cinamato 4-monooxigenasa, una enzima citocromo P450). Posteriormente, a partir del ácido *p*-cumárico se forma el ácido caféico, precursor del ácido ferúlico y este a su vez del ácido sinápico, todos los cuales son los hidroxicinamatos más representativos (Vogt, 2010; Kumar y Goel, 2019). Por otro lado, la pérdida de dos átomos de carbono en la molécula de ácido *trans*-cinámico resulta en la formación del ácido benzoico, precursor de los ácidos benzóicos (*p*-hidroxibenzóico, salicílico,

vanílico, siríngico y gálico, entre otros) (Kumar y Goel, 2019; Durazzo *et al.*, 2019; Vanholme *et al.*, 2019).

Los fenilpropanoides se encuentran en altas concentraciones en bebidas (café, vino, té verde y negro, mate, cocoa), vegetales, granos, frutos (especialmente los frutos rojos como cerezas, bayas, frambuesas, moras y fresas, entre otros) así como en hojas. Muchos fenilpropanoides son moléculas tóxicas e inestables, por lo que dentro de las células vegetales usualmente son almacenados en formas más estables, por ejemplo, formando enlaces éster- o amida- con otras moléculas orgánicas (Molgaard y Ravn 1988; Vogt, 2010; Le Roy *et al.*, 2016; Kumar y Goel, 2019; Durazzo *et al.*, 2019; Vanholme *et al.*, 2019):

- glicósidos: mono-, di- y trisacáridos
- polialcoholes: glicerol y mio-inositol
- aminoácidos, aminos y otros grupos nitrogenados: putrescina, espermidina, tiramina o espermina, DOPA, triptófano, glutatión, serotonina, colina.
- lípidos: ácidos grasos y esteroides.
- ácido quínico: ácido clorogénico (ácido caféico + ácido quínico), el ácido hidroxicinámico soluble más abundante.
- ácidos orgánicos: ácido tartárico, ácido málico, ácido glucárico, ácido fenilpirúvico o algún otro ácido hidroxicinámico (por ejemplo, ácido ferúlico con ácido caféico o ácido *p*-cumárico).
- ácidos hidroxilados: ácido rosmarínico (ácido caféico + ácido hidroxifenil láctico).
- ácidos hidroxicinámicos de anillo cerrado: cumarinas.

Entre estas modificaciones, la glicosilación parece ser una de las reacciones principales que ha conducido no sólo al aumento en la cantidad de estructuras químicas sino también a la diversidad de sus propiedades (Le Roy *et al.*, 2016). Además de prevenir a las células de la potencial toxicidad de los fenilpropanoides en su forma aglicona, las modificaciones químicas también son importantes por la producción de moléculas que ayudan a contrarrestar los efectos de las especies reactivas de oxígeno. La actividad antioxidante se debe, sobre todo, a diversos grupos hidroxilo y dobles enlaces insaturados presentes en las estructuras (Yu y Jez, 2008; Le Roy *et al.*, 2016).

Aparte de su importancia como proveedores del esqueleto central de carbono para diferentes metabolitos ('fenilpropanoide-derivados'), los fenilpropanoides están implicados en diversos procesos fisiológicos, pues se ha documentado que algunos pueden incluso dirigir el crecimiento y desarrollo de las plantas (Vanholme *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha reportado que las paredes celulares de los pastos se caracterizan por contener grandes cantidades de ácido ferúlico y cumárico. En estas especies, el ácido ferúlico se encuentra unido a lignina, polisacáridos y proteínas estructurales. El ácido ferúlico también se encuentra presente en las paredes celulares de muchas dicotiledóneas, aunque en menor cantidad (Le Roy *et al.*, 2016).

Los fenilpropanoides son vitales en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, por ejemplo, sirviendo como protectores contra la radiación UV. Este rasgo es especialmente importante, ya que se considera que el desarrollo de moléculas con este tipo de propiedad permitió a las primeras plantas terrestres (probablemente briofitas) poblar ambientes diferentes a los acuáticos, previniendo y contrarrestando los daños generados por la radiación solar (Cheynier *et al.*, 2013; Le Roy *et al.*, 2016).

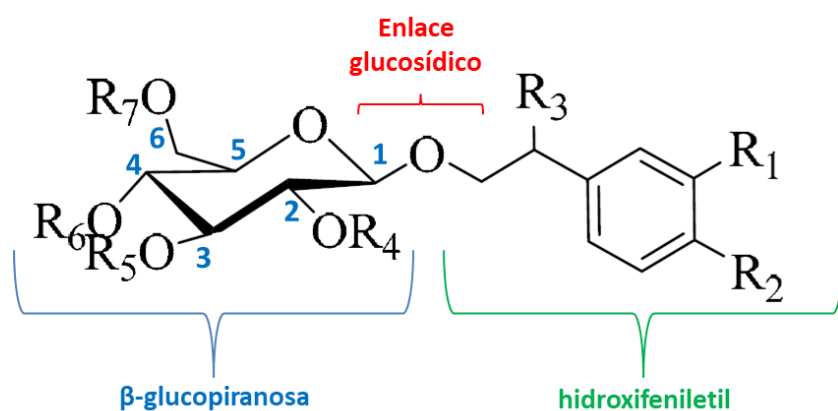
Un hecho adicional de suma importancia es que el anillo aromático en la estructura de los fenilpropanoides les permite atravesar membranas celulares para poder ejercer sus actividades biológicas, por lo que muchos fármacos son derivados de compuestos fenólicos (por ejemplo, el ácido acetilsalicílico) (Yu y Jez, 2008).

### **2.2.1 Feniletanoide glicósidos**

Los feniletanoide glicósidos (PhGs por sus siglas en inglés, Phenylethanoid glycosides) son un grupo de compuestos fenólicos solubles en agua. Estructuralmente consisten en un elemento hidroxifeniletíl (alcohol fenético, C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, ej. tirosol e hidroxitirosol) unido a una β-glucopiranososa o β-alopiranososa (aunque lo más común es encontrar glucopiranosósidos, ya que la aparición de alopiranosósidos en el reino vegetal es muy rara, con compuestos identificados aislados únicamente en *Magnolia officinalis*; Xue y Yang, 2016) mediante un enlace glicosídico (**Figura 4**). Con frecuencia, esta estructura central es enriquecida con múltiples grupos sustituyentes, como ácidos aromáticos (por ejemplo, los ácidos hidroxicinámicos cinámico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico) y varios azúcares (por ejemplo, ramnosa, xilosa, apiosa, glucosa, galactosa, lixosa y arabinosa) unidos a la glucosa central mediante enlaces éster o glicosídicos, respectivamente. De hecho, a los PhGs compuestos por uno o más grupos

fenilpropilo se los denomina 'fenilpropanoide glicósidos' (Jiménez y Riguera, 1994; Fu *et al.*, 2008; Xue y Yang, 2016).

En general, la gran mayoría de los PhGs contienen menos de cuatro azúcares en sus moléculas; es común encontrar uno en el carbono C-3 de la glucosa central, siendo la L-ramnosa el sustituyente más popular en esta posición (Fu *et al.*, 2008). Por otro lado, entre los ácidos aromáticos más frecuentes se encuentran los ácidos caféico, ferúlico, cumárico, vanílico, siríngico y gálico (Fu *et al.*, 2008; Xue y Yang, 2016).



**Figura 4.** Estructura central de los feniletanoide glicósidos. Consisten de un elemento hidroxifeniletíl (verde) unido a una  $\beta$ -glucopiranososa (azul) mediante un enlace glucosídico (rojo). A esta estructura se unen usualmente múltiples sustituyentes, como ácidos hidroxicinámicos y/u otros azúcares (R4-7).

\*Modificada de Xue y Yang, 2016.

Aunque los feniletanoide glicósidos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, su producción sobresale en algunas familias, por mencionar algunas: Labiatae, Verbenaceae, Oleaceae, Plantaginaceae, Lamiaceae, Orobanchaceae, Acanthaceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Buddlejaceae, Gesneriaceae y Scrophulariaceae (Ghisalberti, 1994; Jiménez y Riguera, 1994; Fu *et al.*, 2008). En ellas, estos compuestos han sido aislados de raíces, hojas, corteza y partes aéreas (Fu *et al.*, 2008).

La síntesis de estos compuestos, al igual que la mayoría de los compuestos de naturaleza fenólica, empieza en la ruta del shikimato (**Figura 2**), con la generación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, siendo este último precursor del grupo alcohol fenético (tirosol e hidroxitirosol) de los PhGs, el cual puede ser sintetizado vía tiramina y/o DOPA, dependiendo de la especie (Ellis, 1983; Saimaru y Orihara, 2010; Hu *et al.*, 2011a; Torrens-Spence *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020). La glicosilación de estos compuestos es regulada por la acción combinada de glicosiltransferasas, por ejemplo, las UDP-glicosiltransferasas (UGPs) (catalizan la transferencia de azúcares de moléculas donadoras hacia moléculas receptoras específicas como otros azúcares, lípidos, proteínas o moléculas pequeñas como fenilpropanoides) y glucósido hidrolasas (Le Roy *et al.*, 2016; Torrens-Spence *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020). En cuanto a las moléculas accesorias, como por ejemplo los ácidos hidroxicinámicos, tienen su origen en la ruta general de los fenilpropanoides (Ellis, 1983; Saimaru y Orihara, 2010; Hu *et al.*, 2011a; Torrens-Spence *et al.*, 2018). En el caso de los azúcares accesorios, en la mayoría de los casos se desconoce su procedencia, incluso el de la glucosa central (y tampoco se conocen las enzimas y genes comprometidos en su biosíntesis). En realidad, hay pocos ejemplos de PhGs cuya ruta biosintética haya sido completamente dilucidada (Torrens-Spence *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020).

Al igual que muchos otros metabolitos secundarios, la diversidad estructural de los PhGs se traduce en la gran variedad de actividades biológicas que se reportan, incluyendo: actividad antiinflamatoria, antihipertensiva, antioxidante, antiedad, antibacterial, antiviral, antitumoral, citotóxica, efectos analgésicos, inmunomoduladores, hepato- y neuroprotectores, así como potenciadores de la memoria, entre otras (Jiménez y Riguera, 1994; Fu *et al.*, 2008; Xue y Yang, 2016). Todo ello hace a los PhGs moléculas particularmente atractivas para el desarrollo de fármacos.

### **2.2.1.1 Verbascósido**

El PhG verbascósido (sin. acteósido, kusaginina) fue aislado por primera vez de *Orobancha rapum-genistae* en 1924 y se le llamó “orobanchina” (Bridel y Charaux, 1924). En ese trabajo se mostró que los componentes glucosa, ramnosa y el ácido caféico representaban la mayor parte de la estructura. Posteriormente el compuesto fue aislado de diferentes especies pertenecientes al orden Lamiales (por ejemplo, *Verbascum sinuatum*, *Syringa vulgaris*,

*Conandron ramoidiodes* y *Cleodendron trichotomum*) aunque en cada caso fue nombrado como si se tratase de compuestos diferentes. Hasta que la estructura del verbascósido fue definida por completo se demostró que se trataba del mismo compuesto (Alipieva *et al.*, 2014).

#### **2.2.1.1.1 Distribución biológica**

El verbascósido es una molécula ampliamente distribuida, de hecho, es uno de los fenilproetanoide glicósidos (éster disacárido del ácido caféico) con mayor distribución en el reino vegetal (Molgaard y Ravn, 1988). Su síntesis no es específica de algún órgano vegetal en particular, ya que ha sido aislado tanto de partes aéreas (como tallos, corteza, hojas, flores y frutos) como de partes subterráneas (como raíces primarias y secundarias) en más de 200 especies vegetales, pertenecientes a más de 23 familias en muy variables concentraciones (He *et al.*, 2011; Alipieva *et al.*, 2014).

Se ha reportado al PhG verbascósido como uno de los compuestos con mayor presencia en muchas especies del género *Buddleja* (Mahlke *et al.*, 2009). Por mencionar algunas, *Buddleja cordata* (Avila *et al.*, 1999), *B. globosa* (Pardo *et al.*, 1993), *B. parviflora* (Arciniegas *et al.*, 1997), *B. yunanesis* (Liao *et al.*, 1999), *B. scordioides* (Acevedo *et al.*, 2005), *B. davidii*, *B. americana*, *B. madascariensis*, *B. asiatica*, *B. purdomii*, *B. officinalis*, *B. brasiliensis*, *B. salviifolia* (referencias en He *et al.*, 2011; Alipieva *et al.*, 2014).

##### **2.2.1.1.1.1 *Buddleja cordata* Kunth, planta medicinal productora de verbascósido**

*Buddleja cordata* Kunth (Scrophulariaceae, antes Lamiaceae), en México comúnmente conocida como 'tepozán', es una especie dioica que dependiendo de las condiciones puede desarrollarse como un arbusto o como un árbol, midiendo de 1 a 20 m de altura. Su distribución es amplia en el territorio mexicano, desde los estados del norte, Sinaloa, Chihuahua y Durango, hasta los estados del sur, Oaxaca y Chiapas (Acevedo *et al.*, 2000; Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2006). Debido a su amplia distribución (crece en un amplio rango de hábitats, como bosques nubosos de abeto y pino-roble, valles de altura, matorrales desérticos con cactus y mezquite o con juníperos), y a su alta tolerancia ecológica (gracias a que sus semillas son fácilmente dispersadas por el viento coloniza con facilidad lugares abiertos tan heterogéneos como grietas, huecos entre las rocas, superficies planas, áreas de cultivo, entre



otros muchos puntos en zonas urbanas), la variación en los rasgos morfológicos, fisiológicos y genéticos de *B. cordata* es extremadamente elevada (Mendoza, 2003; Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2006).

#### **2.2.1.1.1.1 Usos e importancia para la población de México**

En la medicina tradicional mexicana se tienen registros sobre su empleo para diversas enfermedades. Sus hojas, corteza y raíces han sido muy empleadas en el tratamiento de heridas o enfermedades de la piel, infecciones gastrointestinales, trastornos del hígado y riñones, hemorragias nasales, reumatismo, calambres musculares y dolores de cabeza (Martínez, 1989; Acevedo *et al.*, 2000). Además, se le atribuye efecto antibiótico, analgésico, eupéptico, diurético y antiséptico. Como pesticida, el extracto acuoso de la planta es utilizado como repelente del gusano cogollero, contra algunas enfermedades de animales, forraje complementario de ganado ovino, caprino y vacuno y también para la restauración ecológica, ya que produce una gran cantidad de materia orgánica (Ortiz, 1996; Mendoza, 2003).

En el noreste de México, los indios tarahumaras de Chihuahua le llaman el árbol “matowi” o “wasala”. Este grupo étnico emplea las hojas, madera y corteza no solo para el tratamiento de enfermedades de la piel e inflamaciones, sino también como medicina ritual para el tratamiento de males como el miedo y la pérdida del alma (Acevedo *et al.*, 2000).

#### **2.2.1.1.1.2 Fitoquímica**

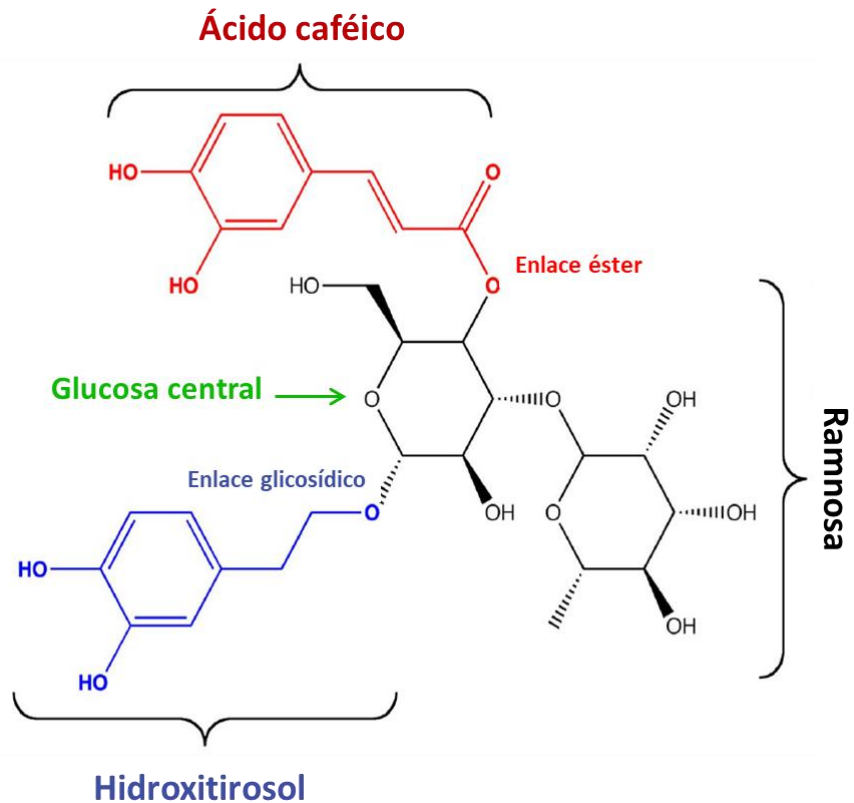
Trabajos previos referentes a las propiedades fitoquímicas de la especie han reportado la identificación de metabolitos pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos como flavonoides, fenilpropanoides y feniletanoide glicósidos; pero también otro tipo de compuestos como sesquiterpenos, iridoides y esteroides (Acevedo *et al.*, 2000). La mayor parte de estos grupos químicos han sido identificados también en otras especies pertenecientes al género *Buddleja* (Houghton y Mensah, 1999; Khan *et al.*, 2019).

Entre los componentes aislados e identificados en *B. cordata* se hallan los metabolitos secundarios del tipo fenilpropanoide, aislados principalmente de partes aéreas, como los ácidos hidroxicinámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico, el PhG verbascósido y el

flavonoide linarina (Houghton y Mensah, 1999; Houghton *et al.*, 2003). Las propiedades terapéuticas de la planta se han asociado principalmente con los compuestos del tipo fenilpropanoide, por presentar una o varias de las siguientes actividades: parasiticida, antimicrobiana, analgésica, antiviral, antiproliferativa o citotóxica, antihipertensiva, antioxidante, antipirética y antiinflamatoria (Houghton y Mensah, 1999; Acevedo *et al.*, 2000; Houghton *et al.*, 2003). También se han identificado metabolitos del tipo terpenoide, como el sesquiterpeno buddledina A, con actividad pesticida y antifúngica, o el iridoide aucubina, con actividad antibacterial y antioxidante (Houghton y Mensah, 1999; Houghton *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2019).

#### **2.2.1.1.2 Estructura**

La estructura del verbascósido ha sido dilucidada por técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (Ghisalberti, 1994; Saimaru y Orihara, 2010). Está compuesto por cuatro elementos: ácido caféico, glucosa, ramnosa e hidroxitirosol (**Figura 5**). El azúcar ramnosa se une al carbono C<sub>3</sub> de la glucosa central mediante un enlace glicosídico, la molécula de ácido caféico esterifica al C<sub>4</sub> de la misma, mientras que la molécula de hidroxitirosol forma un enlace glicosídico con el C<sub>1</sub> (Ghisalberti, 1994; Saimaru y Orihara, 2010).



**Figura 5.** Estructura química del metabolito verbascósido. Está compuesto por cuatro elementos: una molécula de glucosa como compuesto central a la cual se une una molécula de ramnosa; mediante un enlace éster se une una molécula de ácido caféico y una molécula de hidroxitirosol se une mediante un enlace glicosídico.

### 2.2.1.1.3 Actividades biológicas

Diversos estudios relacionados con las acciones biológicas y farmacológicas del verbascósido han demostrado que posee una gran cantidad de propiedades interesantes, por mencionar algunas es un potente inhibidor de la proteína cinasa C, tiene actividad antioxidante, antibiótica, antiviral, analgésica, antihipertensiva, antiinflamatoria, actividad hepatoprotectora, antinefrítica, citotóxica, además de propiedades protectoras contra padecimientos neurológicos como Alzheimer y Parkinson (referencias en: Ghisalberti, 1994; Duynstee *et al.*, 1999; Kawada *et al.*, 1999; He *et al.*, 2011; Alipieva *et al.*, 2014).

En 2005, Feng *et al.* demostraron que el verbascósido promueve la reparación de la piel y aminora la inflamación de esta, debido a su capacidad antioxidante (por eliminar especies reactivas de oxígeno), quelante de hierro y de inducción de la acción de las enzimas glutatión S-transferasas. Campo *et al.* (2012) reportaron que ejerce actividad inhibitoria en la

agregación de plaquetas humanas. Recientemente ha sido demostrado su efecto anti-obesidad (Wu *et al.*, 2014). En años más recientes se ha investigado mucho con el fin de esclarecer los mecanismos moleculares de acción del compuesto en las actividades antes reportadas, por ejemplo, su actividad anti-tumoral (efecto inhibidor de la proteína cinasa C, Cheimonidi *et al.*, 2018) o ante daños hepáticos (Cui *et al.*, 2018), pero también para dar soporte a la base sobre su potencial uso como agente terapéutico para el tratamiento contra diabetes (Morikawa *et al.*, 2014), neuropatías (Amin *et al.*, 2016), leishmaniasis (Maquiaveli *et al.*, 2016), neumonía (Zhao *et al.*, 2016), fatiga muscular (Zhu *et al.*, 2016), glioblastoma (Jia *et al.*, 2018; Hwang *et al.*, 2019), osteoartritis (Qiao *et al.*, 2019), esclerosis múltiple (Li *et al.*, 2020), además, su actividad fotoprotectora ante radiación ultravioleta ha sido recientemente reportada (Gómez-Hernández *et al.*, 2021). En algunos casos se le ha señalado como un pro-fármaco, ya que algunos estudios farmacocinéticos han señalado a los compuestos derivados de la hidrólisis del verbascósido (principalmente por la acción del microbioma intestinal) por ejemplo, hidroxitirosol, ácido caféico y ácido hidroxifenilpropiónico, como las moléculas responsables y/o complementarias de actividades biológicas relacionadas con la prevención del estrés oxidativo e inflamación, entre otras (Cui *et al.*, 2018 y referencias ahí).

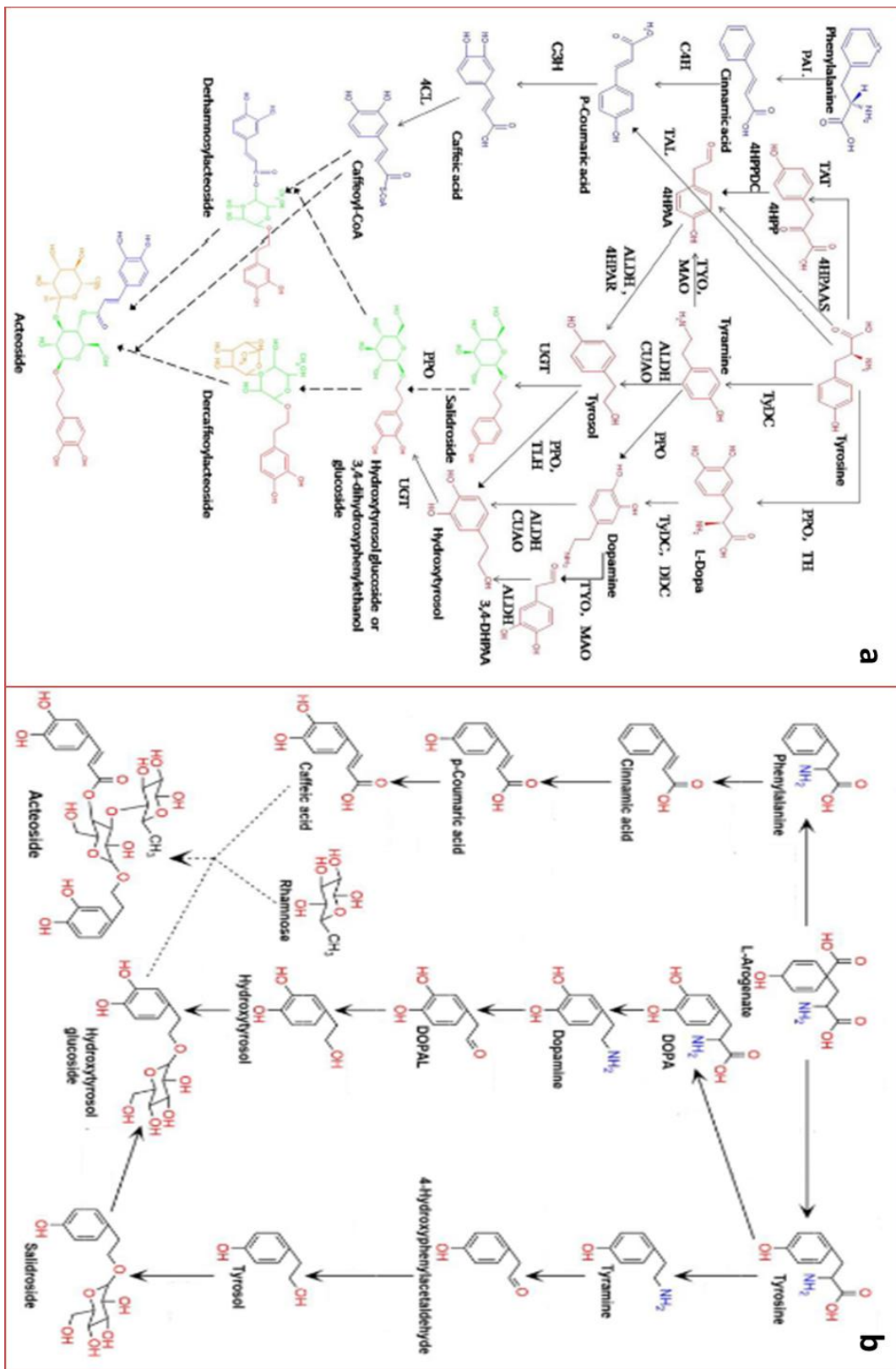
Por otro lado, ha sido reportada su aplicación en cosméticos, nutracéuticos y alimentos funcionales para el tratamiento de estrés oxidativo relacionado con muchos padecimientos humanos (Cardinali *et al.*, 2012). Por ello, en conjunto con sus múltiples actividades terapéuticas y sobre todo a la aparente inexistencia de efectos tóxicos en términos de fisiología celular (Cheimonidi *et al.*, 2018), el verbascósido se considera una molécula importante a nivel industrial.

#### **2.2.1.1.4 Síntesis y biosíntesis del verbascósido**

La síntesis química total del verbascósido fue reportada con un mes de diferencia primero en los Países Bajos (Duynstee *et al.*, 1999) y posteriormente en Japón (Kawada *et al.*, 1999).

La biosíntesis del compuesto es una historia inconclusa que inició hace tiempo, con trabajos que involucraron el uso de precursores radioactivos en *Syringa vulgaris* (Ellis, 1983), *Cynara acolymus* (Andary e Ibrahim, 1986), *Olea europea* (Saimaru y Orihara, 2010) y de inhibidores específicos en *Cistanche deserticola* (Hu *et al.*, 2011a), gracias a los cuales se demostró que la molécula de hidroxitirosol deriva de la tirosina mientras que el ácido caféico a partir de

fenilalanina, por la ruta general de los fenilpropanoides, siendo la vía del ácido shikímico el punto de partida (génesis de aminoácidos aromáticos) (**Figura 2**). Las enzimas/genes de los primeros pasos en la síntesis del compuesto se conocen como las implicadas en la ruta general de los fenilpropanoides, algunas de las cuales han sido ampliamente estudiadas como la fenilalanina amonio liasa (Alipieva *et al.*, 2014). En tiempos recientes, se han llevado a cabo muchos trabajos transcriptómicos enfocados en la identificación de genes/enzimas implicadas en la síntesis del compuesto o de compuestos relacionados (como el salidrósido, un fenólico derivado de la tirosina, Torrens-Spence *et al.*, 2018) con el objetivo final de dilucidar completamente la ruta biosintética del verbascósido (Zhou *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Las enzimas/genes y rutas propuestas hasta ahora, han sido resumidas por Zhou *et al.* (2020) (**Figura 6a**). Por otro lado, recientemente, Park *et al.* (2020) propusieron un modelo metabólico diferente, resultante del análisis genómico de *Abeliophyllum distichum* empleando el recurso bioinformático MetaPre-AI, en el cual a partir de secuencias genómicas identifica y compara con bases de datos de secuencias nucleotídicas, aminoacídicas y filogenéticas, presentando como resultado la reconstrucción *in silico* de una ruta biosintética, en su caso la del verbascósido (**Figura 6b**). En cualquier caso, a pesar de los avances sobre las principales rutas involucradas en la biosíntesis de verbascósido (por ejemplo, *a*) ruta general de los fenilpropanoides: de fenilalanina a ácido caféico (**Figura 2**); *b*) ruta del salidrósido: de tirosina a tiramina a tirosol (4-hidroxifeniletanol) a salidrósido; *c*) ruta del hidroxitirosol: de tirosina a DOPA a dopamina a hidroxitirosol) así como de la identidad de algunas enzimas involucradas (por ejemplo, PAL, C4H, además de las referidas por Park *et al.*, 2020 y Zhou *et al.*, 2020), aún hay detalles por esclarecer.



**Figura 6.** Propuestas de ruta de biosíntesis de verbascósido, **a)** Figura 1 en Zhou *et al.*, 2020 y **b)** Figura 2 en Park *et al.*, 2020.

### 2.2.1.1.5 Producción biotecnológica de verbascósido

Considerando el amplio rango de actividades biológicas reportadas en la literatura para este compuesto, desde hace tiempo existe un considerable interés en la producción de PhGs en general, y de verbascósido en particular. El primer reporte sobre la producción del verbascósido, y de hecho de cualquier PhG a partir de células vegetales, fue descrito por Ellis en 1983. A la fecha se encuentra disponible una gran cantidad de referencias sobre la producción biotecnológica de este metabolito, que además de producirse como compuesto principal, en algunos casos su producción está asociada al crecimiento como en especies de *Aphelandra* (Nezbedová *et al.*, 1999), *Eremophila* (Ellis, 1983), *Syringa* (Inagaki *et al.*, 1991), *Tecoma* (Antognoni *et al.*, 2012) y *Buddleja* (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009). Entre los sistemas *in vitro* reportados con éxito para la producción de verbascósido destacan:

- callos vegetales (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009);
- cultivo de células en suspensión (Ellis, 1983; Inagaki *et al.*, 1991; Szabo *et al.*, 1999; Antognoni *et al.*, 2012; Krzyzanowska *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2018b; Temporiti *et al.*, 2020);
- cultivo de embriones en suspensión (Shohael *et al.*, 2008);
- cultivo de raíces en suspensión (Lee *et al.*, 2015; Piatczak *et al.*, 2016).

En algunos casos, se ha reportado el incremento en la producción del compuesto mediante estrategias biotecnológicas, como:

- la manipulación de la composición nutricional y de los RCVs (Inagaki *et al.*, 1991; Wysokińska y Rózga 1998; Cheng *et al.*, 2005a; Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009);
- adición de elicitors de origen fúngico (Lu y Mei, 2003; Cheng *et al.*, 2005b y 2006);
- adición de ácido jasmónico y sus derivados como metil jasmonato (MeJa) (Nezbedová *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1999; Krzyzanowska *et al.*, 2012; Antognoni *et al.*, 2012; Shohael *et al.*, 2008; Piatczak *et al.*, 2016);
- adición de elicitors abióticos (elementos raros de la tierra) (Ouyang *et al.*, 2003);
- adición de precursores metabólicos como aminoácidos (Ouyang *et al.*, 2005a; Liu *et al.*, 2007a; Hu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018b).

Especialmente, la biosíntesis de fenilpropanoides se encuentra entre las actividades metabólicas que con mayor frecuencia es inducida tras el tratamiento de tejidos o células vegetales cultivadas con elicitors como el metil jasmonato, el cual se ha reportado que puede inducir la expresión de genes de respuesta al ataque de patógenos y heridas, incluyendo a

aquellos relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios protectores (Antognoni *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la elicitación con MeJa sobrerregula la actividad de la enzima PAL y de otras enzimas cruciales en la ruta general de los fenilpropanoides (**Figura 2**) (Krzyanowska *et al.*, 2012).

Por otro lado, los metabolitos secundarios que son sintetizados por las rutas del shikimato y por la ruta general de los fenilpropanoides (**Figura 2**) producen una serie de compuestos intermediarios, incluyendo la L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano, ácido cinámico y sus derivados, ácidos hidroxicinámicos, los cuales han sido empleados como precursores con éxito en la síntesis de PeGs, así como en la síntesis de otros compuestos (Ouyang *et al.*, 2005a; Liu *et al.*, 2007a y b).

Estrada-Zúñiga *et al.* (2009) establecieron cultivos celulares de *B. cordata* productores de los fenilpropanoides verbascósido, linarina y ácidos hidroxicinámicos (ácidos cumárico, caféico, ferúlico y sinápico). La inducción más alta de callo (76.4-84.3%) fue obtenida en cinco tratamientos con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D: 0.45-9.05  $\mu$ M) en combinación con cinetina (KIN: 2.32, 4.65  $\mu$ M). El verbascósido fue el principal fenilpropanoide producido en los cultivos *in vitro* (callo verde y callo blanco) (66.24-86.26 mg/g peso seco [PS]), mientras que la producción de linarina y de los ácidos hidroxicinámicos fue baja (0.95-3.01 mg/g PS). La línea de callo blanco, que presentó mayor acumulación de fenilpropanoides que la de callo verde, fue establecida como sistema en suspensión. La producción de verbascósido y linarina fueron mejoradas en cultivos de células en suspensión (116 mg/g PS y 8.12 mg/g PS, respectivamente). Los autores propusieron que, con base en trabajos previos, sería posible obtener mayores concentraciones de verbascósido probando estrategias biotecnológicas, lo cual además puede contribuir al control y dilucidación de su ruta biosintética.



### III. JUSTIFICACIÓN

Las plantas sintetizan una amplia gama de metabolitos especializados, frecuentemente con estructuras complejas y diversas. *In planta*, estos compuestos significan una ventaja ante condiciones biológicas y/o ambientales adversas; por otro lado, muchos de estos compuestos son importantes para el desarrollo humano, siendo una fuente de nutrientes y debido a sus importantes actividades biológicas (por ejemplo, como base para muchos medicamentos) (Oksman-Caldentey e Inze, 2004; Kolewe *et al.*, 2008; Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016; Kessler y Kalske, 2018; Marchev *et al.*, 2020). Debido a que la síntesis química de la gran mayoría de dichos compuestos no es económicamente factible, en la actualidad son extraídos directamente de plantas silvestres o cultivadas, poniendo en riesgo su disponibilidad y prevalencia (Kolewe *et al.*, 2008; Atanasov *et al.*, 2015; Marchev *et al.*, 2020). Alternativamente, el cultivo de células vegetales *in vitro* ha demostrado ser una alternativa útil para la producción biotecnológica de algunos metabolitos de interés. No obstante, a la fecha ha tenido un éxito comercial limitado, debido sobre todo a la falta de conocimiento referente a los procesos biosintéticos completos de dichos metabolitos (Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016; Marchev *et al.*, 2020).

El verbascósido es un metabolito secundario con una amplia variedad de funciones biológicas reportadas y cuya síntesis química completa no resulta costeable. Como parte de la solución a la gran demanda del compuesto, previamente se han establecido cultivos *in vitro* de callo y de células en suspensión de *Buddleja cordata* productoras del compuesto; sin embargo, las concentraciones obtenidas no son suficientes para satisfacer las necesidades farmacológicas e industriales de dicho producto. Por lo anterior, en este trabajo se plantea como primera estrategia, incrementar la producción del compuesto en cultivos de células en suspensión de *B. cordata* mediante **a)** elicitación con metil jasmonato, **b)** alimentación de los cultivos con L-fenilalanina como precursor y **c)** mediante la acción combinada de metil jasmonato y L-fenilalanina. Como segunda estrategia, se plantea determinar algunas de las enzimas clave implicadas en la ruta biosintética del verbascósido mediante el uso de inhibidores, para posteriormente clonar y silenciar una de dichas enzimas y poder evaluar su efecto sobre la producción del metabolito. Finalmente, se contempla analizar y comparar los perfiles metabólicos generados por los cultivos tratados con metil jasmonato, L-fenilalanina e inhibidores.

En su totalidad, esta propuesta deberá generar una mayor comprensión de la biosíntesis del verbascósido, así como de otros compuestos relacionados y, en caso posible, este conocimiento podría permitir incrementar su producción en cultivos celulares en suspensión de *B. cordata*.

#### IV. HIPÓTESIS

- ⊙ Emplear estrategias biotecnológicas relacionadas con el incremento en la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares *in vitro* por ejemplo, la adición metil jasmonato, fenilalanina y/o su combinación, aumentará el rendimiento en la producción del compuesto verbascósido en cultivos de células en suspensión de *B. cordata*.
- ⊙ Emplear estrategias de tipo químico (inhibidores enzimáticos) y molecular (clonación de genes de interés) permitirá dilucidar algunas enzimas involucradas en la biosíntesis del metabolito secundario verbascósido.
- ⊙ El estudio del papel del gen *pal* permitirá optimizar la producción de verbascósido en cultivos de células en suspensión de *B. cordata*.
- ⊙ El análisis comparativo de los perfiles metabólicos generados por los cultivos celulares tratados con metil jasmonato, L-fenilalanina e inhibidores permitirá profundizar el conocimiento sobre la naturaleza química de otros metabolitos producidos por células en suspensión de *B. cordata*.

## V. OBJETIVOS

### Objetivo general

- ⊙ Aumentar la producción del metabolito secundario verbascósido en cultivos de células en suspensión de *B. cordata* mediante estrategias biotecnológicas y determinar algunas enzimas clave involucradas en la biosíntesis del compuesto.
- ⊙ Profundizar el conocimiento sobre la naturaleza química de otros metabolitos producidos por células en suspensión de *B. cordata*.

### Objetivos particulares

1. Restablecimiento de la línea celular de *B. cordata* como sistema en suspensión
2. Incrementar la producción de verbascósido en cultivos de células en suspensión de *B. cordata* mediante:
  - ✓ Elicitación con metil jasmonato (MeJa)
  - ✓ Alimentación con L-fenilalanina (L-Phe) como precursor
  - ✓ Combinación de L-fenilalanina y metil jasmonato
3. Dilucidar las vías mediante las cuales se obtienen los residuos de ácido caféico e hidroxitirosol del verbascósido en *B. cordata* mediante inhibidores enzimáticos:
  - ✓ Ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, inhibidor de la enzima fenilalanina amonio liasa [PAL, EC 4.3.1.24])
  - ✓ Metil tirosina (AMPT, inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa, EC 1.14.16.1)
  - ✓ Benserazida (inhibidor de la enzima DOPA decarboxilasa, EC 4.1.1.28)
4. Clonación del gen *pal* (*Bcpal1*) de *B. cordata* y comprobación del gen y su producto con las bases de datos.
5. Transformación de *B. cordata* con el gen *Bcpal1*:
  - ✓ Silenciamiento del gen *Bcpal1*
6. Análisis de perfiles metabólicos putativos de células en suspensión de *B. cordata*

## VI. MATERIALES

### 6.1 Material vegetal

El cultivo celular de *B. cordata* fue proporcionado por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Ha sido mantenido en medio de inducción (*ver Anexo*), de acuerdo con Estrada-Zúñiga *et al.* (2009): medio basal MS al 50% (*ver Anexo*), suplementado con 2,4-D 0.45  $\mu\text{M}$  y KIN 2.32  $\mu\text{M}$ ; 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel como gelificante, además de 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico y 150 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico como antioxidantes. El pH del medio fue ajustado a 5.8 con NaOH y HCl 1 N antes de ser esterilizado en autoclave a 121°C durante 18 min. Los cultivos fueron incubados a 26  $\pm$  2°C con un fotoperiodo de 16 h de luz, usando lámparas fluorescentes de luz blanca con una intensidad de 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$ .

### 6.2 Cepas microbianas

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$** . Es una cepa no patógena ampliamente usada para la manipulación de ADN. Es altamente transformable (hasta 5  $\times$  10<sup>8</sup> transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN) y permite la selección por  $\alpha$ -complementación (Rodríguez-Quiñones y Benedí, 1993). Su genotipo es F- $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17 (rK-, mK+) deoR thi1 phoA supE44  $\lambda$ -gyrA96 relA1 (Al-Allaf *et al.*, 2013).

### 6.3 Vectores de clonación

**pGEM-T easy vector system I** (Promega, Madison, WI, EUA), es un vector linealizado con una timidina única en ambos extremos 3'. Las T's salientes en el sitio de inserción incrementan en gran medida la ligación de los productos de PCR, previniendo la recircularización del vector y proveyendo un nucleótido cohesivo complementario para los productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables (por ejemplo, *Taq* polimerasas). Las reacciones de ligación y de transformación fueron llevadas a cabo siguiendo los protocolos recomendados por el proveedor ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

## VII. MÉTODOS

### 7.1 Cultivos celulares en suspensión de *B. cordata*

#### 7.1.1 Establecimiento de cultivos en suspensión

Se iniciaron los cultivos en suspensión a partir de la línea proporcionada mediante la transferencia de 3 g de callo (peso fresco, **PF**) dentro de una campana de flujo horizontal a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de inducción previamente estériles. Posteriormente, los cultivos fueron colocados en un agitador orbital a 110 rpm (Modelo: AGO 31-31, Grupo SEV-PRENDO S.A. de C.V., México) e incubados a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 h de luz, usando lámparas fluorescentes de luz blanca con una intensidad de  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Con la finalidad de propagar la biomasa y llevar a cabo subsecuentes experimentos, se llevaron a cabo subcultivos cada 18 días.

#### 7.1.2 Cinéticas de crecimiento

Tras varios ciclos de subcultivo, una vez que se observaron cultivos homogéneos y con características similares a la línea a partir de la cual fueron restablecidos, se infirió su estabilidad mediante la estimación de varios parámetros de crecimiento: tiempo de duplicación (**td**), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) e índice de crecimiento (**IC**) durante tres ciclos continuos de subcultivo (Bourgand y col., 2001).

Se efectuaron mediciones de peso fresco y peso seco (**PS**) en 15 intervalos distribuidos a lo largo de 30 días de cultivo. Las mediciones efectuadas en cada intervalo fueron obtenidas por triplicado (n=3). Los cálculos se llevaron a cabo de acuerdo con Godoy-Hernández y Vázquez-Flota (2012).

El índice de crecimiento (**IC**) es una estimación relativa de la capacidad de crecimiento de una línea celular, provee información sobre la biomasa inicial y la biomasa ganada, siendo esta última la diferencia entre la biomasa final ( $X_F$ ) y la biomasa inicial ( $X_0$ ):

$$IC = \frac{X_F - X_0}{X_0}$$

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se define como el aumento en el crecimiento de la biomasa de una población celular por unidad de concentración de biomasa. Se calcula durante la fase exponencial de crecimiento, cuando el crecimiento en la población celular se ajusta a la siguiente ecuación lineal:

$$\ln X = \mu t + \ln X_0$$

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

donde  $X_0$  es la biomasa inicial y  $X$  es la biomasa en el tiempo  $t$ .

**El tiempo de duplicación ( $t_d$ ) se refiere al tiempo necesario para que ocurra la duplicación de la biomasa en una población celular:**

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

**en donde  $\mu$  representa la velocidad específica de crecimiento.**

## **7.2 Incremento en la producción de verbascósido**

Con la finalidad de incrementar la producción de verbascósido (así como mayores cantidades de ARN mensajero), se probaron dos estrategias biotecnológicas de cultivo de tejidos vegetales en cultivos en suspensión de *B. cordata*:

- a)** alimentación de los cultivos con L-fenilalanina (L-Phe) como precursor,
- b)** elicitación con metil jasmonato (MeJa).

Los compuestos fueron adicionados a cultivos celulares de *B. cordata* preparados en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de inducción en dos momentos: **i)** en la etapa temprana de la fase exponencial y **ii)** durante la etapa tardía de la fase exponencial. Los cultivos fueron colocados en un agitador orbital a 110 rpm e incubados a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  con un

fotoperiodo de 16 h de luz, usando lámparas fluorescentes de luz blanca con una intensidad de  $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$ .

### **7.2.1 Alimentación de los cultivos con L-fenilalanina como precursor**

Soluciones stock de L-Phe (Sigma-Aldrich Co., USA) (20.2, 40.4, 60.6 mM) fueron preparadas con agua Milli-Q (18.2 M $\Omega$ .cm) y posteriormente esterilizadas mediante filtración con membrana (Millipore, Nylon 0.22  $\mu\text{m}$ ). Para evaluar los efectos de diferentes concentraciones de L-Phe (0, 200, 400 y 600  $\mu\text{M}$ ); 0.5 mL de cada solución stock fueron adicionados individualmente a cultivos celulares de *B. cordata*. Después de adicionar el precursor, la biomasa proveniente de dos matraces diferentes fue colectada en intervalos de 2-días durante 19 días de cultivo. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se efectuaron mediciones de PF y PS en cada muestra, además de evaluarse la producción de verbascósido mediante HPLC. El tratamiento 0.0  $\mu\text{M}$  L-Phe (sólo agua) sirvió como control.

### **7.2.2 Elicitación con metil jasmonato**

Soluciones stock con concentraciones de 5.05, 10.1, 20.2, 50.5 mM fueron preparadas mediante la disolución de MeJa (Sigma-Aldrich Co., USA) en etanol absoluto y esterilizadas mediante filtración con membrana (Millipore, Nylon 0.22  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente, 0.5 mL de cada solución stock fueron añadidos de forma individual a cultivos celulares de *B. cordata* para evaluar el efecto de diferentes concentraciones finales de MeJa (0, 50, 100, 200 y 500  $\mu\text{M}$ ). En cada caso, muestras de biomasa (n=2) fueron colectadas a las 0, 12, 24 y 48 h después de la elicitación. Se efectuaron mediciones de de PF y PS en cada muestra, además de evaluarse la producción de verbascósido mediante HPLC. El tratamiento 0.0  $\mu\text{M}$  MeJa (sólo etanol) sirvió como control. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### **7.2.3 Efecto combinado de L-fenilalanina y metil jasmonato**

Una vez que se determinaron las condiciones más favorables para aumentar la producción de verbascósido con **a)** L-Phe como precursor y **b)** elicitación con MeJa, se determinó el efecto de la combinación de estas, sobre la producción de verbascósido y biomasa. Por tanto, se



llevaron a cabo dos experimentos independientes: **i)** L-Phe 600  $\mu\text{M}$  y MeJa 50  $\mu\text{M}$  fueron adicionados durante la etapa tardía de la fase exponencial y **ii)** L-Phe 600  $\mu\text{M}$  fue adicionado durante la etapa tardía de la fase exponencial y una vez que los cultivos llegaron al día 19 de cultivo, MeJa (50  $\mu\text{M}$ ) fue adicionado. En cualquier caso, la biomasa y la producción de verbascósido se evaluaron 24 y 48 h después de que ambos compuestos fueron adicionados a los cultivos celulares de *B. cordata*.

### **7.3 Dilucidación de enzimas involucradas en la síntesis de verbascósido mediante el uso de inhibidores**

#### **7.3.1 Ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, inhibidor de la enzima fenilalanina amonio liasa [PAL, EC 4.3.1.24])**

*El inhibidor AIP fue diluido con agua Milli-Q para ser aplicado en concentraciones finales de 10, 40 y 100  $\mu\text{M}$ . Las diluciones fueron esterilizadas mediante filtración con membrana (Millex-GP 0.22  $\mu\text{m}$ ). El inhibidor (0.5 mL) fue incorporado al medio de cultivo al momento de la inoculación ( $t_0$ ); posteriormente, la biomasa proveniente de dos matraces diferentes fue colectada en intervalos de 2-días durante 14 días de cultivo. Se colectó una muestra adicional a los 21 días de cultivo ( $t_{21}$ ). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. El tratamiento 0.0  $\mu\text{M}$  AIP (sólo agua) sirvió como control. El inhibidor fue sintetizado en el Laboratorio del Dr. Eduardo González Zamora, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.*

#### **7.3.2 Metil tirosina (AMPT, Sigma-Aldrich Co., USA, un inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa, EC 1.14.16.1).**

#### **7.3.3. Benserazida (Sigma-Aldrich Co., USA, inhibidor de la enzima DOPA decarboxilasa, EC 4.1.1.28).**

Siguiendo la metodología descrita por Saimaru y Orihara (2010), después de dos semanas de cultivo en suspensión ( $t_{15}$ ), se añadieron al medio de cultivo los dos inhibidores, de forma independiente, en una concentración final de 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mM de AMPT y de 0.0, 0.5, 2.0 y 3.0 mM de benserazida. Los compuestos fueron previamente esterilizados mediante filtración con membrana (Millex-GP 0.22  $\mu\text{m}$ ). Después de administrar los inhibidores (0.5 mL), los cultivos fueron incubados durante dos semanas adicionales, luego de las cuales, las células

fueron colectadas y preparadas para su análisis. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Un tratamiento al cual únicamente se le añadió agua (0.0 mM de inhibidor), sirvió como control.

#### **7.4 Procedimientos analíticos**

##### **7.4.1 Extracción de fenilpropanoides y preparación de estándares**

Las muestras colectadas en cada experimento (peso fresco, 2 g) fueron deshidratadas dentro de una estufa a 50-55°C durante dos días. Muestras deshidratadas (0.02 g PS) fueron extraídas con metanol en ebullición (10 mL) durante 1 h, posteriormente filtradas y aforadas a 10 mL. Se prepararon soluciones stock de los estándares (0.2 mg mL<sup>-1</sup>) de los ácidos hidroxicinámicos: ácido caféico, p-cumárico, trans-cinámico, ferúlico y sinápico (Sigma-Aldrich Co., USA). Igualmente, de verbascósido (Extrasynthese, Francia) y linarina (Extrasynthese, Francia). A fin de obtener curvas de calibración, se llevaron a cabo diluciones de cada solución stock (30, 20, 17, 15, 7, 3, 0.4 µg mL<sup>-1</sup>) empleando metanol como solvente. A cada muestra, así como a cada dilución empleada para construir las curvas, se le adicionó quercetina (5 µg mL<sup>-1</sup>) como estándar interno.

##### **7.4.2 Cuantificación de metabolitos por HPLC**

Las condiciones del HPLC fueron llevadas a cabo de acuerdo con Estrada-Zúñiga *et al.* (2009), con algunas modificaciones: fase móvil compuesta de una solución de ácido acético al 2% (v/v) (solvente A) y acetonitrilo (solvente B), un volumen de inyección de 20 µL, un flujo de 1.0 mL min<sup>-1</sup> y una longitud de onda de 330 nm para su detección con MWD (detector de longitud de onda múltiple (por sus siglas en inglés Multiple Wavelength Detector)). Se utilizó como gradiente: 20 min, 100-75% A; 3 min 75-25%, 5 min 75-0% A, 5 min 1-100% y finalmente 2 min de post-corrida. La temperatura de la columna y del horno fue mantenida a 40°C. Para la detección, identificación y cuantificación de cada fenilpropanoide en las muestras se construyeron curvas *de calibración a partir de las áreas de los picos correspondientes a los tiempos de retención (TR) de los estándares. Cada muestra fue inyectada tres veces. El programa OpenLAB (versión A.01.05 Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) fue empleado para analizar los datos cromatográficos.*

### 7.4.3 Velocidad específica de producción y productividad

La velocidad específica de producción (**qp**) se calculó de acuerdo con Godoy-Hernández y Vázquez-Flota (2012). Este parámetro estima la producción de un metabolito en una población celular por unidad de concentración de producto. Cuando la producción está asociada al crecimiento, **qp** se calcula durante la fase de crecimiento. Al igual que en el caso de la velocidad específica de crecimiento, la producción se ajusta a una ecuación lineal:

$$\ln P = \mu t + \ln P_0$$

$$\mu = \frac{\ln p - \ln p_0}{t}$$

en donde  $P_0$  es el producto inicial y  $P$  es el producto en el tiempo  $t$ .

La productividad se calculó de acuerdo con Scragg (1995). La productividad en una población celular ( $g$  de producto  $L^{-1}$  de cultivo por  $día^{-1}$ ) es el resultado de la suma de su velocidad de crecimiento, rendimiento (acumulación de producto) y acumulación de biomasa.

### 7.4.4 Análisis estadístico

Todos los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una variable (ANOVA), la comparación de medias se realizó usando la prueba de Tukey-Kramer con un 5% de nivel de probabilidad para todos los experimentos. Los análisis se llevaron a cabo con el software estadístico NCSS v.12 (Wireframe Graphics, Kaysville, UT, USA) (Hintze, 2001).

### 7.5 Análisis metabolómico

Una vez determinadas las condiciones óptimas para, por un lado, aumentar la producción de verbascósido mediante la adición de **a)** L-fenilalanina y **b)** metil jasmonato y, por otro lado, las condiciones para interrumpir químicamente la producción de verbascósido, esto es mediante **c)** benserazida (inhibidor de la enzima DOPA decarboxilasa, EC 4.1.1.28) y **d)** ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, inhibidor de la enzima fenilalanina amonio liasa [PAL, EC

4.3.1.24]], se realizó el siguiente experimento. Muestras celulares de las cuatro condiciones, cada una con su respectivo control, fueron colectadas (*aproximadamente 2 g PF*) y deshidratadas dentro de una estufa a 50-55°C durante dos días. El proceso se llevó a cabo bajo condiciones estériles, con la finalidad de no contaminar las muestras. Posteriormente, las muestras fueron colectadas en tubos Eppendorf de 2 mL estériles (*aproximadamente 0.2 g PS*). Las muestras fueron enviadas para extracción y análisis de compuestos de naturaleza polifenólica/lípidos complejos mediante CSH-QTOF MS (West Coast Metabolomics Center, UC Davis, CA, EUA).

## **7.5.1 Análisis de perfiles metabólicos**

### **7.5.1.1 Extracción de metabolitos**

De acuerdo con las especificaciones de la compañía, brevemente,  $30 \pm 2$  mg (PS) de muestra fueron colocados en tubos tipo Eppendorf de 2.0 mL, posteriormente, se adicionó 1 mL de metanol frío/agua 80:20 (v/v). Los tubos fueron colocados en vórtex brevemente (~10 s), luego, las muestras fueron homogenizadas dos veces en un equipo Geno Grinder 1500 durante 30 segundos. A continuación, los tubos fueron centrifugados en una microfuga durante 3 min a 14, 000 rpm. Una alícuota de 550  $\mu$ L fue colocada dentro de tubos de análisis y desecados en un concentrador al vacío Centrivap.

### **7.5.1.2 Espectrometría de masas**

#### **7.5.1.2.1 Instrumento y condiciones analíticas**

La detección de masas se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado con una bomba binaria G4220A, un automuestreador G4226A, acoplado a un detector híbrido cuadrupolo/tiempo de vuelo (LC/MS Q-TOF) G6530A, con fuente de ionización electrospray ESI.

La fase móvil consistió de una solución de acetonitrilo 60% (v/v) (solvente A) e isopropanol (solvente B), un volumen de inyección de 3.0  $\mu$ L, un flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. El gradiente empleado para la fase móvil se muestra en el Anexo, Figura 1.

#### 7.5.1.2.2 Adquisición y análisis de datos

Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el programa MassHunter Qualitative Analysis software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Los datos obtenidos fueron analizados empleando MS-Dial (Tsugawa *et al.*, 2015). Primero, los archivos con extensión '.D' fueron convertidos a '.MZML' usando el convertidor Abf (<https://www.reifycs.com/AbfConverter/>). Para el procesamiento de datos, se emplearon los parámetros por default del programa MS-Dial (ver **Anexo, Figuras 2-7**), excepto para la detección de picos, que fue ajustada para cada muestra. Posteriormente, con base en la altura relativa máxima a la altura promedio de los blancos se llevó a cabo la reducción de blancos. Después, mediante MS-FLO (<http://msflo.fiehnlab.ucdavis.edu/#/>), se verificó la presencia de los duplicados potenciales e isotopos, los cuales fueron eliminados en caso de confirmación. Finalmente, los espectros MS/MS fueron analizados antes de combinar los aductos.

Se llevó a cabo un primer análisis de datos en Excel, posteriormente, los metabolitos presentes en más del 50% de las muestras se analizaron con MetaboAnalyst5.0 ([www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca), Xia *et al.*, 2009). También, en la misma plataforma se llevó a cabo el enriquecimiento de datos para proceder al análisis funcional de metabolitos por comparación de masas con compuestos de *Arabidopsis thaliana* en la plataforma Kegg (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html/ath>), PubChem de NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) y HDBM (The Human Metabolome Database, <https://hmdb.ca/>) y entonces generar los perfiles metabólicos putativos de células en suspensión de *B. cordata*.

### 7.6 Dilucidación de enzimas involucradas en la síntesis de verbascósido mediante procedimientos moleculares

#### 7.6.1 Extracción de ADN genómico (ADNg)

La extracción de ADNg se llevó a cabo de acuerdo con Genis (1992), con algunas modificaciones. Brevemente, la biomasa proveniente de cultivos elicitados con MeJa (50  $\mu$ M) adicionada en el  $t_9$  de cultivo con un tiempo de exposición de 48 h (aproximadamente 100 mg [PF] previamente macerada en mortero con N<sub>2</sub> líquido), fue resuspendida con 500  $\mu$ L de

buffer de lisis (*ver Anexo*) y homogeneizada en vortex. Posteriormente, se adicionaron 150  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 a cada uno de los tubos y se mezcló por inversión suave de 4 a 6 veces. Con el propósito de favorecer la precipitación de carbohidratos y proteínas contaminantes, los tubos se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos tras los cuales fueron centrifugados en una microfuga a 14,000 rpm durante 6 min.

El sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y se añadió un volumen igual de isopropanol ( $\sim 600 \mu\text{L}$ ), se mezcló suavemente por inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Después, los tubos fueron centrifugados en una microfuga a 14,000 rpm durante 2 min, el sobrenadante fue descartado y el botón se lavó con 1 mL de etanol al 70% (v/v), y posteriormente con 1 mL de etanol absoluto. El exceso de etanol dentro del tubo se retiró con ayuda de una pipeta Pasteur y se dejó secar totalmente dentro de una campana de extracción.

Finalmente, el botón fue resuspendido con 50  $\mu$ L de agua Milli-Q estéril. El ADNg fue lavado y purificado mediante intercambio iónico empleando columnas con membrana de sílice del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA), de acuerdo con las instrucciones del proveedor ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

Con el fin de verificar la integridad del ADNg obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (p/v). Las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **7.6.2 Extracción de ARN mensajero (ARNm)**

La biomasa de un cultivo celular de *B. cordata* (biomasa proveniente de cultivos elicitados con MeJa (50  $\mu\text{M}$ ) adicionada en el  $t_9$  de cultivo con un tiempo de exposición de 48 h) fue transferida a tubos estériles tipo Falcon de 15 mL y centrifugada a 4000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y la biomasa fue congelada y macerada con  $\text{N}_2$  líquido en un mortero previamente estéril y frío. Se colocó

aproximadamente 100 mg de macerado dentro de tubos tipo Eppendorf de 2 mL previamente congelados con N<sub>2</sub> líquido. Los tubos fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

La biomasa de cada tubo fue resuspendida con 1 mL de Trizol (*Ambion*, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y posteriormente homogeneizada vigorosamente en vórtex. La mezcla se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente, transcurridos los cuales se agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló vigorosamente en vórtex. Los tubos se mantuvieron en reposo durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó en una microfuga a 4°C y 12,000 rpm durante 15 min. La fase acuosa fue recuperada en tubos nuevos (~600 µL) a partir de la cual el ARN fue precipitado mediante la adición de 0.5 volúmenes de etanol absoluto frío mezclando inmediatamente por inversión.

Después el ARNm fue lavado y purificado mediante intercambio iónico empleando columnas con membrana de sílice del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor ([www.promega.com](http://www.promega.com)). Brevemente, la mezcla (~650 µL) fue transferida a una columna de sílice (previamente colocada dentro de un tubo adaptador), se centrifugó en una microfuga a 10,000 rpm durante 15 s. Posteriormente, la membrana fue lavada con 500 µL de solución de lavado de membrana, se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min. Después, la columna fue transferida a un tubo tipo Eppendorf nuevo (1.5 mL), el RNA fue eluido con 30 µL de agua libre de RNAsas (Milli-Q/DEPC) la cual fue adicionada poco a poco dentro de la columna tratando de humectar la mayor superficie posible de la membrana; se mantuvo durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 min a 10,000 rpm. Se llevó a cabo una segunda elución.

Con el fin de verificar la integridad del ARN obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (p/v). Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

### **7.6.3 Obtención de ADN complementario (ADNc)**

La amplificación en este caso se consigue mediante PCR tras transcripción reversa (RT-PCR), dos reacciones que tienen lugar en un mismo tubo: en primera instancia se da la transcripción

reversa y a continuación la amplificación por PCR. Comúnmente se le denomina reacción 'one-step'. Para tal acción se empleó el kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, EUA) siguiendo las especificaciones del proveedor ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

#### 7.6.4 Clonación del gen *PAL* de *Buddleja cordata* (*BcPAL*)

Se realizó una búsqueda de secuencias de nucleótidos del gen *pal*, así como de secuencias de aminoácidos de la proteína PAL de especies cercanas a *Buddleja cordata* en la base de datos GenBank del servidor NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en este caso de especies pertenecientes al orden Lamiales. Posteriormente, tanto las secuencias nucleotídicas como aminoacídicas fueron alineadas individualmente con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Con base en sitios conservados fueron diseñados los siguientes primers degenerados para la amplificación de un fragmento del gen *pal* mediante una PCR anidada:

Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')
PALBCFD+ (F1)	GCN WSN GGN GAY YTN GTN CCN YTN WSN TAY
PALBCFD (F2)	GCN WSN GGN GAT CTN GTK CCN CTN WSN TAY
PALBCRD+1 (R1)	RTA NCK RTC YTG YTT NGG YTT YTG NAR NGG RTC
PALBCRD1 (R2)	RTA NCK ATC YTG YTT NGG YTT YTG NAG NGG ATC
PALBCRD+ (R3)	RTG RTG YTT NAR YTT RTG NGT NAR RTG RTC
PALBCRD (R4)	RTG RTG YTT NAG YTT RTG NGT NAG RTG ATC

El producto de la amplificación de un primer fragmento del gen *BcPAL* fue purificado con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA), ligado al vector pGEM y clonado en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los plásmidos de células exitosamente transformadas (verificado mediante PCR de colonia) fueron purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR



Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) enviados a secuenciación (Macrogen, Corea, [www.dna.macrogen.com](http://www.dna.macrogen.com)). Con base en la secuencia resultante se diseñaron los siguientes primers:

<b>Nombre del primer</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>
PAL-F1up	5'- MGG ATG GTG GAG GAG TTC AGG AAG -3'
PAL-R1dw	5'- CTA GCA GAT AGG NAG AGG WTC ACC ATT CC -3'
PAL-F2nes	5'- TCA AGG CYA GCA GYG AYT GGG TTA TGG A -3'
PAL-R2nes	5'- VAC YTG CCT CAG YTT CTG CAT CAA NGG GTA G -3'

Los cuales fueron empleados para amplificar las regiones 5' y 3' del gen *BcPAL* usando como molde ADNc y el kit RACE (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EUA), siguiendo las instrucciones del proveedor ([www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)).

Además de los primers:

<b>Nombre del primer</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>
GSP1	5'- TTT ATG TGT GAA GTG ATC CGT G -3'
GSP2	5'- GGC TTT CCG TTC ATA ACT TCA GCG A -3'
GSP3	5'- AAA GCC GTT GGT CCG AA -3'
GSP4	5'- GGG AAT CCC TTA GCG CCG A -3'

Los cuales fueron empleados para amplificar las regiones 5' y 3' del gen *BcPAL* usando como molde ADNg y el kit Universal Genome Walker 2.0 (Clontech, Takara Bio, EUA) siguiendo las instrucciones del proveedor ([www.takarabio.com](http://www.takarabio.com)).

Los fragmentos amplificados obtenidos usando tanto ADNc como ADNg, fueron purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA), ligados al vector pGEM y clonados en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los plásmidos de células exitosamente transformadas fueron purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) y enviados a secuenciación (Macrogen, Corea, [www.dna.macrogen.com](http://www.dna.macrogen.com)).

### **7.6.5 Clonación de los productos de PCR en el vector pGEM y transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$**

Se llevó a cabo la ligación de cada uno de los productos de PCR purificados en el vector linealizado pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, EUA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente, los vectores ligados fueron empleados para transformar células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Esta cepa fue utilizada para la amplificación de todas las construcciones plasmídicas. Su crecimiento se llevó a cabo en medio líquido y sólido Luria Bertani (*ver Anexo*) a 37°C durante 16 h. Cuando se propagaron colonias transformantes resistentes a algún antibiótico, los medios fueron suplementados con el antibiótico correspondiente. Para conservarlas, las diferentes cepas provenientes de colonias transformadas se almacenaron en glicerol al 40% (v/v) a -20°C.

### **7.6.6 TENS-Mini Prep**

La obtención de plásmidos (mini preps) se logró siguiendo la metodología descrita por Zhou *et al.* (1990): se seleccionó una colonia bacteriana proveniente de una placa de agar LB con ampicilina con 12-16 h de crecimiento y se dejó crecer en una placa nueva a 37°C toda la noche. Se tomó un botón celular con un palillo y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua estéril. Posteriormente se adicionaron 300  $\mu$ L de Buffer TENS (*ver Anexo*) con los cuales el botón fue perfectamente resuspendido en vórtex durante 2-5 s. Se adicionaron 100  $\mu$ L de acetato de sodio 3.0 M, pH 5.2, y se resuspendió en vórtex durante 2-5 s. La mezcla fue centrifugada en una microfuga a 14000 rpm durante 2 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionaron 900  $\mu$ L de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión, después la mezcla fue centrifugada durante 2 min, el sobrenadante fue retirado. El botón se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% (v/v), se centrifugó durante 2 min y el sobrenadante fue retirado. En seguida se dejó secar dentro de una estufa a 65°C durante 10 min, entonces el botón fue resuspendido con 100  $\mu$ L de agua Milli-Q estéril. Finalmente, 10  $\mu$ L de la muestra fueron analizados en un gel de agarosa al 1% (p/v).

### 7.6.7 Análisis de secuencias amplificadas

La secuencia de aminoácidos de la proteína fenilalanina amonio liasa de *B. cordata* 'BcPAL' fue deducida y analizada con la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Se llevó a cabo un análisis BLAST en el servidor NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los alineamientos múltiples se realizaron con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La predicción de la estructura secundaria de la proteína fue obtenida con SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)). El modelado estructural 3D de la proteína se realizó con Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Studer *et al.*, 2020).

## 7.7 Silenciamiento del gen fenilalanina amonio liasa '*pal*' en cultivos en suspensión de *Buddleja cordata*

### 7.7.1 Construcción del vector de silenciamiento para el gen fenilalanina amonio liasa (*pal*) de *Buddleja cordata* (*Bcpal*)

La construcción del vector de silenciamiento del gen *Bcpal* se llevó a cabo en tres etapas:

1. Amplificación de un fragmento de al menos 500 pb del gen a partir de ADN codificante extraído de biomasa de cultivos en suspensión de *B. cordata* (biomasa proveniente de cultivos elicitados con MeJa (50  $\mu$ M) adicionada en el  $t_9$  de cultivo con un tiempo de exposición de 48 h (GACGGGTGAAGCTCTCCATTCCTCCAAATGCCTCAAATCAATGGCTTGGCAAAGAGCAATTAGGTAAGTTGATGACATAAGCTTAAGAATATCCAAAGCCTCAGTTGTTTTCCCTTGAAGAGATCAATCCCAA TGAGTTAACATCTTGATTATGTTGCTCGGCACTCTGCACGTGGTTCGTGACTGGGTAGCCAAGAAT TGGAGCTCTGAACAGTACGACGCCATAGCGATCTTGCCCCATTGAAACCATAGTCCAAGCTAGGGT TCCTCCCACCCGAAAGATTAGATGGCAAACCATTGTTATAGAAATCATTAAGTTCAGAAAATT GAGCAAACATCAATTTTCCAATAGATGCTATTGCCAATCTTGTATTGTCCATCGACTCCGATAGG CGTGCCTTGAAAGTTGCCACCATGTAAAGCCTTGTTTTTAGAAACATCGATCAAGGGGT).

La amplificación se llevó a cabo con la polimerasa *Taq* Platinum, con la siguiente mezcla de reacción:

- Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, EUA)
- 10X PCR Buffer –MgCl<sub>2</sub>
- MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- dNTPs (10 mM c/u)
- Primer 1 (10 μM)
- Primer 2 (10 μM)

Primers:

<b>Nombre del primer</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>
SilForward (SilF)	GAC GGG TGA AGC TCT CCA TT
SilReverse (SilR)	ACC CCT TGA TCG ATG TTT CTA A

Empleando el siguiente programa:

Desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, apareamiento a 60°C durante 30 segundos con extensión a 72°C durante 1 minuto. La extensión final se llevó a cabo a 72°C durante 5 minutos.

2. El producto de 526 pb de la amplificación por PCR fue empleado directamente para ser ligado en el vector TOPO (pCR8/GW/TOPO, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, EUA):

Producto de PCR	2 μL
Solución salina	0.5 μL
Vector TOPO	0.5 μL
Volumen total	3 μL

La mezcla fue homogenizada suavemente mediante pipeteo e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el total de la reacción fue empleada para transformar células competentes de *E. coli* Mach1 mediante choque térmico, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (con algunas modificaciones). Brevemente, el volumen total de reacción fue colocado sobre las células competentes aún congeladas e incubadas durante 30 minutos a 4°C, posteriormente a 37°C durante 1 minuto e inmediatamente se transfirió el tubo a hielo. Se adicionaron 200 µL de medio SOC (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, EUA) y se incubó a 37°C y 170 rpm durante 40 minutos. Posteriormente las células fueron plaqueadas en cajas de Petri con medio LB adicionado con el antibiótico estreptomina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EUA) en una concentración final de 50 µg/mL. Las cajas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche (16 h).

Al día siguiente se seleccionaron al azar cinco colonias, las cuales fueron incubadas en medio líquido LB adicionado con el antibiótico estreptomina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EUA) en una concentración final de 50 µg/mL, para posteriormente llevar a cabo una extracción de ADN plasmídico y verificar la incorporación del fragmento de interés en el vector BcPalTOPO, por un lado mediante PCR con los primers SilF y SilR y posteriormente por secuenciación para entonces continuar con los siguientes pasos en la construcción del vector de silenciamiento.

3. Una vez confirmada la construcción del vector BcPalTOPO mediante secuenciación, se construyó el vector 'BcPalGW80' mediante una reacción de recombinación tipo LR entre los vectores BcPalTOPO y el vector Gateway binario vacío pGW80 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, EUA). La reacción se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La correcta construcción del vector BcPalGW80 fue verificada mediante secuenciación (Macrogen, Corea, [www.dna.macrogen.com](http://www.dna.macrogen.com)).

### **7.7.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens***

Células electro-competentes de la cepa hipervirulenta AGL1 de *A. tumefaciens* (Lazo *et al.*, 1991) fueron transformadas con el vector BcPalGW80, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los cultivos control (vacíos) y aquellos portadores del vector BcPalGW80 fueron incubados en medio YEB (*ver Anexo*), adicionado con los antibióticos kanamicina (100 mg L<sup>-1</sup>) y ampicilina (100 mg L<sup>-1</sup>); además, se adicionó estreptomina/espectinomicina (100 mg L<sup>-1</sup>)

para la selección de transformantes. Las cepas fueron cultivadas a 28°C en oscuridad total durante 2-3 días.

### 7.7.3 Inoculación, co-cultivo y selección de transformantes

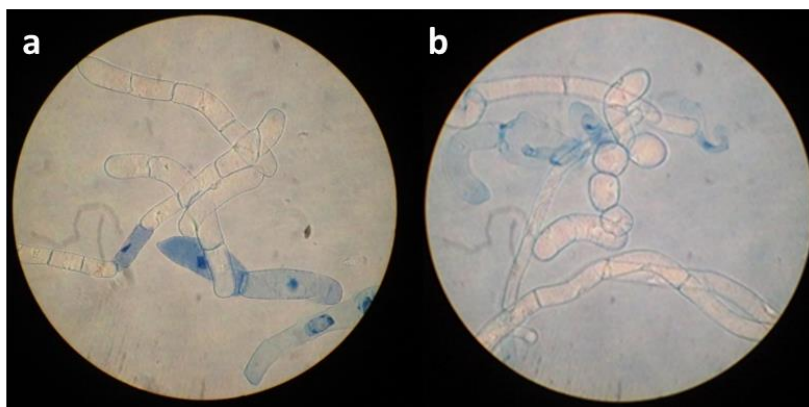
Los procedimientos de inoculación, co-cultivo y selección de transformantes se llevaron a cabo con base en la metodología reportada por Weir *et al.* (2001), con algunas modificaciones.

Aproximadamente 1 g en peso fresco de cultivos de *B. cordata* en fase exponencial (aproximadamente 3 días de cultivo) fue filtrado al vacío dentro de una campana de flujo laminar con membranas estériles Whatman tamaño de poro 0.5 µm. Posteriormente, el filtro fue colocado sobre cajas de Petri con 25 mL de medio de crecimiento YEB suplementado con los antibióticos kanamicina, ampicilina y estreptomina, cada uno en una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente, las células vegetales fueron impregnadas con 1 mL de una suspensión de *A. tumefaciens* **a)** vacías (control) y **b)** portadoras del vector BcPalGW80. Los inóculos fueron incubados durante 3 horas a temperatura ambiente. Después, en condiciones de esterilidad, las membranas fueron transferidas a cajas de Petri con 25 mL de medio de inducción (*ver Anexo*). El co-cultivo se llevó a cabo a 26 ± 2°C en oscuridad durante 2-3 días. Posteriormente, las membranas fueron transferidas a cajas de Petri con medio de inducción suplementado con el antibiótico Meropenem (50 mg L<sup>-1</sup>) para inhibir el crecimiento microbiano; los cultivos fueron incubados a 26 ± 2°C con un fotoperiodo de 16 h de luz, usando lámparas fluorescentes de luz blanca con una intensidad de 50 µmol/m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> durante una semana. Las membranas fueron transferidas después a cajas de Petri con medio de inducción suplementado con el herbicida glufosinato de amonio (20 mg L<sup>-1</sup>), con la finalidad de seleccionar las células transformantes exitosas de *B. cordata*. Las células sobrevivientes fueron subcultivadas cada 21 días en medio de inducción.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 La línea celular de *B. cordata* reestablecida en suspensión mantuvo la capacidad de crecer rápidamente, así como de producir en alta concentración verbascósido

El cultivo celular de *B. cordata* fue restablecido en suspensión sin mayor complicación. Fue propagado con la finalidad de que la línea se readaptara al medio líquido y, además, que la mayor cantidad de células posible estuviera en contacto con el medio de cultivo (ocupar la mayor superficie de contacto), por lo que una vez que dejaron de observarse agregados celulares (aproximadamente después de siete ciclos de subcultivo) se infirió su estabilidad. La morfología de las células en cultivo fue muy parecida a la descripción previamente reportada, es decir, células blancas, friables, de rápida proliferación (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009). Al microscopio, usualmente se las observó formando cadenas integradas por aproximadamente 2 a 8 células, principalmente alargadas (**Figura 7a**), aunque también se las observó en forma redonda, como se muestra en la **Figura 7b**.



**Figura 7.** Morfología celular de *B. cordata* células cultivadas en suspensión. Cadenas integradas por aproximadamente 2 a 8 células principalmente **a.** alargadas o en **b.** forma redonda. Las observaciones fueron

realizadas a 100X. La tinción se llevó a cabo con colorante azul de Evans, para determinar la viabilidad celular (las células azules son inviables).

Posteriormente, para determinar si las células eran o no adecuadas para llevar a cabo experimentos sobre el incremento de la producción de verbascósido, se evaluó la estabilidad de la línea mediante la determinación de parámetros de crecimiento así como el estudio analítico de la producción del compuesto, tomando en cuenta que, factores como la edad de los cultivos, la densidad celular y el número de subcultivos, entre otros factores ambientales, han sido reportados entre las principales causas que afectan el comportamiento del crecimiento, así como la actividad biosintética de los cultivos (Sierra *et al.*, 1992; Bourgaud *et al.*, 2001). Las determinaciones se llevaron a cabo en dos etapas diferentes entre los ciclos de subcultivo, cada una consistente de tres subcultivos continuos. En adelante, cada una de las etapas será denominada como 'primera determinación' y 'segunda determinación'. Es importante mencionar que desde el momento en que se inició el restablecimiento de la línea se procuró controlar estrictamente la composición del medio del cultivo, la cantidad de biomasa empleada como inóculo y la periodicidad con la que se llevó a cabo cada subcultivo.

En lo referente a los parámetros de crecimiento ( $\mu$ ,  $td$  e  $IC$ ), no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las tres cinéticas de la primera determinación, al igual que ocurrió con las tres cinéticas correspondientes a la segunda determinación; lo cual nos condujo a pensar que, a pesar de ser una línea sometida a múltiples ciclos de cultivo, su capacidad para adaptarse con facilidad a un ambiente líquido de forma estable ha trascendido. No obstante, se observaron algunas diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias de los parámetros entre la primera y segunda determinación, indicando cambios en el patrón de crecimiento de la línea en el ínterin. Se observó que con el tiempo ocurrió un incremento del 61% en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu= 0.103 \pm 0.015 \text{ d}^{-1}$  para la primera y  $0.166 \pm 0.012 \text{ d}^{-1}$  para la segunda determinación). Se observó un comportamiento diferente en el tiempo de duplicación, el valor medio de la primera determinación fue 25% más elevado en relación con el de la segunda (por ejemplo,  $td= 5.306 \pm 0.184$  días vs  $td= 4.192 \pm 0.315$ ). Es decir que, con el tiempo, la línea incrementó la velocidad para aumentar la biomasa ( $\mu$ ) pero disminuyó la tasa de división celular ( $td$ ). Igualmente, con el tiempo, el índice de crecimiento disminuyó 3%,  $IC= 4.780 \pm 0.012$  para la primera y  $4.647 \pm 0.048$  para la segunda determinación (**Tabla 4**).



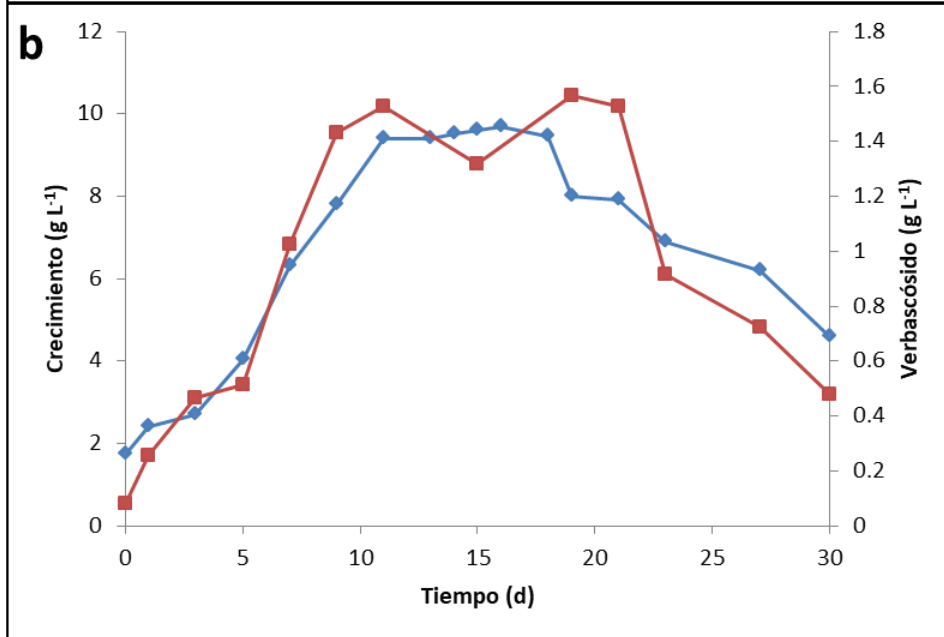
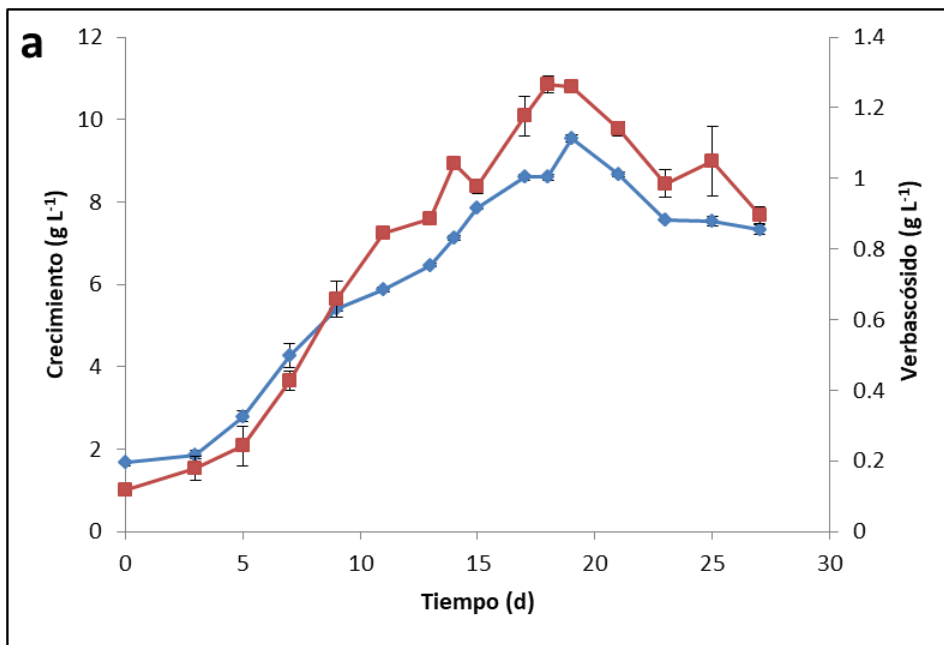
**Tabla 4.** Parámetros de crecimiento de la primera y de la segunda determinación de la línea de *B. cordata* en suspensión. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS.

Subcultivo	Parámetro de crecimiento	Valor	
		Primera determinación	Segunda determinación
1ro	$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	0.102	0.153
	td (días)	5.293	4.536
	IC	4.766	4.588
2do	$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	0.109	0.177
	td (días)	5.129	3.918
	IC	4.787	4.706
3ro	$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	0.099	0.168
	td (días)	5.496	4.121
	IC	4.787	4.647
Media	$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	0.103 $\pm$ 0.015	0.166 $\pm$ 0.012
	td (días)	5.306 $\pm$ 0.184	4.192 $\pm$ 0.315
	IC	4.780 $\pm$ 0.012	4.647 $\pm$ 0.048

Por otro lado, el perfil de crecimiento de la línea celular fue evaluado mediante la construcción gráfica de cinéticas de crecimiento (**Figura 8**). En ambas determinaciones, los cultivos acumularon cantidades semejantes de biomasa (9.5 y 9.4 g PS L<sup>-1</sup>, respectivamente); no obstante, se observaron diferencias significativas en la extensión de las fases de crecimiento (**Tabla 5**). En la primera determinación (**Figura 8a**), la línea exhibió un patrón típico de crecimiento, muy semejante al reportado para la línea original (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009). Contrariamente, en la segunda determinación (**Figura 8b**) los cultivos mostraron una fase exponencial acelerada y, de hecho, prácticamente no se observó fase *lag*. Además, la línea alcanzó el máximo crecimiento con mayor velocidad, en el día 9 de cultivo, mientras que en la primera determinación ocurrió en el día 15. Lo anterior indicó que, con el tiempo, la línea dirigió con mayor eficacia sus procesos metabólicos hacia el crecimiento y la viabilidad.

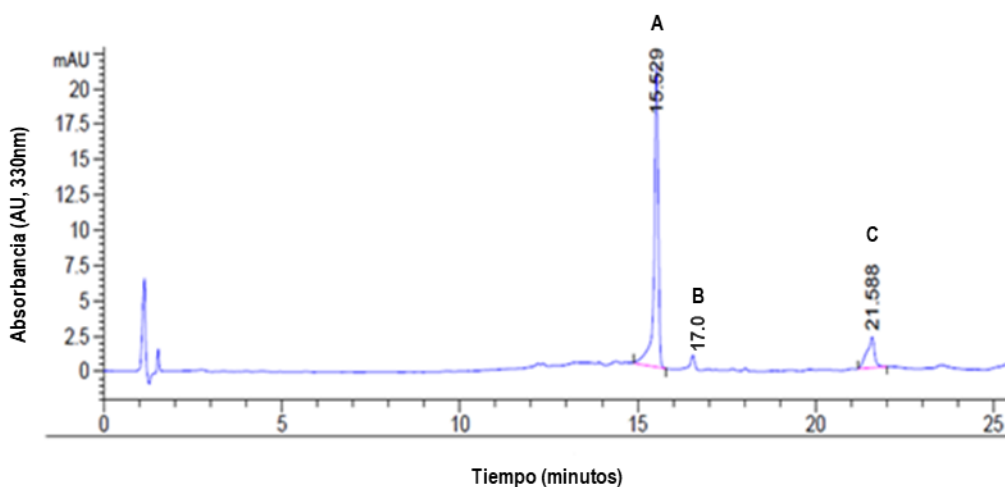
**Tabla 5.** Comparación de la extensión de las fases de crecimiento entre la primera y la segunda determinación de la línea de *B. cordata* restablecida como sistema en suspensión.

Fase de crecimiento	Determinaciones	
	Primera	Segunda
	Duración (días)	
Lag	3	0
Log	14	11
Estacionaria	6	7
Muerte	6	12



**Figura 8.** Perfiles de crecimiento (azul) y de producción de verbascósido (rojo) de la línea celular restablecida en suspensión de *B. cordata*. **a.** primera determinación; **b.** segunda determinación. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS.

Respecto a la producción de verbascósido, con base en los perfiles de producción obtenidos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (**Figura 8**), se determinó que a pesar del tiempo transcurrido desde su génesis (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009), la línea conserva la capacidad de sintetizar el compuesto, siendo además el metabolito más abundante con un tiempo de retención (TR) de 15.5 minutos (**Figura 9**).



**Figura 9.** Perfil cromatográfico (HPLC, detector DAD 330 nm) de un extracto metanólico de una muestra de un cultivo de células en suspensión de *B. cordata*. Señalado en el cromatograma, (A) verbascósido, (B) cumarina, (C) estándar interno.

Por otro lado, debido a que los valores de velocidad específica de producción ' $qp$ ' fueron similares a los de velocidad específica de crecimiento ( $qp= 0.127 \pm 0.011$  día<sup>-1</sup> y  $\mu= 0.103 \pm 0.015$  día<sup>-1</sup> para la primera determinación y  $qp= 0.177 \pm 0.007$  día<sup>-1</sup> y  $\mu= 0.166 \pm 0.012$  día<sup>-1</sup> para la segunda), se confirmó que la producción del fenilpropanoide continúa vinculada al crecimiento. Algunas diferencias se observaron entre las cinéticas de producción obtenidas para la primera y la segunda determinación (**Figura 8**). Por ejemplo, en la última, la producción máxima del metabolito ocurrió del día 9 al 21 de crecimiento (sin diferencias estadísticamente significativas), mientras que en la primera determinación ocurrió del día 15 al 25 (sin diferencias estadísticamente significativas). Además, se observaron cambios

estadísticamente significativos en la producción de verbascósido, por ejemplo, el nivel de producción fue 18% mayor en la segunda determinación respecto a la primera determinación ( $1.43 \pm 0.0945 \text{ g L}^{-1}$  (0.154 g g) y  $1.21 \pm 0.0286 \text{ g L}^{-1}$  (0.127 g g), respectivamente). En 2009, la máxima producción del compuesto fue  $1.44 \text{ g L}^{-1}$  (0.111 g g). Por otro lado, los valores de velocidad específica de producción mostraron que la producción de verbascósido ocurrió 39% más rápido en la segunda determinación ( $qp = 0.127 \pm 0.011 \text{ día}^{-1}$  y  $0.177 \pm 0.007 \text{ día}^{-1}$ , respectivamente). Además, también hubo diferencias respecto a la productividad del compuesto (**Tabla 6**): para la primera determinación, una combinación de  $9.5 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa máxima y un rendimiento de 12.73%, correspondió a una productividad de  $0.08 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  a los 15 días de cultivo. Para la segunda determinación,  $9.4 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa y un rendimiento de 13.83% correspondió a una productividad de  $0.14 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  a los 9 días de cultivo. En el caso de la línea original, una combinación de  $12.93 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa y un rendimiento de 11.13%, correspondió a un valor de productividad de  $0.1 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  a los 14 días de cultivo. Es decir que la productividad de verbascósido incrementó un 75% en la segunda determinación respecto a la primera y un 71% respecto a la línea original.

**Tabla 6.** Comparación entre los datos de productividad de la línea celular de *B. cordata* durante la primera y segunda determinación, así como los valores de la línea original (2009).

Determinación	Biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ )	Tiempo (días)	Rendimiento (%)	Rendimiento ( $\text{g L}^{-1}$ )	Productividad ( $\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ )
Primera	9.5	15	12.73%	$1.21 \pm 0.0286$	0.08
Segunda	9.4	9	13.83%	$1.43 \pm 0.0945$	0.14
Línea en 2009*	12.93	14	11.13%	1.44	0.1

\*Valores de 'Línea en 2009' de acuerdo con Estrada-Zúñiga *et al.*, (2009).

El empleo de cultivos celulares vegetales en suspensión para la obtención de compuestos químicos derivados de plantas, es decir a modo de 'fábricas verdes' productoras de metabolitos secundarios de importancia industrial, con frecuencia se ve limitado por la pérdida gradual de viabilidad y/o de capacidades metabólicas (por ejemplo, bajos rendimientos en la producción de compuestos), las cuales se deben principalmente a cambios epigenéticos que tienen lugar durante el cultivo, especialmente tras largos periodos de cultivo (por ejemplo, de meses a años). A los cambios genéticos originados durante el cultivo *in vitro* se los denomina 'variaciones somaclonales', las cuales en el peor de los casos conducen a la

reducción de biomasa y a la merma en la productividad de compuestos de interés (Scragg, 1995; Phillips *et al.*, 1994; Kolewe *et al.*, 2008; Neelakandan y Wang 2012; Wilson y Roberts 2012; Coppede *et al.*, 2014). Se ha reportado que entre las aberraciones genéticas predominantes en los cultivos de células vegetales están: cambios en la estructura de los cromosomas, diferente número de copias de cromosomas, cambios en la secuencia de ADN, así como amplificación de genes. Al parecer, los eventos que conducen a la ruptura de cromosomas, y en algunas ocasiones al subsecuente intercambio o reunión de fragmentos, parecen tener una importancia fundamental (Lee y Phillips, 1988; Bairu *et al.*, 2011). Dos de los posibles orígenes del rearrreglo cromosomal en el cultivo de tejidos son la replicación retardada de la heterocromatina y el desbalance en la concentración intracelular de nucleótidos; además, se menciona que perturbar la sincronía entre la replicación cromosomal durante la fase S y la división celular muy probablemente resulte en alguna aberración cromosomal (Lee y Phillips, 1988; Bairu *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha sugerido que eventos como la activación de elementos transponibles, el silenciamiento putativo de genes, además de una alta frecuencia en el patrón de metilación de secuencias de una sola copia pueden jugar un papel principal en la variación somaclonal (Bairu *et al.*, 2011).

En algunos casos, se ha señalado al número de subcultivos y a la duración de los mismos como factores que incrementan la tasa de variaciones somaclonales, especialmente en cultivos celulares en medio semisólido y en suspensión (Bairu *et al.*, 2011). Sin embargo, no en todas las especies vegetales la prolongada duración de los cultivos resulta en este tipo de modificaciones genéticas: un claro ejemplo de ello es el caso de cultivos de brotes múltiples de chícharo, los cuales, aún después de ser mantenidos en cultivo durante un largo periodo de tiempo (24 años), se mantuvieron genéticamente estables en comparación con el genotipo original (Smýkal *et al.*, 2007).

Bourgau *et al.* (2001) establecieron que después de un intervalo de tiempo que puede variar entre meses y años, dependiendo de la especie, los cultivos pueden alcanzar cierta estabilidad genética y entonces ser considerados como cultivos 'homogéneos'. No obstante, lo anterior implica que los cultivos pueden favorecer la producción estable de algún(os) compuesto(s) y en cambio, dificultar la producción de otros (Coppede *et al.*, 2014). Este podría ser el caso del verbascósido en la línea celular de *B. cordata*, ya que en 2009 para ésta se reportó la producción de ácidos hidroxicinámicos (ácidos cumárico, caféico, ferúlico y sinápico) así como del flavonoide linarina (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009), compuestos que en este trabajo no

fueron detectados mediante las condiciones de extracción y cuantificación por HPLC. En cambio, se detectó la producción de otros compuestos con TRs de: 3.0, 12.2, 12.36, 13.47, 14.65, 16.53, 17.0\*, 17.65, 18.05, 22.57, 22.71 y 22.86 minutos, de los cuales se identificó al compuesto fenólico cumarina\* (**Figura 9**). Además, a 280 nm se detectó un pico con un TR de 9.47, el cual fue identificado como ácido siríngico. Cabe mencionar que, a la fecha, la producción de ninguno de estos nuevos compuestos identificados ha sido reportada para *B. cordata* ni para alguna especie perteneciente al género *Buddleja* (Khan *et al.*, 2019).

Es posible que al ser los ácidos hidroxicinámicos derivados del ácido cinámico y este a su vez precursor de fenilpropanoides como el verbascósido (**Figura 2**), su producción haya disminuido en el caso de los ácidos derivados del ácido caféico (por ejemplo, los ácidos ferúlico y sinápico) e inmediatamente ser incorporados a la producción de ácido caféico en el caso de los ácidos precursores (por ejemplo, el ácido cumárico) para poder ser ese ácido caféico incorporado al esqueleto del compuesto verbascósido (**Figura 5**). En cuanto al compuesto linarina, es probable que las condiciones de cultivo, en combinación con los múltiples ciclos de subcultivo, actuaran negativamente en su producción. García-Mateos *et al.* (2005) reportaron la reducción general en la producción de alcaloides en cultivos celulares de *Erythrina americana* como consecuencia de repetitivas rondas de subcultivo; contrariamente, se favoreció la producción del compuesto erisovina (un alcaloide).

Después de ser restablecida como cultivo en suspensión, la línea celular de *B. cordata* pasó por una etapa de readaptación (primera determinación) hasta adecuarse totalmente a las condiciones líquidas (segunda determinación). La producción de verbascósido de forma continua y además asociada al crecimiento, persistió. Aun cuando la cantidad de biomasa máxima disminuyó con respecto a la de la línea original (9.4 g L<sup>-1</sup> y 12.93 g L<sup>-1</sup>, respectivamente), la producción máxima de verbascósido se ha mantenido estable con el paso del tiempo (1.43 g L<sup>-1</sup> y 1.44 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). Incluso, con base en los datos de productividad (**Tabla 6**), lo hace con mayor eficacia (0.14 g L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> y 0.1 g L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, respectivamente). Se observaron diferencias mínimas entre los subcultivos correspondientes a la primera y segunda determinaciones, lo cual indicó un alto grado de homogeneidad celular en la línea, con lo cual se aseguró el poder usar la línea para llevar a cabo los siguientes objetivos planteados en este trabajo.

La estabilidad de la línea celular de *B. cordata* puede en parte ser explicada por su baja tendencia a formar agregados. Se ha mencionado que en estas aglomeraciones celulares usualmente la difusión de nutrientes y gases se limita a sólo algunas células (Dixon, 1985), lo cual con frecuencia genera subpoblaciones celulares metabólicamente heterogéneas (Hulst *et al.*, 1989; Naill y Roberts 2004 y 2005; Kolewe *et al.*, 2008; Wilson y Roberts 2012). En algunos reportes, por el contrario, se ha planteado la inducción de agregados celulares como estrategia para incrementar la producción de productos de interés (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007). Por otro lado, la plasticidad fenotípica de la línea puede ser un carácter inherente al espécimen biológico a partir del cual fue establecida la línea. En la literatura se ha descrito la persistencia de algunos rasgos en las células cultivadas *in vitro* que también son observables en las plantas precursoras (Fountain *et al.*, 2003; Kwiatkowska *et al.*, 2014), los tejidos altamente diferenciados como raíces, hojas y tallos generalmente producen más variantes que los explantes menos diferenciados (poseen meristemas pre-existentes, como tejidos inmaduros, yemas auxiliares, nodos apicales) (Sharma *et al.*, 2007). En el presente trabajo, la línea fue originada a partir de explantes foliares inmaduros.

Al igual que las plantas que integran los diferentes ecosistemas terrestres, las células vegetales cultivadas en laboratorio tienen la capacidad de alterar sus programas moleculares para adaptarse a sus condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura, fotoperiodo, velocidad de agitación, composición del medio de cultivo) para incrementar su fitness y asegurar de este modo su supervivencia (Fang *et al.*, 2019; Kessler y Kalske, 2018; Wang *et al.*, 2019). Se ha señalado que las condiciones de crecimiento *in vitro* pueden resultar extremadamente estresantes para las células vegetales y pueden inducir procesos altamente mutagénicos (Bairu *et al.*, 2011). En los cultivos *in vitro*, esta capacidad de adaptación puede ser favorecida por los reguladores de crecimiento vegetal (**Tabla 2**) (Neelakandan y Wang, 2012). Aunque, debido a que los RCVs incrementan la tasa de división preferentemente en células genéticamente anormales; la composición genética de la población celular puede, por lo tanto, ser influida por los niveles relativos de ambos, auxinas y citocininas, actuando como un arma de doble filo (Bairu *et al.*, 2011).

En el caso particular de la línea objeto de estudio de este trabajo, la composición del medio de cultivo pudo tener un rol especialmente importante en el mantenimiento de la estabilidad de la línea, que a su vez tuvo la predisposición de ajustar su programa genético (sobre todo

cambios epigenéticos) en respuesta a la auxina sintética 2,4-D así como a la citocina sintética KIN (ambas adicionadas al medio de cultivo, en primera instancia para inducir la formación de callo y posteriormente para mantener esta morfología y la producción de verbascósido). Tanto 2,4-D como KIN tienen efecto sobre el ciclo celular; de entrada, en los cultivos *in vitro*: son empleadas para inducir la dediferenciación celular, pero también se ha reportado que su presencia es benéfica en la producción de metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos (Miller *et al.*, 1955 y 1956; Leguay y Guern 1975; Yang *et al.*, 2002; Raghavan *et al.*, 2006; Barciszewski *et al.*, 2007; Perrot-Rechenmann, 2010; Neelakandan y Wang 2012; Kieber y Schaller 2014; Jamwal *et al.*, 2017; Isah *et al.*, 2018). Igualmente, se ha señalado a los reguladores de crecimiento vegetal como un factor determinante en la producción continua de metabolitos en cultivos mantenidos *in vitro* durante largos periodos de tiempo (por ejemplo, años). Sierra *et al.* (1992) reportaron que la producción estable de alcaloides en cultivos celulares mantenidos durante largos periodos de tiempo (dos años) en suspensión de *Tabernaemontana divaricate* dependió principalmente del tipo y concentración de los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo. Advirtieron que una concentración específica de un regulador de crecimiento garantizaba un rendimiento de producción relativamente constante, el cual se veía afectado negativamente al hacer cambios en el medio (por ejemplo, en los reguladores de crecimiento). De manera interesante, la producción era restablecida a sus niveles originales después de algunos subcultivos en el medio de producción original. Los autores concluyeron que no hubo cambios genéticos durante el periodo en que los cultivos fueron mantenidos en suspensión, o que al menos, la capacidad de producir alcaloides en grandes cantidades se mantuvo. Es decir que, la determinación de las condiciones ambientales que confieran y promuevan el desarrollo de los procesos metabólicos involucrados en la proliferación y capacidad biosintética de las líneas celulares es fundamental (Coppede *et al.*, 2014; Jamwal *et al.*, 2017; Isah *et al.*, 2018).

Generalmente, la extensión del cultivo de células *in vitro* durante largos periodos de tiempo es considerada perjudicial para la producción industrial de compuestos bioactivos, debido a que frecuentemente puede resultar en: descenso en la producción de biomasa, patrones inconsistentes o pérdida gradual de la producción de alguno o/y algunos metabolitos secundarios, tal como ha sido el caso en la obtención de antocianinas, alcaloides, taxanos, taxol y resveratrol (Dubrovina y Kiselev, 2016; Le *et al.*, 2019). No obstante, el exitoso empleo de células y tejidos vegetales en cultivo durante largos periodos de tiempo para la producción



estable de compuestos orgánicos de importancia industrial también ha sido reportado. Por mencionar algunos ejemplos, la producción de alcaloides en células en suspensión de *Tabernaemontana divaricata* (Sierra *et al.*, 1992), betaxantinas en cultivos de callo de *Beta vulgaris* (Trejo-Tapia *et al.*, 2008), así como la producción de ginsenoides en cultivos añejos de *Panax ginseng* (Le *et al.*, 2019).

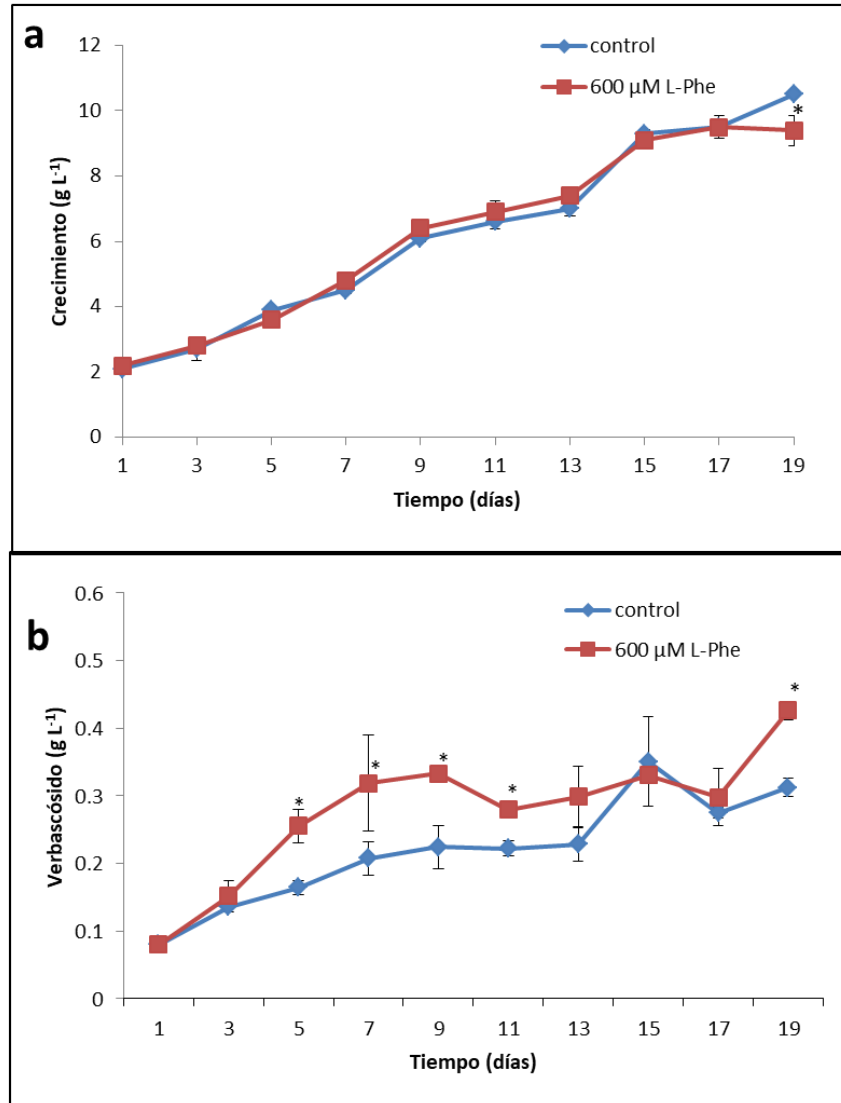
A pesar de que se observó en la línea restablecida de *B. cordata*, en comparación con la línea original la reducción en el índice de crecimiento, así como en la producción máxima de biomasa, además de la aparente pérdida o reducción de la capacidad biosintética del flavonoide linarina, la producción de verbascósido además de continuar asociada al crecimiento persistió y el nivel es comparable al de la línea original (1.43 g L<sup>-1</sup> y 1.44 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). Le *et al.*, (2019) reportaron un comportamiento similar en cultivos mantenidos durante largos periodos de tiempo (20 años) de células en suspensión de *Panax ginseng*; con el tiempo, la producción de biomasa disminuyó, pero la producción de ginsenoides permaneció constante.

## **8.2 La producción de verbascósido en cultivos en suspensión de *B. cordata* aumentó al emplear estrategias biotecnológicas**

### **8.2.1 Alimentación de los cultivos con L-fenilalanina (L-Phe) como precursor**

La aplicación exógena de precursores biosintéticos en el medio de cultivo, al inicio o durante el periodo de cultivo, es un procedimiento biotecnológico ampliamente usado para incrementar el rendimiento en la producción de compuestos bioactivos (Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018). Los precursores son adicionados a los cultivos *in vitro* con la finalidad de incrementar la reserva de sustratos a partir de los cuales las células vegetales fabricarán los metabolitos secundarios (Namdeo *et al.*, 2007; Wilson y Roberts, 2012; Yue *et al.*, 2016; Isah *et al.*, 2018). El aminoácido L-fenilalanina tiene un papel importante como precursor en la biosíntesis de feniletanoide glicósidos (**Figura 2**), por lo que su aplicación exógena para incrementar la producción de verbascósido en cultivos celulares en suspensión de *B. cordata* se planteó como un objetivo plausible. Durante el análisis del perfil de producción de verbascósido de la línea celular, en la segunda determinación (**Figura 8b**) se detectaron niveles elevados del compuesto, especialmente en dos momentos de la cinética de

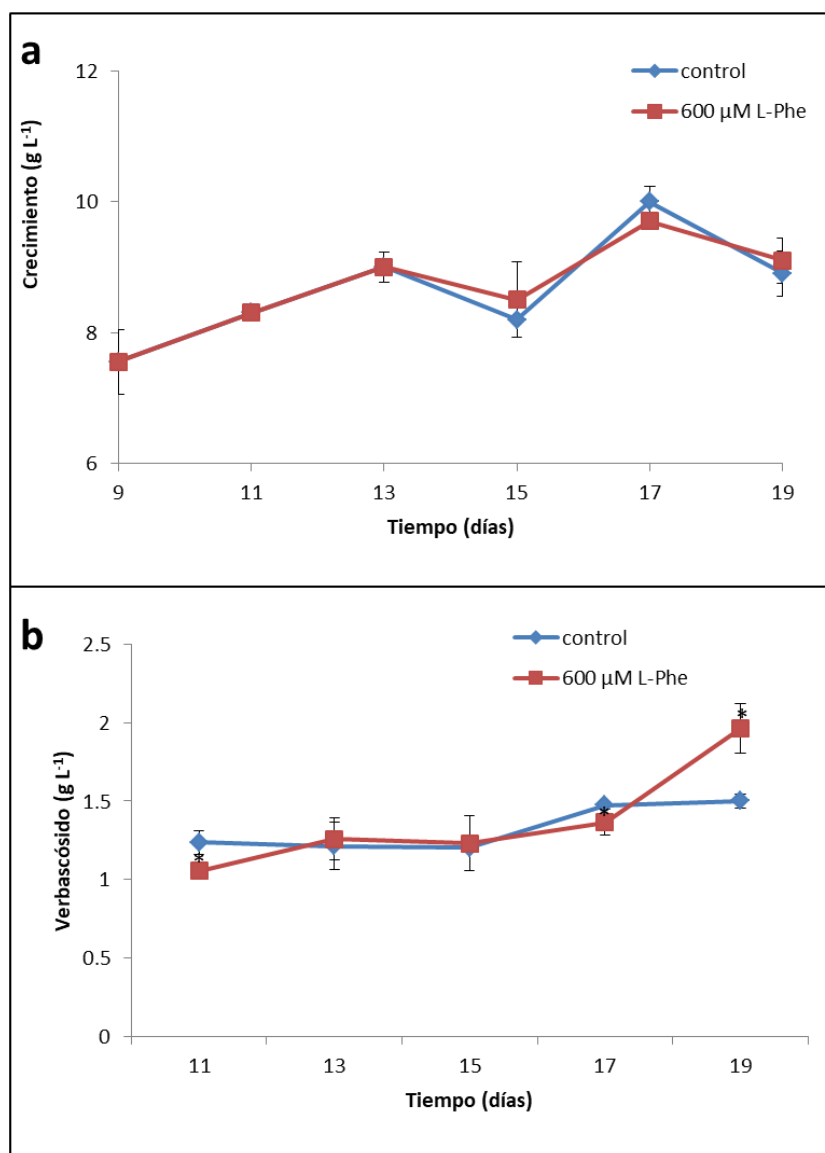
crecimiento: cuando las células entraron en la fase exponencial de crecimiento ( $t_0$ ) y cerca del final de la misma fase ( $t_9$ ). Por esta razón, los dos tiempos referidos fueron seleccionados para adicionar diferentes concentraciones de L-fenilalanina [0, 200, 400 y 600  $\mu\text{M}$ ] a cultivos celulares de *B. cordata* y estudiar su efecto sobre el crecimiento celular y la producción de verbascósido. Únicamente, el tratamiento consistiendo de L-fenilalanina 600  $\mu\text{M}$  causó efectos significativos en la producción de biomasa y de verbascósido por la línea celular y que, éstos a su vez dependieron del tiempo de adición del aminoácido (**Figuras 10**; adición al  $t_0$ , y **11**; adición al  $t_9$ ). Cuando el aminoácido fue adicionado en el  $t_0$ , se advirtió un cambio estadísticamente significativo en la producción de biomasa, la cual disminuyó 10.5% ( $9.4 \pm 0.46$  *contra*  $10.5 \pm 0.11$  para el control) después de 19 días de exposición ( $t_{19}$ ) (**Figura 10a**). Por otro lado, también se notaron cambios estadísticamente significativos sobre la producción de verbascósido en diferentes tiempos de exposición respecto a sus controles correspondientes, por ejemplo: después de 5 días de exposición ( $t_5$ ), en los cultivos tratados la concentración del compuesto fue  $0.26 \pm 0.02$  g L<sup>-1</sup> y  $0.16 \pm 0.01$  g L<sup>-1</sup> en el control; después de 7 días de exposición ( $t_7$ ),  $0.32 \pm 0.07$  g L<sup>-1</sup> *contra*  $0.21 \pm 0.02$  g L<sup>-1</sup>; después de 9 días de exposición ( $t_9$ ),  $0.33 \pm 0.016$  g L<sup>-1</sup> *contra*  $0.22 \pm 0.03$  g L<sup>-1</sup>; después de 11 días ( $t_{11}$ ),  $0.28 \pm 0.01$  g L<sup>-1</sup> *contra*  $0.22 \pm 0.01$  g L<sup>-1</sup>; finalmente, después de 19 días ( $t_{19}$ ),  $0.43 \pm 0.01$  g L<sup>-1</sup> *contra*  $0.31 \pm 0.01$  g L<sup>-1</sup> (**Figura 10b**).



**Figura 10.** Perfiles de **a.** producción de biomasa (línea azul, corresponde al control) y **b.** verbascósido (línea azul corresponde al control) de la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* después de adicionar L-Phe (600 μM) en el día 0 de cultivo ( $t_0$ ). Las células fueron colectadas cada dos días después de la alimentación con el precursor. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

La adición del aminoácido en el  $t_9$  no tuvo efecto sobre la producción de biomasa, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas (**Figura 11a**). Una situación contraria se observó en cuanto a sus efectos sobre la producción de verbascósido (**Figura 11b**), principalmente se observaron dos efectos estadísticamente significativos, el primero, disminuyó la producción después de 2 y 8 días de exposición ( $t_{11}$  y  $t_{17}$ , respectivamente). Al  $t_{11}$ , la producción de verbascósido disminuyó 14.7% ( $1.05 \pm 0.04$  g L<sup>-1</sup> contra  $1.24 \pm 0.08$  g L<sup>-1</sup> correspondiente al control), y 7.2% al  $t_{17}$  ( $1.37 \pm 0.08$  g L<sup>-1</sup> contra  $1.47 \pm 0.01$  g L<sup>-1</sup>

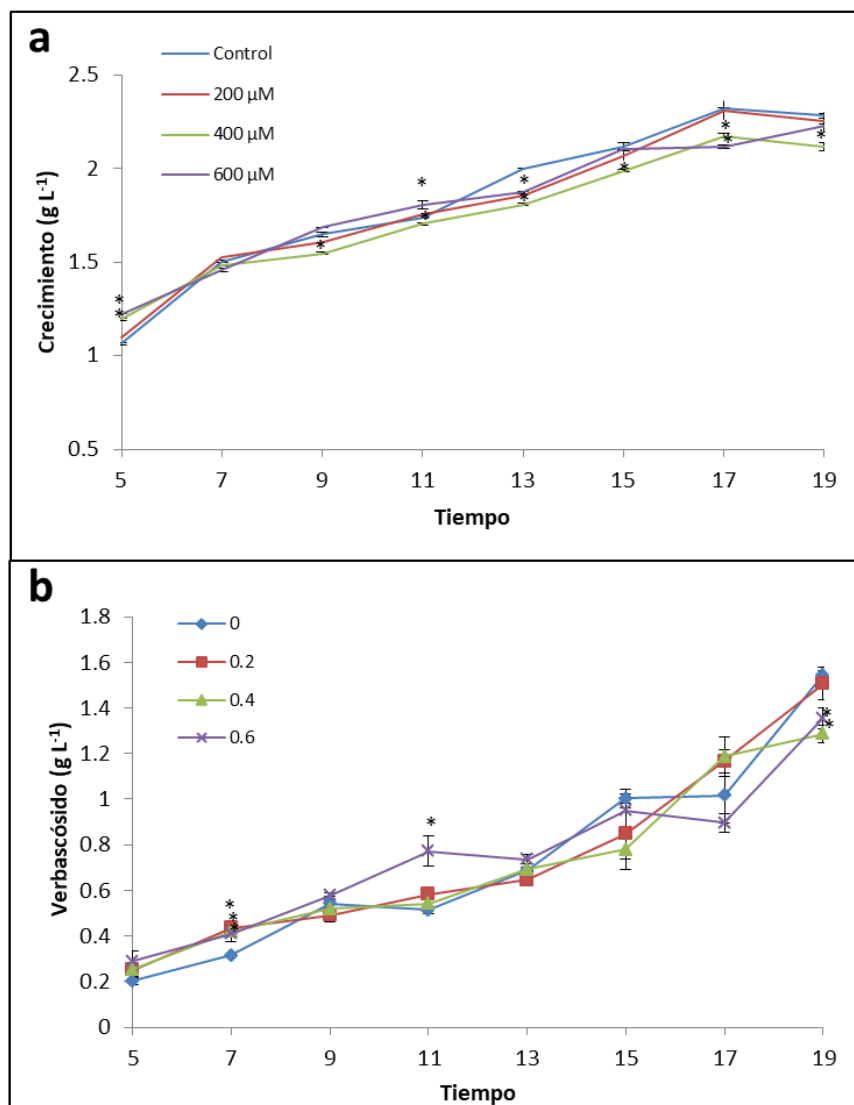
correspondiente al control). El segundo, fue un efecto positivo, luego de un tiempo de exposición de 10 días ( $t_{19}$ ), la producción del compuesto incrementó 130.7% ( $1.96 \pm 0.16 \text{ g L}^{-1}$  contra  $1.50 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$  correspondiente al control).



**Figura 11.** Perfiles de **a.** producción de biomasa (línea azul corresponde al control) y **b.** verbascósido (línea azul corresponde al control) de la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* después de adicionar L-Phe ( $600 \mu\text{M}$ ) en el día 9 de cultivo ( $t_9$ ). Las células fueron colectadas cada dos días después de la alimentación con el precursor. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

Adicionalmente, se decidió evaluar el efecto del precursor [ $0, 200, 400$  y  $600 \mu\text{M}$ ], aplicándolo a los cultivos durante el día 3 ( $t_3$ ) de cultivo. El análisis estadístico mostraró que la producción

de biomasa fue significativamente afectada a través del tiempo y dependiendo de la concentración de L-Phe (**Figura 12a**). Después de 48 horas de exposición ( $t_5$ ), las concentraciones 400 y 600  $\mu\text{M}$  de L-Phe incrementaron en un 10.5% la producción de biomasa ( $1.211 \pm 0.016 \text{ g L}^{-1}$  *contra*  $1.064 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ ); además la última concentración incrementó en un 4% la producción de biomasa después de 8 días de exposición ( $t_{11}$ ) respecto al control ( $1.808 \pm 0.016 \text{ g L}^{-1}$  *contra*  $1.740 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ ). Todas las concentraciones afectaron negativamente la producción de biomasa después de 10 días de exposición ( $t_{13}$ ), observándose una disminución promedio de 7.8% respecto al control ( $1.845 \pm 0.016 \text{ g L}^{-1}$  *contra*  $2.001 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ ) (**Figura 12a**), aunque para L-Phe 400  $\mu\text{M}$  la reducción en la producción de biomasa ocurrió desde el sexto día de exposición y hasta el final del experimento (del  $t_9$  al  $t_{19}$ ). Los cambios en la producción de verbascósido fueron estadísticamente significativos únicamente en el  $t_7$  en el cual todas las concentraciones probadas generaron un aumento del 10% en la producción del compuesto respecto al control ( $0.422 \pm 0.016 \text{ g L}^{-1}$  *contra*  $0.3156 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ ), así como bajo L-Phe 600  $\mu\text{M}$  después de 8 días de exposición en los cultivos ( $t_{11}$ ) el cual provocó un aumento del 40% de verbascósido respecto al control ( $0.7710 \pm 0.016 \text{ g L}^{-1}$  *contra*  $0.5129 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ ). Las concentraciones 400 y 600  $\mu\text{M}$  de L-Phe disminuyeron en un 14.5% la producción del metabolito después de 10 días de exposición ( $t_{19}$ ) ( $1.32 \pm 0.016 \text{ g L}^{-1}$  *contra*  $1.5451 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ ) (**Figura 12b**).



**Figura 12.** Perfiles de **a.** producción de biomasa y **b.** verbascósido de la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* después de adicionar L-Phe en el día 3 de cultivo ( $t_3$ ). Azul-control; rojo-200  $\mu\text{M}$ ; verde-400  $\mu\text{M}$ ; morado-600  $\mu\text{M}$ . Las células fueron colectadas cada dos días después de la alimentación con el precursor. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

Complementar el medio de cultivo con precursores de naturaleza aminoacídica durante la fase exponencial de crecimiento con la finalidad de mejorar la producción de PhGs ha probado ser un recurso valioso en diversos sistemas vegetales *in vitro*, como aquellos derivados de la especie *Cistanche deserticola* como se describe en el siguiente párrafo. Por ejemplo, la adición de L-Phe 200  $\mu\text{M}$  a cultivos celulares de la especie durante el octavo día de crecimiento (correspondiente al inicio de la fase exponencial) tuvo un efecto positivo sobre la producción

de PhGs, con un incremento global del 75% respecto al control (Ouyang *et al.*, 2005a). En cambio, en otra línea celular de *C. deserticola*, Cheng *et al.* (2005a), reportaron como óptima la adición de L-Phe a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  para aumentar la producción de PhGs en un 53.6%. Igualmente, Hu *et al.* (2014) probaron por separado los efectos de L-Phe y L-Tyr, reportando un aumento del 130% después de adicionar L-Phe (1.5 mM) a cultivos en fase exponencial. Por otro lado, la tirosina 750  $\mu\text{M}$  tuvo un efecto positivo sobre la producción general de PhGs (160%) mientras que, a una concentración de 5 mM el efecto fue particularmente significativo sobre la producción de salidrósido, generando un rendimiento extra del 400%.

Los efectos positivos del aminoácido aromático L-Phe sobre la producción de PhGs, y en particular de verbascósido, probablemente sean el resultado de su rol bioquímico en la biosíntesis de fenilpropanoides (**Figura 2**) (Ouyang *et al.*, 2005a; Liu *et al.*, 2018b). En un estudio fundamental, mediante el uso de isótopos radioactivos de L-Phe, Ellis (1983) fue capaz de rastrear los primeros pasos en la biosíntesis de verbascósido. Su estudio demostró que la [ $^{14}\text{C}$ ]-fenilalanina era incorporada directamente al grupo cafeóil del compuesto (**Figura 5**). Se sabe que el metabolismo de L-Phe es esencial en la biosíntesis del ácido *trans*-cinámico y sus derivados ácidos hidroxicinámicos que incluyen al ácido caféico (**Figura 2**), por lo que su uso como complemento de sustratos en el medio de cultivo puede impulsar la regulación de una de las rutas (ruta general de los fenilpropanoides) involucradas en la síntesis del metabolito.

Por otro lado, la adición exógena de precursores puede resultar en efectos tóxicos (Yue *et al.*, 2016). En algunos casos, se ha reportado que también puede inducir la inhibición metabólica tipo feedback (por retroalimentación) en algunas rutas biosintéticas (Ouyang *et al.*, 2005a). En apoyo a esas observaciones está la inhibición por producto (el producto de una reacción enzimática inhibe la actividad enzimática) de la enzima PAL por el ácido *trans*-cinámico (Zhang y Liu, 2015). En este caso, la inhibición transitoria de la enzima PAL podría explicar la disminución en la producción del compuesto observada después de 2 ( $t_{11}$ ) y 8 días ( $t_{17}$ ) cuando el precursor fue adicionado en el  $t_0$  a una concentración de 600  $\mu\text{M}$  (**Figura 11b**), sin embargo, para dar por cierta esta premisa, habría que corroborarlo con estudios relacionados con la actividad enzimática de PAL.

Como fue mencionado previamente, las concentraciones 200 y 400  $\mu\text{M}$  no tuvieron efectos estadísticamente significativos en lo referente a producción de biomasa y/o verbascósido cuando fueron adicionadas al  $t_0$  o al  $t_9$ . En cambio, cuando fueron adicionadas al  $t_3$ , especialmente 400  $\mu\text{M}$  tuvo un efecto principalmente perjudicial en el crecimiento (**Figura 12a**). Por otro lado, con L-Phe 600  $\mu\text{M}$  únicamente se observó un efecto negativo después de diez días de exposición ( $t_{19}$ ) cuando fue añadido al  $t_9$ . Debido a que la disminución ocurrió durante la fase estacionaria de crecimiento (**Figura 8b**), aparentemente no implicó un efecto tóxico en las células, como pudo ser el caso de la concentración 400  $\mu\text{M}$ , cuyo efecto negativo se observó durante una parte de la fase exponencial de crecimiento. En el caso de la concentración 600  $\mu\text{M}$ , el momento en el cual ocurrió la disminución de biomasa coincidió con el momento de mayor producción del compuesto (**Figura 8**), lo cual conduce a pensar en una redirección del flujo de carbono del metabolismo primario hacia el secundario (Korkina, 2007; Vogt, 2010; Kumar y Goel, 2019; Vanholme *et al.*, 2019). Aunque en la literatura no es común encontrar reportes sobre los efectos negativos de L-Phe sobre el crecimiento celular, es posible encontrar publicaciones en donde se menciona este aspecto, por ejemplo, en el trabajo de Ouyang *et al.*, (2005a) se menciona el efecto negativo de L-Phe 200  $\mu\text{M}$  sobre el crecimiento en cultivos celulares de *Cistanche deserticola*. Por otro lado, Liu *et al.* (2018b), reportaron la inhibición en el crecimiento de células en cultivo de *Cistanche tubulosa* cuando se emplearon altas concentraciones del aminoácido (30 mM). En ninguno de los casos los autores dan mayor explicación sobre las posibles causas. La selección de precursores cuyo uso no implique inconvenientes en términos metabólicos, o bien, aquellos que puedan ser usados en concentraciones relativamente altas, es crítica durante el diseño de estrategias biotecnológicas para aumentar los niveles de producción de metabolitos de interés industrial. Igualmente, es importante determinar el momento del ciclo celular en el cual se adicionarán los precursores al medio de cultivo, el tiempo de exposición, así como su concentración (Ouyang *et al.*, 2005a; Yue *et al.*, 2016).

La incorporación adicional de L-Phe en una concentración de 600  $\mu\text{M}$  al medio de cultivo durante la fase exponencial de crecimiento estimuló la producción de verbascósido después de 8 días de exposición en los cultivos ( $t_{11}$ ) cuando fue añadido en el tercer día de cultivo; pero, sobre todo, después de 10 días de exposición cuando fue añadido en el  $t_9$ . Los niveles de producción del compuesto fueron comparables o superiores a los previamente reportados para cultivos de *B. cordata* y de otras especies vegetales productoras de PhGs (**Tabla 7**). Por



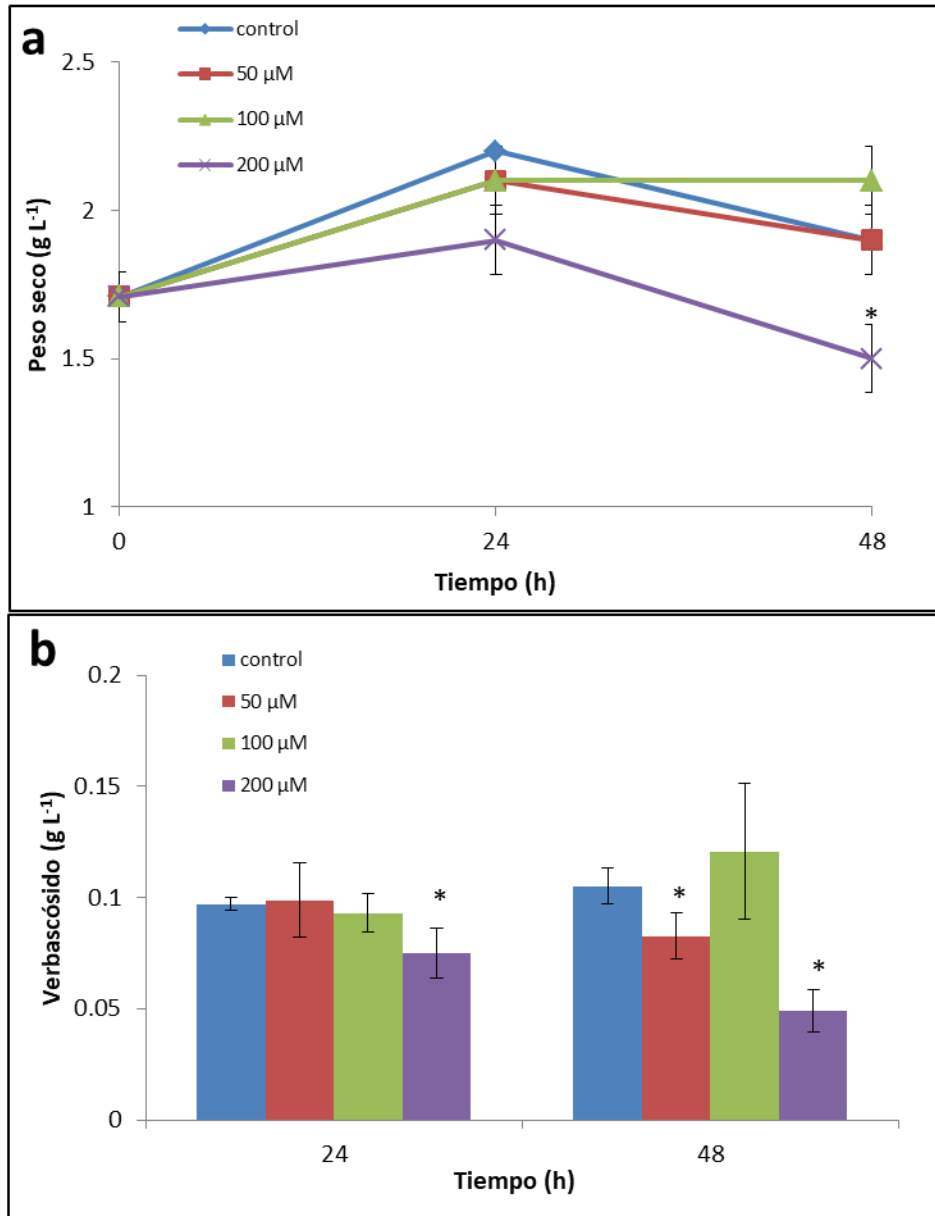
ello, el uso de fenilalanina como precursor para incrementar la producción de verbascósido en cultivos celulares en suspensión de *B. cordata* es una estrategia biotecnológica factible.

### 8.2.2 Elicitación de los cultivos con metil jasmonato (MeJa)

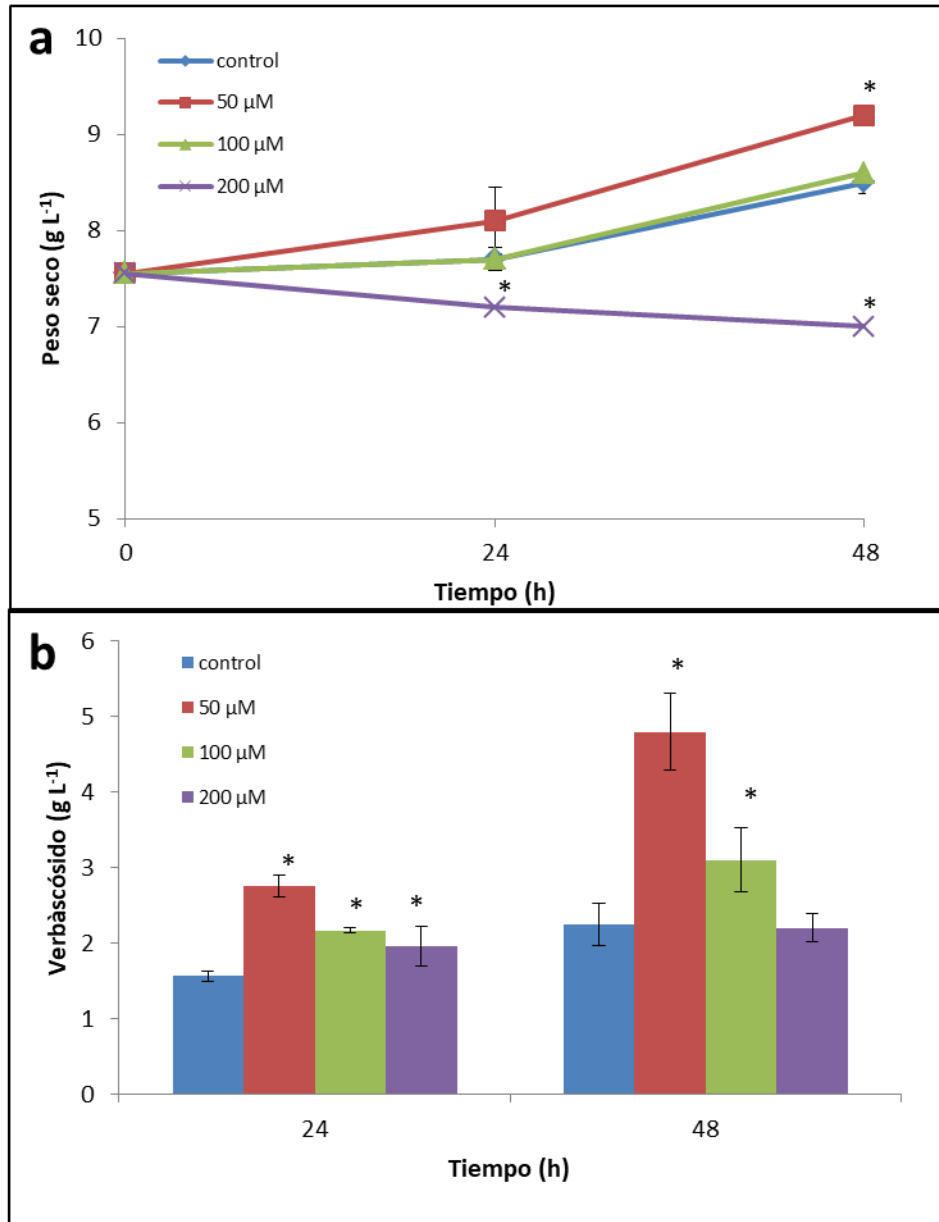
Los denominados 'elicitores' son compuestos que *in planta* tienen la capacidad de desencadenar la producción de respuestas metabólicas de defensa. Por esta razón, la elicitación exógena es una de las estrategias biotecnológicas más empleadas para intensificar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* (Vasconsuelo y Boland 2007; Yue *et al.*, 2016).

La elicitación con MeJa a diferentes concentraciones en las células de *B. cordata* modificó la producción de verbascósido, la cual dependió de **i**) la concentración de MeJa, **ii**) el momento de adición del compuesto y **iii**) el tiempo de exposición del elicitador (**Figuras 13b y 14b**). En términos generales, la adición de MeJa al  $t_0$ , influyó negativamente en el proceso de biosíntesis de verbascósido. Un comportamiento totalmente opuesto al observado cuando la elicitación ocurrió en el  $t_9$ , con importantes incrementos estadísticamente significativos en la producción de verbascósido. En los experimentos en los cuales MeJa 200  $\mu\text{M}$  fueron aplicados al  $t_0$ , se observó un decremento en la concentración de verbascósido después de 24 ( $0.08 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$  para los cultivos tratados *contra*  $0.10 \pm 0.003 \text{ g L}^{-1}$  para los cultivos control) y 48 (decremento del 53.3%, con una producción de  $0.05 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ ) horas de exposición. Además, después de adicionar 50  $\mu\text{M}$  al tiempo  $t_0$ , se observó una disminución del 21.3% después de 48 horas de exposición ( $0.08 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$  *contra*  $0.11 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ ) (**Figura 13b**). Por el contrario, al adicionar MeJa 100 y 200  $\mu\text{M}$  al  $t_9$ , un incremento del 132% ocurrió después de 24 horas de exposición ( $2.06 \pm 0.15 \text{ g L}^{-1}$  en los cultivos tratados, frente a  $1.56 \pm 0.07 \text{ g L}^{-1}$  en los cultivos control). Los efectos fueron estadísticamente significativos con 50  $\mu\text{M}$  MeJa después de 24 horas de exposición, ya que la producción del metabolito se incrementó un 176.2% ( $2.75 \pm 0.14 \text{ g L}^{-1}$ ). Sin embargo, los efectos más considerables se observaron después de 48 horas de elicitación: 213.6% con 50  $\mu\text{M}$  ( $4.8 \text{ g L}^{-1}$ ) y 138.1% con 100  $\mu\text{M}$  ( $3.1 \text{ g L}^{-1}$ ) en comparación con el tratamiento control ( $2.25 \text{ g L}^{-1}$ ) (**Figura 14b**). Con base en los resultados, es posible asegurar que de los tiempos evaluados en este trabajo respecto a la adición de MeJa para mejorar la producción de verbascósido, las células en suspensión de *B. cordata* respondieron mejor cuando el elicitador fue adicionado en la fase exponencial tardía

(*t*<sub>9</sub>). Este resultado es consistente con otros trabajos sobre el impacto positivo de MeJa aplicado a cultivos *in vitro*, especialmente al ser incorporados durante la fase exponencial tardía de crecimiento, como en el caso de células en suspensión de *Mentha x piperita* (Krzyzanowska *et al.*, 2012) y *Cistanche tubulosa* (Liu *et al.*, 2018b), así como en cultivos de raíces de *Rehmannia glutinosa* (Piątczak *et al.*, 2016). Es posible que la respuesta positiva sobre la biosíntesis de metabolitos especializados sea consecuencia del estatus metabólico/genético propio de las células durante la etapa exponencial de crecimiento, es decir, la combinación de altas concentraciones de enzimas y proteínas en conjunto con la continua renovación de proteínas y tasas de expresión génica elevadas es necesaria para proveer a las células de los recursos necesarios para recibir, traducir y convertir las señales químicas en productos metabólicos (Vasconsuelo y Boland 2007; Antognoni *et al.*, 2012). Por otro lado, en la literatura también hay trabajos que reportan que los máximos niveles de producción de PhGs fueron logrados luego de incorporar el elicitador durante la fase temprana de crecimiento, por ejemplo, en cultivos celulares de *Coleus blumei* (Szabo *et al.*, 1999) y *Teucrium chamaedrys* (Antognoni *et al.*, 2012), cultivos embriogénicos en suspensión de *Eleutherococcus sessiliflorus* (Shohael *et al.*, 2008) y cultivos de raíces adventicias de *Eleutherococcus koreanum* (Lee *et al.*, 2015). Los denominados 'elicitores' son compuestos que *in planta* tienen la capacidad de desencadenar la producción de respuestas metabólicas de defensa. Por esta razón, la elicitación exógena es una de las estrategias biotecnológicas más empleadas para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* (Vasconsuelo y Boland 2007; Yue *et al.*, 2016). El origen y la naturaleza química de los elicitores son muy heterogéneos (**Tabla 3**), entre ellos se encuentran moléculas señal de origen biológico que incluyen a las especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y metil jasmonato, los cuales han demostrado ser elementos químicos que promueven la biosíntesis de alcaloides, terpenoides y fenilpropanoides (Krzyzanowska *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2016).



**Figura 13.** Efecto de metil jasmonato (0, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ ) sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto en el día 0 de cultivo ( $t_0$ ). Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.



**Figura 14.** Efecto de Metil jasmonato (0, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ ) sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto en el día 9 de cultivo ( $t_9$ ). Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

En todos los estudios (incluyendo el presente trabajo), el éxito del proceso de elicitación ha dependido en gran medida de la manipulación caso-específico de variables que difieren de las respuestas dependientes del crecimiento: por ejemplo, del tipo y la concentración del compuesto elicitor. En el caso particular de la producción *in vitro* de PhGs empleando MeJa, el rango es amplio: en el límite más bajo se emplean concentraciones de 100 and 200  $\mu\text{M}$ , como

en el caso de cultivos embriogénicos en suspensión de *Eleutherococcus sessiliflorus* (Shohael *et al.*, 2008). En el límite más alto, Antognoni *et al.* (2012), encontraron que MeJa a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ , favorecía la producción de teucrósido (un PhG) en cultivos en suspensión de *Teucrium chamaedrys*.

En el presente trabajo, las células de *B. cordata* mostraron mayor sensibilidad a una concentración más baja (50  $\mu\text{M}$ ), lo cual además de significar una ventaja práctica en cuanto a inversión de recursos, fomenta el uso de la línea debido a sus inherentes características genéticas/metabólicas. El tiempo de exposición del elicitador es otra de las variables críticas implicadas en el proceso de elicitación. Trabajos previos han mostrado que este factor depende en gran medida de la especie, así como del tipo de cultivo; los mejores tiempos de respuesta al elicitador varían entre 16 y 72 horas. Como se ha descrito, la más alta producción del compuesto se observó después de 24 y 48 horas, intervalo de tiempo situado en la media de lo reportado por otros autores. En este punto es importante mencionar que en experimentos previos también se evaluó el efecto de MeJa después de 6 y 12 horas; sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles correspondientes.

Por otro lado, la adición de MeJa también tuvo efectos estadísticamente significativos sobre la acumulación de biomasa. Por ejemplo, cuando el compuesto fue agregado al  $t_0$ , y con una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , la biomasa disminuyó en un 21% después de 48 horas de exposición (1.5 g PS L<sup>-1</sup> para los cultivos tratados contra 1.9 g PS L<sup>-1</sup> para los cultivos control) (**Figura 13a**). La misma concentración, pero añadida al  $t_9$ , también provocó un efecto negativo. En este caso, la acumulación de biomasa disminuyó 6.5% después de 24 horas (7.2 g PS L<sup>-1</sup> para los cultivos tratados contra 7.7 g PS L<sup>-1</sup> para los tratamientos control), y 17.6% después de 48 h de exposición (7 g PS L<sup>-1</sup> contra 8.5 g PS L<sup>-1</sup>). Es decir que, de entre las concentraciones evaluadas, la más alta (200  $\mu\text{M}$ ), independientemente del tiempo de adición y/o tiempo de exposición, fue principalmente perjudicial para la acumulación de biomasa. Contrariamente, se registró un incremento del 8.2% en la acumulación de biomasa después de 48 horas de exposición a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de MeJa (9.2 g PS L<sup>-1</sup>) (**Figura 14a**).

El efecto de MeJa sobre el crecimiento celular también ha sido probado en cultivos *in vitro* de diferentes especies vegetales, tales como *Coleus blumei* (Szabo *et al.*, 1999), *Mentha x piperita* (Krzyzanowska *et al.*, 2012), *Teucrium chamaedrys* (Antognoni *et al.*, 2012), *Eleutherococcus*

*sessiliflorus* (Shohael *et al.*, 2008), y *Rehmannia glutinosa* (Piątczak *et al.*, 2016). En todos los casos con efectos perjudiciales, la concentración de MeJa con la cual se observó tal resultado varió (dependiendo de la especie) entre 150 y 500  $\mu\text{M}$ .

En general, el efecto del metil jasmonato (como cualquier otra molécula elicitora), inicia con su unión a proteínas receptoras ubicadas en la membrana plasmática celular (unión reversible mediante procesos de fosforilación/desfosforilación *via* proteínas de membrana y citosólicas), lo cual a su vez desencadena la activación de vías de transducción de señales, flujos iónicos (principalmente influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ ), alcalinización extracelular y acidificación del citoplasma, activación de la vía MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), activación de NADPH oxidasa y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), expresión de genes involucrados en la respuesta de defensa primaria, producción de jasmonato, etileno, ácido abscísico y expresión de genes involucrados en la respuesta de defensa secundaria; respuestas que conducen a la potenciación de los procesos biosintéticos de metabolitos secundarios (Zhao *et al.*, 2005; Ramirez-Estrada *et al.*, 2016). En células en suspensión de *Arabidopsis thaliana*, el efecto de MeJa ha sido asociado con la inducción diferencial tiempo-dependiente de genes pertenecientes a diversas clases funcionales. Por ejemplo, genes involucrados en la regulación transcripcional de la biosíntesis de jasmonato son inducidos antes que aquellos comprometidos con el arresto del ciclo celular y la activación de genes de defensa vegetal (incluyendo la biosíntesis de fenilpropanoides), habilitando el flujo de energía y sustratos (carbono) del metabolismo primario hacia el secundario (Pauwels *et al.*, 2008). Es decir que, entre muchas respuestas bioquímicas, la transducción de señales implica la eventual sobreexpresión transcripcional de genes de defensa que incluyen genes codificantes de enzimas como PAL (Isah *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018a). La observación sobre la expresión diferencial de genes, que implica tanto el arresto del ciclo celular (es decir la división celular y por ende la acumulación de biomasa), así como la expresión de genes del metabolismo secundario, podría explicar la observación anterior sobre el efecto en la disminución de biomasa en los cultivos por un lado y por otro el incremento en la producción de verbascósido. Probablemente por la acción *per se* del metil jasmonato o bien como resultado de la amplificación de la *vía* de señalización, es decir que la adición exógena de MeJa posiblemente incrementó la síntesis de jasmonato y sus derivados (como MeJa), de este modo permitiendo que el proceso de elicitación afectara a un mayor número de células, y resultando en el aumento de la producción de verbascósido. Es decir, una clásica respuesta metabólica a

una molécula señal asociada con la puesta en marcha de los mecanismos de defensa vegetal contra agresiones ambientales de naturaleza biótica o abiótica (Antognoni *et al.*, 2012). Hace falta llevar a cabo estudios en *B. cordata* que corroboren lo anterior.

Reportes previos han señalado que la biosíntesis de PhGs es particularmente receptiva a la adición externa de MeJa como compuesto elicitador (Shohael *et al.*, 2008; Antognoni *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015; Piątczak *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018b). No obstante, como se aprecia en el presente trabajo, su uso en cultivos *in vitro* vegetales requiere de procedimientos de evaluación caso-específicos para determinar la especificidad del elicitador, la concentración óptima, su tiempo de exposición, los cuales pueden afectar el estatus genético y fisiológico en el cual las células en cultivo podrían ser más susceptibles a su acción (Liu *et al.*, 2018b).

Adicionalmente, ha sido reportado un efecto sinérgico entre elicitores y precursores de la síntesis de metabolitos secundarios. Qu *et al.* (2011), encontraron que en cultivos de células en suspensión de *Vitis vinifera*, la combinación de L-Phe y MeJa beneficiaba la biosíntesis de antocianinas (compuestos flavonoides), multiplicando 4.6 veces su producción. Esta observación justificó evaluar el efecto de las dos moléculas sobre el crecimiento y producción de verbascósido, partiendo de las condiciones óptimas determinadas previamente para cada compuesto (L-Phe y MeJa). Sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos en comparación con las concentraciones de producto obtenidas sólo con el precursor (**Figuras 10b y 11b**).

No obstante, como se muestra en la **Tabla 7**, las concentraciones de verbascósido generadas con L-Phe (1.96 g L<sup>-1</sup>, 600 µM) y con MeJa (4.8 g L<sup>-1</sup>, 50 µM; 3.1 g L<sup>-1</sup>, 100 µM) son comparables (y en muchos casos superiores) a los valores previos reportados para verbascósido y/o otros PhGs, cuya producción ha sido intensificada mediante el uso de diversas estrategias biotecnológicas en diferentes cultivos de tejidos y células vegetales *in vitro*. Lo anterior es significativo, no sólo por las cualidades de la línea celular de *B. cordata* sino sobre todo porque puede ser empleada para escalar la producción de verbascósido. Múltiples estudios sustentan la utilidad de los cultivos celulares en suspensión como modelo para la producción de PhGs a nivel reactor (Ouyang *et al.*, 2005b; Shohael *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015; Vázquez-Márquez *et al.*, 2019) y en particular de verbascósido (Georgiev *et al.*, 2011a; Medina-Pérez *et al.*, 2015; Ahmadi-Sakha *et al.*, 2016).

**Tabla 7.** Comparación de los rendimientos de producción de PhGs y/o verbascósido cuya biosíntesis fue mejorada *vía* diversas estrategias biotecnológicas en diferentes sistemas vegetales cultivados *in vitro*.

Producto	Sistema de producción	Estrategia biotecnológica	Rendimiento en el control	Rendimiento después del tratamiento	Referencia
Verbascósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Leucosceptera japonicum</i> f. <i>barbinerve</i>	Variaciones en el medio de cultivo basal	1.87 g L <sup>-1</sup> PS	2.43 g L <sup>-1</sup> PS	Inagaki et al., 1991
Verbascósido	Cultivos de raíces de <i>Paulownia tomentosa</i>	Variaciones en el medio de cultivo basal	No determinado	94.9 mg g <sup>-1</sup> eq. 1.21 g L <sup>-1</sup> PS	Wysokińska y Rózga, 1998
Equinacósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Elicitor fúngico de <i>Fusarium solani</i>	No publicado	14.7 mg g <sup>-1</sup> PS	Lu y Mei, 2003
Verbascósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Mezcla de elementos raros de la Tierra	0.6 g L <sup>-1</sup> PS	8.9 mg g <sup>-1</sup> PS	Ouyang et al., 2003
PhGs	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Leche de coco	69 mg L <sup>-1</sup> PS	87.1 mg L <sup>-1</sup> PS	Cheng et al., 2005a
PhGs	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Hidrolizado de caseína	69 mg L <sup>-1</sup> PS	103 mg L <sup>-1</sup> PS	
		L-Phe	69 mg L <sup>-1</sup> PS	106 mg L <sup>-1</sup> PS	
		Prolina	69 mg L <sup>-1</sup> PS	117 mg L <sup>-1</sup> PS	
PhGs	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Elicitor de levadura	129 mg L <sup>-1</sup> PS	317.8 mg L <sup>-1</sup> PS	Cheng et al., 2005b
PhGs	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Alimentación con precursor (L-Phe)	0.628 g L <sup>-1</sup> PS	1.10 g L <sup>-1</sup> PS	Ouyang et al., 2005a
PhGs	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Elicitación con quitosano	137.2 mg L <sup>-1</sup> PS	364.6 mg L <sup>-1</sup> PS	Cheng et al., 2006
Equinacósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Elicitación en dos etapas	505.1 mg L <sup>-1</sup> PS	1.7 g L <sup>-1</sup> PS	Chen et al., 2007
Verbascósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Alimentación con precursor (L-Phe+L-Tyr+cucumber juice)	209.4 mg L <sup>-1</sup> PS	0.4 g L <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche salsa</i>		294.6 mg L <sup>-1</sup> PS	689.4 mg L <sup>-1</sup> PS	Liu JY et al., 2007
Equinacósido			370.1 mg L <sup>-1</sup> PS	640.8 mg L <sup>-1</sup> PS	
2'-acetilacetósido			28.2 mg L <sup>-1</sup> PS	54.9 mg L <sup>-1</sup> PS	
PhGs	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche deserticola</i>	Estrés Osmótico	20.7 mg g <sup>-1</sup> PS	26.9 mg g <sup>-1</sup> PS	Liu y Cheng, 2008



Eleuterósido B	Cultivos embriogénicos en suspensión de <i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	Meja	0.038 mg g <sup>-1</sup> PS	0.138 mg g <sup>-1</sup> PS	Shohaël et al., 2008
Eleuterósido E			0.065 mg g <sup>-1</sup> PS	0.174 mg g <sup>-1</sup> PS	
Eleuterósido E1			0.072 mg g <sup>-1</sup> PS	0.184 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Cultivo de callos de <i>Buddleja cordata</i>	Cultivo en suspensión	86.26 mg g <sup>-1</sup> PS	116.36 mg g <sup>-1</sup> PS	Estrada-Zúñiga et al., 2009
Verbascósido	Cultivos de raíces de <i>Verbascum xanthophloeum</i>	Transformación de raíces mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	3.48 mg g <sup>-1</sup> PS	23.3 mg g <sup>-1</sup> PS	Georgiev et al., 2011b
Verbascósido	Cultivos de raíces de <i>Scutellaria lateriflora</i>	Extracto de levadura <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	18.5 mg g <sup>-1</sup> PS	25.9 mg g <sup>-1</sup> PS	Wilczanska-Batska et al., 2012
Teucriósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Teucrium chamaedrys</i>	Elicitación con Meja	10 mg g <sup>-1</sup> FW	50 mg g <sup>-1</sup> FW	Antognioni et al., 2012
Teucriósido		Prolina	5.08 mg g <sup>-1</sup> FW	30.18 mg g <sup>-1</sup> FW	
Teucriósido		Hidroxiprolina	5.08 mg g <sup>-1</sup> FW	73.16 mg g <sup>-1</sup> FW	
Teucriósido		Combinación of prolina e hydroxyprolina	5.08 mg g <sup>-1</sup> FW	51.05 mg g <sup>-1</sup> FW	
Verbascósido	Cultivo de tejidos de <i>Plantago lanceolata</i> L.	Relación NH <sup>+</sup> <sub>4</sub> /NO <sup>-</sup> <sub>3</sub> Y concentración de la fuente de N		13.0 mg g <sup>-1</sup> PS	Gonda et al., 2014
Plantanaósido				35.4 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Cultivos de brotes de <i>Cistanche tenuiflora</i>	Elicitor fúngico de <i>Fusarium oxysporum</i>	19.19 mg g <sup>-1</sup> PS	94.66 mg g <sup>-1</sup> PS	Cardenas-Sandoval et al., 2015
Isoverbascósido			14.11 mg g <sup>-1</sup> PS	54.3 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche salsa</i>	Efecto de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	380 mg L <sup>-1</sup> PS	510 mg L <sup>-1</sup> PS	Chen et al., 2015
Equinacósido			480 mg L <sup>-1</sup> PS	589.3 mg L <sup>-1</sup> PS	
2'-acetilacteosido			17.6 mg L <sup>-1</sup> PS	30.6 g L <sup>-1</sup> PS	
Eleuterósido B	Cultivos de raíces adventicias de <i>Eleutherococcus koreanum</i> Nakai	Meja	0.276 mg L <sup>-1</sup> PS	0.275 mg L <sup>-1</sup> PS	Lee et al., 2015
Eleuterósido E			0.916 mg L <sup>-1</sup> PS	1.193 mg L <sup>-1</sup> PS	
Ácido clorogénico			66.95 mg L <sup>-1</sup> PS	78.22 mg L <sup>-1</sup> PS	
Eleuterósido B		Ácido salicílico	0.276 mg L <sup>-1</sup> PS	2.329 mg L <sup>-1</sup> PS	

Eleuterósido E				0.916 mg L <sup>-1</sup> PS	0.919 mg L <sup>-1</sup> PS	
Ácido Clorogénico				66.95 mg L <sup>-1</sup> PS	65.96 mg L <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Cultivos de brotes de <i>Castilleja tenuiflora</i>	Deficiencia de nitrógeno		57.6 mg g <sup>-1</sup>	113.9 mg g <sup>-1</sup> PS	Medina-Pérez et al., 2015
Isoverbascósido				21.3 mg g <sup>-1</sup>	36.4 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Cultivos de raíces de <i>Rehmannia glutinosa</i>	Meja		100.14 mg L <sup>-1</sup> PS	845.45 mg L <sup>-1</sup> PS	Piątczak et al., 2016
Isoverbascósido				4.58 mg L <sup>-1</sup> PS	24.94 mg L <sup>-1</sup> PS	
Catalpol				17.15 mg L <sup>-1</sup> PS	29.68 mg L <sup>-1</sup> PS	
Harpágrado				0.29 mg L <sup>-1</sup> PS	1.86 mg L <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Cultivos <i>in vitro</i> de <i>Verbena officinalis</i>	Luz artificial continua		7.48 mg g <sup>-1</sup> PS	24.54 mg g <sup>-1</sup> PS	Kubica et al., 2017
Verbascósido		Oscuridad		7.48 mg g <sup>-1</sup> PS	21.35 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Cistanche tubulosa</i>	Meja		2.36 mg g <sup>-1</sup> PS	52.4 mg g <sup>-1</sup> PS	Liu X et al., 2018
Equinacósido				117.7 mg g <sup>-1</sup> PS	211.8 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido		Ácido salicílico		22.4 mg g <sup>-1</sup> PS	28.9 mg g <sup>-1</sup> PS	
Equinacósido				123.5 mg g <sup>-1</sup> PS	130.3 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido		Alimentación con precursor (L-Tyr)		21 mg g <sup>-1</sup> PS	29.3 mg g <sup>-1</sup> PS	
Equinacósido				121.5 mg g <sup>-1</sup> PS	163.7 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido		Alimentación con precursor (L-Phe)		21 mg g <sup>-1</sup> PS	26.8 mg g <sup>-1</sup> PS	
Echinacósido				121.5 mg g <sup>-1</sup> PS	168.6 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Brotes de <i>Plantago media</i> cultivados <i>in vitro</i>	Explantos micropropagados		0.64 mg g <sup>-1</sup> PS	20.65 mg g <sup>-1</sup> PS	Budzianowska et al., 2019
Plantamajósido				7.69 mg g <sup>-1</sup> PS	44.08 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Raíces de <i>Plantago media</i> cultivadas <i>in vitro</i>	Explantos micropropagados		0.64 mg g <sup>-1</sup> PS	7.09 mg g <sup>-1</sup> PS	
Plantamajósido				7.69 mg g <sup>-1</sup> PS	44.08 mg g <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido	Cultivos celulares en suspensión de <i>Buddleja cordata</i>	Alimentación con precursor (L-Phe)		1.51 g L <sup>-1</sup> PS	1.96 g L <sup>-1</sup> PS	Este trabajo
Verbascósido		Meja 50 µM		2.25 g L <sup>-1</sup> PS	4.8 g L <sup>-1</sup> PS	
Verbascósido		Meja 100 µM		2.25 g L <sup>-1</sup> PS	3.1 g L <sup>-1</sup> PS	

### **8.3 Dilucidación de las enzimas que participan en la síntesis de verbascósido en *B. cordata*: residuos de ácido caféico e hidroxitirosol**

Los inhibidores enzimáticos son valiosas herramientas en estudios bioquímicos y fisiológicos; han sido empleados en la dilucidación de mecanismos enzimáticos, así como de sitios activos. Los inhibidores enzimáticos específicos son especialmente útiles para el estudio de rutas metabólicas *in vivo*, además dependiendo del organismo que porte la enzima blanco pueden funcionar como droga, toxina, antibiótico, herbicida, etc. (Zón y Amrhein, 1992; Appert *et al.*, 2003). Su uso ha contribuido al esclarecimiento de algunas reacciones enzimáticas que forman parte de rutas biosintéticas de PhGs en general (Reuber *et al.*, 1993; Gaisser y Heide, 1996; Hu *et al.*, 2011b), y también del verbascósido en particular (Saimaru y Orihara, 2010).

#### **8.3.1 La inhibición de la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.24) disminuyó la producción de verbascósido**

En las plantas superiores, una significativa cantidad del carbono fijado es redirigido por fenilalanina amonio liasa (PAL) desde el metabolismo primario hacia el metabolismo secundario, entre otras, hacia la ruta de los fenilpropanoides (**Figura 2**). La PAL cataliza la eliminación de amonio del aminoácido aromático L-fenilalanina para producir ácido *trans*-cinámico, precursor de un amplio espectro de compuestos, tales como polifenoles flavonoides, polifenoles no-flavonoides y algunos alcaloides (Perassolo *et al.*, 2007). Debido a la función clave de PAL en un punto de inflexión del metabolismo, los inhibidores de esta enzima han sido empleados para estudiar el rol bioquímico y fisiológico de compuestos que son derivados biosintéticamente del ácido *trans*-cinámico (Appert *et al.*, 2003).

Muchos inhibidores de PAL han sido descritos en la literatura, sobre todo compuestos aminofosfatados. Por mencionar algunos:

- Ácido  $\alpha$ -aminooxiacético, (AOA, por sus siglas en inglés:  $\alpha$ -aminooxyacetic acid).
- Ácido 2-aminooxi-3-fenipropanóico, (AOPP, por sus siglas en inglés, (S)-2-aminooxy-3-phenylpropanoic acid).
- Ácido fosfónico (1-amino-2-feniletíl) (APEP, por sus siglas en inglés, (R)-(1-amino-2-phenylethyl)phosphonic acid).

- Ácido 2-aminoindan-2-carboxílico, (AIC, por sus siglas en inglés: 2-aminoindan-2-carboxylic acid)
- Ácido 2-aminoindan-2-fosfónico, (AIP, por sus siglas en inglés: 2-aminoindan-2-phosphonic acid).

El inhibidor AIP es un compuesto usado con frecuencia en cultivos vegetales *in vitro* (Cvikrová *et al.*, 2003; Perassolo *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2011), se ha reportado como el inhibidor específico de la enzima PAL *in vivo* con el potencial más alto (Zón y Amrhein, 1992; Appert *et al.*, 2003; Perassolo *et al.*, 2007). Con la finalidad de evaluar su acción sobre la producción de biomasa y, sobre todo, del metabolito verbascósido, el inhibidor fue aplicado al inicio del cultivo ( $t_0$ ) en concentraciones finales de 10, 40 y 100  $\mu\text{M}$ . El efecto del compuesto fue evaluado durante 21 días ( $t_{21}$ ), los resultados se muestran en la **Figura 15**.

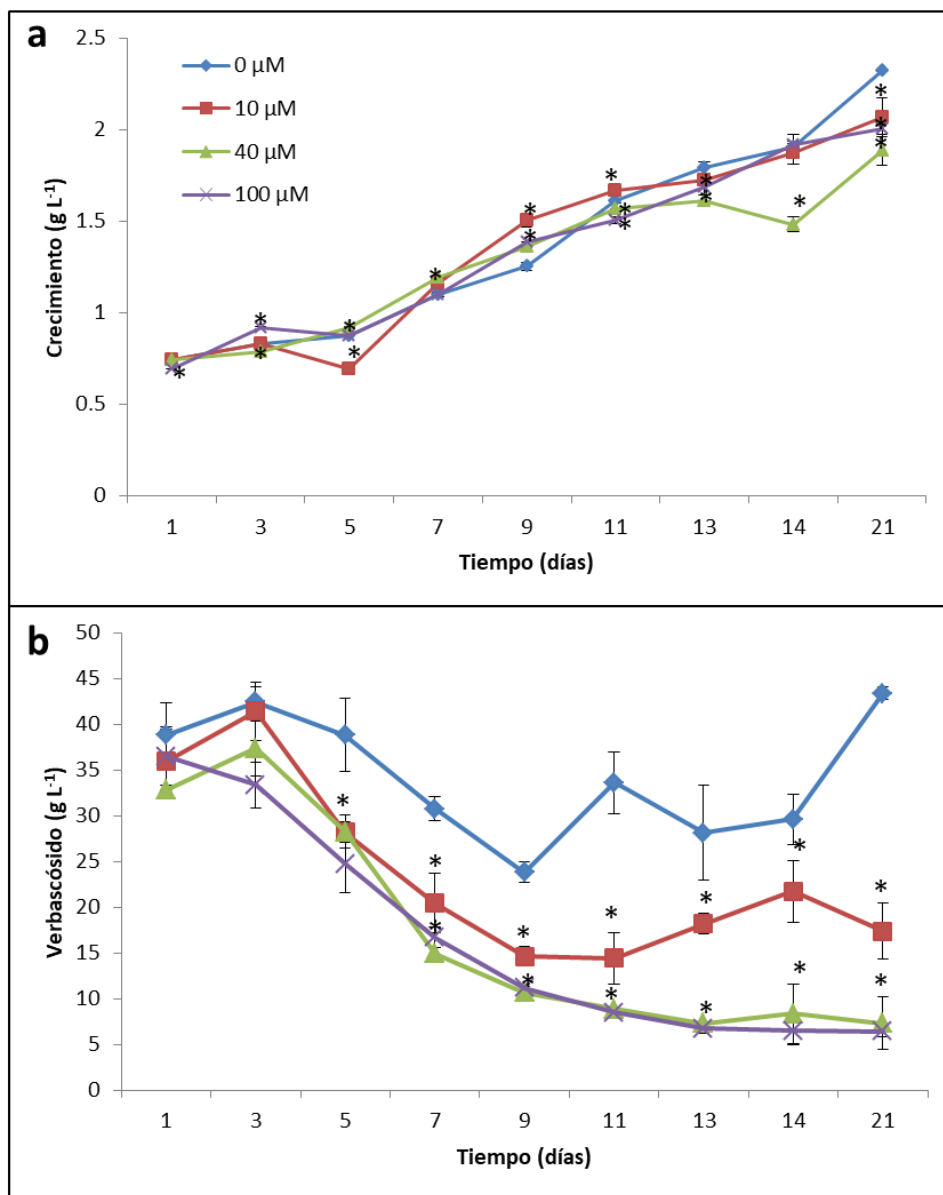
Se observaron cambios estadísticamente significativos en la producción de biomasa, efecto que dependió de la concentración del inhibidor y del tiempo de exposición (**Figura 15**). La concentración 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor causó la disminución del 20.8% en la producción de biomasa; posteriormente aumentó la producción desde el  $t_7$  y hasta el  $t_{11}$  (momento en el cual terminó la fase exponencial e inició la fase estacionaria) ( $t_7$ , 5.9%;  $t_9$ , 20%;  $t_{11}$ , 3.6%). En adelante, disminuyó la producción  $t_{13}$ , 3.86%;  $t_{14}$ , 1.6%;  $t_{21}$ , 11%. La concentración 40  $\mu\text{M}$  del inhibidor causó un incremento en la producción de biomasa desde el día 5 de exposición ( $t_5$ ) hasta el día 9 ( $t_9$ ), con aumentos entre el 5 y el 10%. Por el contrario, con las concentraciones más altas del inhibidor (40 y 100  $\mu\text{M}$ ), después del día 11 ( $t_{11}$ ) y hasta el final del experimento ( $t_{21}$ ), la biomasa disminuyó entre 2.5 y 22% (por ejemplo al  $t_{21}$ ) (**Figura 15a**). Respecto al efecto del inhibidor sobre la producción de verbascósido, de acuerdo con el análisis estadístico, se observó que la concentración del compuesto fue notablemente afectada a partir del quinto día de exposición ( $t_5$ ) y hasta el final del experimento ( $t_{21}$ ) con todas las concentraciones evaluadas (**Figura 15b**). Se registró una disminución estadísticamente significativa en la producción del metabolito del 30% y de ahí en adelante decrece en paralelo con el avance del tiempo de exposición, con una disminución final del 84%. Al igual que en el caso de la biomasa, aunque 10  $\mu\text{M}$  también tuvo efectos estadísticamente significativos, las concentraciones con mayor efecto inhibitorio sobre la biosíntesis de verbascósido fueron 40 y 100  $\mu\text{M}$ .

En la bibliografía, los trabajos que describen los efectos de la inhibición química de la enzima PAL con AIP se centran en la división y crecimiento celular, y son muy variables dependiendo de

la especie vegetal. Por ejemplo, se han documentado consecuencias perjudiciales en el crecimiento de hojas primordiales de centeno (*Secale cereale* L.) al emplear concentraciones mayores a 40  $\mu\text{M}$  (Reuber et al., 1993). Asimismo, se retardó el crecimiento de cultivos de *Spirodela punctata* (Janas et al., 1998), disminuyó la biomasa en cultivos celulares de alfalfa (*Medicago sativa* L.) después de adicionar 100  $\mu\text{M}$  al medio de cultivo (Hrubcová et al., 2000). Osiecka y Janas (1998) reportaron la disminución en el crecimiento de plántulas y raíces de *Vicia faba* al utilizar una alta concentración del inhibidor (100  $\mu\text{M}$ ). Además, en células meristemáticas de la misma especie vegetal, se reportó la ralentización del ciclo celular y de la tasa mitótica como resultado de la acción de AIP (100  $\mu\text{M}$ ) (Cvikrová et al., 2003). Contrariamente, la aplicación de AIP (10  $\mu\text{M}$ ) en cultivos de células en suspensión de alfalfa provocó un incremento en la tasa de división celular en comparación con los cultivos controles (Cvikrová et al., 1999). Este efecto estimulador también ha sido reportado con ácido 2-aminooxi-3-fenipropanóico (AOPP), otro inhibidor de la enzima PAL. En una situación diferente, el uso de AIP (0.5 y 2  $\mu\text{M}$ ) en cultivos celulares de *Cistanche deserticola* no reportó efecto alguno estadísticamente significativo sobre el crecimiento (Hu et al., 2011a).

La inhibición del crecimiento vegetal puede encontrar su causa en múltiples variables, como la drástica reducción en la biosíntesis de fenilpropanoides (Cvikrová et al., 2003), efectos secundarios del inhibidor y/o la acumulación simultánea de almidón durante la inhibición de PAL (Janas et al., 1998). También han sido incluidas alteraciones en la síntesis de proteínas a causa del incremento de L-fenilalanina soluble, es decir algún tipo de inhibición por soluto (Reuber et al., 1993). Osiecka y Janas (1998) señalan que el retraso en el crecimiento celular puede estar asociado con efectos mitodepresores y clastogénicos de algunos aminofosfatos (incluyendo a AIP). Por otro lado, se ha observado que la acumulación de diversos compuestos fenólicos y sus productos oxidativos y poliméricos limitan el crecimiento celular, especialmente en cultivos añejos; por ejemplo, en cultivos celulares en suspensión de tabaco y alfalfa se reportó que los procesos de crecimiento y la acumulación de compuestos fenólicos estaban inversamente relacionados (Cvikrová et al., 1999); por ende, después de inhibir la acción de PAL, se promovió la actividad mitótica durante el ciclo celular. Esta indicación podría explicar el aumento de biomasa durante los primeros días después de la adición del inhibidor ( $t_3-t_9$ ) (Figura 15a) y la posterior disminución en la velocidad específica de crecimiento por ejemplo: control,  $0.166\pm 0.012 \text{ d}^{-1}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ,  $0.1016\pm 0.007 \text{ d}^{-1}$ ; 40  $\mu\text{M}$   $0.0876\pm 0.014 \text{ d}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{M}$   $0.0813\pm 0.007 \text{ d}^{-1}$ . Por otro lado, no fue posible calcular la velocidad

específica de producción debido a que los datos no se ajustaron a un comportamiento lineal por lo que podría concluirse la desvinculación entre la producción de verbascósido y el crecimiento, fenómeno que ha sido previamente reportado en cultivos celulares de *B. cordata* por efecto de la velocidad de agitación en bioreactor (Vazquez-Márquez *et al.*, 2019). Sin embargo, para conformar esa última idea valdría la pena llevar a cabo estudios sobre la cuantificación de fenoles totales. *Este patrón de comportamiento inhibitorio observado en células de B. cordata sobre la concentración de verbascósido es muy similar al observado en cultivos celulares en suspensión de Cistanche deserticola* Hu *et al.*, (2011a). Igualmente, el inhibidor fue aplicado al momento de la inoculación, su efecto sobre el metabolismo no se observó hasta después de dos días de cultivo, el cual independientemente de la concentración evaluada, aumentó a la par del tiempo de exposición. La disminución en la concentración de compuestos fenólicos totales fue del 50.1 al 91.1% con 0.5  $\mu\text{M}$  y del 41.5 al 89.9% con 2  $\mu\text{M}$ , rangos similares a los obtenidos en este trabajo. *El inhibidor afectó a la producción general de PhGs y, en particular, de verbascósido, equinacósido y tubulósido A.*



**Figura 15.** Efecto del inhibidor ácido 2-aminoindan-2-fosfónico, (AIP, 0, 10, 40 y 100  $\mu\text{M}$ ) sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto al momento de la inoculación ( $t_0$ ). Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

*La acción de AIP ha limitado la producción de fenilpropanoides en otros sistemas in vitro, como en cultivos celulares en suspensión de Medicago sativa L. (Cvikrová et al., 1999; Hrubcová et al., 2000), Rubia tinctorum (Perassolo et al., 2007), hojas de Secale cereale L. (Reuber et al., 1993) así como en células meristemáticas de Vicia faba (Cvikrová et al., 2003). Los resultados obtenidos enfatizan la importancia de la actividad enzimática de PAL en la biosíntesis de*

verbascósido por *B. cordata*, que coincide con lo reportado para otros fenilpropanoides (**Figura 2**) y en especial de PhGs, incluyendo verbascósido (**Figura 6**) (Korkina, 2007; Vogt, 2010; Kumar y Goel, 2019; Vanholme *et al.*, 2019).

Usualmente, AIP se emplea en concentraciones entre 20-30  $\mu\text{M}$ . No obstante, en muchos experimentos, dependiendo de la especie, se requieren concentraciones más altas, por ejemplo, por encima de 50-100  $\mu\text{M}$  o bien, por debajo de 10-2  $\mu\text{M}$  (Osiecka y Janas, 1998; Hu *et al.*, 2011). Esto quiere decir que al igual que en el caso de los precursores y/o compuestos elicitores, el uso de inhibidores implica la manipulación caso-específico de las variables como la concentración del elicitador y el tiempo de exposición (factor que, dependiendo de la pregunta de investigación, puede variar entre horas y días). Por otro lado, el aminoácido aromático L-fenilalanina es sustrato de diversas reacciones en el metabolismo, incluyendo la biosíntesis de polipéptidos, por lo que es indispensable contar con inhibidores que sean estrictamente específicos para la reacción deseada, de otro modo, los inhibidores no específicos podrían intervenir con diversas rutas biosintéticas y ello por tanto podría complicar o imposibilitar la interpretación de un inhibidor observado *in vivo* (Appert *et al.*, 2003).

### **8.3.2 La inhibición de enzimas involucradas en la síntesis de hidroxitirosol disminuyó la producción de verbascósido**

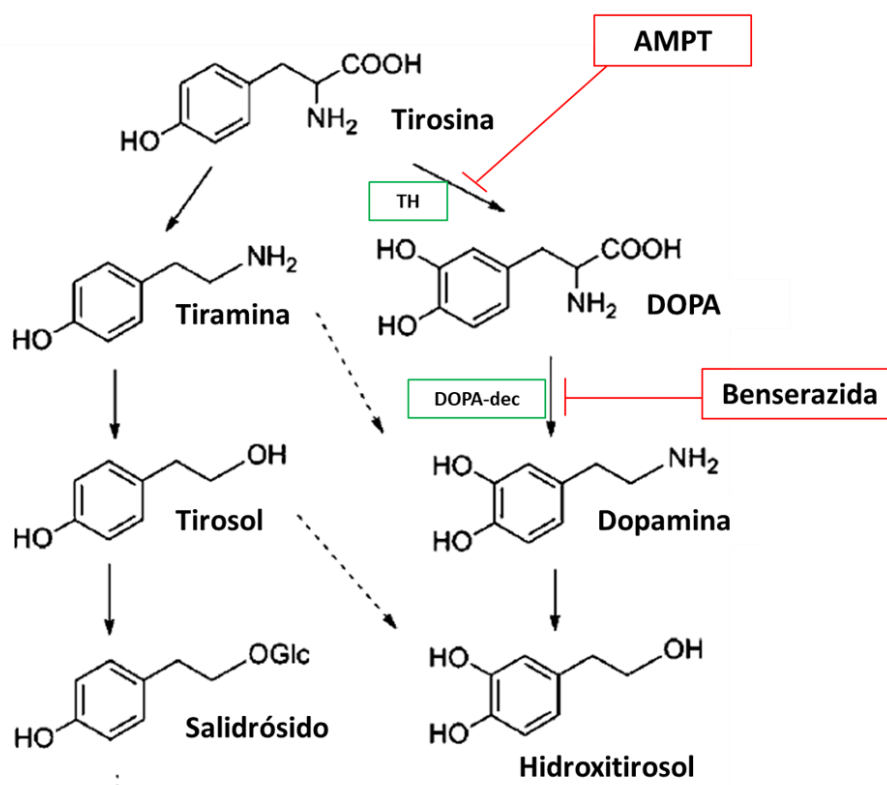
El hidroxitirosol es uno de los elementos hidroxifeniletíl fundamentales en la estructura de los feniletanoide glicósidos (**Figura 3**), como es el caso del metabolito verbascósido (**Figura 5**). En células de olivo (*Olea europaea* L.) y mediante el uso de precursores marcados radioactivamente, así como de los inhibidores AMPT ( $\alpha$ -Metil Tirosina) y benserazida, Saimaru y Orihara (2010) describieron que la molécula de hidroxitirosol era sintetizada principalmente a partir del aminoácido aromático tirosina vía DOPA y dopamina. Reportaron además que la especie cuenta con rutas alternas, por ejemplo, de tiramina a dopamina o de tirosol a hidroxitirosol (**Figura 16**). Recientemente, estas otras rutas también han sido mencionadas en trabajos relacionados con la síntesis de verbascósido (Wang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2020) (*ver Figura 6*).

La conversión de tirosina a DOPA (L-3,4-dihidroxifenil-L-alanina) involucra la hidroxilación del aminoácido por una tirosina hidroxilasa (TH, cuya acción es inhibida por AMPT).



Posteriormente, mediante una reacción de descarboxilación catalizada por la enzima DOPA-decarboxilasa (Tir/DopaDC, EC 4.1.1.25, cuya acción es inhibida por benserazida), DOPA es convertida en dopamina (**Figura 16**).

Con el propósito de generar información sobre la síntesis de hidroxitirosol y su importancia en la biosíntesis de verbascósido en la línea celular de *B. cordata*, se examinó la acción de los inhibidores AMPT y benserazida. Los inhibidores fueron incorporados de forma independiente a los cultivos en el  $t_{15}$ , de cultivo en concentraciones finales de 0.5, 1.0 y 2.0 mM para AMPT y de 0.5, 2.0 y 3.0 mM para benserazida. Después de ser administrados, los cultivos fueron incubados durante dos semanas adicionales, tras las cuales se evaluó su efecto sobre la producción de biomasa y del metabolito verbascósido.

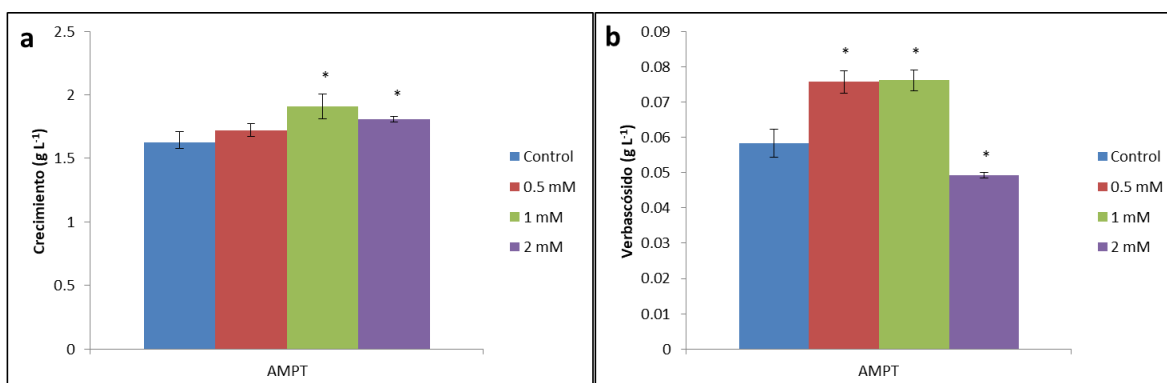


**Figura 16.** Rutas de biosíntesis del compuesto hidroxitirosol en *Olea europaea* L (Saimaru y Orihara, 2010). La ruta principal parte del aminoácido tirosina, el cual es hidroxilado por la enzima tirosina hidroxilasa (TH, cuya acción es inhibida por Metil tirosina 'AMPT') para formar DOPA, el cual a su vez es descarboxilado por la enzima DOPA-decarboxilasa (DOPA-dec, cuya acción es inhibida por benserazida) generando dopamina y ésta a su vez hidroxitirosol.

### 8.3.2.1 Metil tirosina (AMPT), inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa (tirosinasa, EC 1.14.16.2)

Después de 15 días de exposición, la adición del inhibidor AMPT al cultivo celular de *B. cordata* favoreció la acumulación de biomasa, especialmente las concentraciones 1.0 y 2.0 mM, con un aumento del 14% en comparación con el control (**Figura 17a**). En lo concerniente a la producción de verbascósido, causó un incremento del 30% con 0.5 y 1.0 mM; en cambio, con la concentración más alta (2.0 mM) registró una disminución de 15% respecto al control (**Figura 17b**).

Desde los años 60 del siglo pasado se ha documentado el uso de AMPT como un inhibidor eficiente de la tirosina hidroxilasa (tirosinasa, EC. 1.14.16.2), sobre todo en mamíferos como ratas (Rech *et al.*, 1966), conejillos de indias (Spector *et al.*, 1965) e incluso en pacientes humanos (Engelman *et al.*, 1968). Su disposición para el tratamiento de tumores neuroendócrinos (feocromocitomas y paragangliomas, caracterizados por producir y secretar un exceso de catecolaminas) ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (USFDA, por sus siglas en inglés, United States Food and Drug Administration). Además, su eficacia, seguridad y farmacocinética han sido recientemente evaluadas (Naruse *et al.*, 2018). En 2010 Saimaru y Orihara examinaron el efecto del inhibidor sobre la producción de verbascósido en cultivos de olivo, sin embargo, aparentemente no hubo efecto y no hubo mayor discusión al respecto.



**Figura 17.** Efecto de la adición del inhibidor Metil tirosina (AMPT, 0.5, 1.0 y 2.0 mM) después de 15 días de exposición sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto al  $t_{15}$  de cultivo. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

Aunque sólo es necesaria una única reacción de hidroxilación para la producción de DOPA a partir de tirosina, catalizada por una enzima con actividad tirosina hidroxilasa, el mecanismo mediante el cual las plantas productoras de DOPA lo hacen no está en realidad muy claro (Schenck y Maeda, 2018). Han sido descritas por lo menos un par de familias génicas codificantes de enzimas con actividad tirosina hidroxilasa. Por un lado, las enzimas polifenol oxidasa (PPO) que usualmente exhiben tanto actividad oxidasa (EC 1.14.18.1), de monofenol (ej. tirosina) a difenol (ej. DOPA), como actividad catecolasa (EC 1.10.3.1) de difenol a quinonas reactivas en presencia de oxígeno. Por otro lado, están las enzimas tipo-citocromo P450 (CYP76ADs, EC 1.14.16.2), aunque aparentemente los genes codificantes de estas últimas (CYP76AD1, CYP76AD5 o CYP76AD6) sólo se encuentran presentes en plantas productoras de betalainas, compuestos nitrogenados sintetizados únicamente por el taxón Caryophyllales (Tran *et al.*, 2012; Schenck y Maeda, 2018). En cambio, los genes PPO además de encontrarse ampliamente distribuidos en el reino vegetal (en especies codificantes las copias varían entre 1 y 14 en plantas con múltiples genes funcionales PPO), también han sido identificados en algunos procariontes, artrópodos, hongos y animales; usualmente son referidos como tirosinasas y con frecuencia están involucrados en la formación de pigmentos (Tran *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017).

En plantas, las enzimas PPO son consideradas como proteínas de defensa, ya que su expresión aumenta en respuesta a ataques por herbívoros, patógenos y/o heridas (Tran *et al.*, 2012; Araji *et al.*, 2014), pero también están involucradas en la polimerización de exudados en tricomas glandulares, así como en la biosíntesis de pigmentos especializados y otros metabolitos secundarios como fenilpropanoides (Tran *et al.*, 2012; Araji *et al.*, 2014; Schenck y Maeda, 2018).

Se ha observado que, en una sola especie, los diferentes integrantes de la familia PPO muestran patrones regulatorios muy divergentes: pueden ser expresados en diferentes tejidos, o bien, en el mismo tejido, pero en diferentes etapas del desarrollo. Lo anterior sugiere que cada uno de ellos puede tener una variedad de roles dentro de la fisiología y desarrollo de una sola planta (Tran *et al.*, 2012; Araji *et al.*, 2014).

*Juglans regia* (nuez) es una especie vegetal que contiene un solo gen codificante de PPO '*jrPPO1*', cuyo silenciamiento en una línea de embriones somáticos fue analizado a nivel transcripcional (Araji *et al.*, 2014). Se observaron algunas alteraciones en el metabolismo de

compuestos fenólicos y sus derivados; se detectó un notable aumento en la producción de ácidos hidroxicinámicos, como ácidos cumárico, sinápico y ferúlico. Se observó, además, una mayor abundancia de transcritos de genes codificantes de enzimas involucradas en la ruta general de los fenilpropanoides (**Figura 2**), incluyendo trans-cinamato 4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.14.91) y 4-cumaroil-CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12). Simultáneamente, la concentración del metabolito tiramina se multiplicó nueve veces.

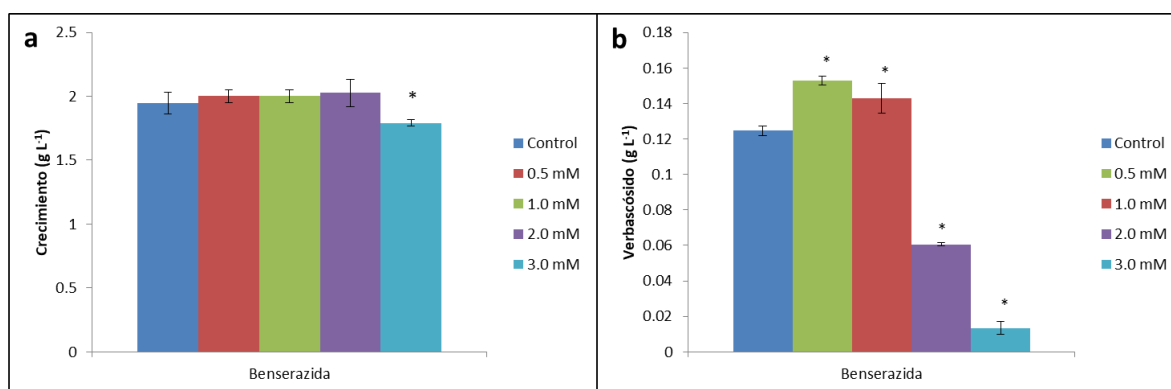
Sin embargo, a la fecha no hay información concerniente a genes/enzimas PPO en *B. cordata*. Considerando un escenario similar al descrito por Araji *et al.* (2014), significaría que AMPT inhibió la acción de un gen putativo *ppo*, bloqueando la síntesis de DOPA a partir de tirosina. Además, podría esperarse un incremento en la producción de tiramina, compuesto que en la vía de producción de verbascósido es sustrato para la producción de dopamina y posteriormente hidroxitirosol (**Figura 16**), lo que se reflejaría en el aumento de la producción de verbascósido observada con 0.5 y 1.0 mM (**Figura 17b**). Se ha mencionado que en la biosíntesis de verbascósido, las enzimas PPO (debido a su actividad oxidasa/catecolasa) pueden catalizar la conversión de *i*) tirosina a DOPA; *ii*) tiramina a dopamina; *iii*) tirosol a hidroxitirosol o *iv*) salidrósido a hidroxitirosol glucósido. Sin embargo, su actividad en cada paso o cuáles pasos forman o no parte de la biosíntesis del metabolito no ha quedado clara (**Figura 6a**) (Wang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

La presencia de una enzima (por lo menos) con actividad tirosina hidroxilasa en *B. cordata* tiene relevancia en un par de aspectos. Recientemente, el análisis del genoma de *Abeliophyllum distichum* (especie productora de verbascósido) reportó la ausencia de genes codificantes de alguna enzima con actividad tirosinasa, en cambio se propone una enzima catecol oxidasa (únicamente tienen actividad difenolasa, EC 1.10.3.1) que catalizaría la conversión de *i*) tirosina a DOPA y *ii*) salidrósido a hidroxitirosol glucósido. La síntesis de tiramina a dopamina no está contemplada en la ruta que proponen (**Figura 6b**) (Park *et al.*, 2020). Por otro lado, Wang *et al.* (2017) reportaron la sobre-regulación de 10 genes relacionados con la biosíntesis de verbascósido en cultivos de raíces de *Rehmannia glutinosa* tratados con MeJa, entre ellos uno codificante de una enzima PPO. Lo anterior implicaría que en los experimentos de MeJa llevados a cabo en este trabajo, el aumento en la producción de verbascósido (**Figura 14b**) podría encontrar una justificación extra basada en el aumento de precursores como tiramina (**Figuras 6 y 16**) por acción de la sobreexpresión de un gen *ppo* en

*B. cordata* (en caso de existir). Por lo que las reacciones, las enzimas que las catalizan, así como los genes que las codifican deberían ser estudiados con mayor profundidad en especies productoras de verbascósido en general y, en este caso, con mayor atención en *B. cordata*. Indudablemente, el rol del aminoácido tirosina en la síntesis de verbascósido es fundamental, por lo que su uso como molécula precursora para incrementar la producción del metabolito bien valdría la pena. Por otro lado, el análisis a nivel genómico, transcriptómico y proteómico de la especie es necesario para generar información relacionada con reacciones e intermediarios en la biosíntesis de verbascósido, por ejemplo, la enzima PPO.

### 8.3.2.2 Benserazida, inhibidor de la enzima DOPA decarboxilasa, (DOPA-dec, EC 4.1.1.28)

Después de 15 días de exposición, únicamente la concentración más alta probada (3.0 mM) de benserazida tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la producción de biomasa en cultivos en suspensión de *B. cordata* (**Figura 18a**), reduciéndolo un 10% respecto de la biomasa observada en el control. En cambio, la producción de verbascósido reportó diversos cambios estadísticamente significativos, con todas las concentraciones probadas respecto al control (**Figura 18b**), por ejemplo, en el caso de las concentraciones 0.5 y 1.0 mM aumentos del 19%; contrariamente, las concentraciones 2.0 y 3.0 mM redujeron la producción 51% y 89%, respectivamente.



**Figura 18.** Efecto de la adición del inhibidor benserazida (0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mM) después de 15 días de exposición sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto al  $t_{15}$  de cultivo. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control.

Las L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAADs), son un antiguo grupo de enzimas dependientes de piridoxal 5'-fosfato (PLP, una de las formas activas de la vitamina B<sub>6</sub>) con funciones asociadas al metabolismo de aminoácidos (Liang *et al.*, 2019; Torrens-Spence *et al.*, 2020). En mamíferos la 5-HTP descarboxilasa cataliza la descarboxilación de 5-hidroxi-L-triptofano (5-HTP) para producir 5-hidroxitriptamina (serotonina), mientras que la enzima DOPA-decarboxilasa (DOPA-dec, EC 4.1.1.28), cataliza la descarboxilación de L-3,4-dihidroxifenil-L-alanina (L-DOPA) formándose dopamina (Torrens-Spence *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020). DOPA-dec es una enzima responsable de la síntesis de muchos neurotransmisores de tipo monoamina (catecolaminas), tales como dopamina, epinefrina y norepinefrina, por lo que ha sido ampliamente estudiada por su rol en importantes padecimientos clínicos, como la enfermedad de Parkinson e hipertensión (Facchini *et al.*, 2000; Meiser *et al.*, 2013; Torrens-Spence *et al.*, 2020). La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurológica, crónica y progresiva, caracterizada por temblores, bradiquinesia, rigidez e inestabilidad en la postura, aunque con frecuencia se observan otros síntomas que incluyen depresión y otros desordenes psiquiátricos, dificultad para tragar, masticar y hablar. Aunque la causa exacta es desconocida, su etiología se remonta a la degeneración y/o pérdida de neuronas productoras de dopamina (dopaminérgicas) en la *substantia nigra* del cerebro (Burkhard *et al.*, 2001; Daidone *et al.*, 2012). Actualmente no existe cura para la enfermedad de Parkinson, pero existe una variedad de paliativos que reducen la gravedad de los síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, con el fin de reponer los niveles de dopamina en el sistema nervioso central, usualmente se administra L-DOPA (levodopa), la cual una vez dentro del organismo es convertida a dopamina por la enzima DOPA-dec (EC 4.1.1.28), la cual abunda en el sistema nervioso central y en el riñón. Sin embargo, por sí misma la dopamina no puede atravesar la barrera sangre-cerebro, por lo que únicamente el 1-5% de L-DOPA llega a las neuronas dopaminérgicas del cerebro (Daidone *et al.*, 2012), razón por la cual, la administración exógena de L-DOPA usualmente es coadministrada con inhibidores de DOPA-dec (incapaces de atravesar la barrera sangre-cerebro), los más comunes carbidopa y benserazida. Estas moléculas forman un compuesto hidrazina con PLP, lo cual se traduce en el bloqueo de PLP y por ende en la inactivación de la enzima (Burkhard *et al.*, 2001; Daidone *et al.*, 2012). Aunque también se ha demostrado que la benserazida puede actuar como sustrato de la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT, Tedroff *et al.*, 1991).

En el reino vegetal, la familia AAAD es ubicua, cuenta con diversas enzimas parálogas con variaciones funcionales tanto en la preferencia de sustratos como en su mecanismo catalítico (Torrens-Spence *et al.*, 2020). Son canónicas las enzimas L-triptófano descarboxilasas (TDC; EC 4.1.1.27) y tirosina/DOPA descarboxilasas (Tir/DopaDC; EC 4.1.1.25), ambas asociadas con los procesos biosintéticos de múltiples metabolitos secundarios (Torrens-Spence *et al.*, 2020). Las enzimas TDC son fundamentales en la biosíntesis de alcaloides de terpeno indol (también denominados secologanina triptamina) como vindolina, vinblastina, ajmalina, catarantina y quinina; pero también son requeridas en la síntesis de algunos reguladores del crecimiento vegetal (**Tabla 2**), como ácido indol-3-acético (AIA) y triptamina (Facchini *et al.*, 2000; Parthasarathy *et al.*, 2018; Torrens-Spence *et al.*, 2020). Por otro lado, las enzimas Tir/DopaDC están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y son necesarias en la biosíntesis de glicósidos como salidrósido (Torrens-Spence *et al.*, 2018) y verbascósido (Ellis, 1983; Saimaru y Orihara, 2010; Wang *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020), pero también de alcaloides tipo benzilisoquinolina como morfina, codeína, papaverina, colchicina y sanguinarina (Facchini *et al.*, 2000; Parthasarathy *et al.*, 2018; Torrens-Spence *et al.*, 2020) así como alcaloides en la familia Amarillidaceae como galantamina, haemantamina y licorina (Wang *et al.*, 2019a). Las Tir/DopaDC eliminan CO<sub>2</sub> de tirosina y L-DOPA para producir tiramina y dopamina, respectivamente (Facchini *et al.*, 2000) (**Figura 16**). A diferencia de las AAADs animales, las enzimas vegetales suelen tener usualmente una alta especificidad de sustrato por L-aminoácidos con cadenas laterales indol o fenol, pero no ambas. En todas las especies vegetales reportadas, las enzimas TDC aceptan triptófano como sustrato, pero son inactivas frente a aminoácidos con cadenas laterales fenólicas, tales como tirosina y DOPA; en cambio, todas las enzimas Tir/DopaDC aceptan como sustrato tirosina y/o DOPA, pero son inactivas frente a triptófano (Facchini *et al.*, 2000). De todas formas, la actividad relativa de Tir/DopaDC frente a tirosina y/o DOPA es especie-dependiente. Por ejemplo, las enzimas de *Papaver somniferum* (amapola real), *Eschscholzia californica* (amapola de California) y *Thalictrum rochebrunianum* parecen aceptar ambos sustratos eficientemente; mientras que *Petroselinum crispum* (perejil); *Thalictrum rugosum*; *Lycoris aurea* y *Syringa vulgaris* (lila) tienen mayor preferencia por tirosina o bien únicamente aceptan tirosina como sustrato, como ocurre con *Arabidopsis thaliana*. De forma contraria, *Sanguinaria canadensis* (sanguinaria), *Hordeum vulgare* (cebada) y *Cytisus scoparius* (retama negra o escoba rubia) tienen mayor afinidad por DOPA (referencias en Facchini *et al.*, 2000; Lehmann y Pollmann, 2009; Wang *et al.*, 2019a). Recientemente, Wang *et al.* (2020), determinaron que la actividad

de la enzima Tir/DopaDC puede ser regulada por la concentración de PLP intracelular. Mediante el análisis de la estructura cristalográfica de una enzima de *Papaver somniferum*, encontraron que la unión Tir/DopaDC-PLP es débil, por lo que, para que la enzima actúe eficazmente, se requieren altas concentraciones del cofactor (relación molar 1:25).

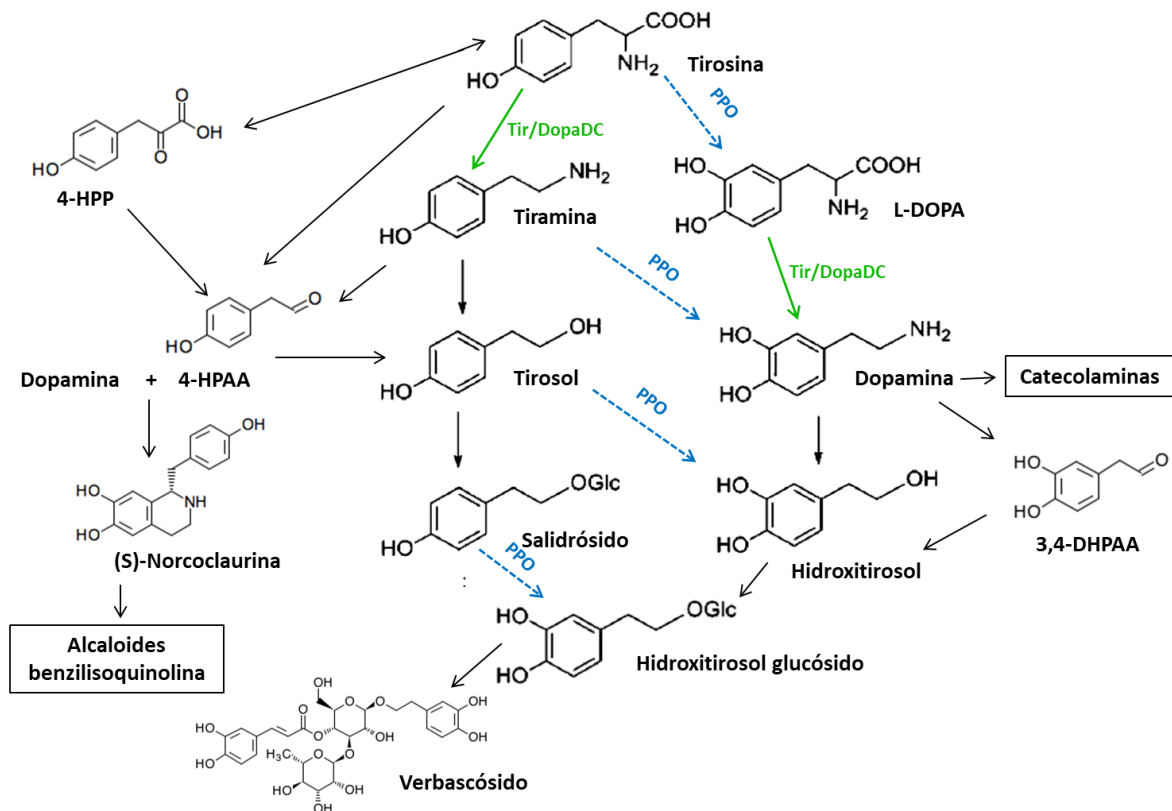
En los experimentos de Saimaru y Orihara (2010) se observó la reducción del 66% en la producción de verbascósido en cultivos celulares de *Olea europaea* luego de dos semanas de exposición con el inhibidor benserazida [1 mM]. En las conclusiones del reporte, los autores sugieren la existencia de una enzima DOPA descarboxilasa en la especie, que además tiene un rol importante en la biosíntesis de verbascósido. En este trabajo, también se advirtió una repuesta notable del inhibidor sobre la producción de verbascósido, disminuyendo su concentración entre 19% y 89%, dependiendo de la concentración del inhibidor (**Figura 18b**). En este punto es importante mencionar que, en una evaluación previa, el efecto del inhibidor de DOPA-dec, benserazida, fue evaluado después de 3, 6, 9 y 12 horas de ser aplicados a cultivos de 15 días. Sin embargo, como se muestra en la Figura 8 en el *Anexo*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, contrario al efecto observado después de 15 días de exposición en los cultivos. Tal comportamiento probablemente se debió a que benserazida debe ser hidrolizado antes de ejercer su efecto: se considera al compuesto trihidroxybenzilhidrazina (un producto de la hidrólisis de benserazida) como el inhibidor real de Tir/DopaDC, ya que reacciona de forma no-enzimática e irreversible con PLP libre, causando su extinción. Por otro lado, se ha reportado que los productos hidrazina derivados de la unión PLP-trihidroxybenzilhidrazina son potentes inhibidores de la enzima piridoxina cinasa (involucrada en la biosíntesis de PLP) (Daidone *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2019). Lo anterior querría decir que en las células de *B. cordata* existe por lo menos una enzima dependiente de PLP y cuya acción tiene un papel primordial en la biosíntesis de verbascósido. Se ha documentado que las enzimas PLP-dependientes incluyen diversos tipos, como aminotransferasas, descarboxilasas, racemasas, aldolasas, sintasas, entre otras. Este tipo de enzimas usualmente están involucradas en diversos procesos celulares clave, incluyéndose el metabolismo de aminoácidos y la producción de metabolitos derivados de aminoácidos (Liang *et al.*, 2019).

Es decir que, es muy probable que, en el caso de *B. cordata*, la enzima implicada sea una L-aminoácido aromático descarboxilasa, tentativamente una Tir/DopaDC cuyo sustrato podría



ser: *i*) tirosina para generar tiramina, *ii*) L-DOPA para generar dopamina, *iii*) sea capaz de aceptar ambos sustratos. Por otro lado, la síntesis de 4-hidroxifenilacetaldehído (4-HPAA) puede ocurrir vía descarboxilación de 4-hidroxifenilpiruvato (4-HPP) o por la oxidación de tiramina; se ha planteado que probablemente Tir/DopaDC esté involucrada en la síntesis de 4-HPAA (Facchini *et al.*, 2000). Nota al calce: la síntesis de 4-hidroxifenilacetaldehído (4-HPAA) a partir de L-tirosina es catalizada por la tirosina aminotransferasa (TAT, EC 2.6.1.5), una enzima PLP-dependiente (Parthasarathy *et al.*, 2018) (**Figura 19**).

La existencia de una enzima Tir/DopaDC involucrada en la biosíntesis de verbascósido en *B. cordata* sería relevante, debido a que en otras especies incluyendo a *Rehmannia glutinosa* (Scrophulariaceae, especie productora de verbascósido) se ha reportado la inducción de la enzima en respuesta a herbivoría, ante la exposición de elicitores fúngicos (Parthasarathy *et al.*, 2018) así como a MeJa (Wang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019a; Wang *et al.*, 2021). En plántulas de *Lycoris aurea* (especie productora de alcaloides derivados de tirosina *vía* tiramina), después de 24 h de tratamiento con MeJa (100  $\mu$ M), se incrementó la transcripción del gen *LaTYDC1* codificante de la enzima Tir/DopaDC. Además, plántulas de la misma especie también tratadas con MeJa, duplicaron el contenido de tiramina en comparación con las plántulas control (Wang *et al.*, 2019a). Lo anterior abre la posibilidad de que el aumento observado en la producción de verbascósido en las células tratadas con MeJa (**Figura 14b**) no sólo se debiese al aumento de los transcritos, producción y actividad de enzimas como PAL y PPO, sino también de la enzima Tir/DopaDC. Por otro lado, podría explicar la disminución en la producción de biomasa observada en algunos puntos durante los experimentos con MeJa (**Figuras 13a y 14a**), ya que con base en lo reportado por Wang *et al.* (2019a), el aumento en la transcripción de la enzima BcTir/DopaDC podría resultar en el incremento de tiramina (compuesto intermediario en la biosíntesis de verbascósido, **Figuras 6 y 16**). Sin embargo, hay que tener en cuenta también que altos niveles de tirosina son tóxicos: Arají *et al.* (2014) reportaron que la aplicación exógena del metabolito promovió la muerte celular en células de *Juglans regia*. *En cualquier caso habría que llevar a cabo experimentos que validen esas hipótesis.*



**Figura 19.** Rutas de biosíntesis asociadas a la producción de hidroxitirosol, salidrósido, catecolaminas y alcaloides benzilisoquinolina. Esquema integrado con datos de Kulma y Szopa 2007; Torrens-Spence *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020 y Lichman, 2021. Las flechas verdes indican los posibles sustratos de la enzima Tir/DopaDC (tirosina/DOPA descarboxilasa). Las flechas azules indican los posibles sustratos de la enzima PPO (polifenol oxidasa).

En tiempos recientes se ha reavivado el interés relacionado con el estudio de plantas y microorganismos que poseen los mecanismos bioquímicos y moleculares para sintetizar compuestos neuroactivos, entre los más comunes: ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina, melatonina, quinurenina, ácido quinurénico, dopamina, norepinefrina, histamina, triptamina, tiramina y  $\beta$ -feniletilamina. Estos compuestos pueden aportar mejoras en la salud (por ejemplo, para respaldar el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson), la cognición, así como el estado anímico y comportamiento de las personas (Pathak-Gandhi y Vaidya, 2017; Yılmaz y Gökmen, 2020). Alimentos fermentados y no fermentados contienen algunos de estos compuestos. Por un lado, los alimentos no fermentados pueden ser proveedores directos de este tipo de compuestos o bien pueden actuar como prebióticos (sustratos selectivamente usados por microorganismos como aquellos presentes en la microbiota intestinal - los 'probióticos' - para conferir un beneficio a la salud). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que ciertos microorganismos

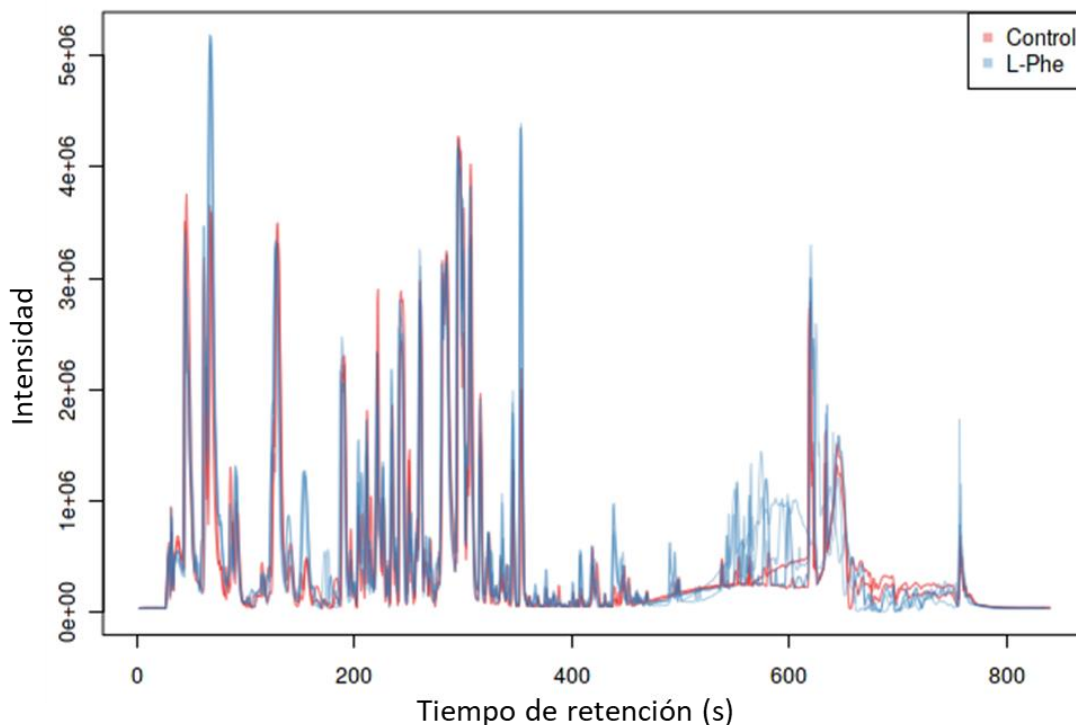
tienen la capacidad de sintetizar compuestos neuroactivos durante el cultivo, aportando un mayor valor nutracéutico a los alimentos fermentados como yogurt, vino blanco y rojo, cerveza, algunos quesos, kimchi, kéfir, etc. (referencias en Yılmaz y Gökmen, 2020). En este sentido, *B. cordata* podría usarse como prebiótico y además como alimento nutracéutico por ser fuente de aminoácidos como fenilalanina y tirosina, además de L-DOPA y dopamina. Por otro lado, la línea celular puede emplearse como proveedora de compuestos neuroactivos como dopamina y/o tiramina, sin apartar la vista del hidroxitirosol, compuesto que *per se*, es una molécula relevante para la industria farmacéutica debido a sus múltiples actividades bioactivas como actividad antiinflamatoria, antibiótica, antioxidante, antitumoral, neuroprotectora, entre otras. Además, junto con sus derivados, ha mostrado ser muy efectivo en el tratamiento de síndrome metabólico y padecimientos cardiovasculares (Robles-Almazan *et al.*, 2018).

### 8.3.3 Perfil metabolómico putativo de células en suspensión de *B. cordata*

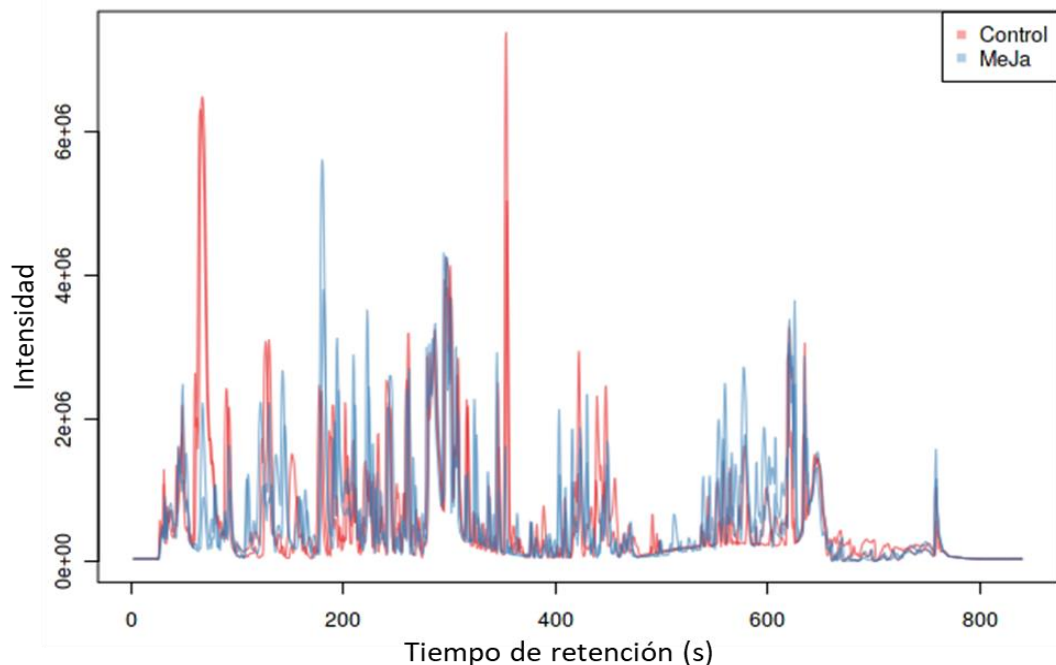
Las estrategias actuales de metabolómica en plantas dependen sobre todo de metodologías basadas en espectrometría de masas (MS). Actualmente, este tipo de análisis acoplado a cromatografía de líquidos 'LC-MS' ofrece un enfoque más comprensible sobre la diversidad de compuestos especializados que es posible encontrar en una especie, en un órgano/tejido, momento y condiciones determinadas (Alseekh y Fernie, 2018). Para aumentar la información relacionada con el perfil metabólico de la fracción polar de células en suspensión de *B. cordata* se empleó el enfoque de metabolómica no dirigida, llevando a cabo cromatografía de líquidos acoplada a masas de muestras celulares tratadas con:

- a)** L-fenilalanina (L-Phe, 600  $\mu$ M adicionado al  $t_9$  con 10 días de exposición),
- b)** metil jasmonato (MeJa, 50  $\mu$ M adicionado al ( $t_9$ ) y 48 horas de exposición),
- c)** benserazida ([3.0 mM] inhibidor de la enzima Tir/DopaDC, EC 4.1.1.25) adicionado a los quince días de cultivo  $t_{15}$  y 15 días de exposición) y
- d)** ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP [100  $\mu$ M], inhibidor de la enzima PAL, EC 4.3.1.24, adicionado al momento de la inoculación  $t_0$  y 21 días de exposición).

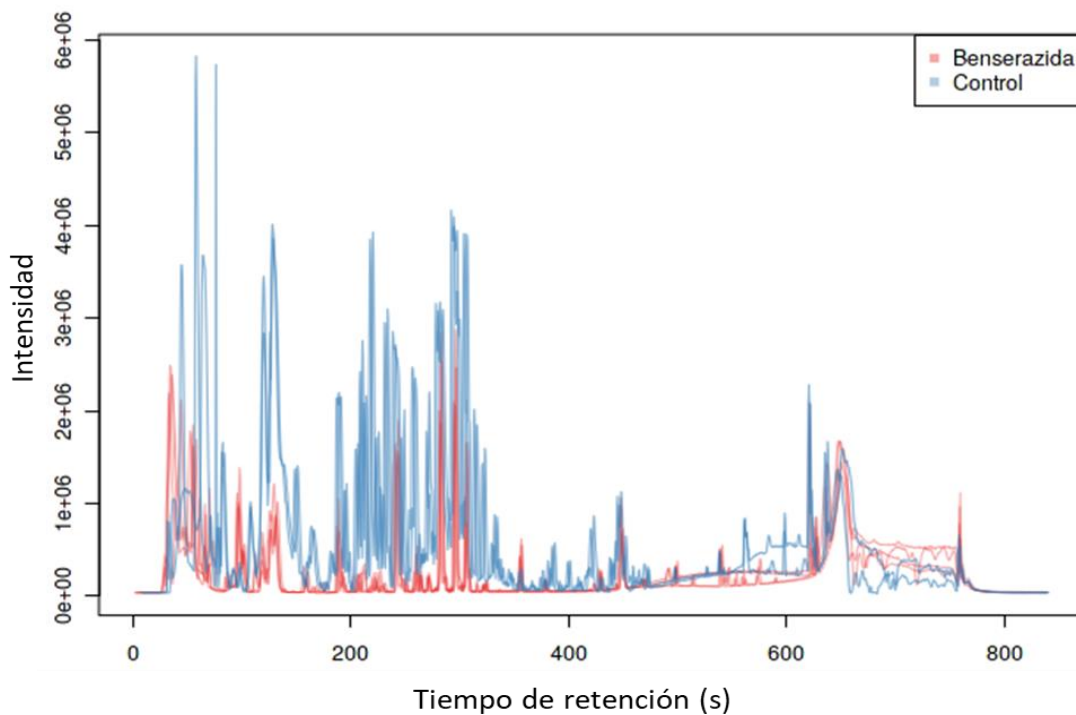
A continuación, se presentan los cromatogramas obtenidos cuando el análisis espectrométrico se llevó a cabo con *fuerza de ionización electrospray* modo negativo: en las **Figuras 20** (L-Phe), **21** (MeJa), **22** (benserazida), **23** (AIP) y **24** (comparación entre cromatogramas de células control colectadas en diferentes puntos de la cinética de crecimiento: días 11, 19, 21 y 30).



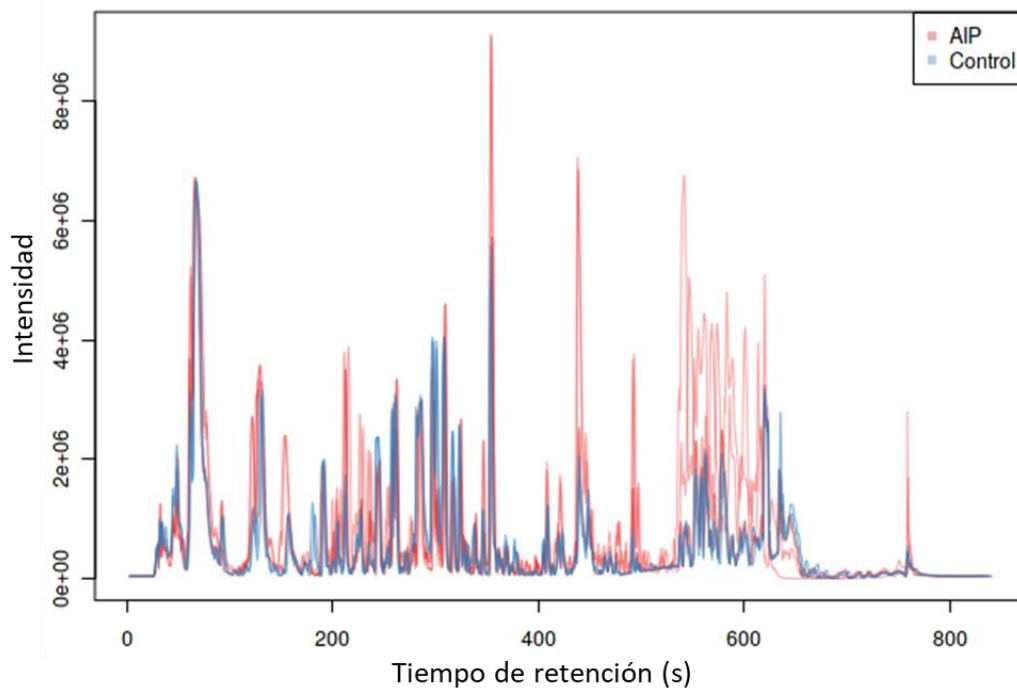
**Figura 20.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electrospray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con L-fenilalanina 600  $\mu\text{M}$ , y su control correspondiente (Control), adicionada al  $t_9$  y colectada después de 10 días de exposición.



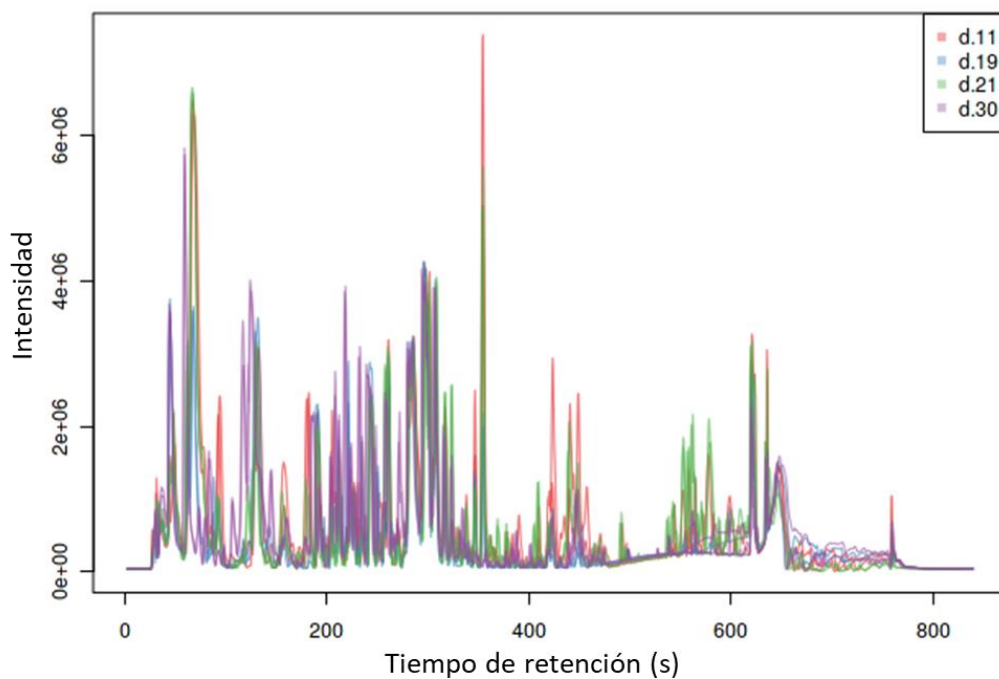
**Figura 21.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con metil jasmonato MeJa, 50  $\mu$ M, y su control (células sin tratamiento), adicionado a  $t_9$  y colectada después de 48 horas de exposición.



**Figura 22.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con benserazida (inhibidor de Tir/DOPA-dec, EC 4.1.1.25, 3.0 mM), y su control correspondiente (Control), adicionado a los quince días de cultivo  $t_{15}$  y colectadas después de 15 días de exposición (benserazida).

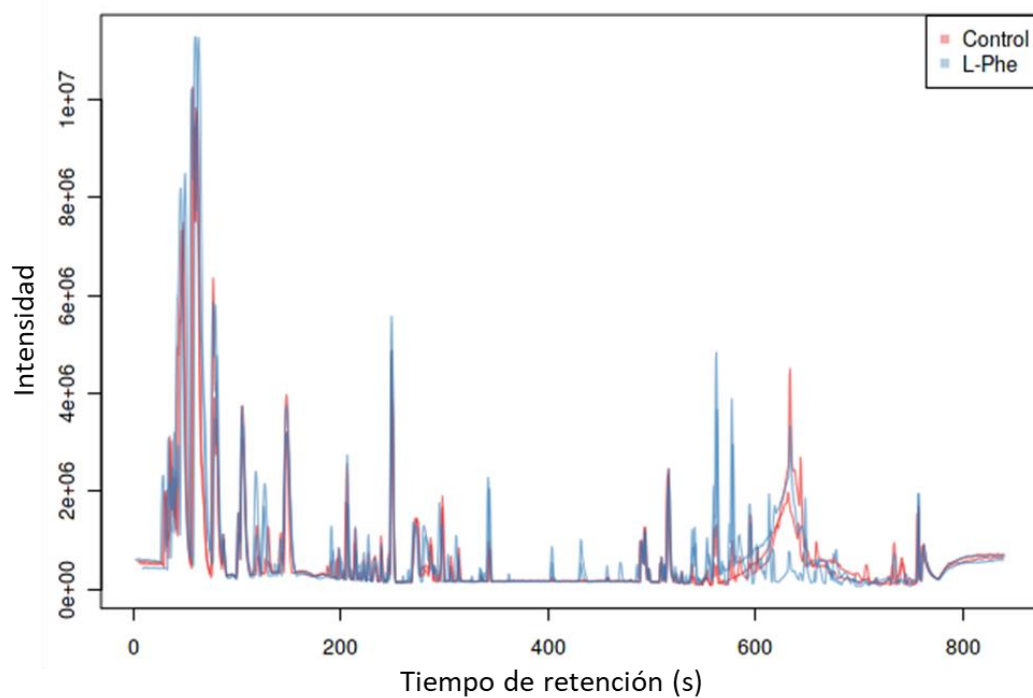


**Figura 23.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con AIP (Ácido 2-aminoindan-2-fosónico, inhibidor de la enzima fenilalanina amonio liasa [PAL, EC 4.3.1.24, 100  $\mu$ M]), y su control correspondiente (Control), adicionado al momento de la inoculación  $t_0$  y colectadas después de 21 días de exposición (AIP).

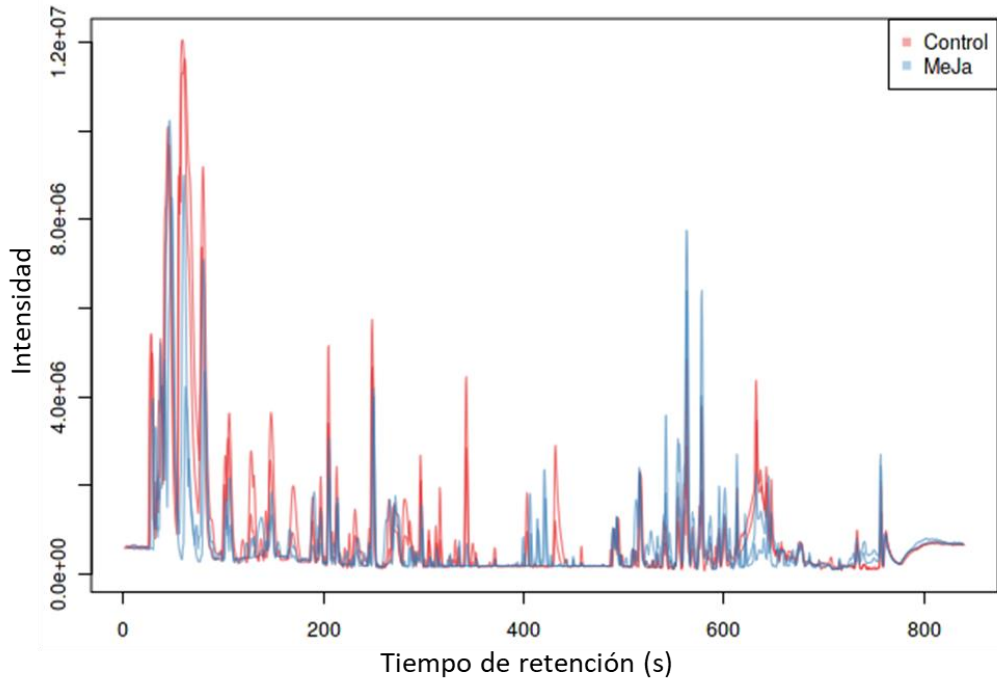


**Figura 24.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo negativo del extracto metanólico de células de *B. cordata* en diferentes momentos de crecimiento: a los días 11, 19, 21 y 30 de cultivo.

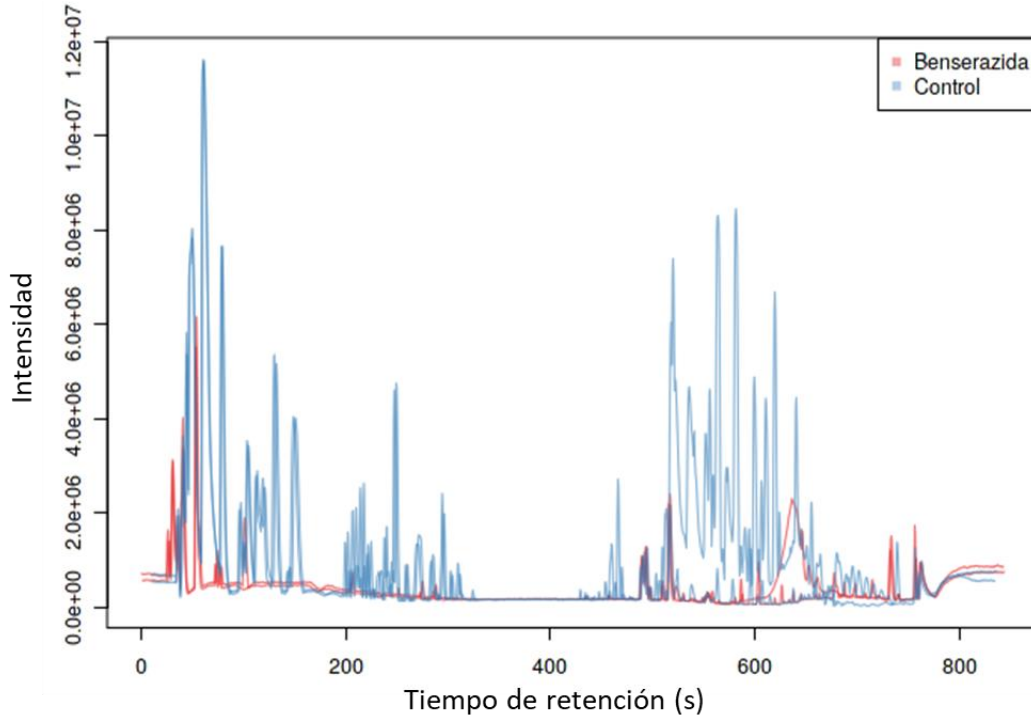
En las **Figuras 25** (L-Phe), **26** (MeJa), **27** (benserazida), **28** (AIP) y **29** (comparación entre cromatogramas de células control colectadas en diferentes puntos de la cinética de crecimiento: días 11, 19, 21 y 30), se presentan los cromatogramas obtenidos cuando el análisis espectrométrico se llevó a cabo en modo positivo.



**Figura 25.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electrospray modo positivo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con L-fenilalanina 600  $\mu$ M, adicionada al  $t_0$  y colectada después de 10 días de exposición (L-Phe) y su control correspondiente (Control).

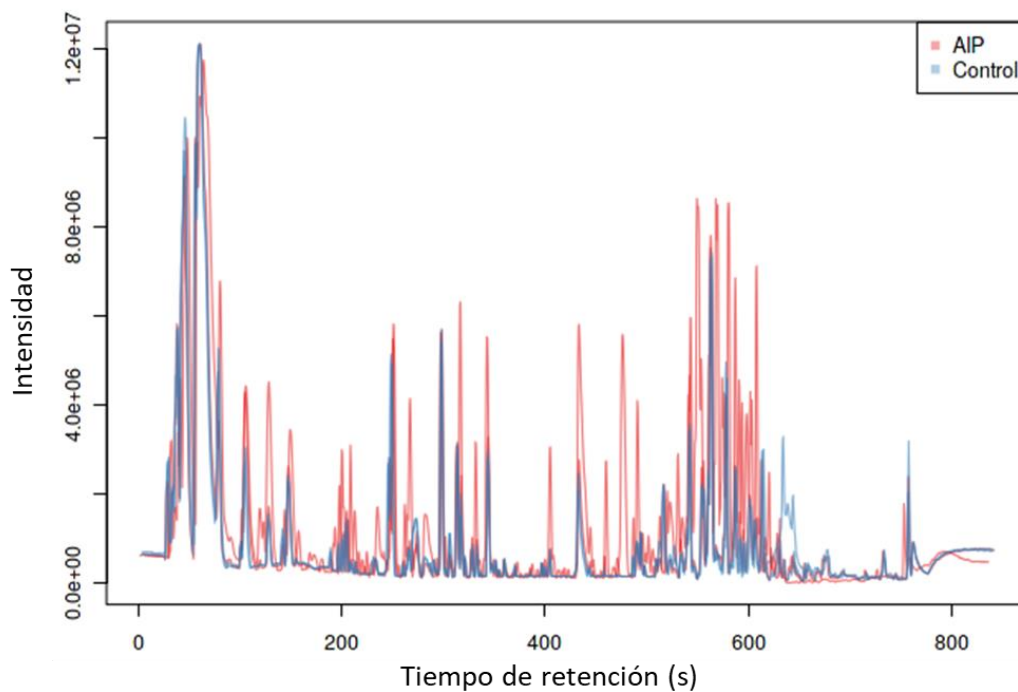


**Figura 26.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) de células de *B. cordata* con fuente de ionización electroespray modo positivo del extracto metanólico tratadas con metil jasmonato MeJa, 50  $\mu$ M, adicionado al ( $t_9$ ) y colectada después de 48 horas de exposición y células sin tratamiento (Control).

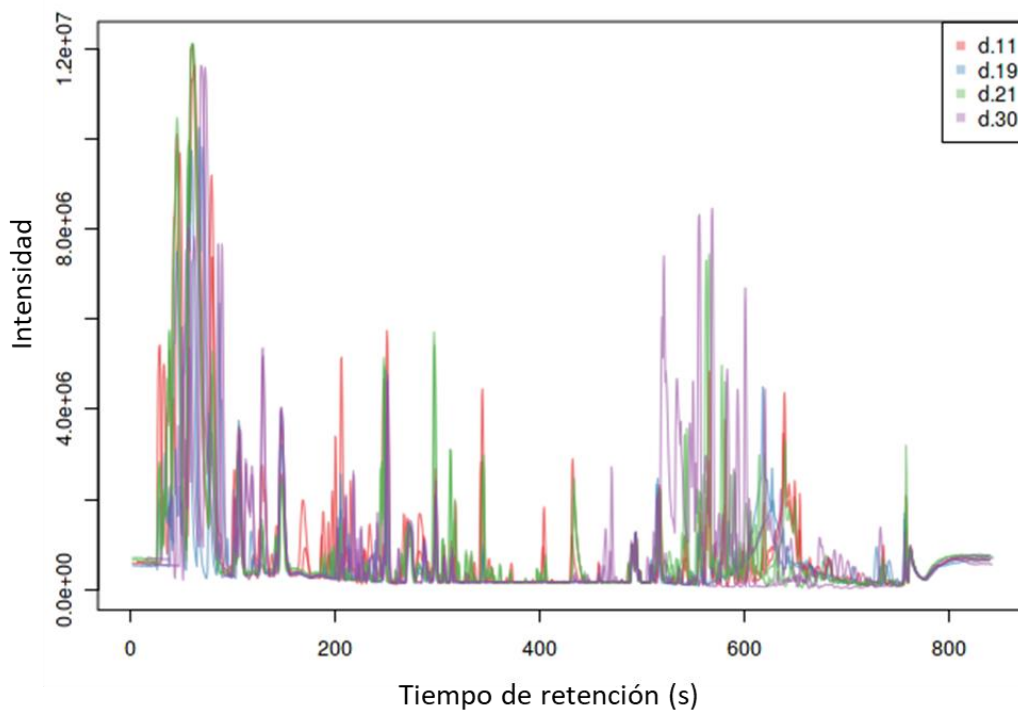


**Figura 27.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electroespray modo positivo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con benserazida (inhibidor de Tir/DOPA-dec, EC 4.1.1.25, 3.0 mM) adicionado a los quince días de cultivo  $t_{15}$  y colectadas después de 15 días de exposición (benserazida) y su control correspondiente (Control).





**Figura 28.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electrospray modo positivo del extracto metanólico de células de *B. cordata* tratadas con AIP (Ácido 2-aminoindan-2-fosfónico, inhibidor de la enzima fenilalanina amonio liasa [PAL, EC 4.3.1.24, 100  $\mu$ M]) adicionado al momento de la inoculación  $t_0$  y colectadas después de 21 días de exposición (AIP) y su control correspondiente (Control).

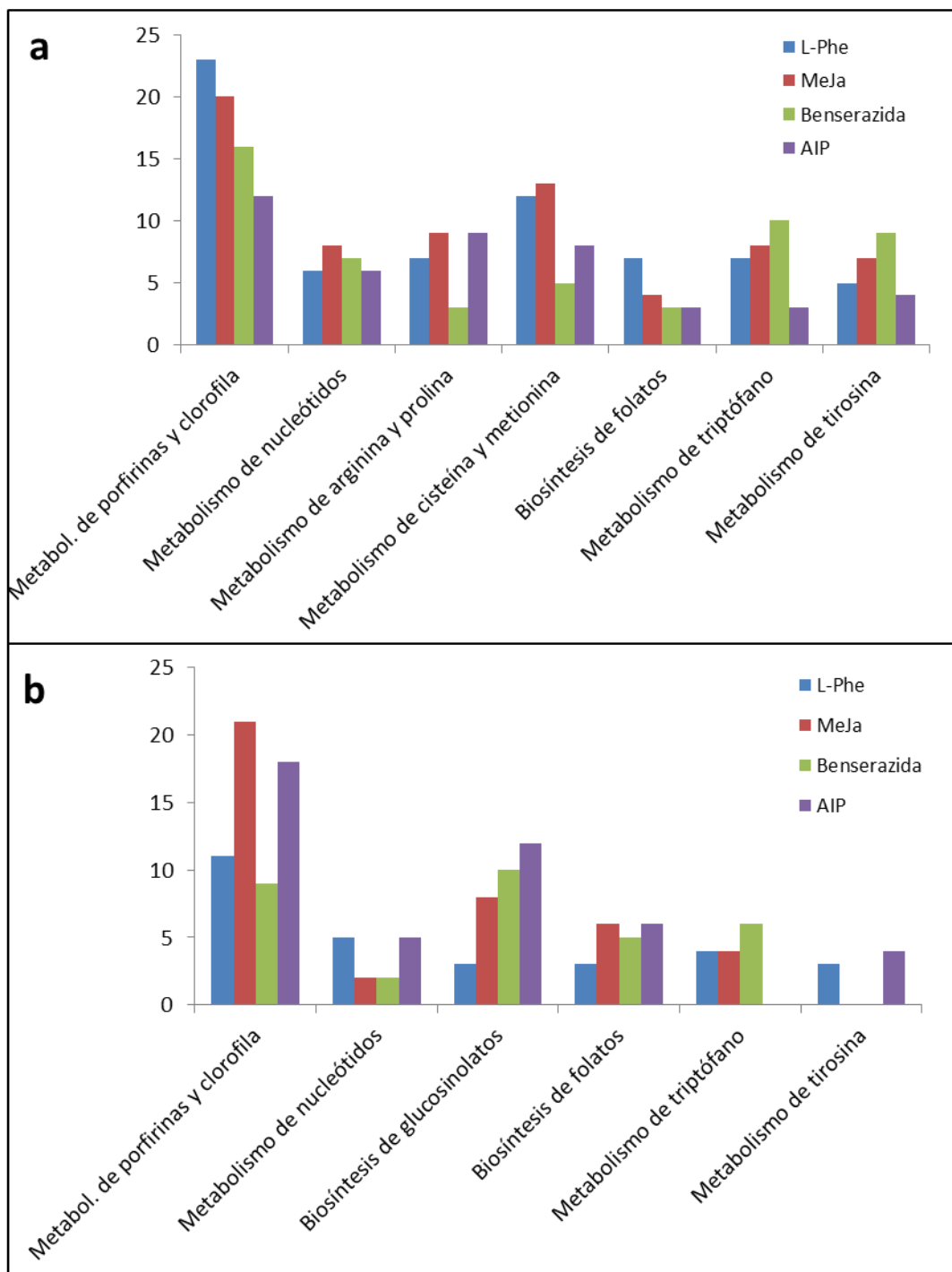


**Figura 29.** Comparación de cromatogramas de picos base (BPI) con fuente de ionización electrospray modo positivo del extracto metanólico de células de *B. cordata* en diferentes momentos de crecimiento: a los días 11, 19, 21 y 30 de cultivo.

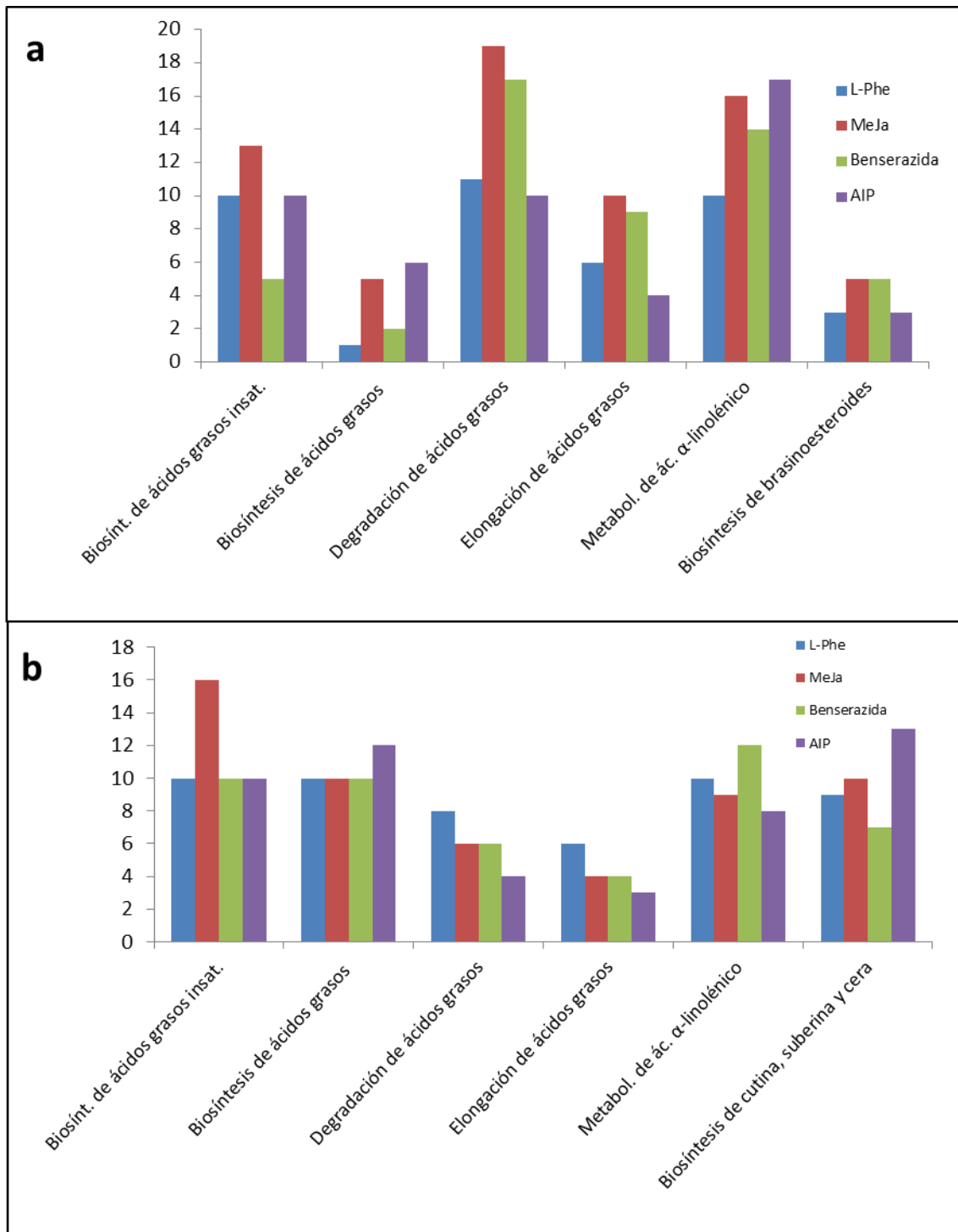
Visualmente, se observan diferencias en cada una de las figuras, entre los tratamientos y sus controles, tanto en las corridas en modo de ionización química negativa como en las de modo de ionización positiva (en modo positivo, el analito es diseminado a un pH bajo con la finalidad de favorecer la formación de iones positivos, mientras que en modo negativo, el análisis normalmente se lleva a cabo a por encima de su punto isoeléctrico para desprotonar las moléculas). Los picos identificados con MS-Dial y con la función 'LC-MS spectral processing' de MetaboAnalyst fueron anotados en Excel con la finalidad de identificar picos constitutivos, así como el efecto de los diferentes tratamientos sobre la producción de metabolitos en células de *B. cordata*. Además, los picos anotados fueron enriquecidos con MetaboAnalyst (Functional Analysis) para asociarlos con las rutas metabólicas principalmente representadas, por comparación con masas precursoras de compuestos en las bases de datos KEGG, HMDB y PubChem. Las rutas resultantes del análisis de picos en modo positivo se muestran en la **Tabla 8** y se representan en las **Figuras 30a, 31a y 32a**. En los resultados se observan rutas del metabolismo primario, como aquellas involucradas en la biosíntesis de porfirinas y clorofilas, de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, aunque también de arginina, prolina, cisteína y metionina (**Figura 30a**). Asimismo, en la biosíntesis de folatos, glucosinolatos, brasinoesteroides, ácidos grasos insaturados, ácido  $\alpha$ -linolénico, igual que en la biosíntesis, elongación y degradación de ácidos grasos (**Figura 31a**). En cuanto a las rutas de metabolismo secundario, la principal ruta representada fue la vía de síntesis de fenilpropanoides, pero también aparecen las de flavonoides, flavonas y flavonol, así como elementos precursores de terpenos, diterpenos, terpenos ubiquinona, precursores de indol-alcaloides y alcaloides isoquinolina (**Figura 32a**). Por otro lado, las rutas más representadas resultantes del análisis de picos en modo negativo se presentan en la **Tabla 8** y se representan en las **Figuras 30b, 31b y 32b**. Es evidente la coincidencia de la gran mayoría de las rutas con aquellas resultantes del análisis en modo positivo; sin embargo, en este caso se observaron también la biosíntesis de cutina, suberina y cera (**Figura 31b**), monoterpenos y metabolismo de caféina (**Figura 32b**).

**Tabla 8.** Principales rutas metabólicas de células de *B. cordata* afectadas por el tratamiento con **a)** L-fenilalanina (L-Phe), **b)** metil jasmonato (MeJa), **c)** benserazida y **d)** ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP). Los resultados fueron obtenidos mediante análisis de enriquecimiento de picos de rutas metabólicas en modo positivo y negativo en la plataforma MetaboAnalist 5.0. Los números indican la cantidad de compuestos putativamente representados de cada ruta en cada tratamiento. \*\*\* ND, no detectado.

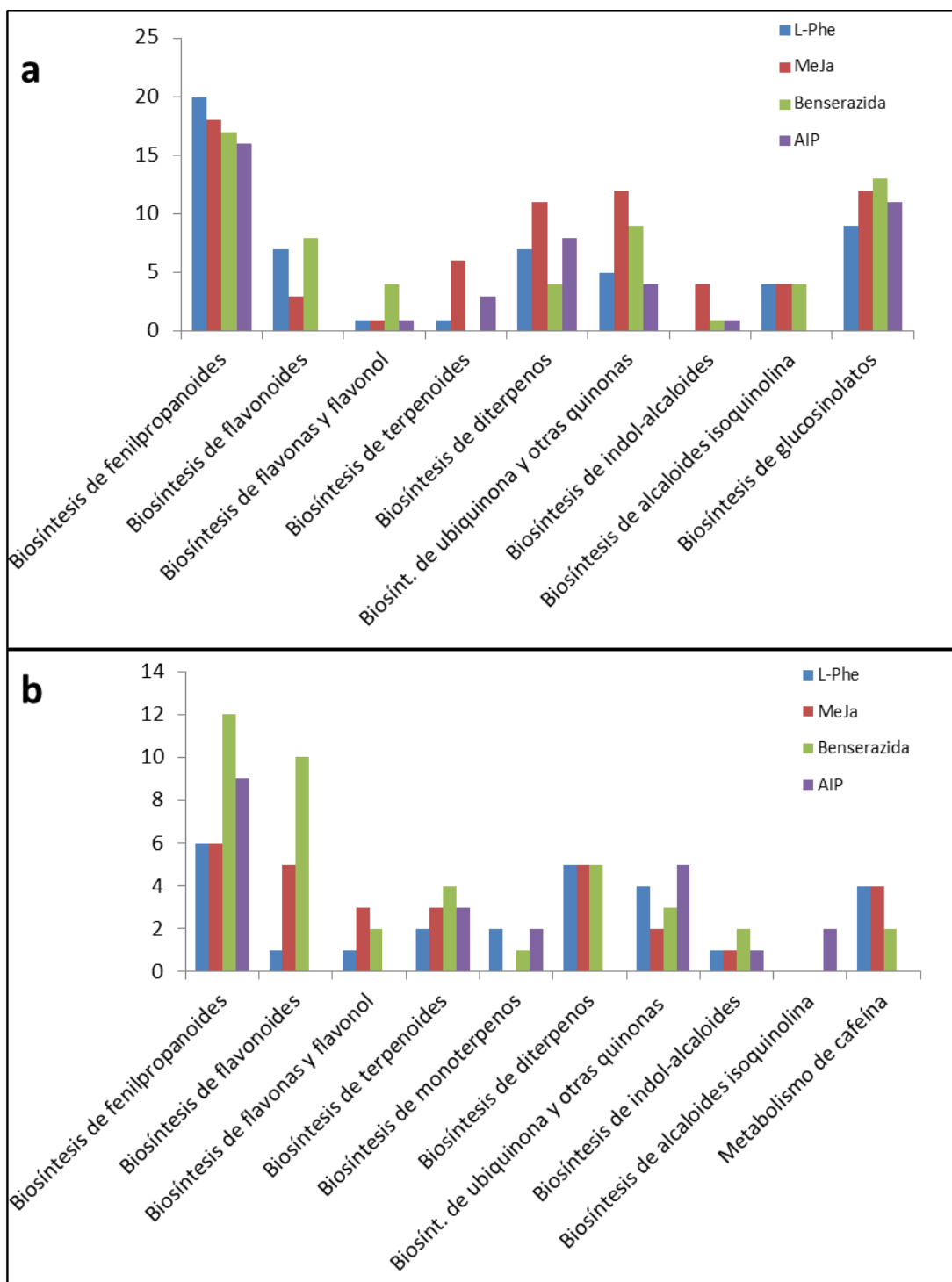
Ruta metabólica	Tratamiento												
	L-Phe		MeJa		Benserazida		AIP						
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
Modo de ionización electrospray													
Metabolismo de porfirinas y clorofila	23	11	20	21	16	9	12	18					
Metabolismo de nucleótidos	6	5	8	2	7	2	6	5					
Metabolismo de arginina y prolina	7	ND	9	ND	3	ND	9	ND					
Metabolismo de cisteína y metionina	12	ND	13	ND	5	ND	8	ND					
Biosíntesis de folatos	7	3	4	6	3	5	3	6					
Biosíntesis de glucosinolatos	9	3	12	8	13	10	11	12					
Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	10	10	13	16	5	10	10	10					
Biosíntesis de ácidos grasos	1	10	5	10	2	10	6	12					
Degradación de ácidos grasos	11	8	19	6	17	6	10	4					
Elongación de ácidos grasos	6	6	10	4	9	4	4	3					
Metabolismo de ácido $\alpha$ -linoléico	10	10	16	9	14	12	17	8					
Biosíntesis de cutina, suberina y cera	ND	9	ND	10	ND	7	ND	13					
Metabolismo de triptófano	7	4	8	4	10	6	3	0					
Metabolismo de tirosina	5	3	7	0	9	0	4	4					
Biosíntesis de fenilpropanoides	20	6	18	6	17	12	16	9					
Biosíntesis de flavonoides	7	1	3	5	8	10	0	0					
Biosíntesis de flavonas y flavonol	1	1	1	3	4	2	1	0					
Biosíntesis de terpenoides	1	2	6	3	0	4	3	3					
Biosíntesis de monoterpenos	ND	2	ND	0	ND	1	ND	2					
Biosíntesis de diterpenos	7	5	11	5	4	5	8	0					
Biosíntesis de ubiquinona y otras quinonas													
terpénicas	5	4	12	2	9	3	4	5					
Biosíntesis de indol-alcaloides	0	1	4	1	1	2	1	1					
Biosíntesis de alcaloides isoquinolina	4	0	4	0	4	0	0	2					
Biosíntesis de brassinoesteroides	3	ND	5	ND	5	ND	3	ND					
Metabolismo de cafeína	ND	4	ND	4	ND	2	ND	0					



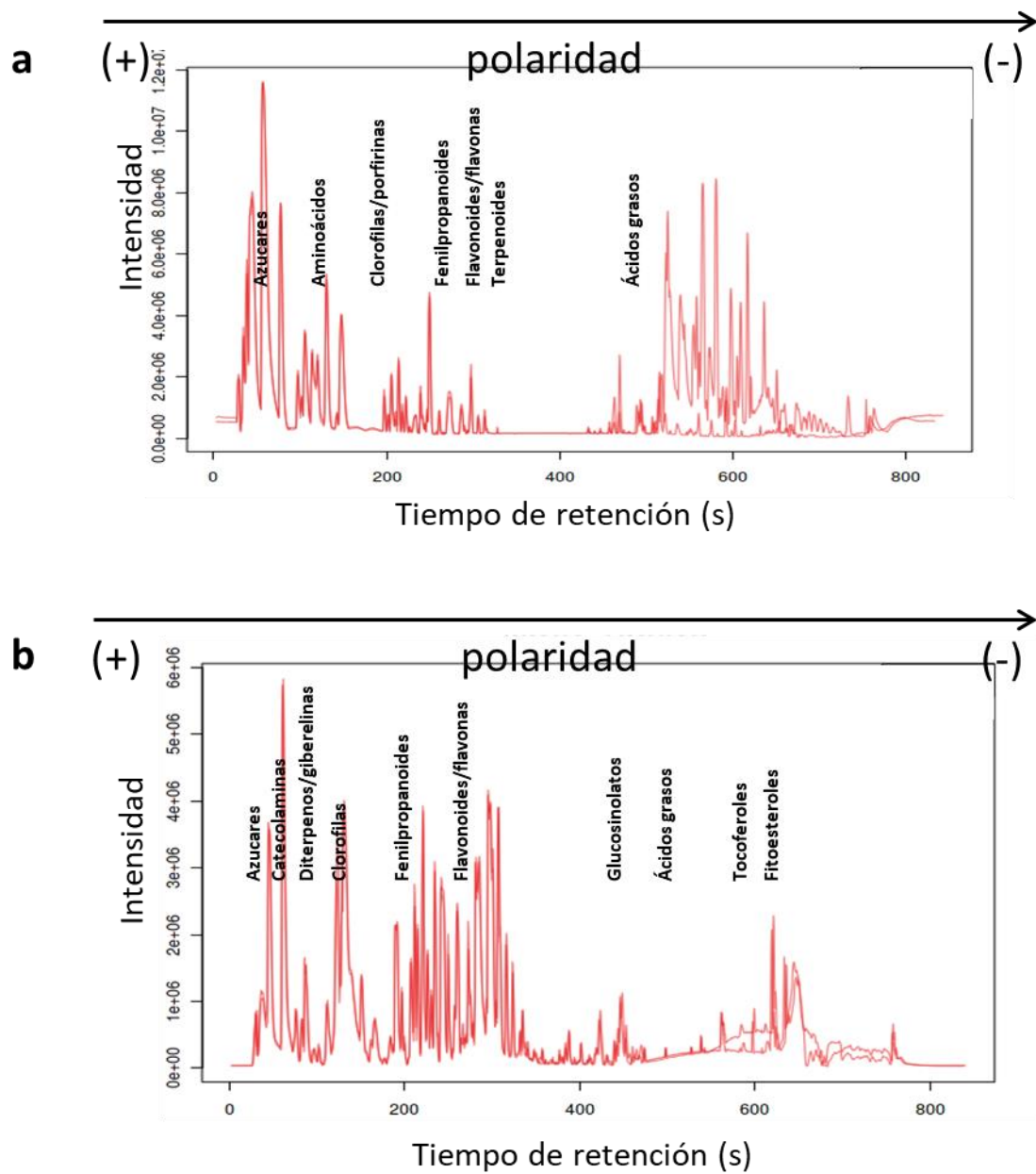
**Figura 30.** Principales rutas del metabolismo primario afectadas por el tratamiento con L-fenilalanina (L-Phe, azul), metil jasmonato (MeJa, rojo), benserazida (verde) y ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, morado) de células de *B. cordata*. Los resultados fueron obtenidos mediante análisis enriquecimiento de rutas metabólicas de picos en **a)** modo positivo y **b)** modo negativo.



**Figura 31.** Principales rutas del metabolismo de ácidos grasos afectadas por el tratamiento con L-fenilalanina (L-Phe, azul), metil jasmonato (MeJa, rojo), benserazida (verde) y ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, morado) de células de *B. cordata*. Los resultados fueron obtenidos mediante análisis enriquecimiento de rutas metabólicas de picos en **a)** modo positivo y **b)** modo negativo.



**Figura 32.** Principales rutas del metabolismo secundario afectadas por el tratamiento con L-fenilalanina (L-Phe, azul), metil jasmonato (MeJa, rojo), benserazida (verde) y ácido 2-aminoindan-2-fosfónico (AIP, morado) de células de *B. cordata*. Los resultados fueron obtenidos mediante análisis enriquecimiento de rutas metabólicas de picos en **a)** modo positivo y **b)** modo negativo.



**Figura 33.** Perfil de elución **a.** en modo positivo y **b.** en modo negativo de compuestos presentes es en células en suspensión de *B. cordata* basado en el análisis de enriquecimiento de rutas (MetaboAnalyst).

Es importante señalar que para llevar a cabo el análisis de enriquecimiento de rutas se procesaron todas las muestras tratadas, en conjunto con sus controles correspondientes, para obtener un perfil global de células en suspensión de *B. cordata*. Sin embargo, fue posible observar cambios en la representación de rutas entre los diferentes tratamientos, como se aprecia en las **Figuras 30-32**.

Reuniendo los compuestos putativamente identificados en modo positivo y en modo negativo, fue posible asignar una posición dentro de los cromatogramas de los principales grupos metabólicos de acuerdo a su perfil de elución (**Figura 33**).

Además, se reconstruyeron las principales vías del metabolismo secundario. En la **Figura 12 del Anexo** se presenta la ruta de los fenilpropanoides, los compuestos se resumen en la **Tabla 9**. En la **Figura 13 (Anexo)** la vía de síntesis de flavonoides, flavonas y flavonoles. Los compuestos se resumen en la **Tabla 10**. En la **Figuras 14 y 15 (Anexo)** se presentan las rutas de síntesis indol-alcaloides y alcaloides benzilisoquinolina, respectivamente. Los compuestos se resumen en la **Tabla 11**. Finalmente, en la **Figura 16 (Anexo)** se presenta la ruta biosintética de terpenoides, esteroides, giberelinas, ubiquinonas, clorofilas, carotenoides y tocoferoles. Los compuestos se observan en las **Tablas 12, 13 y 14**.



**Tabla 9.** Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la ruta biosintética de los fenilpropanoides

Ruta biosintética de los fenilpropanoides		
<b>Compuesto</b>	<b>KEGG</b>	<b>PubChem</b>
L-Fenilalanina	C00079	6140
L-Tirosina	C00082	6057
Feruloil-CoA	C00406	NA
Ácido sinapico	C00482	637775
Cinamoil-CoA	C00540	NA
Coniferil alcohol	C00590	1549095
Coniferina	C00761	5280372
Ácido p-coumárico	C00811	637542
Ácido clorogenico	C00852	1794427
Cinamaldehído	C00903	637511
1-O-Sinapoil-beta-D-glucosa	C01175	NA
Ácido caféico	C01197	4422
Ácido trans-ferulico	C01494	445858
Siringina	C01533	NA
Sinapil alcohol	C02325	5280507
4-Coumaril alcohol	C02646	54682930
Sinapoil malato	C02887	NA
Ácido p-Coumaroil shikímico	C02947	NA
p-coumaraldehído	C05608	641301
Aldehído sinapoil	C05610	NA
Ácido 5-hidroxiferúlico	C05619	446834
Coumarinato	C05838	5280841
beta-D-Glucosil-2-coumarinato	C05839	5316113
Coumarina	C05851	323
4-Hidroxicinamil alcohol 4-D-glucosido	C05855	NA
Ácido cafeoilshikímico	C10434	6124136
Aldehído caféico	C10945	NA
5-Hidroxiconiferaldehído	C12204	NA
Cafeil alcohol	C12206	NA
Ácido 3-O-p-Coumaroilquínico	C12208	9945785
N1,N5,N10-Tricafeoil espermidina	C18070	NA
N1,N5,N10-Triferuloil espermidina	C18071	NA
N1,N5,N10-Tri-(hidroxiferuloil)-espermidina	C18072	NA

**Tabla 10.** Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la ruta biosintética de flavonoides, flavonas y flavonoles.

<b>Biosíntesis de Flavonoides y flavonas</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>KEGG</b>	<b>PubChem</b>
Ácido 3-O-p-Coumaroilquínico	C12208	9945785
Dihidromiricetina	C02906	5833
Feruloil-CoA	C00406	NA
Pinobanksina	C09826	NA
Kaempferol	C05903	5280863
Delfinidina	C05908	68245
Leucocianidina	C05906	NA
Aromadendrina	C00974	662
Pentahidroxi-flavanona	C05911	NA
Eriodictiol	C05631	440735
Taxifolina	C01617	NA
Fustina	C01378	NA
Cinamoil-CoA	C00540	NA
(-)-Epigallocatequina	C12136	72277
Eriodictiol chalcona	C15525	NA
Luteolina	C01514	5280445
Ácido datélico	C10434	6124136
Ácido chlorogenic	C00852	1794427
Pelargonidina	C05904	67249
Leucodelfinidina	C05909	NA
Homoeriodictiol chalcona	C16405	NA
(2R,3R)-3,4',7-Trihidroxi-flavanona	C09751	3512634
Naringenina	C00509	439246
(2S)-Liquiritigenina	C09762	1889
Butina	C09614	NA
(S)-Pinoembrina	C09827	238782
Chalconaringenina	C06561	5280960
Apigenina	C01477	5280443
Pinoembrina chalcona	C16404	NA
Buteina	C08578	NA
Isoliquiritigenina	C08650	638278
Norizalpinina	C10044	5281616
(-)-Epiarizolequina	C12128	443639
5-Deoxileucopelargonidina	C16415	47205713
Apiforol	C12124	NA
Floretina	C00774	4788
4-Coumaroilshikimato	C02947	NA
cis-3 and trans-2-Hexenil propionato	C03648	440073
Quercetina	C00389	5280343
Epicatequina	C09727	72276
Fisetinidol-4beta-ol	C09736	11924
Miricetina	C10107	5281672
Luteoforol	C05907	440834
Kaempferol 3-O-ramnosido-7-O-glucosido	C21854	NA
Quercetina 3-glucosido	C05623	5280804
Quercitrina	C01750	5280459
Kaempferol-3-O-glucosido	C12249	5282102

**Tabla 11.** Compuestos putativamente identificados pertenecientes a las vías de síntesis de precursores de catecolaminas, indol-alcaloides y alcaloides isoquinolina.

<b>Biosíntesis de catecolaminas</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>KEGG</b>	<b>PubChem</b>
Serotonina	C00780	5202
Melatonina	C01598	896
<b>Biosíntesis de indol-alcaloides</b>		
L-Triptofano	C00078	6305
Triptamina	C00398	1150
Secologanina	C01852	NA
3-alpha(S)-Estrictosidina	C03470	NA
<b>Biosíntesis de alcaloides isoquinolina</b>		
L-Tirosina	C00082	6057
Tiramina	C00483	5610
L-Dopa	C00355	6047
3,4-Dihidroxifenilacetaldehído	C04043	119219
Ácido 4-Hidroxifenilpirúvico (HPP)	C01179	979

**Tabla 12.** Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la vía de síntesis de estructuras terpénicas.

<b>Biosíntesis de estructuras terpénicas</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>KEGG</b>	<b>PubChem</b>
2-C-Metil-D-eritritol 4-fosfato (CDP-ME)	C11434	NA
Geranilgeranil-PP (GGPP)	C00353	447277
Dehidrodolicol difosfato	C05859	8152
Isopentenil fosfato (IPP)	C20345	163312083
Acetoacetil-CoA	C00332	439214
Fitol difosfato	C05427	7791
(-)-alfa-Terpineol	C11393	NA
(R)-3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol	C11389	67179
(+)-Neomentol	C00553	439263
4-(Citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-MEP)	C11435	NA
Ácido (S)-5-Difosfomevalónico (MVP)	C01143	439418
all-trans-Nonaprenil difosfato	C04145	6830
2-trans,6-trans-Farnesal	C03461	5280598
all-trans-Nonaprenil difosfato	C04145	6830
trans,trans-Farnesil fosfato	C20121	135626581

**Tabla 13.** Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la vía de síntesis de terpenos ubiquinona y tocoferoles.

Biosíntesis de terpenos ubiquinona y tocoferoles		
Compuesto	KEGG	PubChem
Ácido 4-Hidroxifenilpirúvico	C01179	979
2-Metil-6-fitolhidroquinona	C15882	23724601
Ácido 4-Hidroxicinámico	C00811	637542
Delta-Tocoferol	C14151	92094
Nonaprenil difosfato	C04145	6830
Geranilgeranil-PP	C00353	447277
1,4-Dihidroxi-2-naftoato	C03657	NA
Alfa-Tocoferol	C02477	14985
Alfa-Tocotrienol	C14153	5282347
Ácido Homogentísico	C00544	780
Vitamina K1	C02059	5280483
L-Tirosina	C00082	6057
Vitamina K reducida (filoquinona)	C03313	5284607
2,3-Dimetil-5-fitolquinol	C15883	NA
Gamma-Tocoferol	C02483	14986
Gamma-Tocotrienol	C14155	5282349
Demetilfiloquinol	C21084	295369346
Beta-tocoferol	C14152	6857447
Menaquinol	C05819	5280839
6-Geranilgeranil-2,3-dimetilbenzeno-1,4-diol	C20738	254741206
epsilon-Tocoferol	C14154	9844470
2-Succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexeno-1-carboxilato	C16519	NA
fitil difosfato	C05427	7791
Vitamina K2	C00828	5283547
Dimetilfiloquinona	C13309	56927684
(1R,6R)-6-Hidroxi-2-succinilciclohexa-2,4-dieno-1-carboxilato	C05817	NA
Isocorismato	C00885	NA

**Tabla 14.** Compuestos putativamente identificados pertenecientes a la vía de síntesis de diterpenos/giberelinas.

Biosíntesis de diterpenos/giberelinas		
Compuesto	KEGG	PubChem
Giberelina A20	C02035	NA
Giberelina A51	C11865	13964928
Giberelina A9	C11863	NA
Giberelina A19	C02034	4632015
Giberelina A4	C11864	NA
Gibberelina A124	C11861	0
Giberellin A44 diacid	C06095	NA
ent-Copalil difosfato	C06089	NA
Geranilgeranil-PP	C00353	447277
Giberelina A51-catabolito	C11854	NA
Ácido (ent-6alfa,7alfa)-6,7-Dihidroxi-16-cauren-19-oico	C11876	0
(3E,7E)-4,8,12-Trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno	C20700	13941492
Ácido ent-7alfa-Hidroxicaur-16-en-19-oico	C11875	NA
ent-16-cauren-19-al	C11873	0
Giberelina A1	C00859	NA
Giberelina A34	C11868	NA
ent-16-cauren-19-ol	C11872	529650
(E,E)-Geranilinalol	C20681	172232401
Giberelina A29	C06096	NA
Giberelina A12 7-aldehído	C06093	5253705
Giberelina A15 lactona	C11860	NA
Giberelina A53	C06094	5253706
Giberelina A8-catabolito	C11870	NA
2beta-Hidroxigiberelina 1	C03579	NA
Giberelina A12	C11857	NA
Ácido caur-16-en-18-oico	C11874	NA
Giberelina A34-catabolito	C11869	NA

El orden de elución de los compuestos (**Figuras 33**) corresponde a lo esperado, ya que al ser una cromatografía de reparto en fase reversa, primero aparecen los compuestos más polares (como los azúcares) y finalmente aquellos de naturaleza menos polar (como los ácidos grasos). Por otro lado, algunos metabolitos se ionizan mejor en modo positivo (los que se comportan más como bases, por ejemplo los alcaloides); metabolitos como los fenoles que tienen moléculas hidroxilo o carboxilo se comportan como ácidos y se ionizan mejor en modo negativo.

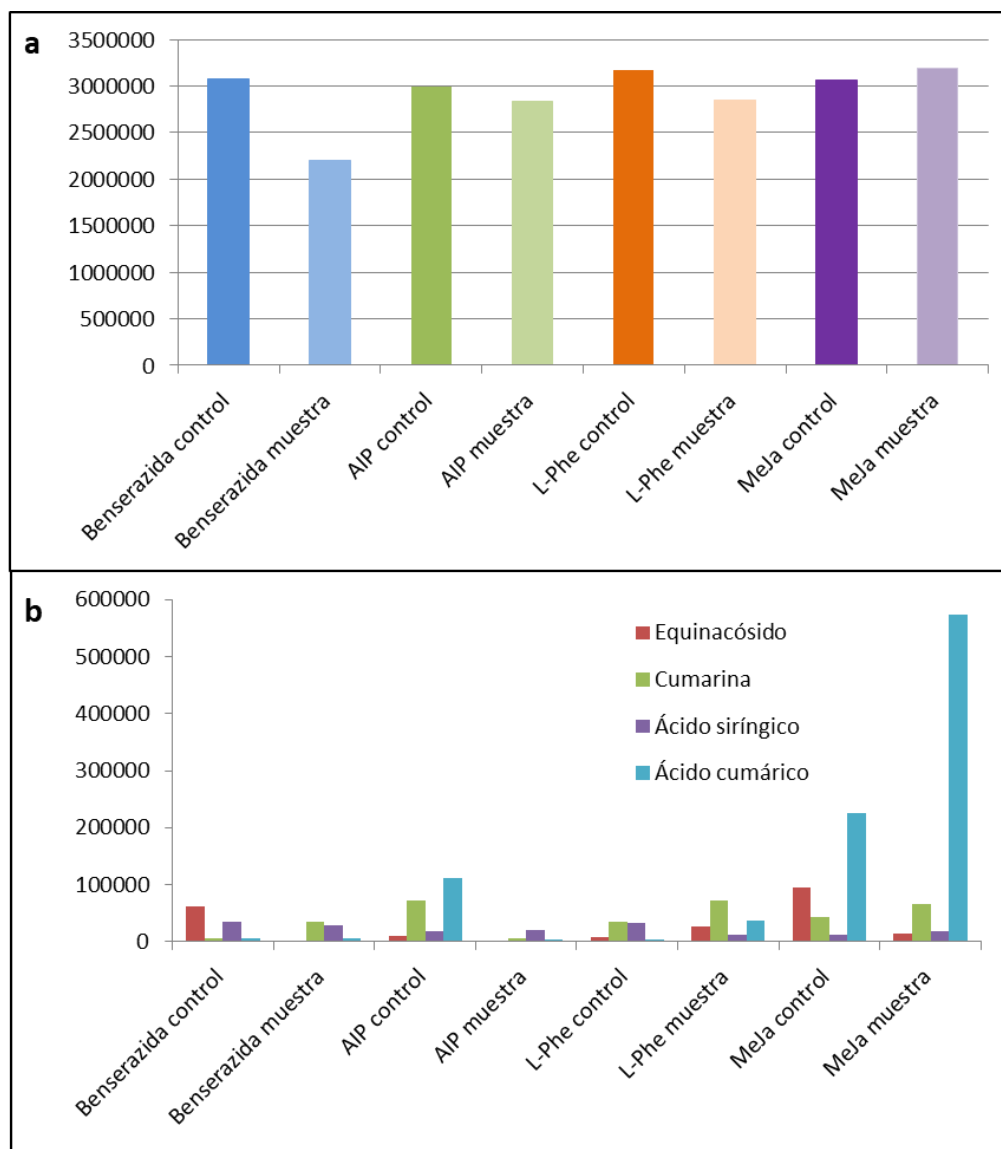
En una reciente revisión sobre compuestos bioactivos presentes en el género *Buddleja*, se enlistan iridoides, lignanos, fenilpropanoides, feniletanoides, terpenoides (sesquiterpenos, di y triterpenos, en conjunto con sus glicósidos), neolignanos, flavonoides, esteroides, ésteres aromáticos, ésteres ácido graso-fenoles (Khan *et al.*, 2019). Considerando lo anterior, los compuestos identificados después del enriquecimiento eran los esperados, siendo una de las principales vías la de los fenilpropanoides y de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) (**Tabla 8, Figuras 30 y 32**). Por otro lado, es relevante la actividad en las vías de síntesis de los aminoácidos prolina, arginina, metionina y cisteína, ya que podrían ser empleados como precursores para incrementar la síntesis de glucosinolatos en el caso de cisteína y metionina. Prolina y arginina como precursores de coumaroil-CoA y feruloil-CoA y estos a la vez de flavonoides y ligninas, por ejemplo (KEGG, mapas 00330, 00940 y 00941; <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). En cuanto al triptófano, podría emplearse como precursor de elementos neuroactivos como triptamina y las catecolaminas serotonina y melatonina (*ver* **Tabla 11**) (Pathak-Gandhi y Vaidya, 2017; Yilmaz y Gökmen, 2020). No obstante, es necesario precisar su identidad.

Se identificó un ion precursor de 623.20 [m/z] al minuto 4.75 en las corridas en modo negativo, y un ion más de 785.25 [m/z] al minuto 5.20, asociados a los feniletanoide glicósidos verbascósido y equinacósido, respectivamente. Las abundancias de los iones precursores obtenidas en cada una de las muestras analizadas se muestran en la **Tabla 15** y se presentan en la **Figura 34**. En el caso de verbascósido (**Figura 34a**) se observó la disminución del ion precursor en las muestras tratadas con los inhibidores benserazida y AIP, lo cual es consistente con las observaciones previas (**Figuras 15b y 18b**). También hubo consistencia con MeJa (**Figura 14b**), pero no así con L-Phe (**Figura 11b**). Igualmente se observó la

disminución en las abundancias del ion precursor de equinacósido en las muestras tratadas con los dos inhibidores. L-Phe aumentó su abundancia mientras que MeJa la disminuyó (**Figura 34b**). En otras especies del género *Buddleja* han sido identificados ambos compuestos en la misma especie, por ejemplo, en *Buddleja globosa* (Mensah *et al.*, 2001), *Buddleja officinalis* (Guo *et al.*, 2004) y *Buddleia lindleyana* (Lu *et al.*, 2005), algo que también ha sido detectado en otras plantas productoras de verbascósido como *Cistanche desertícola* (Chen *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2011a), *Cistanche tubulosa* (Morikawa *et al.*, 2014), *Cistanche salsa* (Chen *et al.*, 2015) y *Scrophularia striata* (Ahmadi-Sakha *et al.*, 2016), por mencionar algunas. Al igual que el verbascósido, el equinacósido posee múltiples actividades farmacológicamente importantes, con especial atención en efectos neuroprotectores y cardiovasculares. Se proyecta como un compuesto potencial para tratar las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Liu *et al.*, 2018a).

**Tabla 15.** Abundancias relativas de los iones precursores de los compuestos verbascósido, equinacósido, cumarina, ácido siríngico y ácido cumárico obtenidas por espectrometría de masas en cada uno de los tratamientos probados en células de *B. cordata*, benserazida, AIP, L-Phe y MeJa.

Compuesto	Ionización	m/z	RT	Tratamiento							
				Benserazida control	Benserazida muestra	AIP control	AIP muestra	L-Phe control	L-Phe muestra	MeJa control	MeJa muestra
Verbascósido	[M-H] <sup>-</sup>	623.2011	4.75	3077527	2201310.5	2992764	2838134	3177402.5	2847464	3059328	3185260.5
Equinacósido	[M-H] <sup>-</sup>	785.2295	5.2	61286.5	1239	9712		7423	27346	94379	15281
Cumarina	[M+H] <sup>+</sup>	145.0064	2.15	6732.5	34391	73028	5592	36022.5	71394.5	43700	66370
Ácido siríngico	[M-H] <sup>-</sup>	197.805	3.6	34020	28925	18913.5	20661.5	32950	11388	11205	19328
Ácido cumárico	[M+H] <sup>+</sup>	147.0376	2.42	5807.5	5799.5	111668	4376	4803	37585	225804.5	572912.5



**Figura 34.** Comparación de abundancias relativas de los iones precursores de los compuestos **a.** verbascósido y **b.** equinacósido, cumarina, ácido siríngico y ácido cumárico obtenidas por espectrometría de masas en cada uno de los tratamientos probados en células de *B. cordata*, benserazida, AIP, L-Phe y Meja.

Por otro lado, se detectó un ion precursor de 145.14 [m/z] en el minuto 2.15 identificado como cumarina, además de un ion precursor de 197.17 [m/z] al minuto 3.6 identificado como ácido siríngico, ambos pertenecientes a la vía de síntesis de los fenilpropanoides (**Figura 12 en el Anexo**); ambos aparecieron además en los análisis de enriquecimiento (**Tabla 9**). Es importante resaltar que estos elementos previamente habían sido identificados durante los análisis de HPLC empleando estándares puros (*ver* en esta sección **Cinética de crecimiento y producción de fenilpropanoides**). Por otro lado, en esa misma sección se señaló que a



diferencia de los primeros análisis cromatográficos en la línea original (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009), esta vez no se habían identificado los ácidos hidroxicinámicos: ácido cumárico, caféico, ferúlico y sinápico. Estos compuestos aparecieron en el análisis de masas especialmente ácido cumárico (ión precursor de 147.03 [m/z] en el minuto 2.42) (**Tabla 9, Figura 12 en el Anexo**), por lo que la explicación de unas bajas concentraciones debido a su inmediata incorporación a la producción de otros fenilpropanoides (como posible causa de por qué no se detectaron durante los análisis HPLC) es coherente (**Figura 5**). Las abundancias de los iones precursores de cumarina, ácido sirínico y ácido cumárico obtenidas en cada una de las muestras analizadas se muestran en la **Tabla 15** y se presentan en la **Figura 34b**. Las abundancias de los iones precursores de los compuestos ácido cumárico y cumarina disminuyeron con el inhibidor AIP, pero aumentaron con L-Phe y MeJa, las observaciones son congruentes partiendo de que ambos compuestos son derivados del ácido cinámico el cual es producto de la actividad de la enzima PAL. Por otro lado, las abundancias de los iones precursor de ácido sirínico disminuyeron con el inhibidor benserazida y con L-Phe, pero aumentaron con MeJa. De acuerdo con lo anterior, MeJa podría ser empleado en cultivos de *B. cordata* para aumentar la producción de cumarina, ácido sirínico y ácido cumárico.

Adicionalmente, después de llevar a cabo los análisis de enriquecimiento, bajo las condiciones evaluadas, no se identificó el flavonoide linarina (**Figura 13 en el Anexo , Tabla 10**), al igual que en como se había observado previamente durante el análisis cromatográfico de líquidos. Sin embargo, la ruta de biosíntesis de flavonoides se mostró como una de las vías principalmente representadas (**Figuras 12 y 13 del Anexo; Tabla 8**). Vazquez-Marquez *et al.*, (2019), señalaron la producción de flavonoides además de compuestos fenólicos y feniletanoide glicósidos durante ensayos en biorreactor con la línea original de *B. cordata*. Es probable que tales flavonoides correspondan a algunos de los compuestos putativamente identificados durante los ensayos de enriquecimiento (*ver Figura 14 en el Anexo y Tabla 10*). Haría falta comprobar su identidad mediante análisis con estándares puros o bien mediante resonancia magnética nuclear. En otras especies del género *Buddleja*, han sido identificados algunos flavonoides como eriodictiol, luteolina, luteolina glucopiranosido, rutinósido, quercetina, apigenina, diosmina e isorhoifolina, entre otros (Khan *et al.*, 2019). Y en otras especies productoras de verbascósido naringenina, quercetina, apigenina, luteolina y rutina (Rubio-Rodriguez *et al.*, 2021).

Los compuestos de naturaleza fenilpropanoide y flavonoide son ampliamente estudiados y producidos debido a sus efectos antienvjecimiento, por mencionar algunos: ácido caféico, curcumina, EGCG, epicatequina, kaempferol, luteolina, miricetina, naringenina, quercetina, resveratrol, tirosol, vitamina E (Si y Liu, 2014 y referencias ahí). De comprobarse la identidad de los flavonoides producidos por *B. cordata*, la línea celular podría emplearse como fuente de estos importantes elementos químicos, además de otros de naturaleza terpénica, esteroides, giberelinas, ubiquinonas, clorofilas, carotenoides, tocoferoles (por ejemplo, vitamina E), elementos precursores de catecolaminas, indol-alcaloides y alcaloides benzilisoquinolina (ver **Tablas 11-14**).

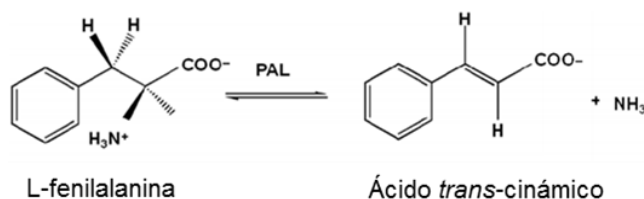
Indudablemente, *B. cordata* es una importante fuente de metabolitos especializados con múltiples actividades farmacológicas, es conveniente llevar a cabo estudios para precisar la identidad de los compuestos putativamente identificados para tener mayor claridad sobre los cambios cuantitativos, aplicando métodos estadísticos para señalar los cambios metabólicos debidos a los diferentes tratamientos (por ejemplo, L-fenilalanina, metil jasmonato, y los inhibidores benserazida y AIP. Igualmente, sería enriquecedor realizar el análisis del perfil metabólico medianamente y poco polar de la línea celular (por ejemplo, de fracciones extraídas con hexano, diclorometano y acetato de etilo).

#### **8.4 Clonación del gen *PAL* de *Buddleja cordata* (*Bcpal*)**

La fenilalanina amonio liasa 'PAL' (EC 4.3.1.24) es una enzima ampliamente distribuida en el reino vegetal. Se encuentra presente en todas las plantas superiores (monocotiledóneas, dicotiledóneas, gimnospermas, helechos y licopodios), en algunos hongos (basidiomicetos, deuteromicetos y ascomicetos) y en pocos organismos procariotas, incluyendo *Streptomyces* (Appert *et al.*, 1994; Hyun *et al.*, 2011). En cambio, a la fecha no hay reportes sobre la presencia de genes homólogos a *pal* en los linajes de algas verdes, algas rojas ni en mamíferos (Barros y Dixon, 2020). PAL pertenece a la familia de enzimas aminoácido aromático-liasas, las cuales catalizan la ruptura de enlaces químicos en compuestos orgánicos por un mecanismo diferente a la hidrólisis o la oxidación. Es una de las pocas enzimas transformadoras de aminoácidos que no dependen de piridoxal 5'-fosfato (PLP) como cofactor (Hyun *et al.*, 2011). La familia incluye además a la enzima bifuncional L-Phe/L-tirosina amonio liasa (PTAL, EC 4.3.1.25), presente únicamente en plantas pertenecientes a la

familia Poaceae. Además, en la naturaleza existe una versión monofuncional, la tirosina amonio liasa (TAL, EC 4.3.1.23), aunque hasta la fecha no ha sido identificada en plantas ni en hongos (Barros y Dixon 2020). Adicionalmente, existe la enzima L-histidina amonio liasa (HAL, EC 4.3.1.3), aunque a pesar de su estrecha relación con PAL y PTAL únicamente se la ha ubicado en el reino animal.

Normalmente, PAL es una enzima integrada por aproximadamente 700 aminoácidos, su estructura ternaria consiste en cuatro subunidades idénticas (homo-tetramérica). Cataliza la desaminación no oxidativa del aminoácido L-fenilalanina para formar ácido *trans*-cinámico y un ión libre de amonio (**Figura 35**) (Hyun *et al.*, 2011; Tohge *et al.*, 2013). Su actividad es controlada principalmente vía síntesis *de novo* de la enzima, pero también puede ser regulada anulando su actividad enzimática por producto, es decir, por el ácido *trans*-cinámico (Tohge *et al.*, 2013).



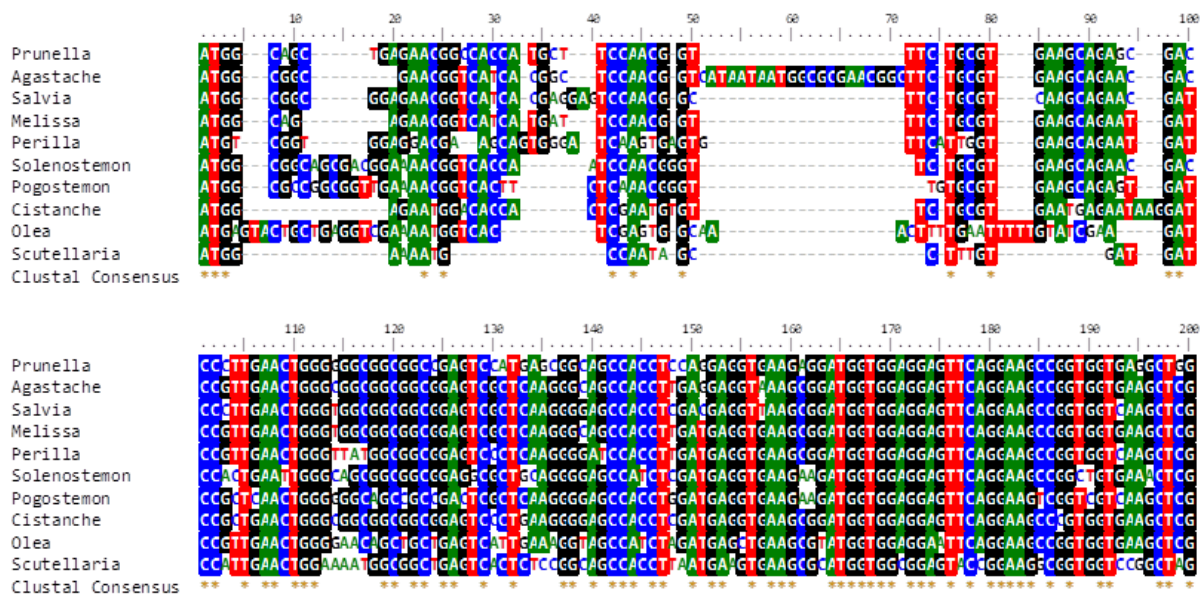
**Figura 35.** Esquema de reacción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Hyun *et al.*, 2011).

La conversión del aminoácido L-fenilalanina a ácido *trans*-cinámico es el paso de entrada en la canalización del flujo de carbono del metabolismo primario al metabolismo secundario (incluyendo un amplio espectro de compuestos fenilpropanoides, fenoles y algunos alcaloides). PAL ha sido extensivamente estudiada debido a su rol en el desarrollo de las plantas y a su respuesta a una gran variedad de estímulos ambientales incluyendo herbivoría, radiación ultravioleta, etileno, patógenos y elicitores (Appert *et al.*, 1994; Korkina, 2007; Song y Wang, 2009; Vogt, 2010; Hu *et al.*, 2011b; Hyun *et al.*, 2011; Kumar y Goel, 2019; Vanholme *et al.*, 2019).

Con base en los resultados obtenidos previamente respecto al uso del inhibidor de la fenilalanina amonio liasa, 'AIP', se determinó que la enzima PAL tiene un papel fundamental

en la síntesis de verbascósido en *B. cordata*, como también es el caso de diferentes dicotiledóneas productoras del compuesto, así como de otros feniletanoide glicósidos, por ejemplo *Cistanche deserticola* (Hu et al., 2011b) y *Teucrium chamaedrys* (Antognoni et al., 2012). Con la finalidad de entender con mayor detalle la regulación, biosíntesis y acumulación de verbascósido en cultivos de células en suspensión de *Buddleja cordata*, en este trabajo se planteó como otro objetivo la clonación de un gen codificante de la proteína PAL de *B. cordata* 'Bcpal'.

Debido a la falta de información genética de la especie, y en primera instancia para la clonación del gen *Bcpal*, se obtuvo información en las bases de datos digitales sobre la secuencia nucleotídica del gen *pal* así como de la secuencia de aminoácidos de la proteína en especies cercanas a *Buddleja cordata*; en este caso, especies pertenecientes al orden Lamiales ya que a la fecha no hay información disponible al respecto sobre especies pertenecientes al género *Buddleja* ni a la familia Scrophulariaceae. La información obtenida en las bases de datos de NCBI sirvió como base para el diseño de primers degenerados con base en secuencias altamente conservadas (Figuras 36 y 37).



210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

Prunella GGGAGAGACCTCACATATCGAGGTGCCGGGATCGCGCCAGGATATCGCTGGCGGTGGAGTTGGCGGATCGCCGAGGGCCCGCGTCAAGGC

Agastache GGGGAGACCTCACATATCTCAGGTCCCGGATCGCCGCAAGGATATCGGTTGGCGGTGGAGCTGGCGGACTCGCCGAGGGCCCGCGTCAAGGC

Salvia GCGGAGACCTCACATATCTCAGGTGCCGGGATCGCGCCAGGATATCGGTTGGCGGTGGAGCTGGCGGACTCGCCGAGGGCCCGCGTCAAGGC

Melissa GCGGAGACCTCACATATCTCAGGTGCCGGGATCGCGCCAGGATATCGGTTGGCGGTGGAGCTGGCGGACTCGCCGAGGGCCCGCGTCAAGGC

Perilla GCGGAGACCTCACATATCGAGGTGCCGGGATCGCGCCGCGGATATCGGTTGGCGGTGGAGCTGGCGGACTCGCCGAGGGCCCGCGTCAAGGC

Solenostemon GCGGAGACCTCACATATCGAGGTGCCGGGATCGCGCCAGGATATCGGTTGGCGGTGGAGCTGGCGGACTCGCCGAGGGCCCGCGTCAAGGC

Pogostemon GGGGAGACCTCACATATCGAGGTGCCGGGATCGCGCCAGGATATCGGTTGGCGGTGGAGCTGGCGGAGCGCCGAGGGCCCGCGTCAAGGC

Cistanche GGGGAGACCTCACATATCGAGGTGCCGGGATCGCGCCAGGATATCGGTTGGCGGTGGAGCTGGCGGAGCGCCGAGGGATGGCGTTAAGGC

Olea GGGAGAGACCTCACATATCTCAGGTGCCGGGATCGCGCCAGGATATCGGTTGGCGGTGGAGCTGGCGGAGCGCCGAGGGATGGCGTTAAGGC

Scutellaria GCGGAGACCTCACATCGGAGGTGCCGGGATCGCGCCAGGATATCGGTTGGCGGTGGAGCTGGCGGAGCGCCGAGGGATGGCGTTAAGGC

Clustal Consensus \*\*\*\*\*

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

Prunella TAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Agastache CAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Salvia CAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Melissa CAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Perilla CAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Solenostemon CAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Pogostemon CAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Cistanche CAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Olea TAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Scutellaria CAGCAGGATGGGTTATGGAAGCATGAACAAAGGACCGGACAGTTACGGCTACACCGGTTTCGGTCCACCTCACACCGAGGACCAACAGGGC

Clustal Consensus \*\*\*\*\*

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

Prunella GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Agastache GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Salvia GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Melissa GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Perilla GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Solenostemon GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Pogostemon GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Cistanche GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Olea GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Scutellaria GGGCTCTTCAGAAAGAGCTCATTAGGTTCTTGAAGCCGGAAATATTCGGAAGGGACGGAATCTTCCACACCTTCCCGCCACACGGCACCGG

Clustal Consensus \*\*\*\*\*

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

Prunella CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Agastache CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Salvia CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Melissa CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Perilla CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Solenostemon CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Pogostemon CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Cistanche CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Olea CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Scutellaria CCAATGCTGGTTCGGATCAACACCTCTCCCAAGGTACTCCGGCATCAGATTGGAATCTTGGAAAGCCATACCAAAATTCCTCAACCAACATCACCC

Clustal Consensus \*\*\*\*\*

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

Prunella CTGCCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Agastache ATGCCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Salvia ATGCCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Melissa ATGCCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Perilla ATGCCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Solenostemon CTGCCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Pogostemon TTGCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Cistanche TTGCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Olea ATGCCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Scutellaria ATGCCTCCCCCTCCGGCCACCATCACGGCTCGGGGATCTCGTCCCCCTCTCTACATGCGGGCTCCTCACCAGCCGCCCAACTCCAAAGCCGT

Clustal Consensus \*\*\*\*\*









A continuación, se llevó a cabo una serie de reacciones de PCR empleando diferentes primers degenerados: con las combinaciones de primers **a)** F1 con R1 o R2 o **b)** F2 con R1 o R2, esperando amplificar un fragmento de ~450 pb. Por otro lado, con las combinaciones **c)** F1 con R3 o R4 o **d)** F2 con R3 o R4 el tamaño del fragmento esperado era de ~330 pb. Los fragmentos obtenidos con los tamaños correspondientes fueron enviados a secuenciación. Después de comparar las secuencias obtenidas con las de las bases de datos (análisis BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se confirmó que la identidad de dichas secuencias no correspondía al gen *pal* sino más bien a otros genes (ver *Anexo*). Por lo que se llevó a cabo un rediseño de primers degenerados (F1up, F2nes, R1dw, R2nes) igualmente con la intención de llevar a cabo una PCR anidada. Con la combinación de primers F1up-R1dw se esperaba amplificar un fragmento de ~2019 pb, mientras que con la combinación F2nes-R2nes un fragmento de ~1523 pb. De acuerdo con las bases de datos y después de llevar a cabo análisis BLASTn en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de las secuencias nucleotídicas amplificadas, fue posible confirmar que la identidad de algunos fragmentos obtenidos (**Figuras 39 y 40**), en este caso sí correspondieron al gen *pal* (**Figura 41**). Posteriormente, con base en esas secuencias, se diseñaron primers específicos para amplificar las regiones hacia 5' (GSP1 y GSP2) y hacia 3' del gen (GSP3 y GSP4), empleando como molde **i)** ADN complementario y **ii)** ADN genómico.



Figura 39. Secuencia de nucleótidos de un fragmento de ARN mensajero de un gen *pal* de *Buddleja cordata*, producto de una PCR anidada con los primers F2nes-R2nes. (Secuenciación con primer F2nes).



**Figura 40.** Secuencia de nucleótidos de un fragmento de ARN mensajero de un gen *pal* de *Buddleja cordata*, producto de una PCR anidada con los primers F2nes-R2nes. (Secuenciación con primer R2nes).

**a**

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum phenylalanine ammonia-lyase (LOC105174307) mRNA	1672	1672	99%	0.0	84.48%	<a href="#">XM_011096360.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Sesamum indicum phenylalanine ammonia-lyase (PAL) mRNA complete cds	1581	1581	99%	0.0	83.16%	<a href="#">KP070825.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum phenylalanine ammonia-lyase (LOC105161378) mRNA	1581	1581	99%	0.0	83.16%	<a href="#">XM_011079036.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Scutellaria viscidula phenylalanine ammonia-lyase (PAL) mRNA complete cds	1572	1572	99%	0.0	83.03%	<a href="#">FJ432698.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Scutellaria baicalensis phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1) mRNA complete cds	1559	1559	99%	0.0	82.83%	<a href="#">HM062776.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Digitalis lanata mRNA for phenylalanine ammonia-lyase	1515	1515	99%	0.0	82.17%	<a href="#">AJ002221.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Perilla frutescens phenylalanine ammonia-lyase (PAL) mRNA complete cds	1496	1496	99%	0.0	81.90%	<a href="#">JQ277717.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Olea europaea phenylalanine ammonia-lyase (PAL) mRNA complete cds	1464	1464	99%	0.0	81.44%	<a href="#">KJ511868.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Osmanthus fragrans phenylalanine ammonia-lyase (PAL) mRNA complete cds	1455	1455	99%	0.0	81.31%	<a href="#">MN512442.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Ocimum basilicum phenylalanine ammonia-lyase (PAL) mRNA partial cds	1454	1454	99%	0.0	81.41%	<a href="#">KU375119.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Rehmannia glutinosa phenylalanine ammonia-lyase (PAL1) mRNA complete cds	1408	1408	99%	0.0	80.65%	<a href="#">AF401636.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Scutellaria baicalensis phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) mRNA complete cds	1401	1401	99%	0.0	80.52%	<a href="#">HM062777.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Ipomoea triloba phenylalanine ammonia-lyase (LOC116028538) mRNA	1356	1356	99%	0.0	79.85%	<a href="#">XM_031270271.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Pogostemon cablin isolate A phenylalanine ammonia-lyase (PAL3) mRNA complete cds	1353	1353	99%	0.0	79.80%	<a href="#">KJ768875.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis phenylalanine ammonia-lyase (LOC104116279) mRNA	1346	1346	99%	0.0	79.80%	<a href="#">XM_003627102.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Nicotiana tabacum phenylalanine ammonia-lyase-like (LOC107769293) mRNA	1344	1344	99%	0.0	79.67%	<a href="#">NM_001325017.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana sylvestris phenylalanine ammonia-lyase (LOC104218178) mRNA	1344	1344	99%	0.0	79.67%	<a href="#">XM_009768603.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Picrohiza kurrooa phenylalanine ammonia-lyase mRNA complete cds	1344	1344	99%	0.0	79.44%	<a href="#">JQ996410.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> Nicotiana tabacum phenylalanine ammonia-lyase 4 (pal4) mRNA complete cds	1344	1344	99%	0.0	79.67%	<a href="#">EU883670.1</a>

**b**

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits
<a href="#">Pentapetalae</a>	<a href="#">eudicots</a>		<a href="#">103</a>
• <a href="#">asterids</a>	<a href="#">eudicots</a>		<a href="#">101</a>
• <a href="#">Lamiids</a>	<a href="#">eudicots</a>		<a href="#">95</a>
• • <a href="#">Lamiales</a>	<a href="#">eudicots</a>		<a href="#">28</a>

**Figura 41.** Resultado del análisis tipo BLASTn (nucleótidos, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de las secuencias de nucleótidos obtenidas (Figuras 39 y 40), **a)** descripción de los resultados de secuencias con el mayor parecido a las secuencias analizadas, **b)** taxonomía de los organismos a los cuales pertenecen las secuencias resultantes.

Después, mediante el análisis y comparación de las secuencias resultantes de la nueva ronda de reacciones de PCR, fue posible generar información relevante concerniente sobre todo a una isoforma del gen *pal*, de la cual se obtuvo la mayor información (**Figura 42**) y la cual en adelante será referida como '*Bcpal1*'. Sabemos de este gen que contiene dos exones y un intrón, lo cual es consistente con los genes *pal* en la mayoría de las angiospermas como *Arabidopsis thaliana* (*Atpal1*, L33677.1 y *Atpal2*, AT3G53260), *Coffea canephora* (DQ067599.1), *Salvia miltiorrhiza* (*Smpal1*, EF462460.1), *Beta vulgaris* (AJ810175.1), *Nicotiana tabacum* (M84466.1), *Medicago sativa* (X58180.1), *Glycine max* (*Pal1*, X52953.1), *Trifolium subterraneum* (*Pal1*, M91192.1), *Solanum lycopersicum* (*PAL5*, M90692.1), *Solanum tuberosum* (*Pal1*, X63103.1), *Oryza sativa* (X16099.1), *Daucus carota* (*gDcPAL1*, D85850.1) y

*gDcPAL3*, AB089813.1), *Pisum sativum* (*Pal1*, D10002.1 y *Pal2*, D10003.1), entre otras. Los intrones vegetales varían entre 60 y 10 000 pb, la extensión de los intrones *pal* también es muy variable, pero típicamente (como en la mayoría de los intrones vegetales) son ricos en A+T y tienen como sitio de splicing estándar GT/AG (Lorkovic *et al.*, 2000; Song y Wang, 2009). No fue posible conocer la extensión total del intrón del gen *Bcpal1* (únicamente conocemos 1212 pb), sin embargo, fue posible identificar el sitio de splicing (**Figura 42**), el contenido de A+T aproximado de la secuencia es del 70%, lo cual es consistente con algunas de las características relevantes de las secuencias intrónicas *pal*. En cuanto a las secuencias exónicas, únicamente se determinó la secuencia codificante total del exón 2, actualmente, el extremo 5' del exón 1 es aún desconocido (**Figura 42**). Es decir, que del gen *Bcpal1* conocemos un marco de lectura abierto de 2019 pb que codifica 672 aminoácidos. El análisis BLASTn de *Bcpal1* indicó que el gen tiene una identidad alta con otros genes *pal*, principalmente de especies vegetales pertenecientes al orden Lamiales, por ejemplo, comparte una similitud del 82.99% con *Sesamum indicum* (XM\_011096360.2), 81.3% con *Scutellaria viscidula* (FJ432698.1), 81.1% con *Scutellaria baicalensis* (HM062776.1), 80.46% con *Cistanche deserticola* (GU451308.1), 80.22% con *Rehmannia glutinosa* (AF401636.1), 80.11% con *Perilla frutescens* (JQ277717.1) y del 80.03% con *Digitalis lanata* (AJ002221.1). Además el análisis BLASTp confirmó su semejanza con proteínas PAL esencialmente de organismos pertenecientes al orden Lamiales, por ejemplo, 91.52% con *Sesamum indicum* (XP\_011077338.1), 90.77% con *Handroanthus impetiginosus* (PIM98440.1), 90.33% con *Perilla frutescens* (AEZ67457.1), 90.03% con *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), 89.73% con *Pogostemon cablin* (AJ053274.1), 89.58% con *Solenostemon scutellarioides* (AFZ94859.1), 89.43% con *Scutellaria viscidula* (ACR56688.1) igual que con *Salvia miltiorrhiza* (*Pal3*, AGW27206.1), 89.29% con *Erythranthe guttata* (XP\_012836017.1) y 89.15% con *Digitalis lanata* (O23924.1) y *Cistanche deserticola* (ADD12041.1). Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos putativa posee la secuencia consenso: G-[STG]-[LIVM]-[STG]-[AC]-S-G-[DH]-L-X-P-L-[SA]-X(2)-[SAV] propia de las fenilalanina e histidina amonio liasas (Song y Wang, 2009), Prosite PS00488 (**Figura 42** dentro de un rectángulo y en la **Figura 43b** resaltada en amarillo: GTITASGDLVPLSYIAG).

-----inicio 5'-----

CGTATGGTGGAGGAGTTCAGGAAGCCGGTGTGAAGCTCGCGCGGAGAGTTTGACTATATCGCAGGTGGCGGGATCGCGGCCAGGATA  
**R M V E E F R K P V V K L G G E S L T I S Q V A A I A A R D**  
ATGCGGTGGCGGTGAGCTGGCGGAGACGGCGAGGGCCGCGTTAAGGCCAGCAGTGATTGGGTTATGGAGAGTATGAATAAAGGGGACTGA  
**N A V A V E L A E T A R A G V K A S S D W V M E S M N K G T**  
TAGCTATGGCGTTACTACTGGTTCGGTGCCACTTCTCACCGGAGAACTAAGCAAGGCGGTGCTCTCCAAAAGGAGCTTATCAGGaccacctaac  
**D S Y G V T T G F G A T S H R R T K Q G G A L Q K E L I R**

-----intrón-----

ttctattttgaatttategagttcagattttgtttcaattttgttttaagtgttggaattgacttctcaagtccgaacaggagtcgagtaacagaaattgattttgtttgacataatttateatlttttaacttaatttaagtcgagtttgcagcaaaagtatt  
tcataattgttttaatatggtttaatatgtttatcgaatttacttcaacaagcttttaactaacggttaaaccgacgagatcraaacagctctgctgttattcagcctattcagcgttaaccttaccgtatccatlttaaaaaaataatttgaataaatttgcgataatgctat  
ataattttctctactcttagtacacctattgatatagtgataatagtaataagtaatttcaattatatttcaaaaaatatttttacacatttagcatgacagtgagcagagacagaaataaaacttcttttgcaccgaacaatgaaattgattgtgctcgrattttataaaa  
tttggattcacaatgagattttttttctgttcgagccacacaaaaatatttcaatacaagtcgacatataaataagaataatttattttaaagaaataattttctattttatttaccggtgaccataaatgtagtgtagacaaaatgataaaaaa  
agtaaaataaaaaaaaaattctgtacagaatgaggtgggtgctaggctttgaccgtcctgaattttataacttggaggacagtttaatttttaactcaagaagaagagataacttataccagctgataactcagtagatagttataattgtag  
agccataaaaaacctatttatttcaatgaggggagagccacaaacttgggtcattgtctcctaggttcgaacacaaaccttaataaaaaatgggggggtagatccactagaccacaaagttaggacattttatttcaagggaattgtttagtgat  
ataccacaataatttgaataaaaattccaaaaaggaccctttgaccgaatttaatttgaacccgggttaaatcaattaaaaactcaaaaattaccocaaaaataataaatggaacaccttaattgacctctcaattgctctcgaattgctggagcaggggat  
gccc-----intrón-----  
**GT**TTCTAAATGCTGGAATTTTCGGACAGGGACAGAATCATGCCACACACTCCCACACTCAGCAACAAGAGCAGCAATGCTTGAAGAATCA

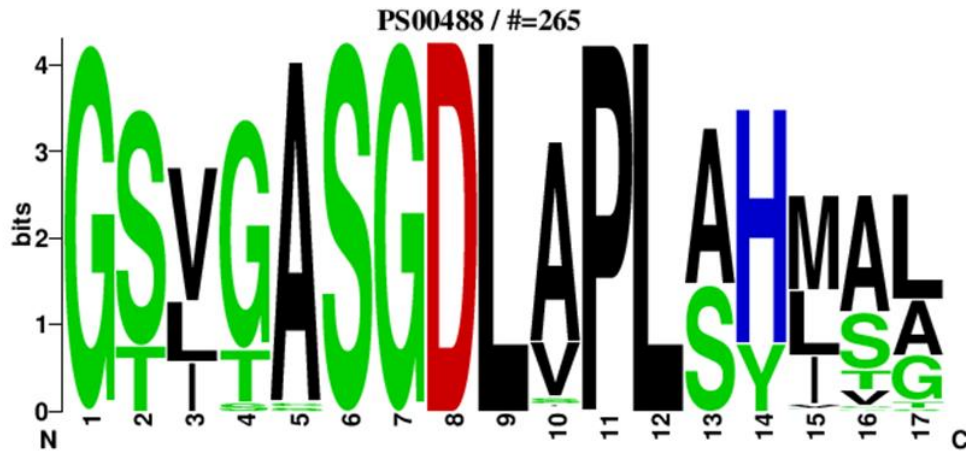
**F L N A G I F G Q G T E S C H T L P H S A T R A A M L V R I**  
ACACTCTTCCAAAGGCTACTCAGGCATAAGATTGTGAATCTTGGAACTCATAACCAAATTCCTCAACCACAACTACTCCGCTCTTTGGCC  
**N T L L Q G Y S G I R F E I L E V I T K F L N H N I T P S L P**  
CTCCGTGGCAGATCACCGCTCCGGCGACCTGTGCCCTTATCTCACTTGGCGGGCTTTAACTGGCCGTCCAACTCCAAAAGCCGCTGGC  
**L R G T I T A S G D L V P L S Y I A G L L T G R P N S K A V G**  
CCGAAGCGCAAGCCCTAAACGCTGAAGAAAGGGTTCAGCTCGCCGGAGTTGACGGTGGTTTCTTCGAGCTGCAGCCTAAGGAAGGCCCTTGC  
**P N G E A L N A E E A F K L A G V D G G F F E L Q P K E G L**  
CCTAGTCAACGGAAACAGCTGFCGGCTFCGGGATTGGCCGCATTGCTCTCTACGAGGCCAACGTTCTTCGATGTTGTCTGAAGTTATGTCTG  
**A L V N G T A V G S G L A A I A L Y E A N V L A L L S E V M S**  
CTCTTTTCGCTGAAGTTATGAACGGAAAGCCGGAATTCACCGATCATTGACCCACAAGTTGAAGCACCATCCGGGTCAAATCGAGGCTGGC  
**A L F A E V M N G K P E F T D H L T H K L K H H P G Q I E A A**  
GCTATAATGGAAACATATTCTTGATGGTAGCTCATATGTTAAGGCTGCACAAAAGATGCATGAAATGGATCCCTTACAAAACCAAGCAAG  
**A I M E H I L D G S S Y V K A A Q K M H E M D P L Q K P K Q**  
ATAGATATGCTCTTAGAACCTCCCAACAATGGCTCGGTCCGCAAAATCGAAGTCATTTCGGGCCCTAATAAGATGATCGAGCGCGAGATCAAC  
**D R Y A L R T S P Q W L G P Q I E V I R A A N K M I E R E I N**  
TCGGTTAACGACAAACCCTTTGATGATGTTTCTAGAAACAGGCCCTTACATGTTGGAAACTTCCAAGGTACACCAATTCGGAGTTCATGGA  
**S V N D N P L I D V S R N K A L H G G N F Q G T P I G V S M**  
TAACACTAGATTGGCTATAGCATCAATTCGGAAAGTTAATGTTTGGCTCAATTTTCGGAACTTGTTAATGATTTTTACAATAACGGGTTACCG  
**D N T R L A I A S I G K L M F A Q F S E L V N D F Y N N G L P**  
TCTAATCTCCGGCGGGCGGACCCGAGCTTGGATTACGGTTTCAAAGGAATGAAATCGCCATGGCCCTCATATTGCTCAGAGCTCCAAT  
**S N L S G R D P S L D Y G F K G M E I A M A S Y C S E L Q**  
CTTGCTAACCCAGTCAAAACATGTCCAAGCGCCGAGCAGCATAACCAAGATGTGAATTTCTAGGTTTGTATCTCTCGAGGAAACCG  
**F L A N P V T N H V Q S A E Q H N Q D V N S L G L I S S R K T**  
TTGAGGCTTTGGATATCTTGAAGCTTATGTTATCAACATACCTAGTCGGGCTATGCCAAGCCGTCGATTGAGGCATTGGAAGAGAATTA  
**V E A L D I L K L M L S T Y L V G L C Q A V D L R H L E E N L**  
AAACTTGTCTAAGAAATAGTGAAGCCAGTTGCTAAAAAACCCTAACAAATGGGTGCTAATGGAGAGCTTCATCCATCAGCATTTTGGC  
**K L A I K N S V S H V A K R T L T M G A N G E L H P S R F C**  
AAAAGGCTTTACTTCAAGTAGTCGAACGTGAGTAGGTTTTGGTACGTGGATGACCCGTGCAGCGGATCTATCCGTTGATGCAGAAACTG  
**E K A L L Q V V E R E Y V F A Y V D D P C S G S Y P L M Q K L**  
AGGCAAGTATCTGCTGATCATGCATTGGAGAATGGAGACAATGAGAAGAGTGTGGGAACGTTTATTTTCCATAAGATTGAAGCGTTTGA  
**R Q V S A D H A L E N G D N E K S V G T F I F H K I E A F E**  
ACGAACTGAAGGCCATTTTGCCTAGAGAAAGTGGAGCGCGGAGAAAGTCCGCTCGCGAGTGGAAATCCTGCGATTGGGAACAGGATTAAAGGA  
**N E L K A I L P R E V E S A R S A L A S G N P A I G N R I K**  
ATGTAGATCATATCCTTTGTATAAGTTTATAAGGGAGGAATTTGGAAACGGAGTTCTTGACAGGGCAAAAGGTTACGTCGCCGGCGAGGAG  
**E C R S Y P L Y K F I R E E L G T E F L T G E K V T S P G E E**  
GGAGAAAAAGTGTACTGCTTTGAGCAATGGACTAATTTGTGATCCATTGTTGAAGTGTCTTGACGGGAGTGGAAATGGTGGAGCTCTCC  
**G E K V F T A L S N G L I V D P L L K C L A R E W N G E P L P**  
TATCTGCTAG

I C -

**Figura 42.** Secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos putativa del gen *Bcpa1* de *Buddleja cordata*. El codón de paro (TAG) está en negritas y subrayado. El sitio de *splicing* GT/AG está sombreado. La secuencia consenso del sitio activo de la enzima (PS00488) está dentro de un rectángulo. Se desconoce la región 5' del primer exón, así como la región 3' de la secuencia intrónica.

**a**

### Sequence logo for PS00488



Name and characterization of the entry

Description [info]	Phenylalanine and histidine ammonia-lyases signature.
Pattern [info]	[GS]-[STG]-[LIVM]-[STG]-[SAC]-S-G-[DH]-L-x-[PN]-L-[SA]-x(2,3)-[SAGVTL].

**b**

```

RMVEEFRKPFVVKLGGESLTIISQVAAIAARDNAVAVELAETARAGVKASSDWVMSMNKGTDSYGVIT
TGFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGQGTESCHTLPHSATRAAMLVLRINTLLQGYSGIRFE
ILEVITKFLNHNITPSLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGEALNAEEAFKLAGV
DGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGLAALYEAANVLLALLSEVMSALFAEVMNGKPEFTDHLTHKLNK
HHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQKMHMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRAANKMIE
REINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMNTRLAIASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPS
NLSGGRDPSLDYGFKGMEIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTVEALDI
LKLMLSTYLVGLCQAVDLRHLEENLKLAIKNSVSHVAKRTLTMGANGELHPSRFCEKALLQVVERE
YVFAYVDDPCSGSYPLMQKLRQVSADHALENGDNKESVGTFIHFKIEAFENELKAILPREVESARS
ALASGNPAIGNRIKECRSYPLYKFIREELGTEFLTGEKVTSPGEEGEKVFTALSNGLIVDPLLKCL
AREWNGEPLPIC
  
```

**Figura 43.** Motivo rúbrica de las fenilalanina e histidina amonio liasa. **a)** secuencia del motivo PS00488 en la base de datos Prosite (<https://prosite.expasy.org/>), **b)** motivo rúbrica en la secuencia de aminoácidos de la proteína putativa BcPal1 (resaltado en amarillo).

## 8.5 Caracterización de la proteína BcPal1 putativa

Mediante el uso de la herramienta en línea **ProtParam** (<https://web.expasy.org/protparam/>) se calculó el punto isoelectrico (pI) y el peso molecular de la proteína deducida BcPal1, 6.11 y 73.1 kDa, respectivamente (**Tabla 16**). Además, con el recurso en línea **SOPMA** ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)) se determinaron las propiedades de estructura secundaria de la proteína: su composición consiste en un 56.4% de  $\alpha$ -hélices, 6.55% hebras extendidas, 6.10% giros  $\beta$  y 30.05% de enrollamientos al azar.

Asimismo, los datos obtenidos fueron comparados con los datos de algunas especies cercanas a *B. cordata* como *Cistanche deserticola* (GU451308.1, Hu *et al.*, 2011), *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), *Picrorhiza kurrooa* (AGA84059.1) y *Digitalis lanata* (CAA05251.1). Los datos indican una gran semejanza entre las propiedades de estructura secundaria de BcPal1 y las de las especies comparadas (**Tabla 16**).

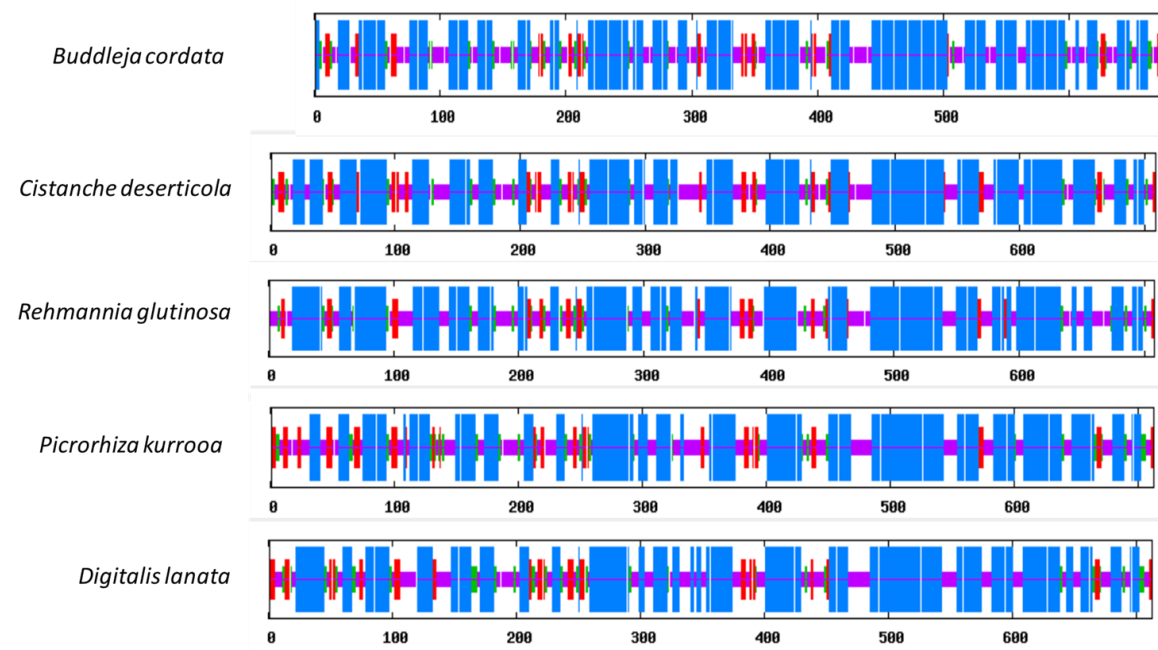
No obstante, se observó que el contenido de hebras extendidas (6.55%) está por debajo de la media (por ejemplo, *Cistanche deserticola* 8.6%, *Rehmannia glutinosa* 7.49%, *Picrorhiza kurrooa* 9.54%, *Digitalis lanata* 7.94%), probablemente se trate del tipo de estructura codificado en la región 5' desconocida del exón 1 de *Bcpal1*. Aunque al comparar gráficamente las estructuras secundarias de las proteínas en la **Figura 44** hay señales que indican que probablemente no sólo falten hebras extendidas (en color rojo) sino también  $\alpha$ -hélices (en color azul) y giros  $\beta$  (en color verde).

Se observa que PAL es una enzima altamente conservada, sobre todo del aminoácido en la posición 100 en adelante (**Figuras 37 y 44**); en cambio, las variaciones más evidentes se observan en el sentido contrario, es decir del residuo 100 al primero; este patrón también se observa en las secuencias nucleotídicas (**Figura 36**).



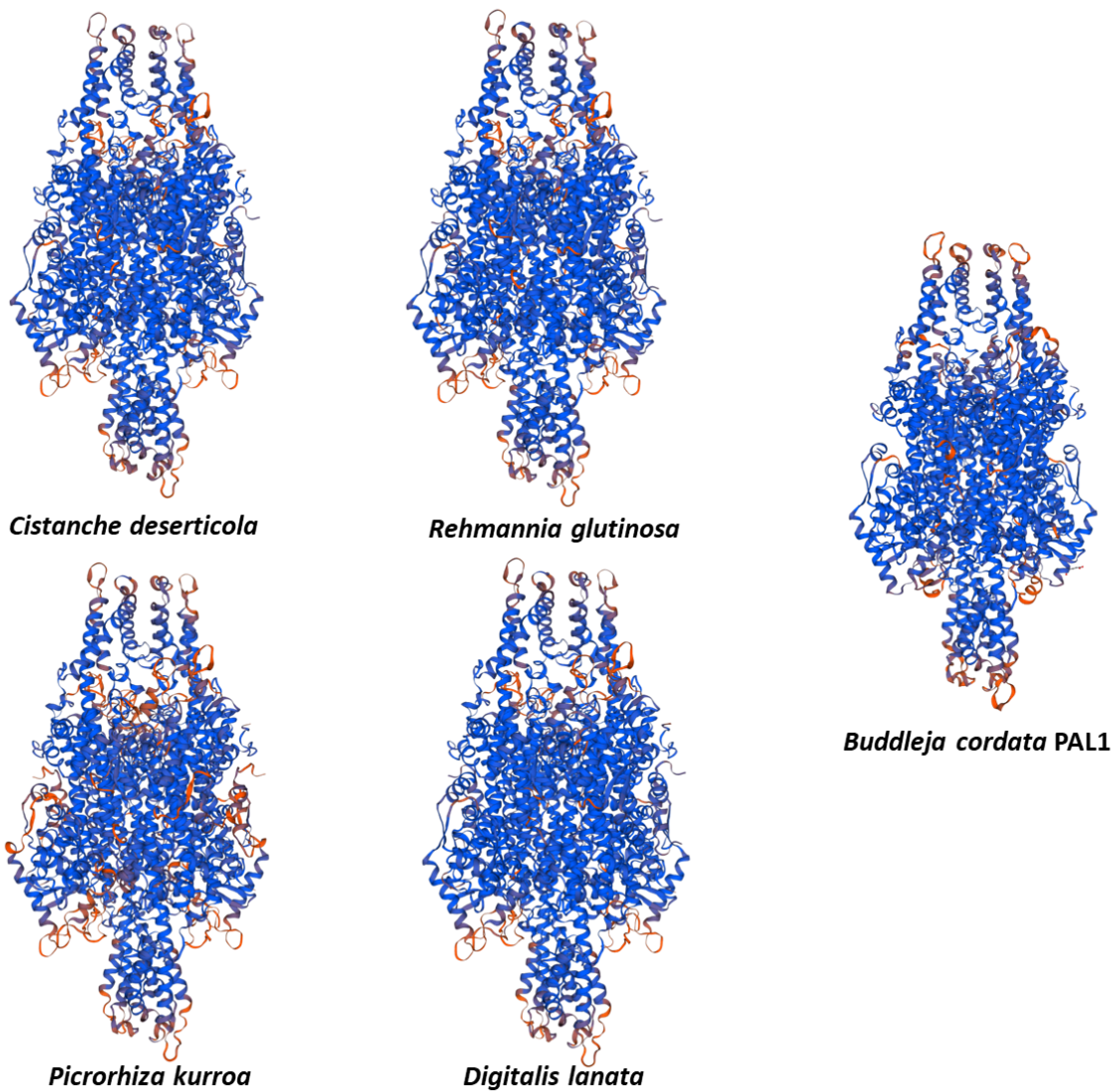
**Tabla 16.** Comparación de la composición de la estructura secundaria deducida de una proteína fenilalanina amonio liasa de *Buddleja cordata* (Bcpal1) y algunas especies cercanas pertenecientes al Orden Lamiales (*Cistanche deserticola*, GU451308.1; *Rehmannia glutinosa*, AAK84225.1, *Picrorhiza kurrooa*, AGA84059.1 y *Digitalis lanata*, CAA05251.1). Los datos fueron obtenidos con los recursos en línea ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), para calcular el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular de las proteínas, y SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)), para determinar la estructura secundaria de las proteínas.

Composición de la estructura secundaria de la proteína PAL	Especie				
	<i>Buddleja cordata</i> pal1 (putativa)	<i>Cistanche deserticola</i>	<i>Rehmannia glutinosa</i>	<i>Picrorhiza kurrooa</i>	<i>Digitalis lanata</i>
$\alpha$ -hélice	56.4%	56.14%	56.78%	53.3%	52.12%
Hebras extendidas	6.55%	8.60%	7.49%	9.54%	7.94%
Giros $\beta$	6.10%	5.22%	5.37%	6.59%	7.15%
Enrollamientos al azar	30.05%	30.04%	30.51%	30.58%	29.73%
Número de aminoácidos	672	709	708	713	713
Peso molecular	73.1 Kda	77.2 KDa	76.8 KDa	77.7 KDa	77.7
Punto isoeléctrico (pI)	6.11	6.04	6.16	6.82	6.21

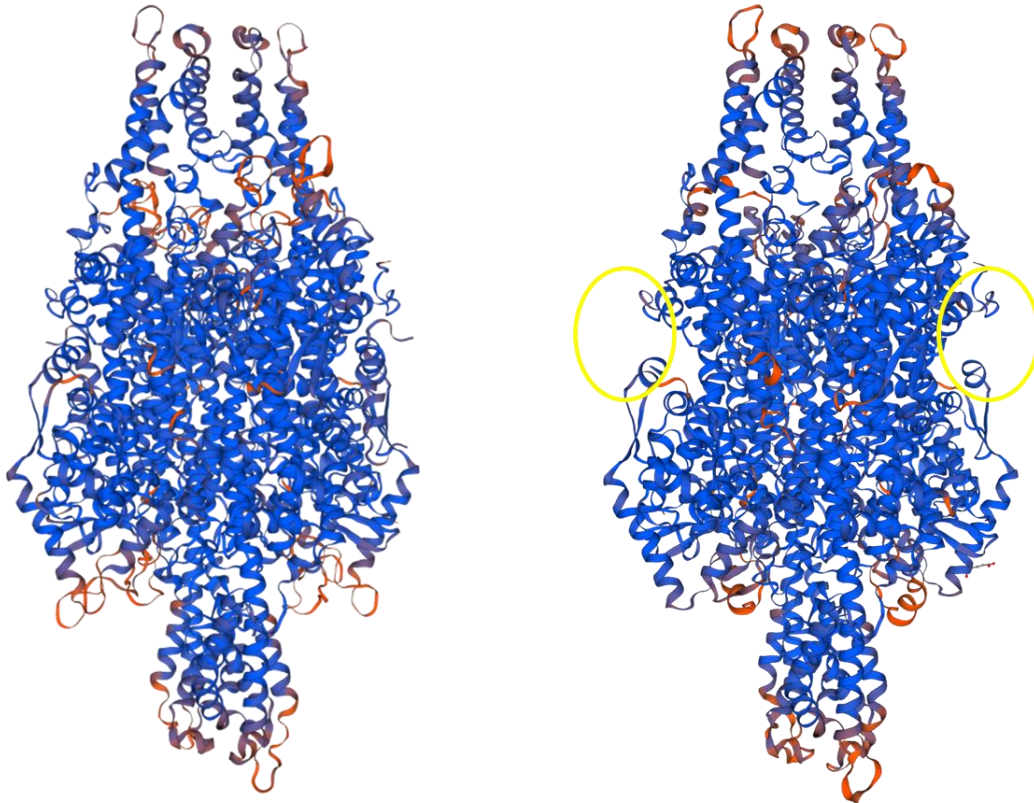


**Figura 44.** Estructura secundaria deducida de una isoforma de la proteína PAL de *Buddleja cordata* (BcPal1) y de otras proteínas PAL vegetales pertenecientes al Orden Lamiales, *Cistanche deserticola* (GU451308.1, Hu *et al.*, 2011), *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), *Picrorhiza kurrooa* (AGA84059.1) y *Digitalis lanata* (CAA05251.1).  $\alpha$ -hélice (azul), Giros  $\beta$  (verde), hebras extendidas (rojo), enrollamientos al azar (amarillo). Los datos fueron obtenidos con el recurso en línea SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html))

En los modelos 3D de las proteínas PAL construidos con **Swiss-Model** (<https://swissmodel.expasy.org/>) (**Figura 45**), los cambios estructurales no son tan evidentes ya que, de entrada, en todos los casos se trata de estructuras homo-tetraméricas. Cuando se observa con mayor atención, las variaciones se notan especialmente en las regiones medio-laterales de los modelos, esto es: partiendo verticalmente los modelos, las regiones centrales externas de cada mitad. Estas regiones, están codificadas en la región 5' de los genes *pal*, lo cual explica la homología estructural de BcPal1 con las otras proteínas y a la vez evidencia la región faltante en la proteína (**Figura 46**). A pesar del fragmento faltante, se puede observar la homología de BcPal1 con otras proteínas PAL aún perteneciendo a géneros diferentes. Incluso la composición de aminoácidos es muy semejante, como puede constatarse en la **Tabla 17**.



**Figura 45.** Estructura 3D deducida de una isoforma de la proteína PAL de *Buddleja cordata* y estructura 3D de otras proteínas PAL vegetales pertenecientes al Orden Lamiales, *Cistanche deserticola* (GU451308.1, Hu *et al.*, 2011), *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), *Picrorhiza kurroa* (AGA84059.1) y *Digitalis lanata* (Acceso, CAA05251.1). Los modelos fueron obtenidos con Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>).



*Cistanche deserticola*

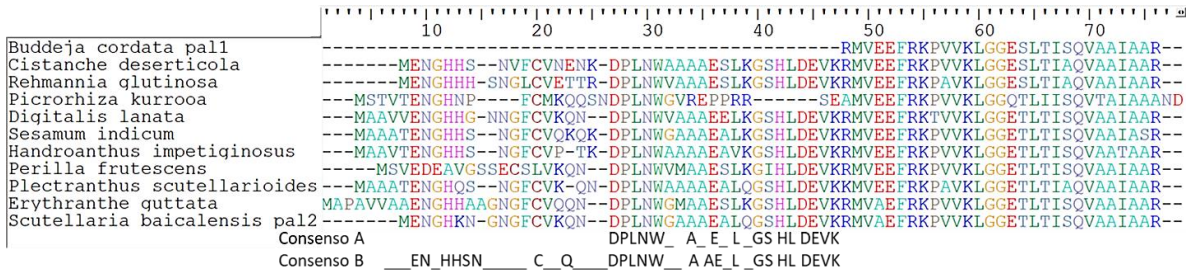
*Buddleja cordata* PAL1

**Figura 46.** Estructura 3D deducida de una isoforma de la proteína PAL de *Buddleja cordata* y estructura 3D de la proteína PAL de *Cistanche deserticola* (Hu *et al.*, 2011). Con círculos amarillos se indica la región faltante de la proteína (la región 5' en el gen *Bcpal1*). Los modelos fueron obtenidos con Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>).

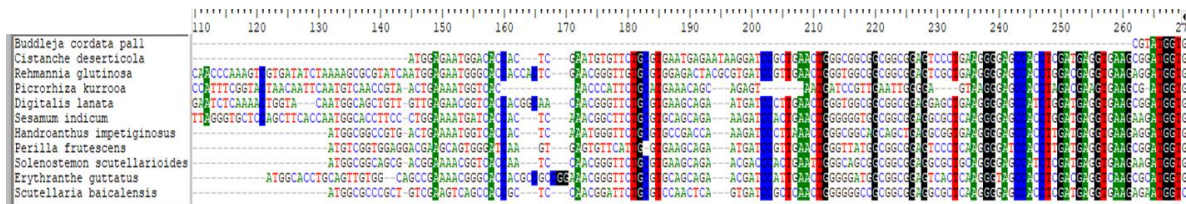
Por comparación con secuencias consenso de algunas proteínas PAL (**Figura 47**), es posible hacerse una idea aproximada (hasta cierto punto) sobre los aminoácidos que podrían encontrarse en la región 5' del gen *Bcpal1*. La predicción se complica al comparar la secuencia de nucleótidos (**Figura 48**) debido a que incluso entre isoformas pertenecientes a una misma especie la región 5' es sumamente variable (**Figura 49**) por lo que se complica el diseño de un primer específico y/o degenerado para amplificar esta región a partir de ADN codificante.

**Tabla 17.** Comparación de la composición de aminoácidos deducida para una proteína fenilalanina amonio liasa de *Buddleja cordata* (Bcpal1) y algunas especies cercanas pertenecientes al Orden Lamiales (*Cistanche deserticola*, GU451308.1; *Rehmannia glutinosa*, AAK84225.1, *Picrorhiza kurrooa*, AGA84059.1 y *Digitalis lanata*, CAA05251.1). Los datos fueron obtenidos con el recurso en línea ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

<b>Aminoácido</b>	<b><i>Buddleja cordata pal1</i></b>	<b><i>Cistanche deserticola</i></b>	<b><i>Rehmannia glutinosa</i></b>	<b><i>Picrorhiza kurrooa</i></b>	<b><i>Digitalis lanata</i></b>
Ala (A)	9.70%	9.70%	9.50%	8.80%	9.30%
Arg (R)	4.60%	4.90%	4.50%	4.60%	4.50%
Asn (N)	5.50%	5.50%	5.80%	6.20%	6.00%
Asp (D)	3.40%	4.20%	3.70%	3.40%	3.50%
Cys (C)	1.20%	1.60%	1.40%	1.40%	1.40%
Gln (Q)	3.30%	3.00%	3.10%	3.20%	3.50%
Glu (E)	7.90%	7.80%	7.30%	7.00%	7.60%
Gly (G)	8.30%	8.00%	8.10%	7.70%	7.70%
His (H)	2.70%	2.50%	2.80%	2.50%	2.70%
Ile (I)	5.20%	5.10%	5.50%	5.50%	5.00%
Leu (L)	11.30%	11.00%	11.20%	11.20%	11.10%
Lys (K)	5.40%	5.60%	5.20%	5.50%	5.50%
Met (M)	2.50%	2.10%	2.00%	2.70%	2.50%
Phe (F)	3.70%	3.40%	3.20%	3.20%	3.50%
Pro (P)	4.30%	4.20%	4.40%	4.80%	4.10%
Ser (S)	7.10%	6.90%	7.20%	7.70%	7.30%
Thr (T)	4.80%	4.50%	5.60%	5.60%	5.50%
Trp (W)	0.40%	0.60%	0.60%	0.60%	0.60%
Tyr (Y)	2.20%	2.30%	2.30%	2.20%	2.10%
Val (V)	6.40%	7.10%	6.60%	6.20%	6.70%
Pyl (O)	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Sec (U)	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%



**Figura 47.** Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de una isoforma de la proteína PAL de *Buddleja cordata* con secuencias consenso de otras proteínas PAL vegetales. **Consenso A**, Secuencias aminoacídicas de PAL de perejil, papa, frijol, soya, alfalfa, tomate, tabaco y papa dulce (Appert *et al.*, 1994). **Consenso B**, Secuencias aminoacídicas de PAL de especies cercanas a *B. cordata*, pertenecientes al Orden Lamiales, *Cistanche deserticola* (GU451308.1, Hu *et al.*, 2011), *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), *Picrorhiza kurrooa* (AGA84059.1), *Digitalis lanata* (Acceso, CAA05251.1), *Sesamum indicum* (XP\_011077338.1), *Handroanthus impetiginosus* (PIM98440.1), *Perilla frutescens* (AEZ67457.1), *Plectranthus scutellarioides* (AFZ94859.1), *Erythranthe guttata* (XP\_012836017.1), *Scutellaria baicalensis* (PAL2, ADN32768.1).



**Figura 48.** Comparación de la secuencia de nucleótidos de una isoforma del gen *pal* de *Buddleja cordata* con secuencias *pal* especies cercanas a *B. cordata*, pertenecientes al Orden Lamiales, *Cistanche deserticola* (GU451308.1, Hu *et al.*, 2011), *Rehmannia glutinosa* (AAK84225.1), *Picrorhiza kurrooa* (AGA84059.1), *Digitalis lanata* (Acceso, CAA05251.1), *Sesamum indicum* (XP\_011077338.1), *Handroanthus impetiginosus* (PIM98440.1), *Perilla frutescens* (AEZ67457.1), *Plectranthus scutellarioides* (AFZ94859.1), *Erythranthe guttata* (XP\_012836017.1), *Scutellaria baicalensis* (PAL2, ADN32768.1).



Con base en el análisis de secuencias sabemos que, en realidad, se obtuvo información de por lo menos tres isoformas del gen *pal*, incluyendo *Bcpal1*. En las **Figuras 50 y 51**, se observa el alineamiento de los segmentos de nucleótidos identificados para cada una de las isoformas y además las secuencias de aminoácidos deducidas para cada una de ellas. Es posible advertir que a pesar de que hay bases y aminoácidos conservados, las secuencias no son idénticas entre sí, razón por la cual se concluye que se trata de isoformas diferentes. Es importante mencionar en este punto que la limpieza de las secuencias obtenidas apoya esta conclusión (ver **Figuras 9-11** en el *Anexo*). No obstante, no se obtuvo la secuencia completa de ninguna de las tres isoformas (**Figura 52**).

BcPAL2	AGGACTTTAAACAATGGGGGTCAATGGGGAGCTTCACCCATCTCGATTCTGCGAGTTGGAT	1422
BcPAL1	AGAACCCTAACAATGGGTGCTAATGGAGAGCTTCATCCATCAGATTTTGC AAAAGGCT	1560
BcPAL3	-----GAGCTTCACCCGTCGATTCTGTGAGTTGGAC	33
	***** **.*:***** ** **.:***.	
BcPAL2	TTGCTCCGTGTGGTGGACCGTGAATACGTTTTTCACATACGCAGACGACCCATGCCTTGGGA	1482
BcPAL1	TTACTTCAAGTAGTCGAACGTGAGTACGTTTTTGC GTACGTGGATGACCCGTGCAGCGGA	1620
BcPAL3	TTGCTCCGTGTAGTGGACCGTGAATACGTTTTTCGCATACGCAGATGATCCATGCCTTGGGA	93
	**.* **.*:*** **.* *****.***** .*.***** .** ** **.***.* **	
BcPAL2	TCCTACCCATTGATGCAGAACTGAGGCAGGTATCTGCT-----	1521
BcPAL1	TCCTATCCGTTGATGCAGAACTGAGGCAAGTATCTGCTGATCATGCATTGGAGAATGGA	1680
BcPAL3	TCCTACCCGTTGATGGAGAAATTGAGGCAAGTTCTCGTGGATCATGCATTGAAAAACGGT	153
	***** **.* ***** ***** *****.*: *	

**Figura 50.** Alineamiento de un segmento de nucleótidos de tres isoformas del gen *pal* de *Buddleja cordata*.

BcPAL3	-----ELHPSRFCELDLLRVVDREYVFAYADDPCLG	31
BcPAL1	RHLEENLKLAIKNSVSHVAKRTLTMGANGELHPSRFCEKALLQVVEREYVFAYVDDPCSG	540
BcPAL2	RHLEENLRNAVKN TVSQVAKRTLTMGVNSELHPSRFCELDLLRVVDREYVFTYADDPCLG	494
	***** **.*:*****.*.***** *	
BcPAL3	SYPLMEKLRQVLVDHALKNGENEKNGVTSIFQKIQAFEEELKAVLPKEVESARIALES GN	91
BcPAL1	SYPLMQKLRQVSADHALENG DNEKSVGTFIFHKIEAFENELKAILPREVESARSALASGN	600
BcPAL2	SYPLMQKLRQVSA-----	507
	*****:***** .	
BcPAL3	PAIDNRIKECRSYPLYKFVREELGTEFLTGEKVTSPGEEGDKVFTALS KGLIVDPLLECL	151
BcPAL1	PAIGNRIKECRSYPLYKFIREELGTEFLTGEKVTSPGEEGEKVTALS NGLIVDPLLKCL	660
BcPAL2	-----	507
BcPAL3	Q-GWNGEPLPIC	162
BcPAL1	AREWNGEPLPIC	672
BcPAL2	-----	507

**Figura 51.** Alineamiento de un segmento de aminoácidos deducidos de tres isoformas de la proteína Pal de *Buddleja cordata*.



BcPAL3	-----	0
BcPAL1	RMVEEFRKPVVKLGGESLTI SQVAAIAARDNAVAVELAETARAGVKASSDWVMESMNKGT	60
BcPAL2	-----ASSDWVMESMNKGT	14
BcPAL3	-----	0
BcPAL1	DSYGVTTFGFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGQGESCHTLPHSATRAAMLVRIN	120
BcPAL2	DSYGVTTFGFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNGTESHTLPHSATRAAMIVRIN	74
BcPAL3	-----	0
BcPAL1	TLLQGYSGIRFEILEVITKFLNHNITPSLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAV	180
BcPAL2	TLLQGYSGIRFEILEAIAKFLNENITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAV	134
BcPAL3	-----	0
BcPAL1	GPNGEALNAEEAFKLAGVDGGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGLAAIALYEANVLALLSEV	240
BcPAL2	GPKGESLSAEEAFKLAGVNGGFFELQPK EGLALVNGTAVGSGLASIALYEANILALLSEV	194
BcPAL3	-----	0
BcPAL1	MSALFAEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAQKMHMDPLQK	300
BcPAL2	LSAVFAEVMNGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSGYVKAQKMHMDPLQK	254
BcPAL3	-----	0
BcPAL1	PKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRAANKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPI	360
BcPAL2	PKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRAATMMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPI	314
BcPAL3	-----	0
BcPAL1	GVSMDNTRLAIASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRDPSLDYGFKGMEIAMASY	420
BcPAL2	GTSMDNTRLAIASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASY	374
BcPAL3	-----	0
BcPAL1	CSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTVEALDILKMLSTYLVGLCQAVDL	480
BcPAL2	CSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTTEALDILKLMSTYLIALCQAIDL	434
BcPAL3	-----ELHPSRFCELDLLRVVDREYVFAYADDPCLG	31
BcPAL1	RHLEENLKLAIKNSVSHVAKRTLTMGANGELHPSRFCEKALLQVVEREYVFAYVDDPCSG	540
BcPAL2	RHLEENLRNAVKNVTSQVAKRTLTMGVNGELHPSRFCELDLLRVVDREYVFYADDPCLG ***** **:***:*****:*.**** *	494
BcPAL3	SYPLMEKLRQVLVDHALKNGENEKNGVGT SIFOKIQAFEEELKAVLPKEVESARIALES GN	91
BcPAL1	SYPLMQKLRQVSADHALENGDNESVGT FIFHKIEAFENELKAILPREVESARSALASGN	600
BcPAL2	SYPLMQKLRQVSA----- *****:***** .	507
BcPAL3	PAIDNRIKECRSYPLYKFVREELGTEFLTGEKVTSPGEEGDKVFTALSKGLIVDPLECL	151
BcPAL1	PAIGNRIKECRSYPLYKFIREELGTEFLTGEKVTSPGEEGKVTALSNGLIVDPLLKCL	660
BcPAL2	-----	507
BcPAL3	Q-GWNGEPLPIC	162
BcPAL1	AREWNGEPLPIC	672
BcPAL2	-----	507

**Figura 52.** Alineamiento de aminoácidos deducidos de fragmentos de tres isoformas (BcPal1, BcPal2 y BcPal3) de la proteína PAL de *Buddleja cordata*.

Posiblemente, la mejor opción para amplificar la región 5' de las isoformas implique nuevamente el uso del kit Genome Walker y/o el diseño de uno o más primers que amplifiquen desde la región regulatoria, basados sobre todo en elementos típicos de las secuencias promotoras de genes involucrados en la biosíntesis de fenilpropanoides como las cajas L (consenso: YCYACCWACC), o bien las cajas P (elementos *cis*) (consenso: YT-YMMCMAMCMMC) (Wanner *et al.*, 1995; Song y Wang, 2009).

Entre las diversas técnicas disponibles para la clonación de genes, como *pal*, en organismos vegetales no modelo, es decir, organismos de los cuales no existe información disponible sobre su genoma y/o transcriptoma, los mejores resultados se han generado con el rastreo o selección de genotecas y el uso de primers degenerados. Una genoteca o librería de ADN (que bien puede ser genómica o complementaria) es una colección aleatoria de fragmentos individuales de ADN, los cuales representan parte o todo el genoma de un organismo. En términos generales, el ADN es parcialmente digerido por una enzima de restricción, luego los fragmentos son incorporados en vectores, por ejemplo, el fago  $\lambda$ . Posteriormente son clonados dentro de algún microorganismo como bacterias y levaduras. Para identificar los clones que portan un gen o alguna región de interés en el ADN, debe llevarse a cabo su detección empleando oligonucleótidos o bien, una proteína producida por el gen blanco (Passarge, 2007). Con esta estrategia fueron clonados los genes *pal* de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Gowri *et al.*, 1991), pino de incienso (*Pinus taeda* L.) (Whetten y Sederoff, 1992), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Pellegrini *et al.*, 1994), arabidopsis (*A. thaliana*) (Wanner *et al.*, 1995) y salvia (*Salvia miltiorrhiza*) (Song y Wang, 2009), por mencionar algunos. Un primer degenerado es una mezcla de primers que tienen secuencias casi idénticas al gen blanco, pero con permutaciones específicas en ciertas posiciones. Es decir que las moléculas difieren en al menos una base. La secuencia de los primers degenerados es diseñada a partir de secuencias protéicas ya conocidas o de secuencias de regiones conservadas de una familia génica. La degeneración de un primer es el número de secuencias de ADN distintas en él descritas (Farell, 2010). El uso de este tipo de primers generalmente implica: **1.** El uso de primers degenerados para amplificar parte del gen de interés por una reacción de PCR. **2.** Identificar cuál de los productos obtenidos por PCR corresponde al gen de interés. Si bien el tamaño de los productos orienta sobre el posible paradero del gen blanco, es necesario llevar a cabo un análisis de secuenciación de los productos. **3.** La revisión de una biblioteca de ADN codificante usando el producto correcto de PCR como sonda y finalmente, la clonación del gen de interés.

Mediante el uso de primers degenerados fueron clonados los genes *pal* de pino de Banks (*Pinus banksiana*) (Butland *et al.*, 1998), *Cistanche deserticola* (Hu *et al.*, 2011b), flor del infierno (*Lycoris radiata*) (Jiang *et al.*, 2011), *Bambusa oldhamii* (Hsieh *et al.*, 2011), nogal (*Juglans regia*) (Xu *et al.*, 2012), jatrofa (*Jatropha curcas*) (Gao *et al.*, 2012) y árbol dragón (*Dracaena cambodiana*) (Wang *et al.*, 2013), entre otros.

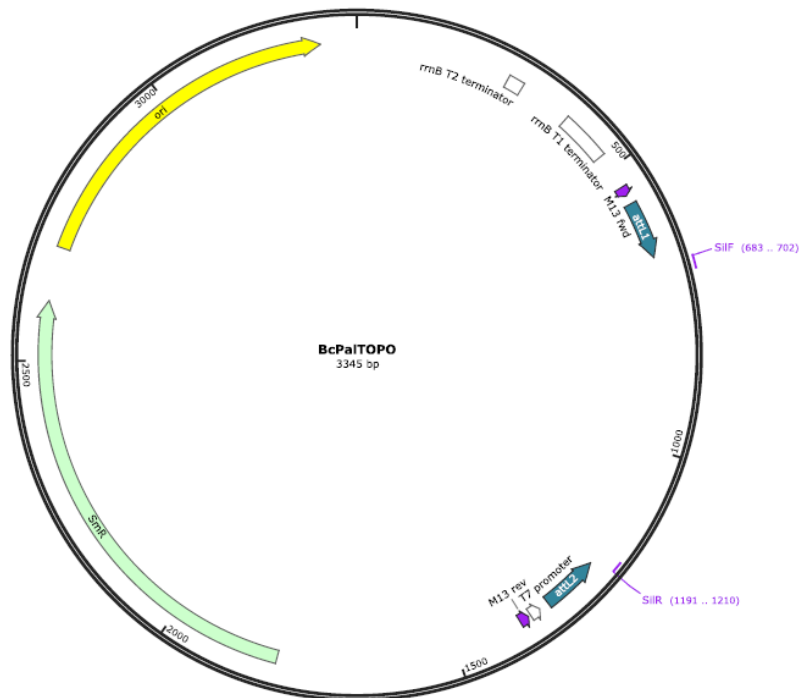
Actualmente, las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación/herramientas bioinformáticas ya no implican la inversión de importantes sumas de recursos económicos (en cambio son sumamente informativas), por lo que su uso podría arrojar claridad sobre la cantidad de isoformas existentes del gen *pal* en *B. cordata*, así como información concerniente a intrones, regiones regulatorias, etc. Pero también sobre genes/enzimas involucrados en la biosíntesis de verbascósido como en los trabajos de Zhou *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019 y Park *et al.*, 2020.

### **8.6 Silenciamiento del gen fenilalanina amonio liasa '*pal*' en cultivos en suspensión de *Buddleja cordata***

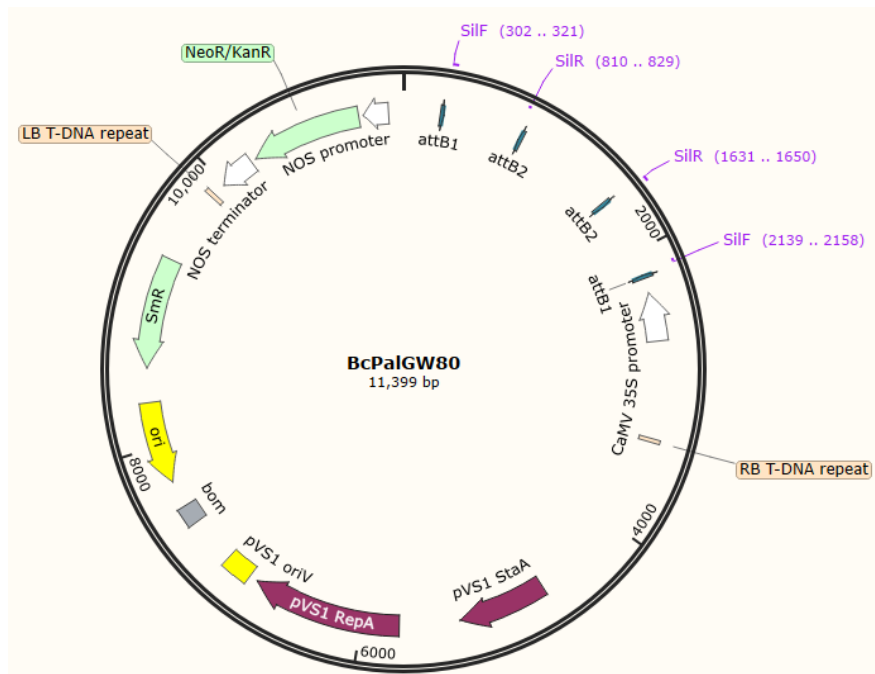
El análisis de la función de mutantes con pérdida de función ha sido fundamental para la caracterización de diversos genes. En especies vegetales, el ARN de interferencia ha sido particularmente útil en la generación de plantas knockdown (Song y Wang, 2011). Con la finalidad de generar un mayor entendimiento sobre la función biológica del gen *pal* de *B. cordata*, además de clarificar su participación en la biosíntesis de verbascósido, en este trabajo se propuso como otro objetivo el silenciamiento de dicho gen suprimiendo su expresión mediante ARN de interferencia.

La obtención de un fragmento fidedigno de secuencia perteneciente al gen de interés (Figura 24) posibilitó la ejecución del objetivo. Inicialmente se construyó el vector de entrada 'BcPalTOPO' (Figura 53), el cual consiste en la ligación de un fragmento de 526 pb del gen *BcPal1* en el vector comercial PCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, EUA). Después, el vector de entrada resultante fue empleado para generar el vector de silenciamiento 'BcPalGW80' (Figura 54) mediante un proceso de recombinación entre el vector BcPalTOPO y el vector binario comercial pGW80 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, EUA). Luego de verificar mediante secuenciación la correcta construcción de los vectores

de entrada y de silenciamiento, este último BcPalGW80 fue empleado para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 y a su vez las transformantes para infectar células en suspensión de *B. cordata*.



**Figura 53.** Mapa del vector de entrada BcPalTOPO empleado para la construcción del vector de expresión BcPalGW80. El vector contiene el origen de replicación 'ori', el promotor T7, las secuencias de terminación transcripcional *rrnB* T1 y T2. Un fragmento del gen *BcPal2*, flanqueado por los primers SiR y SiR. Los sitios de recombinación attL1 y attL2. Además el gen de resistencia a estreptomicina 'SmR' como marcador de selección.



**Figura 54.** Mapa del vector de silenciamiento BcPalGW80. El vector contiene el origen de replicación 'ori', el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 'CaMV35S', el terminador del gen nopalina sintasa 'NOS', dos fragmentos del gen *BcPal2*, cada uno flanqueado por los primers SilR y SilR. Los sitios de recombinación attB1 y attB2, el gen de resistencia a neomicina/kanamicina/geneticina 'NeoR/KanR' con el promotor NOS y además el gen de resistencia a estreptomicina 'SmR' como marcadores de selección.

El proceso de construcción de los vectores de entrada y de silenciamiento no implicó mayor problema, la construcción de vectores Gateway es una metodología conveniente en términos de tiempo y trabajo como se discutirá más adelante. Igualmente, el proceso de transformación de *A. tumefaciens* AGL-1 con el vector BcPalGW80 y la posterior selección de transformantes se llevó a cabo sin muchas complicaciones. Por el contrario, durante el desarrollo de los experimentos para obtener células de *B. cordata* con expresión atenuada del gen *pal* sí ocurrieron bastantes inconvenientes, teniendo que estandarizarse diversos pasos del procedimiento, por ejemplo:

- la cantidad de inóculo de *A. tumefaciens* para llevar a cabo la infección de los cultivos de *B. cordata*,
- ajustar el tiempo de co-cultivo entre *A. tumefaciens* y *B. cordata*,
- ajustar la concentración/tiempo de exposición del antibiótico meropenem para eliminar *A. tumefaciens*,
- ajustar la concentración/tiempo de exposición del herbicida glufosinato de amonio.

El silenciamiento del gen *pal* en células de *B. cordata* resultó en la generación de una línea que no creció en medio semisólido ni se logró establecer como sistema en suspensión. De hecho, después de la selección de transformantes con el herbicida glufosinato de amonio, éstas no sobrevivieron más allá de tres semanas de cultivo. Conforme los días transcurrían, la oxidación se hacía cada vez más evidente, hasta que las células murieron. Como solución se probó a aumentar al doble la concentración de antioxidantes en el medio de cultivo; sin embargo, la estrategia no fue suficiente. El rápido desarrollo del proceso de oxidación celular no es un evento inesperado, como ha sido mencionado con anterioridad: la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa es fundamental en la ruta general de síntesis de los fenilpropanoides (**Figura 2**) incluyendo no sólo al compuesto verbascósido (como ha sido comprobado en este trabajo con el uso del inhibidor AIP, **Figura 15**) sino a otros compuestos de naturaleza fenólica y flavonoides (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009; Vazquez-Marquez *et al.*, 2019), los cuales, entre otras cualidades, se caracterizan por sus propiedades antioxidantes. En línea con esto, la supresión del gen *pal1* de *Salvia miltiorrhiza* vía ARN de interferencia, provocó la alteración en el metabolismo de fenilpropanoides y la reducción de fenoles totales (Song y Wang, 2011). Rohde *et al.* (2004), observaron que el silenciamiento de dos de las cuatro isoformas del gen *pal* de *A. thaliana* (*PAL1* y *PAL2*) podía ser compensado por otra isoforma del gen (*PAL4*). Contrariamente, Song y Wang (2011) reportaron que en líneas con supresión del gen *pal1* de *Salvia miltiorrhiza* la expresión del gen *pal2* también se atenuó de forma importante. Los autores atribuyeron la disminución al hecho de que el fragmento del gen *pal1* empleado para construir el vector de silenciamiento compartía una alta identidad con *pal2* (74%). Esto último es relevante porque al comparar la secuencia empleada del gen *BcPal* para construir el vector de silenciamiento BcPalGW80 (en este trabajo identificado como *BcPal2*, **Figuras 50, 51 y 52**) con la secuencia correspondiente del gen identificado como *BcPal1*, se observó una alta conservación entre secuencias (81.6%) tal y como se muestra en la **Figura 55**.



alta concentración de ácidos fenólicos en las paredes celulares de este tipo de células (Le Roy et al., 2016).

Los ácidos fenólicos presentes en las paredes celulares, por ejemplo los ácidos cumárico y ferúlico (*ver* ruta general de síntesis de los fenilpropanoides, **Figura 2**) tienen un papel importante en la conexión con otros componentes de la pared celular como lignina, polisacáridos y proteínas estructurales (Le Roy et al., 2016). Lo anterior señala la importancia de los ácidos fenólicos en la integridad de las paredes celulares, la comunicación entre paredes y por ende la supervivencia de las células. En este sentido, cabe la posibilidad de que el gen *BcPal2*, tenga además una función vital en la integridad de las paredes celulares cuyo silenciamiento resultó en la inviabilidad de la línea. Efecto que puede soportarse con los resultados obtenidos en los experimentos con el inhibidor AIP, en los cuales la inhibición de la enzima PAL además de ocasionar la disminución en la producción de verbascósido, provocó la disminución en la producción de biomasa (*ver* **Figura 15a**). Probablemente, el hecho de que en *B. cordata* la producción de verbascósido está asociada al crecimiento radica en la actividad de la enzima PAL.

La transformación de plantas vía *Agrobacterium tumefaciens* es una de las principales herramientas empleadas por la biotecnología para la ingeniería genética de plantas desde la década de los 70's (las metodologías de transformación de plantas han sido recientemente revisadas por Keshavareddy et al., 2018). *Agrobacterium* es un género de bacterias patógenas gram negativo que causa tumores en las plantas; incluye las especies *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*. De forma natural, transfieren un fragmento de su material genético (ADN-T, ADN de transferencia) localizado dentro del plásmido inductor de tumores "Ti" al interior del núcleo de las células vegetales de un amplio espectro de especies dicotiledóneas y angiospermas monocotiledóneas (Keshavareddy et al., 2018). El ADN-T es incorporado dentro del genoma vegetal resultando finalmente en el desarrollo de una 'agalla' o tumor (crecimiento anómalo de tejido cuyo fin es aislar el ataque o infección) (Bakhsh et al., 2014; Keshavareddy et al., 2018). En la naturaleza, la transferencia exitosa de ADN-T requiere de dos elementos genéticos bacterianos: **i)** las secuencias localizadas en ambos extremos del ADN-T que consisten en secuencias de 25 pb, **ii)** los genes de virulencia (*vir*) codificados en plásmido Ti, los cuales son responsables del corte, transferencia e integración del ADN-T dentro del genoma de la planta (Bakhsh et al., 2014). Esta capacidad natural de *Agrobacterium* para transferir material genético dentro de plantas y hongos ha sido empleada por la



biotecnología, partiendo de la premisa de que los plásmidos Ti pueden ser empleados como vectores para introducir genes externos dentro de los genomas vegetales. Actualmente, existe una gran variedad de cepas de *A. tumefaciens*, por mencionar algunas, LBA4404, GV2260, GV3101 MP90, EHA101, EHA105, NT1 (pKPSF2), C58C1, AGL-0 y AGL-1 (Gelvin, 2003; Bakhsh *et al.*, 2014). La cepa AGL-1 se caracteriza por su hipervirulencia, característica que le confiere el plásmido Ti pTiBo542, el cual contiene los genes de virulencia *virA* y *virG*, los cuales codifican la expresión de proteínas reguladoras de la expresión de genes implicados en el proceso de infección, los cuales son necesarios para la transferencia de ADN-T (Lazo *et al.*, 1991). Sin embargo, debido a la extensión de los plásmidos Ti (200-800 kpb) y, sobre todo, a que usualmente las regiones ADN-T no contienen sitios únicos de restricción, se han desarrollado algunas alternativas, entre ellas: clonar indirectamente el gen de interés dentro de un plásmido Ti en *cis* junto con los genes de virulencia llamados plásmidos Ti desarmados, o bien, clonar el gen de interés dentro de los bordes de ADN-T en un vector diferente de los genes de virulencia, denominados vectores binarios ADN-T (Gelvin, 2003; Nakagawa *et al.*, 2009). No obstante, la construcción de estos vectores empleando técnicas tradicionales de biología molecular (restricción, digestión y ligación) implicaba por un lado una importante inversión de tiempo y trabajo debido a la limitada cantidad de sitios de restricción disponibles. El desarrollo del sistema de clonación Gateway significó una importante oportunidad para hacer el proceso más eficiente (Nakagawa *et al.*, 2009). Los vectores de clonación Gateway tienen como base los sitios específicos de reacciones de recombinación reversible entre el fago  $\lambda$  y *E. coli*. Durante el proceso, el sitio *attP* (242 pb) del fago  $\lambda$  y el sitio *attB* de *E. coli* (25 pb) recombinan (reacción BP) y el genoma del fago es integrado dentro del genoma de *E. coli*. Como resultado, el genoma de fago  $\lambda$  es flanqueado por los sitios *attL* (100 pb) y *attR* (168 pb). En una reacción reversa, el fago  $\lambda$  es escindido del genoma de *E. coli* mediante un proceso de recombinación entre los sitios *attL* y *attR* (reacción LR) (Karimi *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2009).

La reacción BP requiere dos proteínas, una enzima integrasa (Int) del fago  $\lambda$  y el factor de integración del huésped (IHF) de *E. coli*, mientras que la reacción LR necesita una proteína adicional del bacteriófago, una enzima excisionasa (Xis). El sistema de clonación Gateway emplea estos sitios *att* y el mix de enzimas necesarias (clonatas) para la construcción de plásmidos *in vitro* que eventualmente pueden ser empleados para, por ejemplo, la sobreexpresión y/o silenciamiento de genes (Karimi *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2009). Entre

los vectores binarios se encuentran aquellos cuya expresión genera una doble hebra de ARN, la cual es necesaria en el proceso de silenciamiento post-transcripcional de genes conocido como ARN interferente o ARN de interferencia, entre ellos están los vectores p7GWIWG2(I), p7GWIWG2(II) y pGW80 (Wesley *et al.*, 2001; Karimi *et al.*, 2002). En los sistemas vegetales, un método especialmente efectivo consiste en transformar la planta con una construcción codificante de una repetición invertida de un fragmento de una secuencia génica de interés separada por un espaciador (usualmente una secuencia intrónica) cuya expresión produce un ARN de doble hebra con una estructura tallo-asa (Wesley *et al.*, 2001; Helliwell y Waterhouse, 2003). El silenciamiento de genes mediante ARN de cadena doble es un proceso que resulta en la degradación de una secuencia específica de ARN (Wesley *et al.*, 2001; Helliwell y Waterhouse, 2003; Wilson y Doudna, 2013). Es un proceso ampliamente distribuido en diversos organismos incluyendo vertebrados, invertebrados y plantas; es sumamente importante en la regulación de actividades vitales tales como el crecimiento celular, la diferenciación de tejidos, la formación de heterocromatina y la proliferación celular (Wilson y Doudna, 2013).

El proceso de silenciamiento post-transcripcional inicia con el reconocimiento de un fragmento largo de ARN de doble cadena el cual es seccionado en múltiples fragmentos de entre 21 y 25 ribonucleótidos (denominados pequeños ARN interferentes) por una familia de enzimas con actividad ARNasa denominadas Dicer, las cuales están altamente conservadas en la naturaleza (Helliwell y Waterhouse, 2003; Wilson y Doudna, 2013). Posteriormente ocurre la metilación del grupo hidroxilo 2' de los nucleótidos terminales 3'. Subsecuentemente, un complejo ribonucleoprotéico que incluye a una familia de enzimas denominadas Argonauta conocido como RISC (por sus siglas en inglés RNA-induced silencing complex) es responsable del silenciamiento de un ARN mensajero blanco *vía* su degradación: una sola hebra del ARN de doble cadena (denominada hebra guía) se une a Argonauta para dirigir el proceso de silenciamiento, mientras que la otra (denominada hebra pasajera) es descartada (Wilson y Doudna, 2013). En años recientes, el constante desarrollo de más y mejores herramientas computacionales, a la par de metodologías de bajo costo y fáciles de usar como la tecnología CRISPR/Cas9 [(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (CRISPR-associated)], que en años recientes ha demostrado su utilidad en la edición, modificación, regulación, silenciamiento, etc. de genomas de prácticamente cualquier célula/organismo vivo (Doudna y Charpentier, 2014). De hecho, la combinación “cultivos de células

vegetales/CRISPR-Cas/*Agrobacterium tumefaciens*” se presenta como una gran oportunidad que podría facilitar la predicción y caracterización de genes, *clusters* de genes vegetales y elementos reguladores involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios (a pesar de la existencia de otros sistemas que no requieren fuentes de carbono externas, es decir, organismos fotoautotróficos como cianobacterias, algas y musgos) (Arya *et al.*, 2020). La aplicación de cultivos de células vegetales/CRISPR-Cas/*Agrobacterium tumefaciens*, podría fructificar en el incremento de la producción de compuestos (conocidos y por descubrir) de interés farmacéutico, cosmético y/o nutracéutico, además de mejorar nuestra comprensión acerca de los procesos bioquímicos y moleculares que rigen el metabolismo secundario vegetal.

*Nota al calce.*

- No se llevó a cabo la comparación con la isoforma *BcPal3*, ya que al momento el único fragmento de secuencia conocida no corresponde al fragmento empleado como molde para la construcción del vector de silenciamiento BcPalGW80.

## IX. CONCLUSIONES

La línea celular de *Buddleja cordata*, después de 10 años de mantenimiento, dirigió con mayor eficacia procesos metabólicos relacionados con el crecimiento y la viabilidad. Además de persistir la producción de verbascósido, ésta permanece asociada al crecimiento y su concentración es comparable con la de la línea original (1.43 g L<sup>-1</sup> y 1.44 g L<sup>-1</sup>, respectivamente).

La adición del aminoácido L-fenilalanina a los cultivos en el  $t_0$ , únicamente a la concentración de 600  $\mu\text{M}$  disminuyó la producción de biomasa en un 10.5% ( $9.4 \pm 0.46$  contra  $10.5 \pm 0.11$  para el control) después de 19 días de exposición ( $t_{19}$ ); aunque su adición en el  $t_9$ , no tuvo efectos estadísticamente significativos sobre la producción de biomasa. Mientras que la adición de L-fenilalanina 600  $\mu\text{M}$  a  $t_0$ , ejerció efectos positivos sobre la producción de verbascósido en diferentes tiempos de exposición, y su adición en el  $t_9$ , tuvo dos efectos contrarios: negativo después de 2 y 8 días de exposición y positivo luego de un tiempo de exposición de 10 días ( $t_{19}$ ), cuando la producción del compuesto incrementó un 30.7% ( $1.96 \pm 0.16$  g L<sup>-1</sup> contra  $1.50 \pm 0.04$  g L<sup>-1</sup> correspondiente al control).

La producción de verbascósido aumentó significativamente cuando MeJa fue adicionado durante la fase exponencial tardía ( $t_9$ ). Después de 24 horas de exposición, con las concentraciones 100 y 200  $\mu\text{M}$ , se observó un incremento del 132% ( $2.06 \pm 0.15$  g L<sup>-1</sup> en los cultivos tratados *contra*  $1.56 \pm 0.07$  g L<sup>-1</sup> en los cultivos control). Y de 176.2% ( $2.75 \pm 0.14$  g L<sup>-1</sup>) con 50  $\mu\text{M}$  MeJa. Después de 48 horas de elicitación, la producción aumentó 213.6% con 50  $\mu\text{M}$  ( $4.8$  g L<sup>-1</sup>) y 138.1% con 100  $\mu\text{M}$  ( $3.1$  g L<sup>-1</sup>) en comparación con el tratamiento control ( $2.25$  g L<sup>-1</sup>). Se registró un incremento del 8.2% ( $9.2$  g PS L<sup>-1</sup> *contra*  $8.5$  g PS L<sup>-1</sup>) en la acumulación de biomasa después de 48 horas de exposición de MeJa 50  $\mu\text{M}$  al ser adicionado durante la fase exponencial tardía  $t_9$ . Independientemente del tiempo de adición y/o tiempo de exposición, MeJa 200  $\mu\text{M}$  fue sobre todo perjudicial para la acumulación de biomasa

No hubo efecto sinérgico entre MeJa y L-fenilalanina sobre la producción de verbascósido. El uso de L-fenilalanina y metil jasmonato para incrementar la producción de verbascósido en cultivos celulares en suspensión de *B. cordata* son estrategias biotecnológica factibles, los niveles de producción del compuesto obtenidos en este trabajo fueron comparables o

superiores a los previamente reportados para cultivos de *B. cordata* y de otras especies vegetales productoras de PhGs *in vitro*.

Mediante su inhibición química, fue posible identificar algunas enzimas involucradas en la síntesis de verbáscosido en cultivos celulares de *B. cordata*, incluyendo **i)** fenilalanina amonio liasa (PAL), **ii)** una enzima tirosina hidroxilasa, probablemente una polifenol oxidasa (PPO) y **iii)** una enzima PLP dependiente como Tirosina/Dopa decarboxilasa (Tir/DopaDC).

La línea celular de presenta por lo menos tres isoformas del gen *pal*, aunque se desconoce la secuencia completa de cada una; en particular, el gen denominado *Bcpal1* comparte gran similitud con otros genes *pal*, principalmente de especies pertenecientes al orden Lamiales. Contiene dos exones y un intrón, lo cual es consistente con la estructura de los genes *pal* en la mayoría de las angiospermas. Aunque se desconoce la secuencia completa de la región intrónica, fue posible identificar un sitio de splicing estándar GT/AG en genes *pal*. Se determinó la secuencia codificante total del exón 2, el extremo 5' del exón 1 aun es desconocido.

La secuencia putativa de aminoácidos de la proteína BcPal1 posee la secuencia consenso GTITASGDLVPLSYIAG, característica de las enzimas fenilalanina e histidina amonio liasa. Características como punto isoelectrico (pI), el peso molecular, propiedades estructurales secundarias y terciarias de la proteína deducida BcPal1 son muy semejantes a las de proteínas PAL de *Cistanche deserticola*, *Rehmannia glutinosa*, *Picrorhiza kurrooa* y *Digitalis lanata*.

Se generó una línea celular *knockdown* de *B. cordata* para el gen *Bcpal2* vía el vector de silenciamiento BcPalGW80, demostrándose un rol esencial de la isoforma sobre el crecimiento.

Bajo las condiciones analizadas, no se identificó al flavonoide linarina, en cambio, se identificó a los iones precursores de ácido cumárico, equinacósido, cumarina y ácido sirínigico (los últimos tres metabolitos no han sido previamente reportados en la especie).

*Buddleja. cordata* es una importante fuente de metabolitos especializados, con múltiples actividades farmacológicas, incluyendo además de fenilpropanoides, feniletanoide glicósidos,

flavonas y flavonoides, compuestos de naturaleza terpénica, esteroides, giberelinas, ubiquinonas, clorofilas, carotenoides, tocoferoles (por ejemplo, vitamina E), elementos precursores de catecolaminas, indol-alcaloides y alcaloides benzilisoquinolina.

## X. PERSPECTIVAS

Para asegurar que, efectivamente, la composición del medio de cultivo es una variable fundamental en la estabilidad de la línea celular, podrían llevarse a cabo experimentos en los cuales se modifique la concentración de reguladores de crecimiento vegetal/fuente de carbono y/o composición de sales para en cada caso evaluar su efecto sobre el crecimiento y producción de compuestos y posteriormente evaluar y contrastar los efectos luego de restablecer las variables del medio.

Las cualidades de la línea celular de *B. cordata* hacen de ella un modelo ideal para escalar la producción de verbascósido; incorporar alguna de las estrategias biotecnológicas probadas como efectivas en este trabajo para incrementar la producción del compuesto bien valdría la pena.

Al poseer rutas de biosíntesis de compuestos neuroactivos como hidroxitirosol, L-DOPA, dopamina, tiramina y triptamina, *Buddleja cordata* podría usarse como prebiótico y además como alimento nutracéutico. Por otro lado, la línea celular podría emplearse para suministrar esos compuestos a nivel industrial.

El análisis a nivel genómico, transcriptómico y proteómico de la especie es necesario para generar información relacionada con reacciones e intermediarios en la biosíntesis de verbascósido, por ejemplo, enzimas tipo fenilalanina amonio liasa, polifenol oxidasa, tirosina/DOPA descarboxilasas, L-aminoácido aromático descarboxilasa y tirosina aminotransferasa.

La combinación de cultivos de células vegetales/CRISPR-Cas/*Agrobacterium tumefaciens*, podría fructificar en el incremento de la producción de compuestos (conocidos y por descubrir) de interés farmacéutico, cosmético y/o nutracéutico, además de permitir mejorar nuestra comprensión sobre los procesos bioquímicos y moleculares que rigen el metabolismo secundario vegetal.

Es conveniente llevar a cabo estudios para precisar la identidad de los compuestos putativamente identificados (flavonas y flavonoides, compuestos de naturaleza terpénica, esteroides, giberelinas, ubiquinonas, clorofilas, carotenoides, tocoferoles, elementos precursores

de catecolaminas, indol-alcaloides y alcaloides benzilisoquinolina), así como realizar el análisis del perfil metabólico medianamente y poco polar de la línea celular (por ejemplo de fracciones extraídas con hexano, diclorometano y acetato de etilo).

En virtud de sus múltiples actividades biológicas, los metabolitos secundarios vegetales son la base de la farmacología moderna. Desde el punto de vista biotecnológico, bien vale la pena el constante estudio sobre su identidad, función, síntesis (química o biológica) y/o su producción. Sin embargo, es fundamental recordar que estos compuestos son esenciales para el desarrollo de la vida de las plantas en la Tierra: son elementos básicos para su adaptación, desarrollo y supervivencia. Pero también son indispensables para la existencia de la biosfera terrestre: son información, señales químicas en el ambiente. *Per se*, el estudio de los metabolitos especializados es fascinante.



## XI. REFERENCIAS

- Acevedo L, Martínez E, Castañeda P, Franzblau S, Timmermann B N, Linares E, Bye R, Mata R (2000) New phenylethanoids from *Buddleja cordata* subsp. *cordata*. *Planta Med.* 66:257-61. <https://doi.org/10.1055/s-2000-8570>.
- Acevedo JG, Castañeda CMC, Benitez FJ, Durán DA, Barroso VR, Martínez CG, Muñoz LJJ, Martínez CA, Romo de Vivar A (2005) Photoprotective activity from *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia.* 76:301-309. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.009>
- Aguilar-Rodríguez S, Terrazas T, López-Mata L (2006) Anatomical wood variation of *Buddleja cordata* (Buddlejaceae) along its natural range in Mexico. *Trees* (Berl). 20:253-261. <https://doi.org/10.1007/s00468-005-0007-5>
- Ahmadi-Sakha S, Sharifi M, Niknam V (2016) Bioproduction of phenylethanoid glycosides by plant cell culture of *Scrophularia striata* Boiss.: from shake-flasks to bioreactor. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 124: 275-281. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0891-3>
- Al-Allaf FA, Tolmachov OE, Zambetti LP, Tchetchelnitski V, Mehmet H (2013) Remarkable stability of an instability-prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* Stbl3. *3 Biotech* 3:61-70. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0070-8>
- Al-Samarrai TH, Schmid J (2000) A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Lett Appl Microbiol.* 30:53-56. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00664.x>
- Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI (2014) Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol Adv.* 32:1065-1076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.001>
- Alseekh S, Fernie AR (2018) Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? *Plant J.* 94:933-942. <https://doi.org/10.1111/tbj.13950>
- Amin B, Poureshagh E, Hosseinzadeh H (2016) The effect of verbascoside in neuropathic pain induced by chronic constriction injury in rats. *Phytother Res.* 30:128-135. <https://doi.org/10.1002/ptr.5512>
- Andary C, Ibrahim RK (1986) Biosynthetic capacity of stachys seedlings for verbascoside and related caffeoyl derivatives. *Z Naturforsch C.* 41:18-21. <https://doi.org/10.1515/znc-1986-1-204>.
- Antognoni F, Iannello C, Mandrone M, Scognamiglio M, Fiorentino A, Giovannini PP, Poli F (2012) Elicited *Teucrium chamaedrys* cell cultures produce high amounts of teucroside, but not the hepatotoxic neo-clerodane diterpenoids. *Phytochemistry.* 81:50-59. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.027>
- Appert C, Logema E, Hahlbrock K, Schmid J, Amrhein N (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.) *Eur J Biochem.* 225:491-499. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00491.x>
- Appert C, Zón J, Amrhein N (2003) Kinetic analysis of the inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by 2-aminoindan-2-phosphonic acid and other phenylalanine analogues. *Phytochemistry* 62:415-422. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00561-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00561-7)
- Araji S, Grammer TA, Gertzen R, Anderson SD, Mikulic-Petkovsek M, Veberic R, Phu ML, Solar A, Leslie CA, Dandekar AM, Escobar MA (2014) Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut. *Plant Physiol.* 164:1191-1203. <https://doi.org/10.1104/pp.113.228593>

- Arciniegas A, Avendaño A, Pérez Castorena AL, Vivar AR (1997) Flavonoids from *Buddleja parviflora*. *Biochem Syst Ecol* 25:185-186.
- Arya SS, Rookes JE, Cahill DM, Lenka SK (2020) Next-generation metabolic engineering approaches towards development of plant cell suspension cultures as specialized metabolite producing biofactories. *Biotechnol Adv.* 45:107635. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107635>
- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JM, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM, Stuppner H (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv.* 33:1582-1614. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Avila JG, Liverant JG, Martinez A, Martinez G, Munoz JL, Arciniegas A, Vivar AR (1999) Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 66:75-78. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00203-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00203-7)
- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 63:147-173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>
- Bakhsh A, Anayol E, Ozcan SF (2014) Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L. *Emir J Food Agric.* 26:259-264. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i3.16437>
- Barciszewski J, Massino F, Clark BF (2007) Kinetin-a multiactive molecule. *Int J Biol Macromol* 40:182-192. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.06.024>
- Barros J, Dixon RA (2020) Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends Plant Sci.* 25:66-79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011>
- Belcher MS, Mahinthakumar J, Keasling JD (2020) New frontiers: harnessing pivotal advances in microbial engineering for the biosynthesis of plant-derived terpenoids. *Curr Opin Biotechnol.* 65:88-93. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.001>
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161:839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Bridel M, Charaux C (1924) L'orobanchine, glucoside nouveau, retiré des tubercules de l'*Orobanche rapum* Thuill. *Bull Soc Chim Fr.* 34:1153-1600
- Budzianowska A, Kikowska M, Małkiewicz M, Karolakand I, Budzianowski J (2019) Phenylethanoid glycosides in *Plantago media* L. organs obtained in *in vitro* cultures. *Acta Biol Crac Ser Bot.* 61:75-86. <https://doi.org/10.24425/118060>
- Burkhard P, Dominici P, Borri-Voltattorni P, Jansonius JN, Malashkevich VN (2001) Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPAdecarboxylase. *Nat Struct Biol.* 8:963-967. <https://doi.org/10.1038/nsb1101-963>
- Butland SL, Chow ML, Ellis BE (1998) A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Mol Biol.* 37:15-24. <https://doi.org/10.1023/A:1005941228246>
- Cady N, Peterson SR, Freedman SN, Mangalam AK (2020) Beyond metabolism: the complex interplay between dietary phytoestrogens, gut bacteria, and cells of nervous and immune systems. *Front Neurol.* 11:150. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00150>

- Campo G, Marchesini J, Bristot L, Monti M, Gambetti S, Pavasini R, Pollina A, Ferrari R (2012) The *in vitro* effects of verbascoside on human platelet aggregation. *J Thromb Thrombolysis*. 34:318-325. <https://doi.org/10.1007/s11239-012-0757-z>
- Cardenas-Sandoval BA, Bravo-Luna L, Bermúdez-Torres K, Trejo-Espino JL, Zamilpa A, Trejo-Tapia G (2015) Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Castilleja tenuiflora* Benth. shoot cultures with cell wall oligosaccharides from *Fusarium oxysporum* f. sp *Lycopersici* RACE3. *Rev Mex Ing Quim*. 14:631-639.
- Cardinali A, Pati S, Minervini F, D'Antuono I, Linsalata V, Lattanzio V (2012) Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. *J Agric Food Chem*. 60:1822-1829. <https://doi.org/10.1021/jf204001p>
- Cenis JL (1992) Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res*. 20:2380. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2380>
- Cheimonidi C, Samara P, Polychronopoulos P, Tsakiri EN, Nikou T, Myriantopoulos V, Sakellaropoulos T, Zoumpourlis V, Mikros E, Papassideri I, Argyropoulou A, Halabalaki M, Alexopoulos LG, Skaltsounis AL, Tsitsilonis OE, Aligiannis NN, Trougakos IP (2018) Selective cytotoxicity of the herbal substance acteoside against tumor cells and its mechanistic insights. *Redox Biol*. 16:169-178. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.02.015>
- Chen W-H, Xu C-M, Zeng J-L, Zhao B, Wang X-D, Wang YC (2007) Improvement of echinacoside and acteoside production by two-stage elicitation in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. *World J Microbiol Biotechnol*. 23:1451-1458. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9389-4>
- Chen J, Yan Y-X, Guo Z-Y (2015) Identification of hydrogen peroxide responsive ESTs involved in phenylethanoid glycoside biosynthesis in *Cistanche salsa* cell culture. *Biol Plant*. 59:695-700. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0541-y>
- Cheng X-Y, Wei T, Guo B, Ni W, Liu C-Z (2005a) *Cistanche deserticola* cell suspension cultures: Phenylethanoid glycosides biosynthesis and antioxidant activity. *Process Biochem*. 40:3119-3124. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.012>
- Cheng X-Y, Guo B, Zhou H-Y, Ni W, Liu C-Z (2005b) Repeated elicitation enhances phenylethanoid glycosides accumulation in cell suspension cultures of *Cistanche deserticola*. *Biochem Eng J*. 24:203-207. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.02.013>
- Cheng X-Y, Zhou H-Y, Cui X, Ni W, Liu C-Z (2006) Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *J Biotechnol*. 121:253-260. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.07.012>
- Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S (2013) Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem*. 72:1-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- Chomel M, Guittonny-Larchevêque M, Fernandez C, Gallet C, DesRochers A, Paré D, Jackson DG, Baldy V (2016) Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. *J Ecol*. 104:1527-1541. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12644>
- Coppede JS, Pina ES, Paz TA, Fachin AL, Marins MA, Bertoni BW, França SC, Pereira AM (2014) Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 118:33-43. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0459-7>

- Cui Q, Pan Y, Zhang W, Zhang Y, Ren S, Wang D, Wang Z, Liu X, Xiao W (2018) Metabolites of dietary acteoside: profiles, isolation, identification, and hepatoprotective capacities. *J Agric Food Chem.* 66:2660-2668. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04650>
- Cvikrová M, Binarová P, Eder J, Vágner M, Hrubcová M, Zoň J, Macháčková I (1999) Effect of inhibition of phenylalanine ammonia-lyase activity on growth of alfalfa cell suspension culture: Alterations in mitotic index, ethylene production, and contents of phenolics, cytokinins, and polyamines. *Physiol Plant.* 107:329-337. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.100310.x>
- Cvikrová M, Binarová P, Cenklová V, Eder J, Dolezel J, Macháčková I (2003) Effect of 2-aminoindan-2-phosphonic acid on cell cycle progression in synchronous meristematic cells of *Vicia faba* roots. *Plant Sci.* 164:823-832. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00071-2)
- Daidone F, Montioli R, Paiardini A, Cellini B, Macchiarulo A, Giardina G, Bossa F, Voltattorni CB (2012) Identification by virtual screening and *in vitro* testing of human DOPA Decarboxylase inhibitors. *PLoS ONE* 7:e31610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031610>
- De Silva SF, Alcorn J (2019) Flaxseed lignans as important dietary polyphenols for cancer prevention and treatment: chemistry, pharmacokinetics, and molecular targets. *Pharmaceuticals.* 12:68. <https://doi.org/10.3390/ph12020068>
- Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* 26:51-78. <https://doi.org/10.1002/mas.2010>
- Dixon RA (1985) *Plant Cell Culture: A Practical Approach.* IRL Press, Oxford, UK
- Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 346:1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Dörnenburg H, Knorr D (1995) Strategies secondary for the improvement of metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb Technol.* 17:674-684. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00108-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00108-4)
- Dubrovina AS, Kiselev KV (2016) Age-associated alterations in the somatic mutation and DNA methylation levels in plants. *Plant Biol.* 18:185-196. <https://doi.org/10.1111/plb.12375>
- Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA, Novellino E, Santini A (2019) Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother Res.* 33:2221-2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Duynstee HI, de Koning MC, Ovaa H, van der Marel GA, van Boom JH (1999) Synthesis of verbascoside: a dihydroxyphenylethyl glycoside with diverse bioactivity. *Eur J Org Chem.* 10:2623-2632. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199910\)1999:10<2623::AID-EJOC2623>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199910)1999:10<2623::AID-EJOC2623>3.0.CO;2-K)
- Dziggel C, Schäfer H, Wink M (2017) Tools of pathway reconstruction and production of economically relevant plant secondary metabolites in recombinant microorganisms. *Biotechnol J.* 12:1600145. <https://doi.org/10.1002/biot.201600145>
- Eibl R, Meier P, Stutz I, Schildberger D, Hühn T, Eibl D (2018) Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Applied Microbiol Biotechnol.* 102:8661-8675. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9279-8>
- Ellis B (1983) Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*. *Phytochemistry.* 22:1941-1943. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80018-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80018-1)
- Engelman K, Horwitz D, Jéquier E, Sjoerdsma A (1968) Biochemical and pharmacologic effects of  $\alpha$ -methyltyrosine in man. *J Clin Invest.* 47:577-594. <https://doi.org/10.1172/JCI105754>

- Erb M, Kliebenstein DJ (2020) Plant secondary metabolites as defenses, regulators and primary metabolites- the blurred functional trichotomy. *OSF Preprints*. <https://doi.org/10.31219/osf.io/6ba7r>
- Estrada-Zúñiga ME, Cruz-Sosa F, Verde-Calvo R, Rodríguez-Monroy M, Vernon-Carter EJ (2009) Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 97: 39-47. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9496-z>
- Facchini PJ y De Luca V (1994) Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/DOPA decarboxylase in *Opium Poppy*. *J Biol Chem.* 269:26684-26690. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47073-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47073-1)
- Facchini PJ, Huber-Allanach KL, Tari LW (2000) Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry.* 54:121-138. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00050-9)
- Fang CY, Fernie AR, Luo J (2019) Exploring the diversity of plant metabolism. *Trends Plant Sci.* 24:83-98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.09.006>
- Farrell J. R. E. (Ed.) RNA Methodologies: Laboratory Guide for Isolation and Characterization (2010) Fourth edition. Academic Press (USA)
- Feng R, Lu Y, Bowman L, Qian Y, Castranova V, Ding M (2005) Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem.* 280:27888-27895. doi: 10.1074/jbc.M503347200
- Fernie AR, Tohge T (2017) The genetics of plant metabolism. *Annu Rev Genet.* 51:287-310. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024640>.
- Forni C, Facchiano F, Bartoli M, Pieretti S, Facchiano A, D'Arcangelo D, Norelli S, Valle G, Nisini R, Beninati S, Tabolacci C, Jadeja RN (2019) Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. *BioMed Res Int.* 8748253:1-16. <https://doi.org/10.1155/2019/8748253>
- Fountain MD, Valdes O, Fettig S, Beck E (2003) Expression of cell cycle control factors in non-dividing and ageing photoautotrophic plant cells. *Physiol Plant.* 119:30-39. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00169.x>
- Fu G, Pang H, Wong YH (2008) Naturally occurring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics. *Curr Med Chem.* 15:2592-2613. <https://doi.org/10.2174/092986708785908996>
- Gaisser S, Heide L (1996) Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum*. *Phytochemistry.* 41:1065-1072. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00633-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00633-8)
- García-Mateos MR, Gutiérrez RJM, Soto-Hernández RM, Villegas-Monter A (2005) Alkaloids from several subcultures of *Erythrina americana* Miller calluses. *Rev Chapingo Ser Hort.* 11:21-26.
- Gao J, Zhang S, Cai F, Zheng X, Lin N, Qin X, Ou Y, Gu X, Zhu X, Xu Y, Chen F (2012) Characterization, and expression profile of a phenylalanine ammonia lyase gene from *Jatropha curcas* L. *Mol Biol Rep.* 39:3443-3452. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1116-4>.
- Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:16-37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>

- Georgiev MI, Ludwig-Müller J, Weber J, Stancheva N, Bley T (2011a) Bioactive metabolite production and stress-related hormones in Devil's claw cell suspension cultures grown in bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89:1683-1691. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3008-2>
- Georgiev MI, Ludwig-Müller J, Alipieva K, Lippert A (2011b) Sonication assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. for bioactive metabolite accumulation. *Plant Cell Rep.* 30:859-866. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0981-y>
- Ghisalberti EL (1994). IX. *Eremophila* species (Poverty Bush; Emu Bush): *In vitro* culture and the production of verbascoside. Pp. 176-191. En: *Biotechnology in Agruculture and Forestry 33. Medicinal and aromatic plants*. Baraj Y.P.S (Ed). Springer. New York. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-08612-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08612-4_9)
- Godoy-Hernández G, Vázquez-Flota FA (2012) Growth measurements: Estimation of cell division and cell expansion. En: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (Eds.) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 877. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_4)
- Gómez-Hernández MA, Flores-Merino MV, Sánchez-Flores JE, Burrola Aguilar C, Zepeda-Gómez C, Nieto-Trujillo A, Estrada-Zúñiga ME (2021) Photoprotective activity of *Buddleja cordata* cell culture methanolic extract on UVB-irradiated 3T3-swiss albino fibroblasts. *Plants.* 10:266. <https://doi.org/10.3390/plants10020266>
- Gonda S, Kiss-Szikszai A, Szűcs Z, Máthé C, Vasas G (2014) Effects of N source concentration and NH<sup>4+</sup>/NO<sup>3</sup> ratio on phenylethanoid glycoside pattern in tissue cultures of *Plantago lanceolata* L.: A metabolomics driven full-factorial experiment with LC-ESI-MS<sup>3</sup>. *Phytochemistry.* 106:44-54. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.002>
- Gowri G, Paiva NL, Dixon RA (1991) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) 12. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones and appearance of PAL transcripts in elicitor-treated cell cultures and developing plants. *Plant Mol Biol.* 17:415-429. <https://doi.org/10.1007/BF00040636>
- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol.* 57:761-780. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105248>
- Guo H, Koike K, Li W, Satou T, Guo D, Nikaido T (2004). Saponins from the flower buds of *Buddleja officinalis*. *J Nat Prod.* 67:10-13. <https://doi.org/10.1021/np0300131>
- Haberlandt G (1902). Cellular Totipotency. Pp. 71-90. En: *Plant Tissue Culture: Theory and Practice* (Bhojwani SS, Razdan MK Eds). Elsevier Science Publishing Co., Nueva York.
- He J, Hu X-P, Zeng Y, Li Y, Wu H-Q, Qiu R-Z, Ma W-J, Li T, Li C-Y, He Z-D (2011) Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. *J Asian Nat Prod Res.* 13:449-464. <https://doi.org/10.1080/10286020.2011.568940>
- Heil M, Karban R (2010) Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends Ecol Evol.* 25:137-44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.09.010>
- Helliwell C, Waterhouse P (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods.* 30:289-295. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00036-7](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00036-7)
- Hintze DJL (2001) NCSS and Pass. Number Cruncher Statistical System (NCSS). Kaysville, Utah, USA. (<http://www.ncss.com/>)

- Houghton P, Mensah A (1999). Biologically-active compounds from *Buddleia* species, capítulo 13, pp. 343-368, En: Recent Advances in Phytochemistry Vol 33: Phytochemicals Human Health Protection, Nutrition and Plant Defense, Ed. Romeo JT, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, NY, United States of America.
- Houghton P, Mensah A, Iessa N, Hong L (2003) Terpenoids in *Buddleia*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry*. 64:385-393. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00264-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00264-4)
- Hrubcová M, Cvikrová M, Eder J, Zoň J, Macháčková I (2000) Effect of inhibition of phenylpropanoid biosynthesis on peroxidase and IAA-oxidase activities and auxin content in alfalfa suspension cultures. *Plant Physiol Biochem*. 38:949-956. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01208-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01208-0)
- Hsieh LS, Hsieh YL, Yeh CS, Cheng CY, Yang CC, Lee PD (2011) Molecular characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*BoPAL1*) from *Bambusa oldhamii*. *Mol Biol Rep*. 38:283-290. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0489-0>
- Hu GS, Hur YJ, Jia JM, Lee JH, Chung YS, Yi YB, Yun DJ, Park SK, Kim DH (2011a) Effects of 2-aminoindan-2-phosphonic acid treatment on the accumulation of salidroside and four phenylethanoid glycosides in suspension cell culture of *Cistanche deserticola*. *Plant Cell Rep*. 30: 665-674. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0997-3>
- Hu GS, Jia JM, Hur YJ, Chung YS, Lee JH, Yun DJ, Chung WS, Yi GH, Kim TH, Kim DH (2011b) Molecular characterization of phenylalanine ammonia lyase gene from *Cistanche deserticola*. *Mol Biol Rep*. 38:3741-3750. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0489-0>
- Hu G-S, Jia J-M, Kim DH (2014) Effects of feeding tyrosine and phenylalanine on the accumulation of phenylethanoid glycosides to *Cistanche deserticola* cell suspension culture. *Chin J Nat Med*. 12:367-372. [https://doi.org/10.1016/s1875-5364\(14\)60045-5](https://doi.org/10.1016/s1875-5364(14)60045-5)
- Hulst AC, Meyer MMT, Breteler H, Tramper J (1989) Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth. *Appl Microbiol Biotechnol*. 30:18. <https://doi.org/10.1007/BF00255991>
- Hussain MS, Fareed S, Ansari S, Rahman M, Ahmad IZ, Saeed M (2012) Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioall Sci*. 4:10-20. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.92725>
- Hwang TW, Kim DH, Kim DB, Jang TW, Kim GH, Moon M, Yoon KA, Choi DE, Park JH, Kim JJ (2019) Synergistic anticancer effect of acteoside and temozolomide-based glioblastoma chemotherapy. *Int J Mol Med*. 43:1478-86. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4061>
- Hyun MW, Yun YH, Kim JY, Kim SK (2011) Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase. *Mycobiology*. 39:257-265. <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.4.257>
- Inagaki N, Nishimura H, Okada M, Mitsunashi H (1991) Verbascoside production by plant cell cultures. *Plant Cell Rep*. 9:484-487. <https://doi.org/10.1007/bf00232101>
- Isah T, Umar S, Mujib A, Sharma MP, Rajasekharan PE, Zafar N, Fruk A (2018) Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 132:239-265. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1332-2>
- Isah T (2019) Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biol Res*. 52:39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>

- Jamwal K, Bhattacharya S, Puri S (2017) Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *J Appl Res Med Aromat Plants*. 9:26-38. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.003>
- Janas KM, Osiecka R, Zon J (1998) Growth-retarding effect of 2-aminoindan-2-phosphonic acid on *Spirodela punctata*. *J Plant Growth Regul*. 17:169-172. <https://doi.org/10.1007/PL00007031>
- Jia W-Q, Wang Z-T, Zou M-M, Lin J-H, Li Y-H, Zhang L, Xu R-X (2018) Promoting apoptosis through upregulation of protein tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of STAT3 phosphorylation. *Cell Physiol Biochem*. 47:1871-1882. <https://doi.org/10.1159/000491067>
- Jiang Y, Xia N, Li X, Shen W, Liang L, Wang C, Wang R, Peng F, Xia B (2011) Molecular cloning and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*LrPAL*) from *Lycoris radiata*. *Mol Biol Rep*. 38:1935-1940. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0314-9>
- Jiménez C, Riguera R (1994) Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Nat Prod Rep*. 11:591-606. <https://doi.org/10.1039/NP9941100591>
- Johnson MW, Hendricks PS, Barretta FS, Griffiths RR (2019) Classic psychedelics: An integrative review of epidemiology, therapeutics, mystical experience, and brain network function. *Pharmacol Ther*. 197:83-102. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.010>
- Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X (2014) Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J Pharm Pharmacogn*. 2:377-392.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*. 7:193-195. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)
- Kasote DM, Katyare SS, Hegde MV, Bae H (2015) Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int J Biol Sci*. 11:982-991. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12096>
- Kawada T, Asano R, Hayashida S, Sakuno T (1999) Total synthesis of the phenylpropanoid glycoside, acteoside. *J Org Chem*. 64:9268-9271. <https://doi.org/10.1021/jo9906983>
- Keshavareddy G, Kumar ARV, Ramu VS (2018) Methods of plant transformation- A review. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 7:2656-2668. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>
- Kessler A, Kalske A (2018) Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 49:115-38. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062406>
- Khan S, Ullah H, Zhang L (2019) Bioactive constituents form *Buddleja* species. *Pak J Pharm Sci*. 32:721-741.
- Kieber JJ, Schaller GE (2014) Cytokinins. *Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, United States. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- Kliebenstein DJ, Osbourn A (2012) Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 15:415-423. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.005>
- Kolewe ME, Gaurav V, Roberts SC (2008) Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol Pharm*. 5:243-256. <https://doi.org/10.1021/mp7001494>
- Korenblum E, Aharoni A (2019) Phytobiome metabolism: beneficial soil microbes steer crop plants' secondary metabolism. *Pest Manag Sci*. 75:2378-2384. <https://doi.org/10.1002/ps.5440>



- Korkina LG (2007) Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cel Mol Biol*. 53:15-25. <https://doi.org/10.1170/T772>
- Krzyzanowska J, Czubacka A, Pecio L, Przybys M, Doroszewska T, Stochmal A, Oleszek W (2012) The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha × piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 108:73-81. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0014-8>
- Kubica P, Szopa A, Ekiert H (2017) Production of verbascoside and phenolic acids in biomass of *Verbena officinalis* L. (vervain) cultured under different *in vitro* conditions. *Nat Prod Res*. 31:1663-1668. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1286477>
- Kukula-Koch WA, Widelski J (2017) Alkaloids. Pp. 163-198. En Pharmacognosy. Fundamentals, applications and strategies. Eds. Badal S, Delgoda R Academic Press. Boston. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00009-3>
- Kulma A, Szopa J (2007) Catecholamines are active compounds in plants. *Plant Sci*. 172:433-440. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.10.013>
- Kumar N, Goel N (2019) Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep*. 24:e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Kwiatkowska A, Zebrowski J, Oklejewicz B, Czarnik J, Halibart-Puzio J, Wnuk M (2014) The age-dependent epigenetic and physiological changes in an *Arabidopsis* T87 cell suspension culture during long-term cultivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 447:285-291. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.141>
- Kyzar EJ, Nichols CD, Gainetdinov RR, Nichols DE, Kalueff AV (2017) Psychedelic drugs in biomedicine. *Trends Pharmacol Sci*. 38:992-1005. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.08.003>
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology*. 9:963-967. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>
- Le Roy J, Huss B, Creach A, Hawkins S, Neutelings G (2016) Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants. *Front Plant Sci*. 7:735-753. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00735>
- Le K-C, Jeong C-S, Lee H, Paek K-Y, Park S-Y (2019) Ginsenoside accumulation profiles in long- and short-term cell suspension and adventitious root cultures in *Panax ginseng*. *Hortic Environ Biotechnol*. 60:125-134. <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0108-x>
- Lee M, Phillips RL (1988) The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 39:413-437. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.002213>
- Lee EJ, Park SY, Paek KY (2015) Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 120:1-10. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0567-4>
- Leguay JJ, Guern J (1975) Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiol*. 56:35-39. <https://doi.org/10.1104/pp.56.3.356>
- Lehmann T, Pollmann S (2009) Gene expression and characterization of a stress-induced tyrosine decarboxylase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 583:1895-1900. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.017>

- Li W, Deng R, Jing X, Chen J, Yang D, Shen J (2020) Acteoside ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibiting peroxynitrite-mediated mitophagy activation. *Free Radic Biol Med.* 146:79-91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.408>
- Liang J, Han Q, Tan Y, Ding H and Li J (2019) Current advances on structure-function relationships of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *Front Mol Biosci.* 6:4. <http://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00004>
- Liao Y-H, Houghton PJ, Hoult JRS (1999) Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J Nat Prod.* 62:1241-1245. <https://doi.org/10.1021/np990092+>
- Lichman BR (2021) The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep.* 38:103-129. <https://doi.org/10.1039/D0NP00031K>
- Liu J-Y, Guo Z-G, Zeng Z-L (2007a) Improved accumulation of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to suspension culture of *Cistanche salsa*. *Biochem Eng J.* 33:88-93. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.09.002>
- Liu XN, Zhang XQ, Zhang SX, Sun JS (2007b) Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 91:1-7. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9271-y>
- Liu C-Z, Cheng X-Y (2008) Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in cell cultures of *Cistanche deserticola* by osmotic stress. *Plant Cell Rep.* 27:357-362. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0443-3>
- Liu J, Osbourn A, Ma P (2015) MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. *Mol Plant.* 8:689-708. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.012>
- Liu J, Yang L, Dong Y, Zhang B, Ma X (2018a) Echinacoside, an inestimable natural product in treatment of neurological and other disorders. *Molecules.* 23:1213. <https://doi.org/10.3390/molecules23051213>
- Liu X, Yan Y, Liu Y, Mo T, Wang X, Song Y, Chen Q, Zhao Y, Shi S, Tu P (2018b) Cell culture establishment and regulation of two phenylethanoid glycosides accumulation in cell suspension culture of desert plant *Cistanche tubulosa*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 134:107-118. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1404-y>
- Lorkovic ZJ, Wiczyk Kirk DA, Lambermon MH, Filipowicz W (2000) Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 5:160-167. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01595-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01595-8)
- Lu C, Mei X (2003) Improvement of phenylethanoid glycosides production by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. *Biotechnol Lett.* 25:1437-1439. <https://doi.org/10.1023/a:1025055612517>
- Lu J, Pu X, Li Y, Zhao Y, Tu G. (2005) Bioactive phenylethanoid glycosides from *Buddleia lindleyana*. *Z Nat Forsch.* 60b:211-214.
- Maeda H, Dudareva N (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 63:73-105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>
- Maffei ME, Gertsch J, Appendino G (2011) Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Nat Pro Rep.* 28:1359-1380. <https://doi.org/10.1039/C1NP00021G>
- Mahlke JD, Boligon AA, Machado MM, Spader TB, Alves SH, do Canto-Dorow T, Athayde ML (2009) *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja*

*thyrsoides* Lam. leaves. *Quimica Nova*. 32:277-281. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000200002>

- Maquiaveli CC, Lucon-Junior JF, Brogi S, Campiani G, Gemma S, Vieira PC, Silva ER (2016) Verbascoside inhibits promastigote growth and arginase activity of *Leishmania amazonensis*. *J Nat Prod*. 79:1459-1463. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00875>
- Marchev AS, Yordanova ZP, Georgiev MI (2020) Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol*. 40:443-458. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1731414>
- Martínez M (1989). Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas, México.
- Medina-Pérez V, López-Laredo AR, Sepúlveda-Jiménez G, Zamilpa A, Trejo-Tapia G (2015) Nitrogen deficiency stimulates biosynthesis of bioactive phenylethanoid glycosides in the medicinal plant *Castilleja tenuiflora* Benth. *Acta Physiol Plant*. 37:93-100. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1841-8>
- Meiser J, Weindl D, Hille K (2013) Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal*. 11:34. <http://www.biosignaling.com/content/11/1/34>
- Mendoza PE (2003) El tepozán. *Ciencias*. 70:32-33.
- Mensah AY, Sampson J, Houghton PJ, Hylands PJ, Westbrook J, Dunn M, Hughes MA, Cherry GW (2001). Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *J Ethnopharm*. 77:219-226. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00297-5](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00297-5)
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong F (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc*. 77:1392. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01610a105>
- Miller CO, Skoog F, Okomura FS, von Saltza MH, Strong FM (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J Am Chem Soc*. 78:1345-1350. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01588a032>
- Molgaard P, Ravn H (1988) Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. *Phytochemistry*. 27:2411-2421. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)87005-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)87005-5)
- Morikawa T, Ninomiya K, Imamura M, Akaki J, Fujikura S, Pan Y, Yuan D, Yoshikawa M, Jia X, Li Z, Muraoka O (2014). Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glucose tolerance in mice. *J Nat Med*. 68:561-566. <https://doi.org/10.1007/s11418-014-0837-9>
- Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 118:1-16. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>
- Naill MC, Roberts SC (2004) Preparation of single cells from aggregated *Taxus* suspension cultures for population analysis. *Biotechnol Bioeng*. 86:817-826. <https://doi.org/10.1002/bit.20083>
- Naill MC, Roberts SC (2005) Flow cytometric analysis of protein content in *Taxus* protoplasts and single cells as compared to aggregated suspension cultures. *Plant Cell Rep*. 23:528-533. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0875-y>
- Nakagawa T, Ishiguro S, Kimura T (2009) Gateway vectors for plant transformation. *Plant Biotech*. 26:275-284. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.26.275>
- Namdeo AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacogn Rev*. 1:69-79.

- Namdeo AG, Jadhav TS, Rai PK, Gavali S, Mahadik KR (2007) Precursor feeding for enhanced production of Secondary metabolites: A review. *Pharmacogn Rev.* 1:227-231.
- Naruse M, Satoh F, Tanabe A, Okamoto T, Ichihara A, Tsuiki M, Katabami T, Nomura M, Tanaka T, Matsuda T, Imai T, Yamada M, Harada T, Kawata N, Takekoshi K (2018) Efficacy and safety of metyrosine in pheochromocytoma/paraganglioma: a multi-center trial in Japan. *Endocr J.* 65:359-371. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0276>
- Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep.* 31:597-620. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1202-z>
- Nezbedová L, Hesse M, Dušek J, Werner C (1999) Chemical potential of *Aphelandra* sp. cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 58:133-140. <https://doi.org/10.1023/A:1006363612428>
- Oksman-Caldentey K-M, Inze D (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* 9:433-440. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.006>
- Ortiz Z (1996). Actividad antibacteriana de la raíz de *Buddleia cordata*. Tesis licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. 75 pp.
- O'Shea K, Misra BB (2020) Software tools, databases and resources in metabolomics: updates from 2018 to 2019. *Metabolomics.* 16:36. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01657-3>
- Osiecka R, Janas KM (1998) Mitodepressive and clastogenic effects of some aminophosphonates, inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase. I. 2-aminoindan-2-phosphonic acid. *Plant Physiol Biochem.* 36:805-808 [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(99\)80017-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(99)80017-5)
- Ouyang J, Wan X, Zhao B, Yuan X, Wang Y (2003). Effects of rare earth elements on the growth of *Cistanche deserticola* cells and the production of phenylethanoid glycosides. *J Biotechnol.* 102:129-134. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00019-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00019-1)
- Ouyang J, Wang X, Zhao B, Wang Y (2005a) Enhanced production of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to cell culture of *Cistanche deserticola*. *Process Biochem.* 40:3480-3484. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.025>
- Ouyang J, Wang X, Zhao B, Wang Y (2005b) Improved production of phenylethanoid glycosides by *Cistanche deserticola* cells cultured in an internal loop airlift bioreactor with sifter riser. *Enzyme Microb Technol.* 36:982-988. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.029>
- Pardo F, Perich F, Villarroel L, Torres R (1993) Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. *J Ethnopharmacol.* 39:221-222. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(93\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(93)90041-3).
- Park J, Xi H, Han J, Lee J, Kim Y, Lee J, Son J, Ahn J, Jang T, Choi J, Park J (2020) Prediction and identification of biochemical pathway of acteoside from whole genome sequences of *Abeliophyllum distichum* Nakai, cultivar Ok Hwang 1ho. *Int J Adv Comput Technol.* 10:76-91. <https://doi.org/10.22156/CS4SMB.2020.10.03.076>
- Parthasarathy A, Cross PJ, Dobson RCJ, Adams LE, Savka MA, Hudson AO (2018) A three-ring circus: metabolism of the three proteogenic aromatic amino acids and their role in the health of plants and animals. *Front Mol Biosci.* 5:29. <http://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00029>
- Passarge E. (Ed.) Color atlas of genetics. 3rd Edition Thieme (2007) Alemania

- Pathak-Gandhi N, Vaidya ADB (2017) Management of Parkinson's disease in Ayurveda: Medicinal plants and adjuvant measures. *J Ethnopharmacol.* 197:46-51. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.020>
- Pauwels L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inzé D, Goossens A (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:1380-1385. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711203105>
- Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, Legrand M (1994) Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiol.* 106:877-886. <https://doi.org/10.1104/pp.106.3.877>
- Perassolo M, Quevedo C, Busto V, Ianone F, Giulietti AM, Rodriguez-Talou J (2007) Enhance of anthraquinone production by effect of proline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Enzyme Microb Technol.* 41:181-185. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.004>
- Perrot-Rechenmann C (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a001446. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001446>
- Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5222-5226. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5222>
- Piątczak E, Kuźma L, Wysokińska H (2016) The influence of methyl jasmonate and salicylic acid on secondary metabolite production in *Rehmannia glutinosa* Libosch. hairy root culture. *Acta Biol Crac.* 58:57-65. <https://doi.org/10.1515/abcsb-2016-0004>
- Pott DM, Osorio S, Vallarino JG (2019) From central to specialized metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Front Plant Sci.* 10:835. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>
- Qiao Z, Tang J, Wu W, Tang J, Liu M (2019) Acteoside inhibits inflammatory response via JAK/STAT signaling pathway in osteoarthritic rats. *BMC Complement Alter Med.* 19:264 <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2673-7>
- Qu J, Zhang W, Yu X (2011) A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 107:261-269. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9977-8>
- Raghavan C, Ong EK, Dalling MJ, Stevenson TW (2006) Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Funct Integr Genomics.* 6:60-70. <https://doi.org/10.1007/s10142-005-0012-1>
- Ramakrishna A, Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav.* 6:1720-1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.1761>
- Ramírez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó RM, Palazon J (2016) Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules.* 21:182. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules21020182>

- Rech RH, Borys HK, Moore KE (1966) Alterations in behavior and brain catecholamine levels in rats treated with  $\alpha$ -methyltyrosine. *J Pharmacol Exp Ther.* 153:412-419.
- Reuber S, Leitsch J, Krause GH, Weissenböck G (1993) Metabolic reduction of phenylpropanoid compounds in primary leaves of rye (*Secale cereale* L.) leads to increased UV-B sensitivity of photosynthesis. *Z Naturforsch C.* 48:749-756. <https://doi.org/10.1515/znc-1993-9-1012>
- Ribbenstedt A, Ziarrusta H, Benskin JP (2018) Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLoS ONE.* 13:e0207082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207082>
- Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC (2018) Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res Int.* 105:654-667. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.053>
- Rodríguez-Quiñones F, Benedí VJ (1993) *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> is a suitable host for the study of *phoA* insertions. *Focus.* 15:110-112.
- Rohde A, Morreel K, Ralph J, Goeminne G, Hostyn V, De Rycke R, Kushnir S, Van Doorselaere J, Joseleau JP, Vuylsteke M, VanDriessche G, Van Beeumen J, Messens E, Boerjan W (2004) Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *A. thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, aminoacid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell.* 16:2749-2771. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023705>
- Rubio-Rodríguez E, Vera-Reyes I, Sepulveda-Garcia EB, Ramos-Valdivia AC, Gabriela Trejo-Tapia G (2021) Secondary metabolite production and related biosynthetic genes expression in response to methyl jasmonate in *Castilleja tenuiflora* Benth. *in vitro* plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 144:519-532. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01975-3>.
- Saimaru H, Orihara Y (2010) Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europaea*. *J Nat Med.* 64:139-145. <https://doi.org/10.1007/s11418-009-0383-z>
- Schenck CA, Maeda HA (2018) Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry.* 149:82-102. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.003>
- Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA (2016) Untargeted metabolomics strategies – challenges and emerging directions. *J Am Soc Mass Spectrom.* 27:1897-1905. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>
- Scossa F, Fernie AR (2020) The evolution of metabolism: How to test evolutionary hypotheses at the genomic level. *Comput Struct Biotechnol J.* 18:482-500. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.02.009>
- Scragg AH (1995) The problems associated with high biomass levels in plant cell suspensions. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 43:163-170. <https://doi.org/10.1007/BF00052172>
- Sharma SK, Bryan GJ, Winfield MO, Millam S (2007) Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta.* 226:1449-1458. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0583-2>
- Shohael AM, Murthy HN, Hahn EJ, Lee HL, Paek KY (2008) Increased eleutheroside production in *Eleutherococcus sessiliflorus* embryogenic suspension cultures with methyl jasmonate treatment. *Biochem Eng J.* 38:270-273. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.010>
- Si H, Liu D (2014) Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *J Nutr Biochem.* 25:581-591. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.02.001>.

- Sierra MI, van der Heijden R, van der Leer T, Verpoorte R (1992) Stability of alkaloid production in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* during long-term subculture. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 28:59-68. <https://doi.org/10.1007/BF00039916>
- Smýkal P, Valledor L, Rodríguez R, Griga M (2007) Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 26:1985-1998. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0413-9>
- Song J, Wang Z (2009) Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*SmPAL1*) from *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Biol Rep.* 36:939-952. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9266-8>
- Song J, Wang Z (2011) RNAi-mediated suppression of the phenylalanine ammonia-lyase gene in *Salvia miltiorrhiza* causes abnormal phenotypes and a reduction in rosmarinic acid biosynthesis. *J Plant Res.* 124:183-192. <https://doi.org/10.1007/s10265-010-0350-5>
- Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S (1965) Blockade of endogenous norepinephrine synthesis by  $\alpha$ -methyl-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase. *J Pharmacol Exp Ther.* 147:86-95.
- Stevenson PC, Nicolson SW, Wright GA (2017) Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. *Funct Ecol.* 31:65-75. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12761>
- Studer G, Rempfer C, Waterhous AM, Gumienny G, Haas J, Schwede T (2020) QMEANDisCo - distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics.* 36:1765-1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
- Szabo E, Thelen A, Petersen M (1999) Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep.* 18:485-489. <https://doi.org/10.1007/s002990050608>
- Tedroff J, Hartvig P, Bjurling P, Andersson Y, Antoni G, Långström B (1991) Central action of benserazide after COMT inhibition demonstrated in vivo by PET. *J Neural Transmission.* 85:11-17. (1991). <https://doi.org/10.1007/BF01244653>
- Temporiti MEE, Frezza C, Beccaccioli M, Gelardi L, Bianco A, Bonina FP, Nielsen E (2020) Production of verbascoside and its analogues in *in vitro* cultures of *Verbascum thapsus* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 140:83-93. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01712-5>
- Tetali SD (2019) Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta.* 249:1-8. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3056-x>
- Thorpe TA (2007) History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol.* 37:169-180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, Fernie AR (2013) The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 48:123-152.
- Torrens-Spence MP, Liu P, Ding H, Harich K, Gillaspay G, Li J (2013) Biochemical evaluation of the decarboxylation and decarboxylation-deamination activities of plant aromatic amino acid decarboxylases. *J Biol Chem.* 288:2376-2387. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.401752>
- Torrens-Spence MP, Pluskal T, Li F-S, Carballo V, Weng J-K (2018) Complete pathway elucidation and heterologous reconstitution of *Rhodiola salidroside* biosynthesis. *Mol Plant.* 11:205-217. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.007>

- Torrens-Spence MP, Chiang Y-C, Smith T, Vicent MA, Wang Y, Weng J-K (2020) Structural basis for independent origins of new catalytic machineries in plant AAAD proteins. *PNAS* 117:10806-10817. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920097117>
- Tran LT, Taylor JS, Constabel CP (2012) The polyphenol oxidase gene family inland plants: lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genom.* 13:395. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-395>.
- Trejo-Tapia G, Rodríguez-Monroy, M (2007) Cellular aggregation in secondary metabolite production in *in vitro* plant cell cultures. *Interciencia.* 32:669-674.
- Trejo-Tapia G, Balcazar-Aguilar JB, Martínez-Bonfil B, Salcedo-Morales G, Jaramillo-Flores M, Arenas-Ocampo ML, Jiménez-Aparicio A (2008) Effect of screening and subculture on the production of betaxanthins in *Beta vulgaris* L. var. 'Dark Detroit' callus culture. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 9:32-36. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.009>
- Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M (2015) MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods.* 12:523-526. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Vanholme B, El Houari I, Boerjan W (2019) Bioactivity: phenylpropanoids' best kept secret. *Curr Opin Biotechnol.* 56:156-162. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.012>
- Vanisree M, Tsay HS (2004) Plant cell cultures - An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int J Appl Sci Eng.* 2:29-48. [https://doi.org/10.6703/IJASE.2004.2\(1\).29](https://doi.org/10.6703/IJASE.2004.2(1).29)
- Vasconsuelo A, Boland R (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.* 172:861-875. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.01.006>
- Vázquez-Márquez AM, Zepeda-Gómez C, Burrola-Aguilar C, Bernabé-Antonio A, Nieto-Trujillo A, Cruz-Sosa F, Rodríguez-Monroy M, Estrada-Zúñiga ME (2019) Effect of stirring speed on the production of phenolic secondary metabolites and growth of *Buddleja cordata* cells cultured in mechanically agitated bioreactor. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 39:155-166. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01673-9>
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev.* 1:13-25. <https://doi.org/10.1023/A:1015871916833>
- Vogt T (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol Plant.* 3:2-20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Wang F, Li X, Zuo X, Li M, Miao C, Zhi J, Li Y, Yang X, Liu X, Xie C (2021) Transcriptome-wide identification of WRKY transcription factor and functional characterization of *RgWRKY37* involved in acteoside biosynthesis in *Rehmannia glutinosa*. *Front Plant Sci.* 12:739853. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.739853>
- Wang F, Zhi J, Zhang Z, Wang L, Suo Y, Xie C, Li M, Zhang B, Du J, Gu L and Sun H (2017) Transcriptome analysis of salicylic acid treatment in *Rehmannia glutinosa* hairy roots using RNA-seq technique for identification of genes involved in acteoside biosynthesis. *Front Plant Sci.* 8:787. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00787>
- Wang H, Yua J, Satoh Y, Nakagawa Y, Tanaka R, Kato K, Yao M (2020) Crystal structures clarify cofactor binding of plant tyrosine decarboxylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 523:500-505. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.077>



- Wang R, Han X, Xu S, Xia B, Jiang Y, Xue Y, Wang R (2019a) Cloning and characterization of a tyrosine decarboxylase involved in the biosynthesis of galanthamine in *Lycoris aurea*. *Peer J* 7:e6729. <http://doi.org/10.7717/peerj.6729>
- Wang S, Alseekh S, Fernie AR, Luo J (2019b) The structure and function of major plant metabolite modifications. *Mol Plant*. 12:899-919. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.06.001>
- Wang XH, Gong M, Tang L, Zheng S, Lou JD, Ou L, Gomes-Laranjo J, Zhang C (2013) Cloning, bioinformatics and the enzyme activity analyses of a phenylalanine ammonia-lyase gene involved in dragon's blood biosynthesis in *Dracaena cambodiana*. *Mol Biol Rep*. 40:97-107. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2032-y>.
- Wanner LA, Li G, Ware D, Somssich IE, Davis KR (1995) The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 27:327-338. <https://doi.org/10.1007/BF00020187>
- Weir B, Gu X, Wang M, Upadhyaya N, Elliott AR, Brettel RS (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using suspension cells as a model system and green fluorescent protein as a visual marker. *Aust J Plant Physiol*. 28:807-818. <https://doi.org/10.1071/PP99211>
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant J*. 27:581-590. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01105.x>
- Whetten RW, Sederoff RR (1992) Phenylalanine ammonia-lyase from Loblolly pine. Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. *Plant Physiol*. 98:380-386. <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.380>
- Wilczanska-Barska A, Królicka A, Głód D, Majdan M, Kawiak A, Krauze-Baranowska M (2012) Enhanced accumulation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* following elicitation. *Biotechnol Lett*. 34:1757-1763. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0963-y>
- Wilson RC, Doudna JA (2013) Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*. 42:217-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
- Wilson SA, Roberts SC (2012) Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J*. 10:249-268. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x>.
- Wink M (2008) Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Nat Prod Commun*. 3:1205-1216. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300801>
- Wink M (2020) Evolution of the angiosperms and co-evolution of secondary metabolites, especially of alkaloids. pp. 1-24. En Co-evolution of secondary metabolites. Eds. Mérillon JM, Ramawat KG. Springer. Heidelberg, Germany. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_22)
- Wu X, He W, Zhang H, Li Y, Liu Z, He Z (2014) Acteoside: A lipase inhibitor from the Chinese tea *Ligustrum purpurascens* kudingcha. *Food Chem*. 142:306-310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.071>
- Wysokińska H, Rózga M (1998) Establishment of transformed root cultures of *Paulownia tomentosa* for verbascoside production. *J Plant Physiol*. 152:78-83. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(98\)80105-3](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(98)80105-3)

- Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res.* 37:W652–W660. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp356>.
- Xiong W, Song Y, Yang K, Gu Y, Wei Z, Kowalchuk GA, Xu Y, Jousset A, Shen Q, Geisen S (2020) Rhizosphere protists are key determinants of plant health. *Microbiome.* 8:27. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00799-9>
- Xu F, Deng G, Cheng S, Zhang W, Huang X, Li L, Cheng H, Rong X, Li J (2012) Molecular cloning, characterization and expression of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Juglans regia*. *Molecules.* 17:7810-7823. <https://doi.org/10.3390/molecules17077810>
- Xue Z, Yang B (2016) Phenylethanoid glycosides: research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics. *Molecules.* 21:991-1015. <https://doi.org/10.3390/molecules21080991>
- Yang J, Zhang J, Huang Z, Wang Z, Zhu Q, Liu L (2002) Correlation of cytokinin levels in the endosperms and roots with cell number and cell division activity during endosperm development in rice. *Ann Bot.* 90:369-377. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf198>
- Yang CQ, Fang X, Wu XM, Mao YB, Wang LJ, Chen XY (2012) Transcriptional regulation of plant secondary metabolism. *J Integr Plant Biol.* 54:703-712. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01161.x>
- Yazaki K, Arimura G, Ohnishi T (2017) ‘Hidden’ terpenoids in plants: their biosynthesis, localization and ecological roles. *Plant Cell Physiol.* 58:1615-1621. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx123>
- Yilmaz C, Gökmen V (2020) Neuroactive compounds in foods: Occurrence, mechanism and potential health effects. *Food Res Int.* 128:108744. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108744>
- Yu O, Jez JM (2008) Nature’s assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant J.* 54:750-762. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.03436.x>
- Yue W, Ming Q, Lin B, Rahman K, Zheng C-J, Han T, Qin L (2016) Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol.* 36:215-232. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923986>
- Zhang X, Liu CJ (2015) Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Mol Plant.* 8:17-27. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.001>
- Zhang X, Li C, Wang L, Fe Y, Qin W (2019) Analysis of *Centranthera grandiflora* Benth transcriptome explores genes of catalpol, acteoside and azafrin biosynthesis. *Int J Mol Sci.* 20:6034. <https://doi.org/10.3390/ijms20236034>
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 23:283-333. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.01.003
- Zhao X, Li H, Wang J, Guo Y, Liu B, Deng X, Niu X (2016) Verbascoside alleviates pneumococcal pneumonia by reducing pneumolysin oligomers. *Mol Pharmacol.* 89:376-387. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.115.100610>
- Zhou C, Yujun Y, Ambrose YJ (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8:172-173.

- Zhou Y, Wang X, Wang W, Duan H (2016) De novo transcriptome sequencing-based discovery and expression analyses of verbascoside biosynthesis-associated genes in *Rehmannia glutinosa* tuberous roots. *Mol Breeding*. 36:139. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0548-x>
- Zhou Y, Zhu J, Shao L, Guo M (2020) Current advances in verbascoside biosynthesis pathway elucidation and biosynthesis. *Fitoterapia*. 142:104495. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104495>
- Zhu H, Tan N, Wang H, Chu H, Zhang C (2016) Central anti-fatigue activity of verbascoside. *Neurosci Lett*. 616:75-79. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.042>
- Zón J, Amrhein N (1992) Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: 2-aminoindan-2-phosphonic acid and related compounds. *Liebigs Ann Chem*. 6:625-628. <https://doi.org/10.1002/jlac.1992199201107>

## ANEXO

### Medio basal Murashige y Skoog (MS)

<b>Componente</b>	<b>mg/L (mM)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
	1650
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	(20.6)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	332.2 (2.3)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	---
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370 (1.5)
	1900
KNO <sub>3</sub>	(18.8)
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 (1.3)
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 (100)
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025 (0.1)
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025 (0.1)
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3 (100)
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8 (100)
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9 (100)
KI	0.83 (5)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25 (1)
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6 (30)
<b>Orgánicos</b>	
Mio-inositol	100 (550)
Glicina	2.0 (26.6)
Ácido nicotínico	0.5 (4.1)
Piridoxina HCl	0.5 (2.4)
Tiamina HCl	0.1 (0.3)

### Medio de inducción

Medio basal MS al 50% suplementado con:

- 2,4-D [0.45  $\mu$ M];
- KIN [2.32  $\mu$ M];
- 30 g/L de sacarosa;
- Antioxidantes: 100 mg/L de ácido cítrico y 150 mg/L de ácido ascórbico.

\*\*\*\* Para medio semisólido 2 g/L de Phytigel como gelificante.

### Buffer de lisis pH 7.8 (modificado de Al-Samarrai y Schmid, 2000)

Compuesto	Concentración
Trizma-base	40.0 mmol/L
Acetato de sodio	20.0 mmol/L
EDTA	1.0 mmol/L
SDS	1.0% p/v

### Medio Luria-Bertani (LB)

Compuesto	g/L
Triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	5.0

pH final 7.0  $\pm$  0.2

### Medio YEB

Compuesto	g/L
Extracto de carne	5.0
Extracto de levadura	1.0
Peptona	5.0
Sacarosa	5.0
MgCl <sub>2</sub>	0.5
Agar bacteriano	1.5%

## Buffer TENS

Compuesto	Concentración/pH
Tris-HCl	10 mM (pH 8)
EDTA	1 mM (pH 8)
NaOH	0.1 N
SDS	0.5 (p/v)

## Otras secuencias amplificadas con primers degenerados

### *Sesamum indicum* (Lamiales) proteína NLRC3 (regiones ricas en leucina) (LOC105168209)

GCATATCTGCTGTATATGTCAGCTCCAGTAGCTCCTATGTGGGACCATCCAAGATAAAAGG  
AGGGGTCACATTGCCATGAAATTTAAGAACTTCTGCCAAACAATTAGCACCTTCAGGTCCA  
ATGGGATTATAACCAATTTCCAAAGCATTAATGACAGAATTATCTTTTAAAACCTTGTGCTA  
TTTCATGTATCCCTTTGGCGTGGATGTCATTTCCGCCTAGATCAACATTCGTTACTGAACG  
ATTCTGTTTCAAAGCATCTGCCATTCTTTCAGCTCCCTCGTCTCCAATGTCATTCATGTA  
GACTGATCCATAACAAGCTTTTGCTTTTTTTGACATATTCAGCAACGTGAAAGGCTCCTCT  
AGCACTAATGGAATTGTTTGCAAGATCCAAGGCCGTAAGCTTCCCTTTATGAAAAGACGAG  
CCAGGCATCAGAGTACGGACTCCTTCATCCCAATAGAGTTTCCCTTGCAAATATAGTTCCC  
TCAAGGATTTGTTTCCCTCAAGTCCTTTGGCCAGTGCAGCTGCCCAAGGGGACCACCATA  
ATTGCCATTTGAGGTATATCGACAATATACTTTTATTCTCTAGAAGTGCTCCAGCAAGGCC  
AGAAAAACCAGAATAGTCAATCAAATTTGTTACTAAGTTCAATGACACGCAAGGACGAATT  
TTTCCCTTCAACATCTCATCCTATTGCCTCTTGACCCCCTCATCCCCAAAATGCAGCACTAC  
TTAGCTGTAGCTTCTGAATACCTGGAAATTGATCACCAAAAAAGTTCACATAAA

### *Sesamum indicum* (Lamiales) enzima peroxisomal degradadora de insulina-tipo 1 (insulinasa), (LOC105159756)

GTGATCCTGAAGGATTGAAGGCCTCGCACAAATTTCTAGAACATAAGGTTTTTTAGGCAAGT  
GAAAAGTATCCATTGGAGGATAGTTACTCCAGATACATCAGAGAGCATGGAGGCAGTACA  
GATGCTTTCACATCATCTGAACACACCAACTACTACTTAGATGTTAACCATGACTCTTTTG  
ACGAAGCCTTGGACAGATTTCGCCAGTTTTTTCATCAAACCACTGATGTCTGCTGATGCCAC  
CACGAGGGAAATAAAAGCGGTTGATTCTGAGAATCAGAAGAATTTTTTATAAGGAGAAAG  
GAGAATGATCAGCTTCAGAGACCTTT

GAAGGAAAAGAAGGCCTCGCACATTTTCTTGAACATATTCTTTTTTTGCAAGTGAAAAGTA  
TCCATTGGAGGACAGTTACTCCAGATACATCAGCGAGCATGGAGGCAGTACAAATGCTTTC  
ACATCATCTGAACACACCAACTACTACTTTGATGTTAACCCTGACTCTTTTGACGAAGCCT

TGGACAGATTTCGCCAGTTTTTCATCAAACCACTGATGTCTGCTGATGCCACCACGAGGGA  
AATAAAAGCGGTTGATTCTGAGAATCAGAAGAATTTACTATCTGATGCTTGGAGAATTGA  
ATCAGCTTCAGAAACATTTAAGCGTGAAAGATCA

***Arabidopsis lyrata* clon SINE9 elemento móvil (transposón)**

TAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGT  
TGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCAT  
AGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATTACGAGCCGGAA  
GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTTGCCTAATGAGTTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG  
CGCTCACTGCCCCGTTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC  
AACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTTCCTCGCTTCACTGAC  
TCGCTGCGCTTCGGGACGGTTCGGGCTGCGGCGAGCGGGTATCAGC

***Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* mRNA for predicted protein, partial cds, clone:  
NIASHv3018I06**

GATATCAGACCAGTCAACAAGTACATGGGCATCGTATTGCCGAACCGATAAAGCTAGCAT  
GCCAACGGAATACAGCGAGTCGCTCTTTGTGGAGGTGACTACTACCTAAGAAT

GATATCAGACCAGTCAACAAGTACAATGGGCATCGTATTGCCGAACAGATAAAGCTAGCA  
TGCCAACGGTATACAGCGAGTCGCTCTTTGTGGAGGTGACGATTACCTAACAATCGGTCGA  
TTCGTTTGATGTTATGTTTTGTTCTCGCTTTGGTTGGCAGGTTACGGCCAAGTTCGGTAAG  
AGTGACAGTTTTACAGTTCATGTAAGGCATGGCAGGCCAACGTTAAGCTGTTGAATCATTT  
TAAGTGTCAATCCGGGCACAATTGGAAAATAGAGTCGTGTATACTCTAGGGTGCGCACATT  
TTGTTGTATGATTCTTGATTTTTGGTGCACCCATTTGATCATATGACACGATGTGACCCGG  
CCTTATCTTAGTGATTTTTGAT

***Sesamum indicum* microsatellite DNA, locus SSR SESAME91, clone BSISR91**

ATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTT  
TATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTA AAACTTATATTAAGAACTATGCTAACCACC  
TCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAACCTAC  
GAGCTAAATATTCAATATGTTCCCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTGAACGAGG  
TTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTA AAAATTTAAATTTTTGAAGA  
AAGTTCAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTTGCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAA  
GACGTCTCTTTTTGACATGTTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTATTATCCGCTCATA  
ATCCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTCATGAGTGA  
GCTCACTCAAATTAATCGCGATGCGATCATTGACA

***Boechera divaricarpa* (Brassicales) GSS (HF949854), clone B59-01-F\_K06.**

GAAATTTTTTCCATTCTCTCTCCTCACAATATACCAGCCCCAAGCCTAAAATTATCCCCT  
GCTGCTGCCTAACAGTACCTAGCTAATTCTCATTATTTGCAATGAGCTCATTGTCCTTTTT  
TTTTTGGGAAAACAGTCCTGCCTTCTGCTTTTTTGAATCTTCCCATCGCCCGAGGAGAGGC  
GATTAGCTAATTGAACGCTCTTCCTCTTCATCCCCACTTACTCGCTGCTCTCGATCTTTCG  
GCTGCGACTAGTGTTATCTTCTCACTCCATGGACGTCATAAGGTTATCCACACACTCAGGG  
GATAAGGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCACCTAAAGGCCGAGATCCGTAAAAAT  
GCCGCGTACTGGCGTTTTTCCTTAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACACAGATCGACA  
CTCAAATCATAGGTGGCTAAATCCGACAGGACTATACACATACCACTCTAACCCCTCTGGA  
AGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTACCGACCTGCCGCATACCGTATACCTGACACCATTACT  
CTCTTCTGTACGCCAGACTCTTTCACATAACTCAATCTACAAGTATATCAAATCAGTGTAT  
GACGTTCTCTCAAACACTCAACTGTATGTACTATCCTTCCGTTTCAACAGATCGTTGCTCCTC  
TTCCTG

TTCCTCATCCTCCCACATTGAATCGTTCTCTCTATCCTACGTCTTCATTTAGCGTTATCCT  
TTCACTCAGTGGCGTTAAGACGGTTATCCCCACTTTCAGGGGACGGCACATGAAAGAACAT  
GTGATCCATAGGCCATCACAACGCCATTATCCGTAAAAAGCCTCGATACTGGCGTATTTCC  
TTAGGCTCCGCCCCCTCGACTATCAGCACACAAATCGACTCTCCACCATAGGTGGCTAAAC  
CCGATAGGACTATTAATATAACCAATCAATCCCACCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCACTCCTCT  
ACCGACCTGCCGTTAATAGATTCCTGACAATCTTACTATCTTAGAGTACGTCAGTTGCT  
ATCTCTTAGCAGTACTTATTGTATCTCTAATAGGATGATCGTTGATCTCTCAAACAGGA  
CTGAGAGCACTTTTCCTCCGTTTCAGCC

***Populus euphratica* elongation factor Tu (XM\_011017823), mitochondrial-like  
(LOC105119659)**

GCGTTCCCGCGCTCGTCTGTTCCCTCAACAAGTGGGACATGGTTCGACGATCCGGAGCTGCTC  
GAGCTCGTCGAGATGGAAGTTCGCGAACTGCTCTCGAAGTACGAATTCCCGGGCGATGACA  
TTCCGATCATCAAGGGCTCGGCGCTCGCCGCCCTCGAAGACAAGGACAAGAAGCTCGGCCA  
CGACGCCATCCTCGAGCTGATGCGCAATGTGACGAGTACATCCCGCAGCCGGAGCGTCCGA  
TCGACCAGCCGTTCCCTGATGCCGGGCGAAGACGTGTTCTCGATCGCGGGCCGCGGCCCG

ACGCCGGCGCCGACGGTGGCGCCGCCTTCGCGGATCGCGAAGCGCAGCTTCTCTTCCATCGC  
GATCGGCACGATCAGGTGCACTTCCATCGCGATGTTGTCGCCCGGCATCACCATCTCGG

***Boechea divaricarpa* (Brassicales) GSS (HF949191), clone B25-01-F\_015.**

CTAAGTCATATTATTTACAATACTCTCTCTGACCCCTTCTATTTCGATAAACCACTCGAGCC  
AGCTTCTTTCTCAATCTCCCACCGGAGGGAAGAGGCGATTAGCGTATTGAACACTCTTCC  
TCTTCCTCGCTCATTGAATCGCTGCTCTATCTCTTCGGCTGCAACCAGCGATATCTGAAT



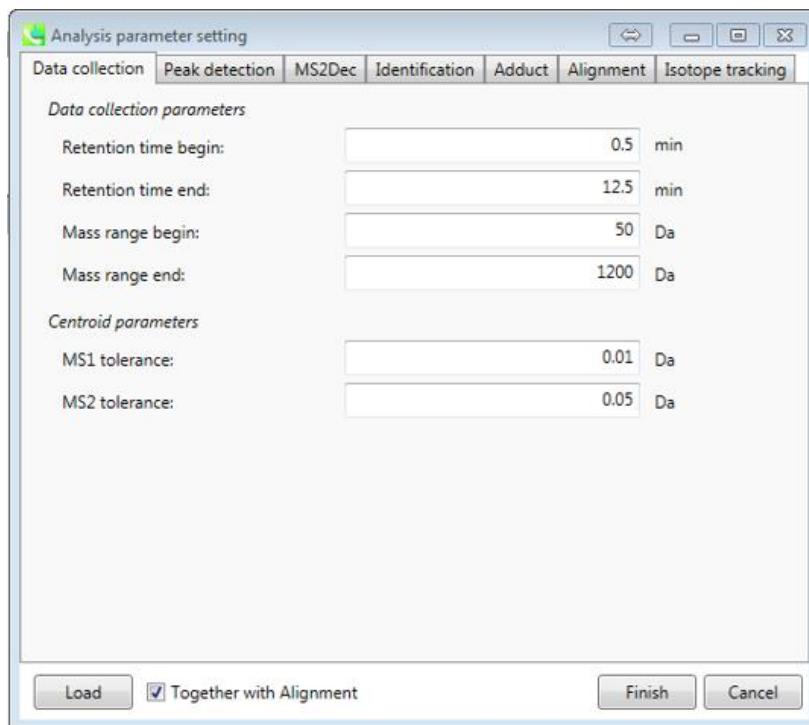
CACTCAGAGGCCGTAATACGGTTATCCGCACATCAGGGGATGACACATCAAAGAACATGTG  
AGCAAAAGGCCAGCCAAACGCCAAGAACCTAAAAAGGCCGCGTTACTGACATTTTTCCAT  
AAGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACGCAGATCGACTCTCAAGTCATAGGTGGCCAAACCC  
GACAGGACTATATACATAACCACGCCTTTCCCCCTAGAAGCTCCCTCTTGCGCTCTCCAGTAC  
CGACCCTGCCGCTTACCGGATATCTGTCCGCCTTTCTCCCTCCGTATGCCAGACGCTTTCT  
CATAGCTCACTCTTCAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAACTAGGCTGTG  
TGCACGATCCCTCCGTTCAACTCGAACGTCGCTCTTATCCGGTAACTATCTTCCTGAGTCC  
TTCCCGGTAAGACATAACTTATCTCCACTTGAAGCAACCTCTGATAACAAGATTA

***Sesamum indicum* factor de respuesta a auxina 1 (LOC105169057),  
XM\_011089324.2**

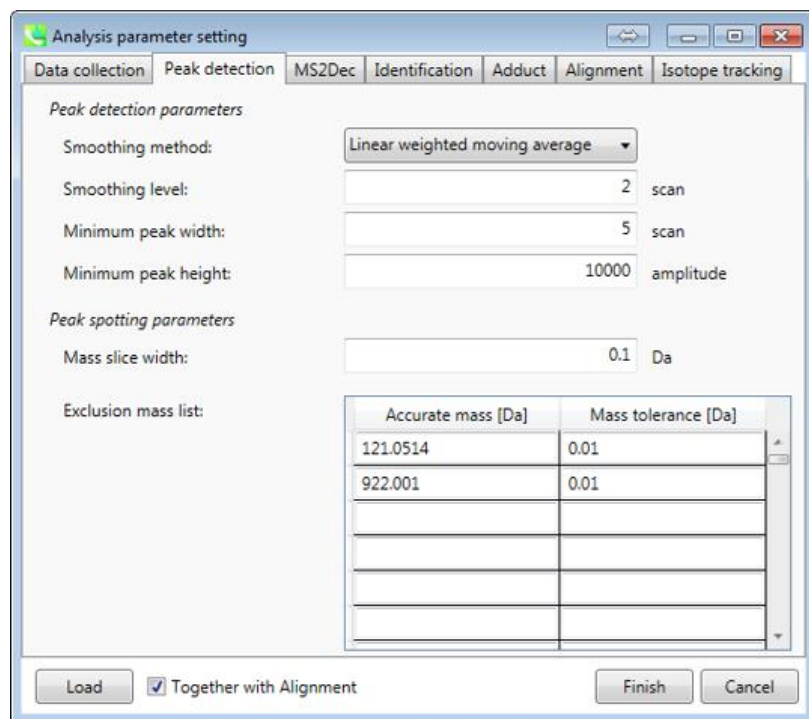
AGAACTGAGGCAGGTATCATCTACTCCTGTAAGTGAAAAGAGACAGGCAAATGGCTGCAG  
GCTTTTTGGTATTGAGTTGGTGGACCATTCAACTGTTGAAGACACCTCACCGGCAGTCCAG  
TCTGGAGCTGCTATTGAGGGTTCTCATATTCCTCTAGATGCTGAATCTGAACAGCATTCTC  
AGCCATCAAATCCTAACCCATCTGATGTTCCCTTTAGACAGTTGCGAACCTGATAAGTCGTG  
CCTGAGATCCACTCATGAGCCAAACAGCCGCCTAACTCGGAGCTGCACCAAGGTTACATG  
CAAGGGATTGCTGTTGGGAGGGCAGTAGATCTGACCAGGTTTGAAGTCTATGAGGATTTAC  
TCAAGAAATTTGAAGAGATGTTTGACATTCAGGGGAACTCTCGGGGTCAACAAAGAAAT  
GGCAGGTTGTCTACACAGATGATGAGGATGACATGATGATGGTTGGAGATGATGCTTGGC  
ATGAATTTTGCAAGATGGTGAAGAGAATATTTATCTATAC

	Time	Function	Parameter
1	1.50 min	Change Solvent Composition	Solvent composition A: 100.00 % B:0.00 %
2	1.50 min	Change Flow	Flow: 0.5 mL/min
3	1.50 min	Change Max. Pressure Limit	Max. Pressure Limit: 1200.00 bar
4	6.00 min	Change Solvent Composition	Solvent composition A: 70.00 % B:30.00 %
5	6.00 min	Change Flow	Flow: 0.5 mL/min
6	6.00 min	Change Max. Pressure Limit	Max. Pressure Limit: 1200.00 bar
7	9.50 min	Change Solvent Composition	Solvent composition A: 20.00 % B:80.00 %
8	9.50 min	Change Flow	Flow: 0.5 mL/min
9	9.50 min	Change Max. Pressure Limit	Max. Pressure Limit: 1200.00 bar
10	10.00 min	Change Solvent Composition	Solvent composition A: 1.00 % B:99.00 %
11	10.00 min	Change Flow	Flow: 0.5 mL/min
12	10.00 min	Change Max. Pressure Limit	Max. Pressure Limit: 1200.00 bar
13	11.80 min	Change Solvent Composition	Solvent composition A: 1.00 % B:99.00 %
14	11.80 min	Change Flow	Flow: 0.5 mL/min
15	11.80 min	Change Max. Pressure Limit	Max. Pressure Limit: 1200.00 bar
16	12.00 min	Change Solvent Composition	Solvent composition A: 100.00 % B:0.00 %
17	12.00 min	Change Flow	Flow: 0.5 mL/min
18	12.00 min	Change Max. Pressure Limit	Max. Pressure Limit: 1200.00 bar
19	15.00 min	Change Solvent Composition	Solvent composition A: 100.00 % B:0.00 %
20	15.00 min	Change Flow	Flow: 0.5 mL/min
21	15.00 min	Change Max. Pressure Limit	Max. Pressure Limit: 1200.00 bar

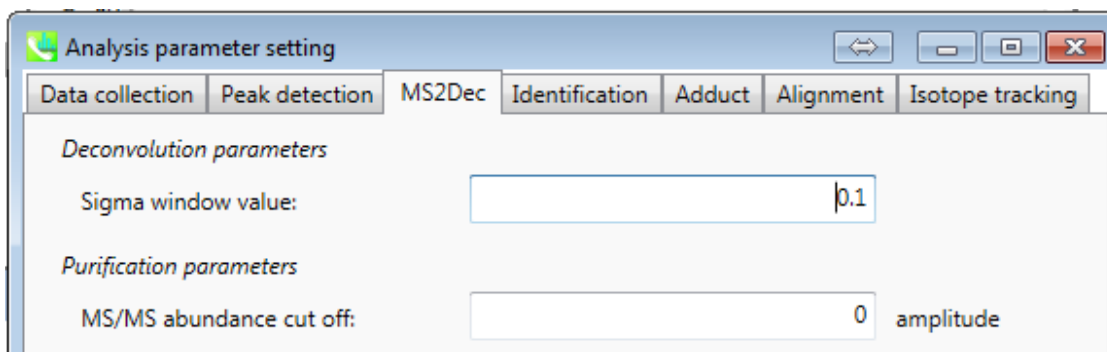
**Anexo. Figura 1.** Gradiente programado para la fase móvil en el análisis de espectrometría de masas de células de *B. cordata*.



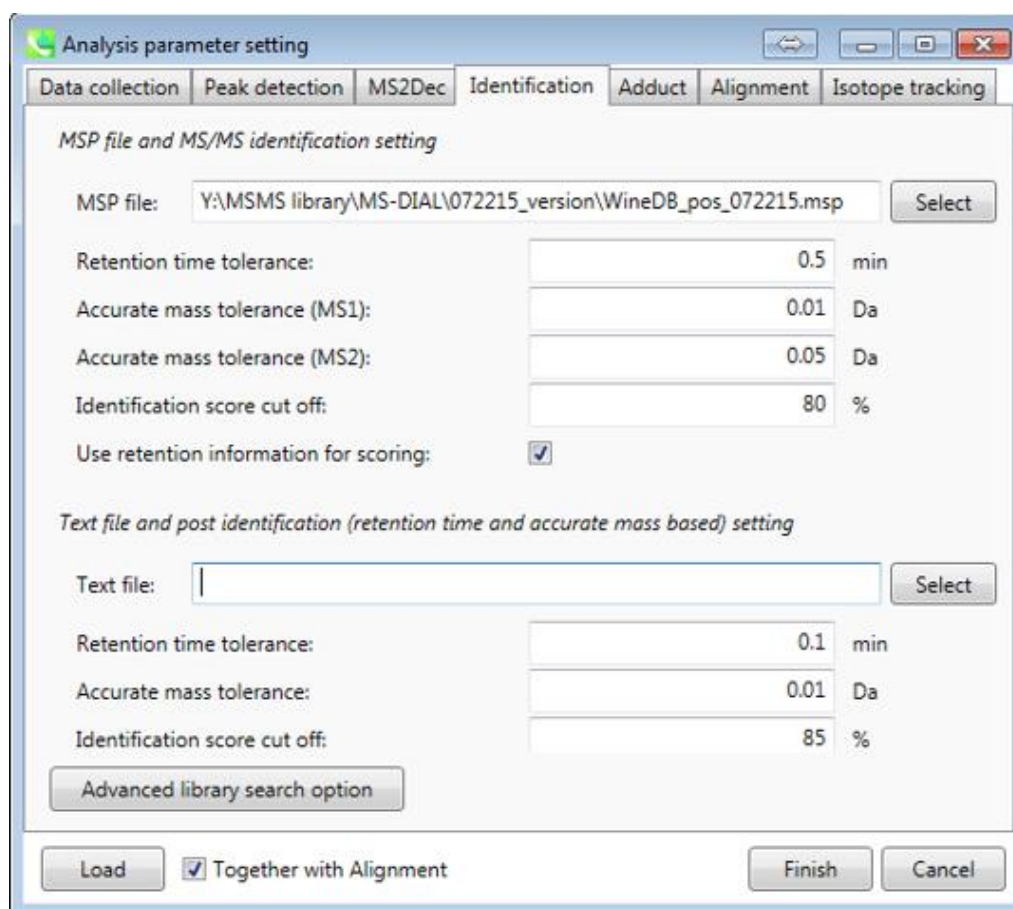
**Anexo. Figura 2.** Parámetros empleados para la colección de datos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de *B. cordata*.



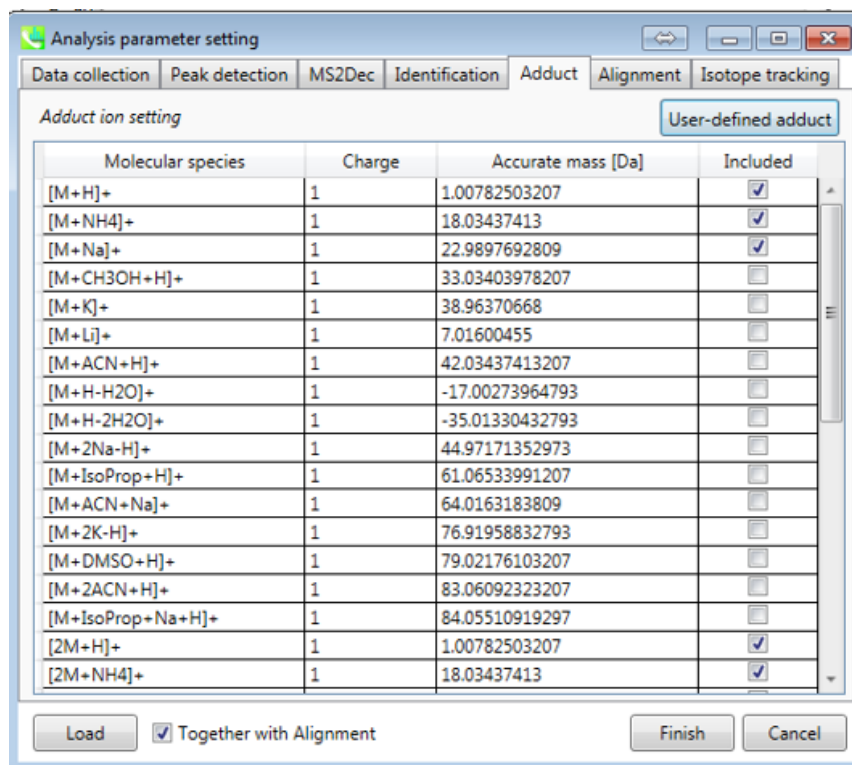
**Anexo. Figura 3.** Parámetros empleados para la detección de picos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de *B. cordata*.



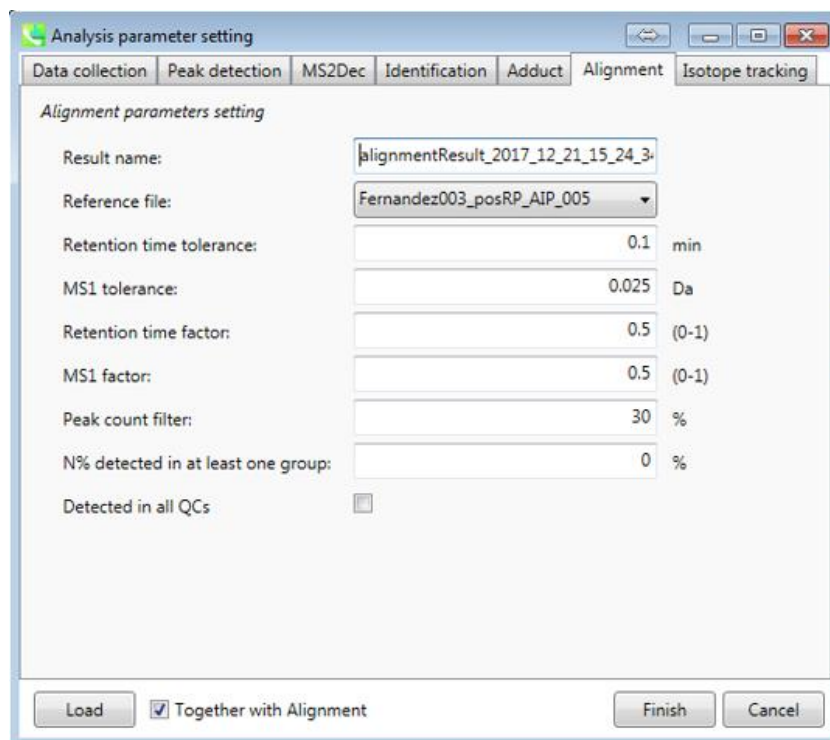
**Anexo. Figura 4.** Parámetros empleados para la deconvolución MS2 con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de *B. cordata*.



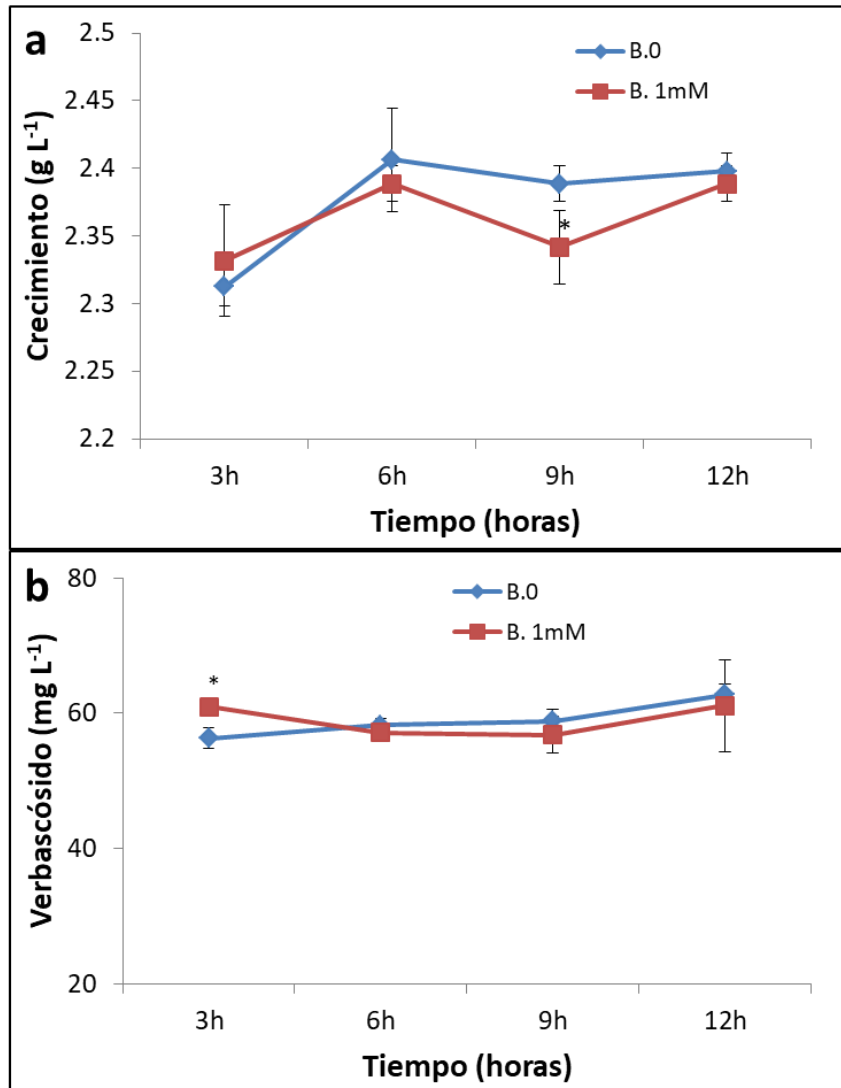
**Anexo. Figura 5.** Parámetros empleados para la identificación de picos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de *B. cordata*.



**Anexo. Figura 6.** Parámetros empleados para la detección de aductos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de *B. cordata*.

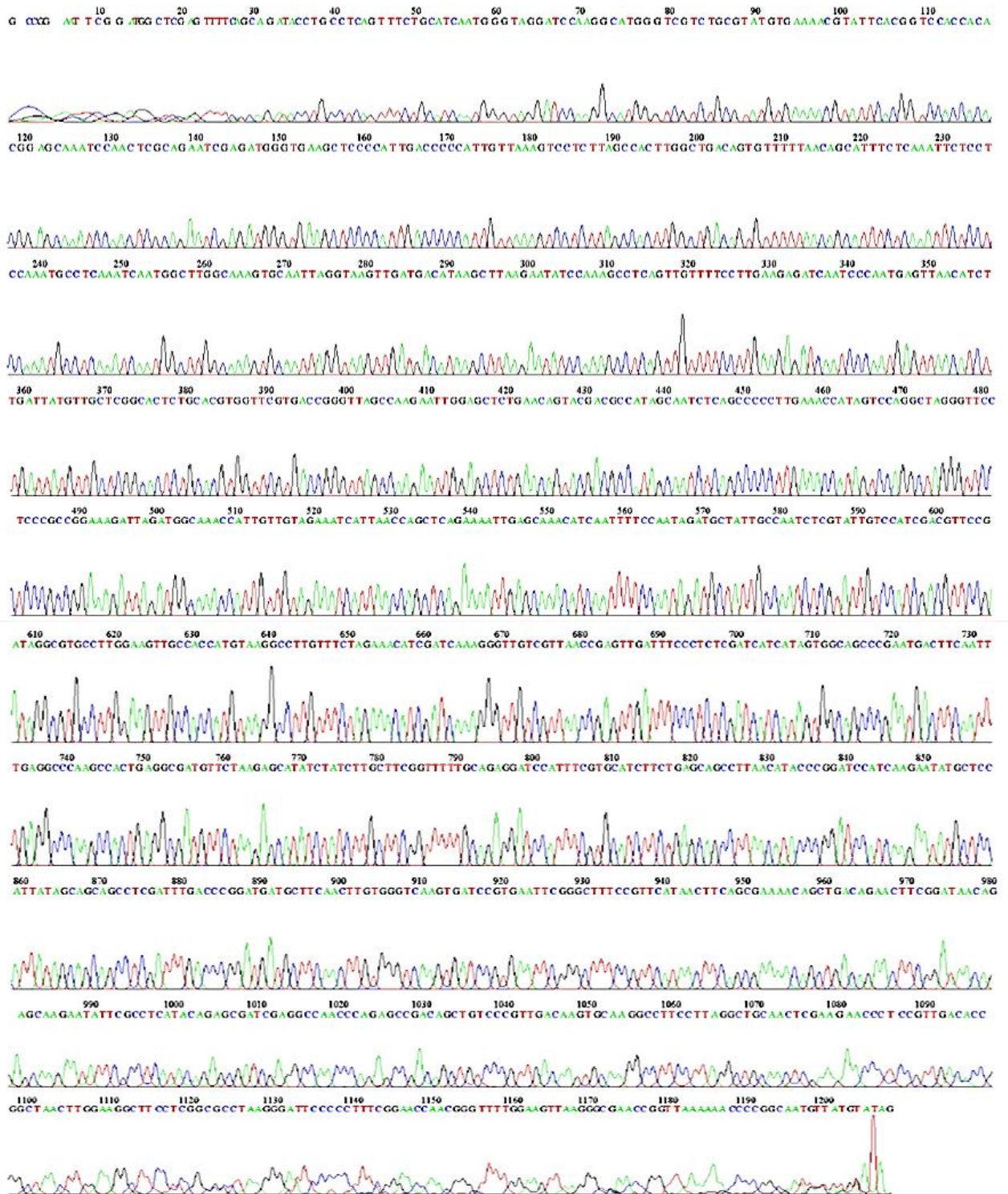


**Anexo. Figura 7.** Parámetros empleados para la alineación de picos con MS-Dial durante el procesamiento de datos de espectrometría de masas de células de *B. cordata*.



**Anexo. Figura 8.** Efecto de la adición del inhibidor benzerazida (1.0 mM) después de 3, 6, 9 y 12 horas sobre **a.** producción de biomasa y **b.** producción de verbascósido en la línea restablecida en suspensión de *B. cordata* al adicionar el compuesto al  $t_{15}$  de cultivo. Los resultados son la media de tres réplicas  $\pm$  DS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas  $P \leq 0.05$  en comparación con el control (líneas negras).

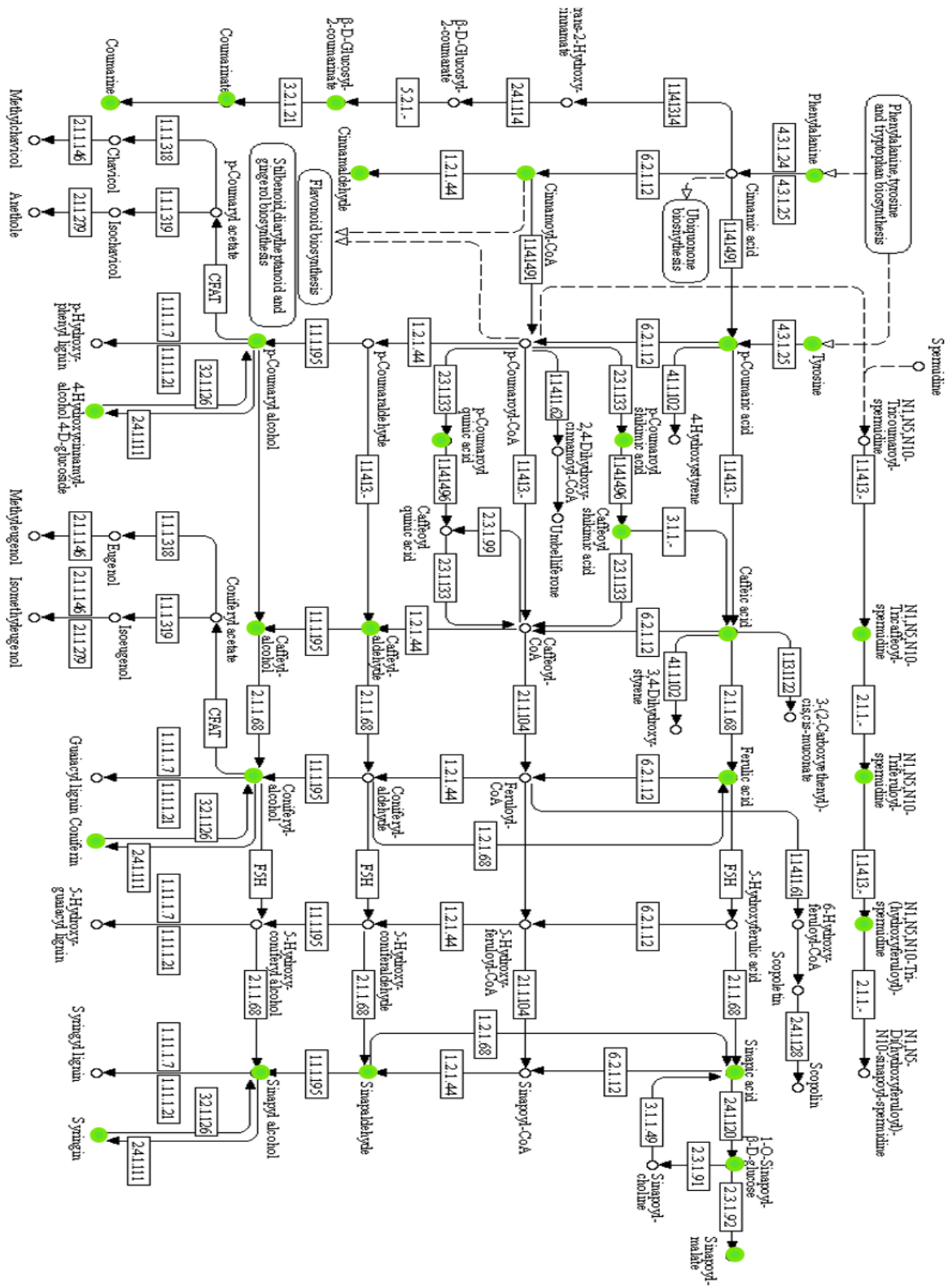




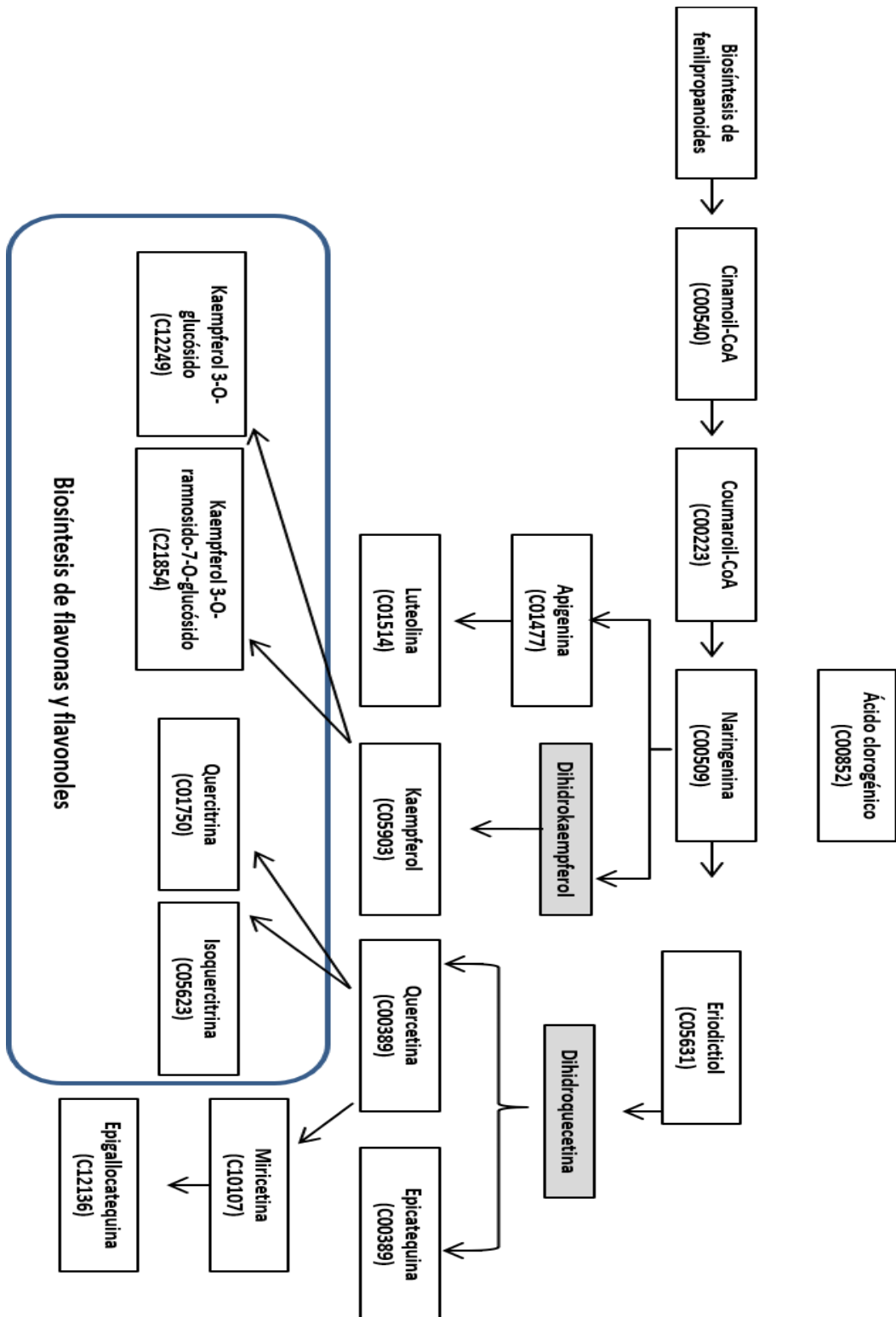
Anexo. Figura 10. Secuencia de nucleótidos de un fragmento de la isoforma 2 del gen *pal* de *Buddleja cordata*.





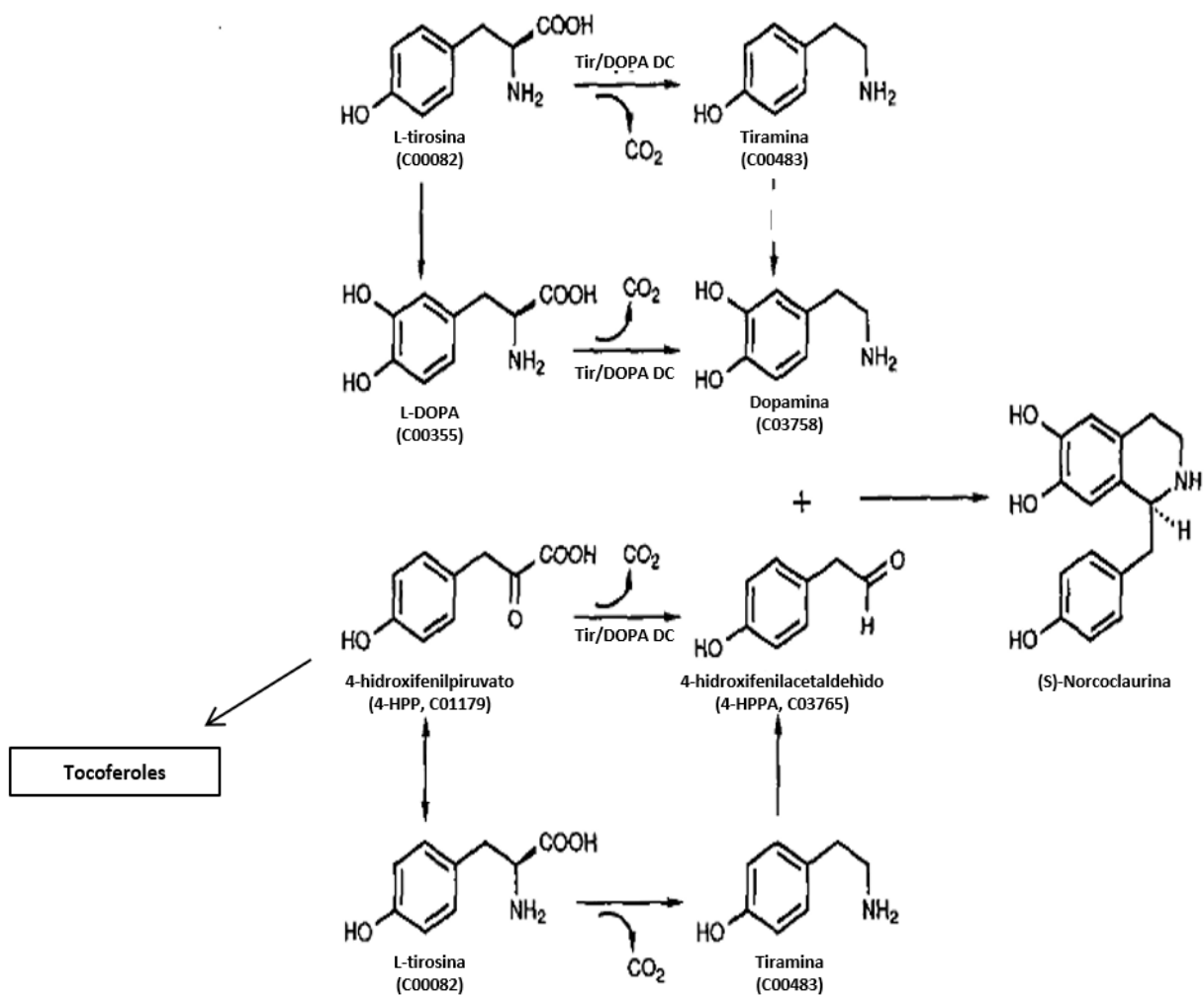


**Anexo. Figura 12.** Ruta biosintética de los fenilpropanoides mapa 00940 en KEGG ([https://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_pathway?map00940](https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00940)). Los puntos verdes representan los compuestos putativos identificados en muestras celulares de *B. cordata*.



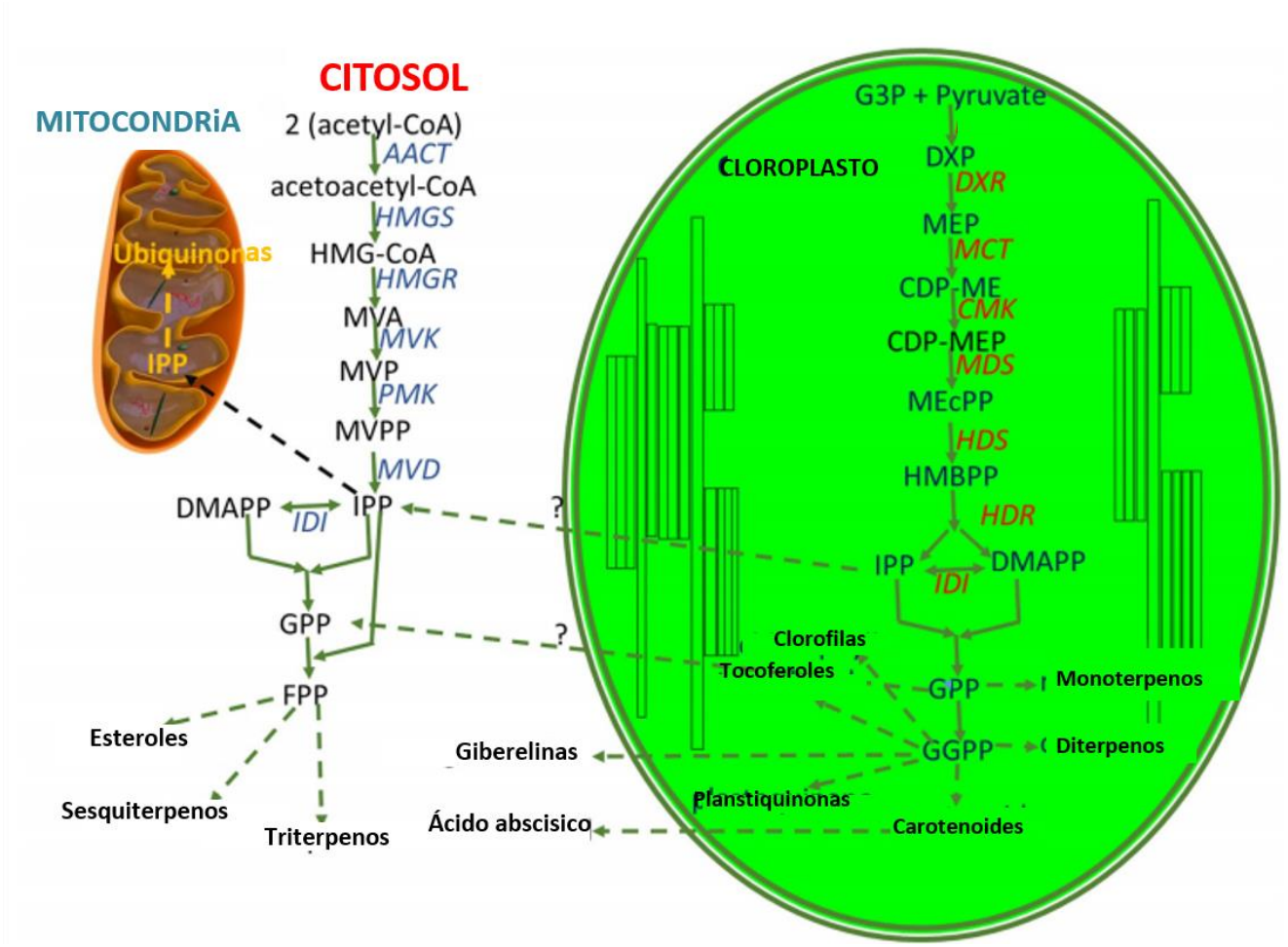
**Anexo. Figura 13.** Biosíntesis de flavonoides, flavonas y flavonoles. Figura estructurada con datos de KEGG sobre biosíntesis de flavonoides ([https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ath00941](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ath00941)) y flavonas y flavonoles ([https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight\\_pathway?scale=1.0&map=map00944&keyword=Acacetin](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map00944&keyword=Acacetin)).





**Anexo. Figura 15.** Principales precursores de diversos alcaloides, benzilisoquinolina y tocoferoles.

\* Figura estructurada con datos de Facchini y De Luca (1994) y Araji *et al.*, (2014)



Anexo. Figura 16. Biosíntesis de terpenoides, esteroides, giberelinas, ubiquinonas, clorofilas, carotenoides y tocoferoles. Imagen modificada de Tetali *et al.*, 2019.



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00254  
Matricula: 2131800123

Estudios sobre la biosíntesis del metabolito secundario verbascósido en cultivos en suspensión de *Buddleja cordata*

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 15:00 horas del día 6 del mes de diciembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA  
DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA  
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO  
DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: HYPATIA ARANO VARELA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

