

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FCA**  
Facultad de  
Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

## TRABAJO DE DIPLOMA

Obtención de plantas transgénicas de *Digitalis purpurea* L. (*Plantaginaceae*) que contienen el gen *vep1* de *Arabidopsis thaliana* L.

Autor: Adrian Alejandro Espinosa Antón

Tutores: Dr. C. Naivy L. Pérez Alonso

MSc. Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz

Santa Clara, Mayo de 2018  
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

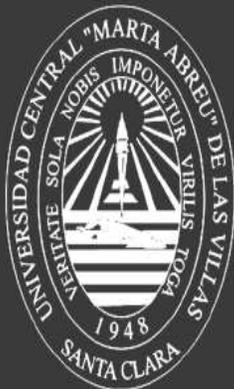
**Atribución- No Comercial- Compartir Igual**



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419



Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Departamento de Biología

Obtención de plantas transgénicas de *Digitalis purpurea* L.  
(*Plantaginaceae*) que contienen el gen *vep1* de *Arabidopsis thaliana* L.



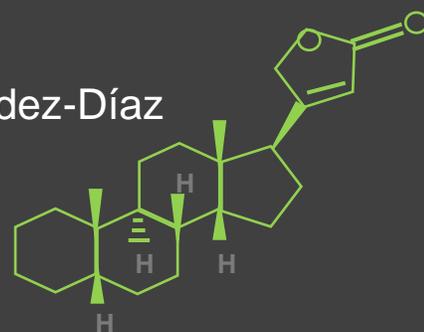
## TESIS DE DIPLOMA



Santa Clara  
2018

Autor: Adrian Alejandro Espinosa Antón

Tutoras: Dr. C. Naivy L. Pérez Alonso  
MSc. Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz



# TESIS DE DIPLOMA



**Obtención de plantas transgénicas de *Digitalis purpurea* L.  
(*Plantaginaceae*) que contienen el gen *vep1* de *Arabidopsis thaliana* L.**

**Autor:** Adrian Alejandro Espinosa Antón

**Tutoras:** Dr. C. Naivy L. Pérez Alonso <sup>1</sup>

MSc. Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. [naivylisbet@gmail.com](mailto:naivylisbet@gmail.com)

<sup>2</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. [kairuzhd@uclv.edu.cu](mailto:kairuzhd@uclv.edu.cu)

**Santa Clara**

**2018**

*Nunca sabes cuan fuerte eres, hasta que ser fuerte es la única elección que tienes. Y cuando esto sucede, eres intocable.*

*-Chuck Palahniuk-*

*A Irma y Olvis, a quienes le debo todo lo que soy*

**RESUMEN**

Hasta la fecha, las plantas del género *Digitalis* son la principal fuente económicamente viable de cardenólidos. Estos metabolitos secundarios constituyen los medicamentos más extensamente empleados a nivel mundial en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y tienen interés farmacológico creciente, debido a sus potencialidades como anticancerígeno. La transformación genética es una herramienta promisoría para el desarrollo de nuevas estrategias biotecnológicas que propicien la sobreproducción de glucósidos cardiotónicos. Este estudio describe la transformación genética de discos foliares de *Digitalis purpurea* L., vía *Agrobacterium tumefaciens*, con el gen *vep1* de *Arabidopsis thaliana* L. Para ello, se compararon los agentes selectivos higromicina B (15 mg L<sup>-1</sup>) y geneticina (70 mg L<sup>-1</sup>) durante el proceso de formación de callos, con la finalidad de elegir el antibiótico más efectivo en el proceso de selección. Posteriormente, se empleó la cepa de *Agrobacterium* C58C1Rf<sup>R</sup> (pMP90), portadora del vector binario pAthspA2-*vep1*, para transferir el gen de interés a los segmentos foliares de *D. purpurea*. Los explantes seleccionados fueron transferidos a medio de cultivo de regeneración. La presencia de los transgenes *p35S*, *hpt* y *vep1* en las plantas obtenidas fue comprobada mediante PCR. La selección con higromicina B durante el proceso de formación de callos de *D. purpurea*, es más eficiente que la realizada con geneticina. Además, se obtuvieron plantas transgénicas de *D. purpurea* que contenían el gen *vep1* de *A. thaliana*. Este constituye el primer informe de la transformación genética de plantas del género *Digitalis*, con un gen involucrado en la biosíntesis de cardenólidos.

**Palabras claves:** *Agrobacterium tumefaciens*, cardenólidos, genes marcadores de selección, *hpt*.

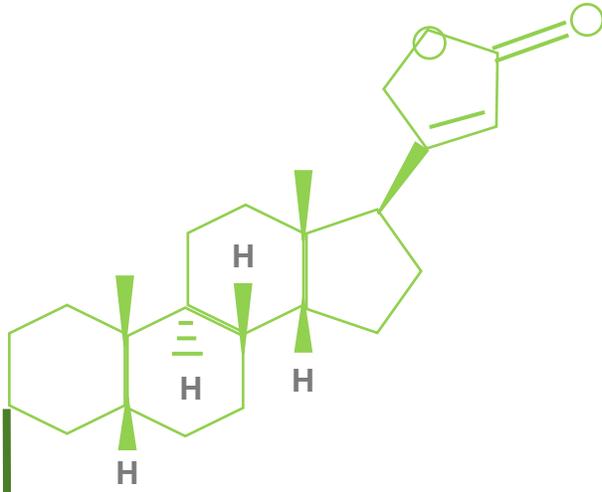
**ABSTRACT**

To date, plants of the genus *Digitalis* are the main economically viable source of cardenolides. These secondary metabolites are the most widely used drugs worldwide in the treatment of heart failure. Also cardenolides have increasing pharmacological interest due to their potential as anticancer agent. Genetic transformation is a promising tool for the development of new biotechnological strategies that propitiate the overproduction of cardiotoxic glycosides. This study describes the genetic transformation of leaves segments of *Digitalis purpurea* L., via *Agrobacterium tumefaciens*, with *Arabidopsis thaliana* L. *vep1* gene. First, the selective agents hygromycin B (15 mg L<sup>-1</sup>) and geneticin (70 mg L<sup>-1</sup>) were compared during the process of callus formation, in order to choose the most effective antibiotic in the selection process. Afterward, the strain of *Agrobacterium* C58C1Rf<sup>R</sup> (pMP90), carrier of the binary vector pAthspA2-vep1, was used to transfer the gene of interest to the foliar segments of *D. purpurea*. The selected explants were transferred to regeneration medium. Successful transformation was confirmed by PCR analyses with *p35S*, *hpt* and *vep1* genes specific primers. The selection with hygromycin B during the process of callus formation of *D. purpurea* is more effective. In addition, transgenic plants of *D. purpurea* containing *vep1* gene were obtained. This is the first report of the genetic transformation of plants of the genus *Digitalis*, with a gene involved in the biosynthesis of cardenolides.

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*, cardenolides, *hpt*, selection marker genes.

## ÍNDICE

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 <i>Digitalis purpurea</i> L. ....	4
2.1.1 Origen, distribución y clasificación taxonómica .....	4
2.1.2 Descripción botánica.....	5
2.1.3 Importancia farmacológica .....	5
2.2 Cardenólidos de <i>Digitalis</i> spp. ....	7
2.2.1 Estructura y biosíntesis de los cardenólidos.....	7
2.2.2 Mecanismo de acción .....	9
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Digitalis</i> spp.....	10
2.3.1 Producción <i>in vitro</i> de cardenólidos.....	12
2.4 Transformación genética en <i>Digitalis</i> spp. ....	14
2.4.1 Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	15
2.4.2 Genes marcadores de selección en <i>Digitalis</i> spp. ....	18
2.5 Genes de interés para la transformación genética en <i>Digitalis purpurea</i> .....	20
Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Comparación de los agentes selectivos higromicina B y geneticina durante el proceso de formación de callos de <i>D. purpurea</i> .....	24
3.2 Transformación de explantes foliares de <i>D. purpurea</i> vía <i>A. tumefaciens</i> .....	26
3.3 Regeneración de plantas transgénicas de <i>D. purpurea</i> con el gen <i>vep1</i> .....	31
Capítulo 4: RESULTADOS .....	34
4.1 Comparación de los agentes selectivos higromicina B y geneticina durante el proceso de formación de callos de <i>D. purpurea</i> .....	34
4.2 Transformación de explantes foliares de <i>D. purpurea</i> vía <i>A. tumefaciens</i> .....	39
4.3 Regeneración de plantas transgénicas de <i>D. purpurea</i> con el gen <i>vep1</i> .....	42
Capítulo 5: DISCUSIÓN.....	45
5.1 Comparación de los agentes selectivos higromicina B y geneticina durante el proceso de formación de callos de <i>D. purpurea</i> .....	45
5.2 Transformación de explantes foliares de <i>D. purpurea</i> vía <i>A. tumefaciens</i> .....	51
5.3 Regeneración de plantas transgénicas de <i>D. purpurea</i> con el gen <i>vep1</i> .....	54
CONCLUSIONES .....	58
RECOMENDACIONES .....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60



● Capítulo 1

● INTRODUCCIÓN



### Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

*Digitalis purpurea* L. ha sido empleada desde la antigüedad como planta medicinal en el tratamiento de enfermedades cardíacas de manera empírica (Verma *et al.*, 2016). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la planta contiene una serie de sustancias cardiotónicas de naturaleza esteroideo-glicosídica conocidas comúnmente como cardenólidos (Melero *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2012).

Los cardenólidos constituyen los medicamentos de uso más frecuente a nivel mundial en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y otras patologías del corazón (Erath *et al.*, 2016). Su importancia como antiarrítmicos es tal, que no han podido ser sustituidos hasta la fecha, al menos en el tratamiento a escala industrial (Gavidia *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2016). Además, tienen interés farmacológico creciente debido a sus potencialidades en la terapia de tumores (Babula *et al.*, 2013). Numerosos estudios han confirmado los efectos antiproliferativos y apoptóticos de estos metabolitos, principalmente de la digoxina y digitoxina en el tratamiento de algunos tipos de carcinomas (Wen *et al.*, 2016). Son ejemplos de ello, el cáncer de mama (Winnicka *et al.*, 2007; Einbond *et al.*, 2010), cáncer de pulmón (Elbaz *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2015), melanoma (Newman *et al.*, 2006), mieloma (Johansson *et al.*, 2001) y cáncer de próstata (McConkey *et al.*, 2000; Leu *et al.*, 2014).

El cultivo de plantas en condiciones naturales es hasta el momento la única fuente comercial para la producción de cardenólidos, pues la síntesis química de estos compuestos no es económicamente viable (Sales *et al.*, 2011). Sin embargo, tanto la producción como el contenido de glucósidos cardiotónicos pueden variar en respuesta a las diferentes estaciones del año y condiciones ambientales (Roca-Pérez *et al.*, 2004). Además, se ha producido una reducción significativa de las poblaciones naturales a causa de una sobreexplotación para satisfacer la demanda cada vez más creciente de las industrias farmacéuticas (Verma *et al.*, 2016).

Por tanto, existe un gran interés en el desarrollo de estrategias para fomentar y potenciar la producción de estos metabolitos mediante técnicas biotecnológicas (Sales *et al.*, 2007; Sales *et al.*, 2011). En este sentido, desde hace décadas se han venido explorando las bondades del cultivo *in vitro* de *Digitalis* spp. Tal es el caso del cultivo de suspensiones celulares (Kreis *et al.*, 1986), cultivos embriogénicos (Lindemann y Luckner, 1997), cultivo de raíces (Yoshimatsu *et al.*, 1990) y cultivo de brotes (Erdei *et al.*, 1981; Hagimori *et al.*, 1983). Además, el cultivo *in vitro* ha brindado una excelente oportunidad para el desarrollo de investigaciones encaminadas al conocimiento bioquímico de las rutas que rigen la

biosíntesis de cardenólidos. Asimismo, ha permitido dilucidar que este proceso se produce solo en tejidos verdes diferenciados de la planta (Stuhlemmer y Kreis, 1996; Gavidia *et al.*, 2007). Sin embargo, los bajos rendimientos de cardenólidos obtenidos en estas investigaciones han impedido su aplicación a escala comercial (Verma *et al.*, 2016). En consecuencia, es necesario buscar otras vías atractivas que potencien la producción de cardenólidos, tales como la transformación genética.

La expresión de uno o varios genes involucrados en la ruta de biosíntesis de los cardenólidos, es una alternativa promisoría para obtener plantas con una productividad elevada (Sato *et al.*, 2007). Se han desarrollado protocolos de transformación en *D. purpurea* mediante *Agrobacterium tumefaciens* L., vía organogénesis directa (Li *et al.*, 2014) e indirecta (Pérez-Alonso *et al.*, 2014b), a partir de discos foliares de plantas cultivadas *in vitro*. En los dos casos se obtuvieron plantas que expresan simultánea y establemente el gen reportero *uidA* y el gen de selección *nptII*. Estos codifican para las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa y neomicina fosfotransferasa II, respectivamente. Sin embargo, Pérez-Alonso *et al.* (2014b) obtuvieron una eficiencia de transformación de 6,92 líneas regeneradas por explante foliar, superior a la alcanzada por Li *et al.* (2014).

Por su parte, los antibióticos propuestos para la selección durante el proceso de formación de callos en *D. purpurea* son la geneticina y la higromicina B. En el caso particular del protocolo descrito por Pérez-Alonso *et al.* (2014b), resultaron plantas no transformadas (escapes) luego del proceso de selección con geneticina. Consecuentemente, es necesario aplicar un esquema de selección más eficiente en el cual se utilice otro agente selectivo de la misma naturaleza, como higromicina B. Este constituye el segundo antibiótico de empleo más frecuente en el proceso de selección de eventos transgénicos, debido en parte a su alta toxicidad para las plantas (Padilla y Burgos, 2010). Investigaciones realizadas por Kairúz *et al.* (2013) permitieron escoger concentraciones mínimas inhibitorias de higromicina B en la formación de callos y la multiplicación de brotes de *D. purpurea*. Este esquema de selección no ha sido aplicado en plantas transformadas y no se ha comparado su eficacia como agente selectivo con la geneticina.

En cuanto a los genes candidatos para la transformación, varios autores apuntan a los genes codificantes de la progesterona  $5\beta$ -reductasa, enzima clave de la ruta de biosíntesis de cardenólidos (Seitz y Gärtner, 1994; Gavidia *et al.*, 2007). Se ha demostrado que uno de los genes codificantes para esta actividad enzimática es el *vep1* (del inglés: *vein patterning 1*) de *Arabidopsis thaliana* L. (Jun *et al.*, 2002). La

transformación de *D. purpurea* con este gen de interés podría ser ventajosa ya que la eficiencia catalítica del producto de este gen es 50 veces mayor que la de su ortólogo en *D. lanata* (Herl *et al.*, 2009; Bauer *et al.*, 2010). En segundo lugar, porque su patrón de expresión en *A. thaliana* se aproxima a la superposición de los patrones de expresión de los genes *p5βr* y *p5βr2* de *D. purpurea* en las mismas condiciones (Izquierdo, 2010). Por último, permitirá desarrollar estudios comparativos a partir de datos de especies modelos como *A. thaliana*, que posibiliten adquirir datos genómicos y de expresión en *D. purpurea*, escasos hasta la fecha (Das y Schäffner, 2016).

En efecto, la obtención de plantas transgénicas de *D. purpurea* que expresen el gen *vep1*, en combinación con otras técnicas como los sistemas de inmersión temporal y/o la elicitación; podrían incrementar los niveles de cardenólidos *in vitro* con una productividad uniforme. De esta manera, se lograrían compensar las necesidades de materia prima (polvo activo) para la elaboración de fármacos en Cuba, donde las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte desde 1970 (ONEI, 2015). Adicionalmente, se sustituiría en gran medida su importación proveniente actualmente de plantas de *Digitalis* de la India.

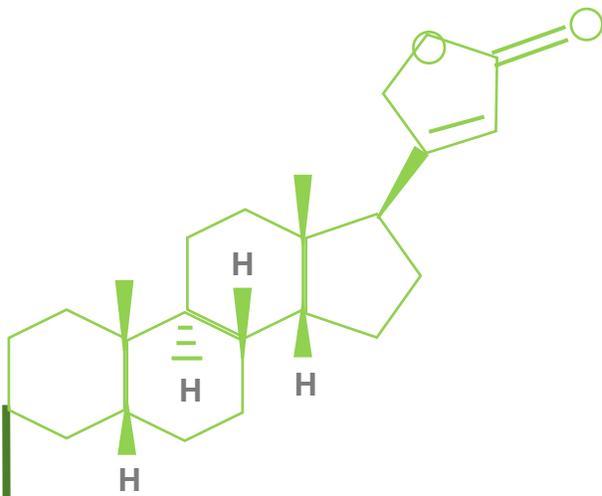
Aunque se han desarrollado dos protocolos para la modificación genética de *D. purpurea*; hasta la fecha no se ha transformado esta especie con un gen de interés. Teniendo en cuenta estos antecedentes se estableció la siguiente hipótesis de trabajo: "Si se transforma genéticamente *D. purpurea* con el gen *vep1* de *A. thaliana* vía *A. tumefaciens* y se realiza la selección con un agente selectivo eficiente, podrían obtenerse plantas transgénicas de *D. purpurea* que contengan este gen."

### OBJETIVO GENERAL

- Obtener plantas transgénicas de *Digitalis purpurea* que contengan el gen *vep1* de *Arabidopsis thaliana*, vía *Agrobacterium tumefaciens*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar los agentes selectivos higromicina B y geneticina durante el proceso de formación de callos de *D. purpurea*.
2. Transformar discos foliares de *D. purpurea* con el gen *vep1* de *A. thaliana*, vía *A. tumefaciens*.
3. Regenerar plantas transgénicas de *D. purpurea* que contengan el gen *vep1* de *A. thaliana*.



● Capítulo 2

● REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



**Capítulo 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

**2.1 *Digitalis purpurea* L.**

**2.1.1 Origen, distribución y clasificación taxonómica**

El género *Digitalis* L. está compuesto por 23 especies vegetales, incluyendo las cuatro especies que forman el género *Isoplexis* (Lindl.) Benth. (Bräuchler *et al.*, 2004; Sales *et al.*, 2011). Una de las especies de mayor relevancia económica y medicinal es *Digitalis purpurea* L. (Sales *et al.*, 2011). La planta es nativa de Europa occidental, el mediterráneo y el noroeste de África (Werner, 1965); aunque se ha naturalizado en otras regiones subtropicales o templadas de Europa, Asia, África, América del Sur, Nueva Zelanda, Canadá y Estados Unidos (Warren, 2005). En estado silvestre se le suele hallar en terraplenes, linderos boscosos o entre los peñascos de las zonas montañosas (Linares, 2015). Debido a sus propiedades medicinales, se ha intentado introducir en Cuba junto a otras especies del género. En nuestro país su crecimiento en condiciones de campo se produce de manera rápida en otoño e invierno; sin embargo, la llegada del verano por lo general ocasiona la muerte de la planta por la ocurrencia de altas temperaturas y abundantes lluvias (Roig, 2012).

La planta es conocida en español con nombres comunes como Dedalera púrpura, Digital o Calzones de zorra. La ubicación taxonómica de *Digitalis purpurea* fue dada a conocer por Carl Linnaeus (Bräuchler *et al.*, 2004). Este género se colocó tradicionalmente en la familia botánica *Scrophulariaceae*, pero la investigación filogenética más reciente la ha colocado en la familia *Plantaginaceae* (Olmstead *et al.*, 2001). Su ubicación taxonómica actual se acepta de la siguiente forma (NCBI, 2017):

**Reino:** *Viridiplantae*

**Phylum:** *Streptophyta*

**División:** *Magnoliophyta*

**Subclase:** *Asteridae*

**Orden:** *Lamiales*

**Familia:** *Plantaginaceae*

**Tribu:** *Digitalideae*

**Género:** *Digitalis*

### 2.1.2 Descripción botánica

*D. purpurea* es una planta bianual o perenne, de hasta 2,5 m de altura. Las hojas son alternas, las basales reunidas en una roseta, pecioladas con limbo ovado-lanceolado y margen dentado. Estas son densamente pilosas principalmente por el envés, mostrando una coloración grisácea. Presenta una invención reticular (reticulódromas) muy saliente por el envés e inflorescencia en un largo racimo terminal (Roig, 2012).

Las flores son pedunculadas y algo péndulas, muy vistosas. El cáliz es pentámero y verde, la corola de 40-55 mm de longitud, en forma de tubo ancho apenas lobulado en la porción distal, de color en el rango desde el púrpura hasta el blanco con manchas oscuras en su interior. Florece entre la primavera y el verano. El fruto es una cápsula que al madurar se abre desprendiendo numerosas semillas de 0,1 a 0,2 mm de diámetro. En el primer año de crecimiento produce únicamente las hojas basales, ovales, dentadas y de peciolo largo mientras que durante el segundo año se desarrolla un tallo largo y cubierto de hojas sésiles y rugosas (Munz y Keck, 1973).

### 2.1.3 Importancia farmacológica

El género *Digitalis*, está representado por un grupo de especies que tienen una larga historia en la fitoterapia, especialmente en el tratamiento de enfermedades del corazón (Frohne y Pfander, 2005). Dentro de ellas sobresalen el infarto de miocardio, disfunciones cardíacas, edema, angina, hipertrofia cardíaca y la hipertensión arterial (Turumtay *et al.*, 2016). Su empleo fitoterapéutico se basa en la presencia de altas concentraciones de glucósidos cardiotónicos (sustancias de naturaleza esteroideo-glucosídica) resultantes del metabolismo secundario (Melero *et al.*, 2000; Kreis y Müller-Uri, 2010).

En particular, *D. purpurea* ha sido empleada desde la antigüedad en el tratamiento de enfermedades cardíacas de manera empírica. Sin embargo, no fue hasta 1785 que William Withering describió las propiedades medicinales de *D. purpurea* en el tratamiento de la hidropesía, enfermedad que en la medicina moderna es reconocida como una consecuencia de la insuficiencia cardíaca (Withering, 1785). En este mismo trabajo también se describían por vez primera los efectos tóxicos derivados de dosis elevadas de preparaciones de la planta. No obstante, no fue hasta 1799 que la acción farmacológica de *D. purpurea* fue relacionada con su efecto sobre el corazón (Ferriar, 1799).

En la actualidad varios cardenólidos, principalmente la digoxina y digitoxina, son utilizados en la terapia cardíaca como antiarrítmicos (Turumtay *et al.*, 2016). La digoxina es

calificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como medicamento esencial y sus principales acciones son: incremento de la fuerza de contracción del miocardio (efecto inotrópico positivo), disminución de la frecuencia cardíaca (cronotropismo negativo), reducción de la velocidad de conducción del corazón (dromotropismo negativo) y vasodilatación al actuar de forma directa sobre el músculo liso vascular (Feussner y Feussner, 2010). Se emplea en las arritmias supraventriculares, aumentando la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (Murphy, 2013). Además, mejora la sintomatología de los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, flúter auricular y taquicardia paroxística supraventricular (Ziff *et al.*, 2015). También, se ha descrito su acción diurética en pacientes que poseen retención de líquidos como resultado de una insuficiencia cardíaca (Rahimtoola, 2004). La digitoxina, por su parte, se utiliza en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y para controlar el ritmo ventricular en la fibrilación auricular crónica (Alfonso *et al.*, 2011). La importancia en la medicina de estos fitofármacos es tal que no han podido ser sustituidos hasta la fecha (Erath *et al.*, 2016).

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se estima que en 2012 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo (OMS, 2015). En Cuba, también constituyen la primera causa de muerte desde 1970 (ONEI, 2015) y afectan la calidad de vida de la población (Richard *et al.*, 2006). La alta incidencia de insuficiencias cardíacas y arritmias supraventriculares en la población constituida por gerontes (10,1% de la población mundial y 13,5% de la población cubana) (NationMaster, 2017), asociado al aumento de la esperanza de vida; conduce a que los cardenólidos sean medicamentos de uso frecuente para el tratamiento de estas enfermedades.

Investigaciones recientes sugieren que los cardenólidos pueden actuar como componentes reguladores de diversos procesos celulares (Wen *et al.*, 2016). Este descubrimiento amplía las aplicaciones terapéuticas de estos compuestos en diversos sectores de interés, como la creación y desarrollo de fármacos para tratar pacientes oncogénicos (Prassas y Diamandis, 2008; Verma *et al.*, 2016). Los resultados de la investigación de Shiratori (1967), constituyen la primera evidencia de la inhibición *in vitro* de la proliferación de células malignas por glucósidos cardiotónicos. A partir de entonces, numerosos estudios han confirmado los efectos antiproliferativos y apoptóticos de estos metabolitos secundarios, principalmente de la digoxina y digitoxina en el tratamiento de algunos tipos de tumores *in vitro* e *in vivo* (Wen *et al.*, 2016). En la Tabla I se relacionan

los diferentes tipos de cardenólidos con actividad demostrada en la inhibición de células cancerígenas en humanos.

**Tabla I.** Efectos de glucósidos cardiotónicos en la inhibición de células cancerígenas. Tomado de Verma *et al.* (2016)

Tipo de Cáncer	Compuestos demostrados	Referencias
Mama	Digitoxina, digoxina, digoxigenina, gitoxina, gitoxigenina	López-Lázaro <i>et al.</i> (2005); Winnicka <i>et al.</i> (2007); Einbond <i>et al.</i> (2010)
Pulmón	Digitoxina, digoxina, Digitoxigenina	Elbaz <i>et al.</i> (2012); Lin <i>et al.</i> (2015)
Colon	Digoxina (modificación del anillo de lactona)	Riganti <i>et al.</i> (2009); Rocha <i>et al.</i> (2014)
Cervical	Digoxina (modificación del anillo de lactona)	Rocha <i>et al.</i> (2014)
Leucemia	Digitoxina	Hallböök <i>et al.</i> (2011)
Melanoma	Digitoxina, digoxina	Newman <i>et al.</i> (2006); López-Lázaro <i>et al.</i> (2005)
Mieloma	Digitoxina, digoxina, digitoxigenina, digitonina	Johansson <i>et al.</i> (2001)
Próstata	Digoxina, digitoxina, digitoxigenina	McConkey <i>et al.</i> (2000); Leu <i>et al.</i> (2014)
Adrenocarcinoma renal	Digoxina, digitoxina, digitoxigenina	López-Lázaro <i>et al.</i> (2005); Nolte <i>et al.</i> (2015)
Páncreas	Digoxina	(Prassas <i>et al.</i> , 2011)

Las diversas aplicaciones farmacológicas de estos metabolitos secundarios acrecientan el interés de producir digoxina y digitoxina (Sales *et al.*, 2011). Hasta la fecha, las plantas del género *Digitalis* son las únicas fuentes económicamente viables para la producción de cardenólidos a escala industrial (Verma *et al.*, 2016), debido a que su complejidad estructural dificulta su síntesis química (Kothari *et al.*, 2010). Sin embargo, tanto la producción como el contenido de glucósidos cardiotónicos pueden variar en respuesta a las diferentes estaciones del año y condiciones ambientales (Roca-Pérez *et al.*, 2004). Por estas razones, es necesario buscar otras alternativas para su obtención en grandes cantidades y de manera uniforme.

### 2.2 Cardenólidos de *Digitalis* spp.

#### 2.2.1 Estructura y biosíntesis de los cardenólidos

Los cardenólidos son moléculas caracterizadas por un núcleo esteroideo (genina o aglicona) que cuenta con un grupo hidroxilo en la posición C14 $\beta$  y un anillo lactónico

insaturado de cinco miembros en la posición C17 $\beta$ . Varias de las demás posiciones de la fracción genina pueden tener además sustituyentes como grupos hidroxilo, formilo o acetilo (Herl *et al.*, 2006a; Verma *et al.*, 2016). A la posición C3 $\beta$  se une una cadena de oligosacáridos típicamente de hasta cinco unidades dentro de las cuales es usual encontrar azúcares poco comunes como la digitoxosa (Piñol *et al.*, 2008; Kreis y Müller-Uri, 2013). Según sus patrones de glicosilación, los cardenólidos se clasifican en primarios, si el azúcar terminal es la glucosa, o secundarios en caso contrario. El núcleo esteroideo tiene la característica peculiar de tener sus cuatro anillos fusionados en la secuencia *cis-trans-cis*, desde el A hasta el D, lo cual les confiere su actividad farmacológica (Melero *et al.*, 2000).

Debido al potencial farmacológico de los cardenólidos, se han hecho consistentes esfuerzos por dilucidar sus rutas de biosíntesis y posterior degradación. Sin embargo, las limitaciones técnicas derivadas de la escasez de datos genómicos de esta especie combinadas con la complejidad de la red metabólica en la que se encuentran inmersos los cardenólidos, ha provocado que el conocimiento de dichas vías metabólicas sea aún incompleto (Pérez-Alonso, 2013).

La biosíntesis de los cardenólidos puede decirse que comienza a partir de la degradación oxidativa de la cadena lateral de los fitoesteroides como el colesterol, campesterol, sitosterol, estigmasterol. El producto de esta reacción es la pregnenolona, el cual es oxidado reversiblemente a pregn-5-eno-3,20-diona por la enzima  $\Delta$ 5-3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (EC 1.1.1.145) (3 $\beta$ -HSD, siglas en inglés). Esta enzima tiene una función en el metabolismo general de los esteroides en células vegetales (Seidel *et al.*, 1990). Este último compuesto se transforma rápidamente en su isómero pregn-4-eno-3,20-diona (progesterona). La próxima reacción de la ruta es la reducción del doble enlace de la progesterona para dar 5 $\beta$ -pregnano-3,20-diona, primer compuesto en el que aparece la conformación 5 $\beta$  característica de los cardenólidos y que por consiguiente se considera el primer paso comprometido absolutamente con la producción de estos compuestos (Gavidia *et al.*, 2007). La reacción es catalizada por la progesterona-5 $\beta$ -reductasa (EC 1.3.1.3), actividad enzimática codificada por al menos dos genes en *D. purpurea*: *p5 $\beta$ r* y *p5 $\beta$ r2*, con patrones de expresión diferentes (Izquierdo, 2010; Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010).

A continuación, la 5 $\beta$ -pregnano-3,20-diona es reducida en su posición C3 a 5 $\beta$ -pregnano-3 $\beta$ -ol-20-ona por la propia 3 $\beta$ -HSD (Finsterbusch *et al.*, 1999). La ruta continúa por derivados de pregnano a partir de las hidroxilaciones en C14 y C20 hasta la condensación

en esta última posición con Acetil-CoA y la formación del anillo lactónico (Kreis *et al.*, 1998). La sucesión de enzimas en esta porción de la ruta, no se encuentra descrita (Pérez-Alonso, 2013).

En general, se asume que la adición de azúcares a la posición C3 se produce luego de la formación de la aglicona, aunque no existen evidencias definitivas acerca de la secuencia relativa de los eventos de glicosilación e hidroxilación. La glicosilación de los glucósidos secundarios a primarios es catalizada por la enzima citosólica y soluble UDP-glucosa: digitoxina 16'-O-glucosiltransferasa (DGT, EC 2.4.1.-) en *Digitalis lanata* (Kreis *et al.*, 1986). Otra enzima relacionada con la biosíntesis tardía de los cardenólidos es la también soluble y citosólica Acetil-CoA: digitoxina 15'-O-acetil transferasa (DAT, EC 2.3.1.-) que cataliza la formación de los lanatósidos a partir de sus precursores no acetilados (Sutor *et al.*, 1990). Este grupo de cardenólidos se denomina de esta forma por ser los más abundantes en *D. lanata* (Izquierdo, 2010).

Kreis y Müller-Uri (2013) realizaron una amplia revisión del estado de conocimiento acerca de la biosíntesis de cardenólidos en el género *Digitalis* (incluyendo *Isoplexis*). Estos autores reflejan que la formación de los cardenólidos no ocurre como un proceso sencillo sino que pueden ser sintetizados a través de una red metabólica muy compleja, donde intervienen enzimas con sustratos altamente inespecíficos. De ahí, que no se encuentre bien dilucidadas las rutas metabólicas que conducen a la síntesis química de los glucósidos cardiotónicos en el género.

### 2.2.2 Mecanismo de acción

En cuanto a su mecanismo de acción, los glucósidos cardiotónicos pueden ser definidos como inhibidores alostéricos de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  presente en la membrana celular cardíaca (Repke *et al.*, 1989; Radzyukevich *et al.*, 2009). La enzima transportadora  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa (E.C. 3.6.1.37) está presente en la membrana de casi todos los tipos de célula del reino animal. Su función es movilizar iones sodio hacia el exterior celular a la vez que transporta iones potasio al interior de la célula con una relación de 3:2, a costa de la hidrólisis de ATP. La bomba mueve ambos iones en contra de su gradiente de concentración, de manera que es la encargada de mantener dicho gradiente, que es responsable de la polarización de la membrana plasmática. Asimismo, es utilizado como fuente de energía para el transporte secundario de otros iones y moléculas necesarias para el funcionamiento celular (Aperia, 2007; Hallberg *et al.*, 2007; Babula *et al.*, 2013).

La inhibición de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  (alrededor del 30% con dosis terapéuticas) provoca un aumento de sodio intracelular, este se intercambia con el calcio que se encuentra fuera de la célula e incrementa sus concentraciones intracelulares (Feussner y Feussner, 2010). Este fenómeno estimula la liberación adicional de calcio del retículo endoplasmático, acrecentando su concentración en el músculo cardíaco y; por consiguiente, originando un aumento en la fuerza de la contracción miocárdica, conocido como efecto cardiotónico (Thomas *et al.*, 1990; Kaplan, 2005; Trenti *et al.*, 2014).

Las dosis elevadas de estos glucósidos provocan la parálisis en cadena de numerosos procesos de transporte secundario que dependen de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , lo cual conduce a la muerte celular y es la base de la toxicidad de estos compuestos (Trenti *et al.*, 2014). De ahí, que la dosis de administración permitida por las organizaciones de salud es de aproximadamente 0,125-0,25 mg/día (Roden, 2001). Este hecho, unido a la ubicuidad de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  en el reino animal, justifica que se haya propuesto como función natural de los cardenólidos repeler herbívoros que traten de alimentarse de las hojas de plantas del género *Digitalis* (Malcolm y Zalucki, 1996; Dobler *et al.*, 2011).

### 2.3 Cultivo *in vitro* de *Digitalis* spp.

La enorme demanda de productos naturales que tiene el mercado internacional le ha concedido gran importancia al cultivo *in vitro* como fuente de metabolitos secundarios y a su vez ha permitido desarrollar nuevas investigaciones en los procesos metabólicos que rigen su producción (Parsaeimehr *et al.*, 2011).

Las principales ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo convencional de plantas para la producción de metabolitos secundarios radican en la posibilidad de controlar las condiciones ambientales; así como obtener un incremento considerable en el rendimiento de los metabolitos específicos (Vanisree y Tsay, 2007). El cultivo *in vitro* brinda la posibilidad de obtener nuevas moléculas que no son producidas por las plantas en su hábitat natural (Oksman-Caldentey y Inze, 2004). Además, es posible reducir los costos e incrementar la productividad; contar con sistemas de producción definidos y establecer sistemas estrictos de control de la calidad del producto (Paek *et al.*, 2005). Asimismo, el proceso de extracción puede ser más simple, rápido y eficiente comparado con la extracción a partir de plantas completas (Karuppusamy, 2009).

Por su importancia en la industria farmacéutica las especies del género *Digitalis* han sido objeto de estudio para su cultivo *in vitro*, casi siempre ligadas a la producción de cardenólidos. Para algunas de estas especies, se han descrito considerables

fluctuaciones de productividad y composición de los componentes activos, así como variaciones morfológicas entre individuos. Estas variaciones son atribuidas al tiempo relativamente corto de cultivo de las especies (a pesar de su extensivo uso a lo largo de la historia); así como a la variación en el número de cromosomas y la formación espontánea de híbridos (Neczypor, 1969). De manera que, en sus inicios, la exploración del cultivo *in vitro* en dicho género tuvo como finalidad la propagación de líneas de elevada productividad y el desarrollo de métodos de producción de cardenólidos a escala industrial. Por ejemplo, Corduan y Spix (1975) desarrollaron un protocolo de regeneración de plantas a partir del cultivo de anteras de *D. purpurea*. En este trabajo se establecían las condiciones para la obtención de callos haploides; además, la regeneración y conversión de plantas diploides y tetraploides.

Los diferentes métodos de cultivo *in vitro* han brindado una excelente oportunidad para incrementar el conocimiento bioquímico de las rutas que rigen la biosíntesis de cardenólidos. Por ejemplo, Furuya *et al.* (1973) propusieron un esquema de biotransformación de la progesterona en *D. purpurea* a partir de plantas germinadas, que evidencia el papel de la enzima 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa en este proceso. Por su parte, Hirotsu y Furuya (1980) desarrollaron numerosos estudios relacionados con la biotransformación de esteroides en cultivos celulares de la especie. Los resultados revelaron que, de los ocho productos biotransformados a partir de la digitoxigenina, solamente era posible aislar tres de ellos para usos futuros: digitoxigenona, epidigitoxigenina y epidigitoxigenina- $\beta$ -D-glucósido. Adicionalmente, habían reportado conversiones de digitoxina en digoxina, gitoxina y otros compuestos por *D. purpurea*. También describieron la conversión de pregnenolona a progesterona y otros esteroides (Hirotsu y Furuya, 1977). Un elemento relevante de los experimentos de ambos autores fue la deducción de que la habilidad de *D. purpurea* para sintetizar cardenólidos, se relaciona estrechamente al proceso de desarrollo de las hojas.

Igualmente, se destacan los trabajos realizados por Hagimori *et al.* (1980) en los cuales se estudiaban el contenido de cardenólidos, principalmente digoxina y digitoxina, durante diferentes etapas del cultivo *in vitro* de *D. purpurea*. Este mismo grupo de investigadores logró desarrollar suspensiones celulares en condiciones de luz y oscuridad (Hagimori *et al.*, 1982b).

Čellárová y Honcariv (1991) demostraron la capacidad morfogenética de *D. purpurea* empleando explantes foliares y cultivo de callos. Seguidamente, Gärtner y Seitz (1993) describieron un protocolo de regeneración para la especie que posibilitó la formación de 7

a 10 plantas por segmento de hoja. Otros trabajos dan cuenta de la restauración del potencial regenerativo de cultivos prolongados de brotes de *D. purpurea*, por acción del ácido giberélico (Chaturvedi y Jain, 1994). Además de los estudios de morfogénesis mencionados, se ha descrito un protocolo completo de regeneración indirecta a partir de explantes foliares (Occeguera, 2008; Pérez-Alonso *et al.*, 2014b).

Para otras especies del género también han sido desarrollados protocolos de regeneración *in vitro*. Pérez-Bermúdez *et al.* (1984) estudiaron la morfogénesis a partir de explantes foliares de *Digitalis obscura*. Una investigación similar desarrollada por Cacho *et al.* (1991) estableció el potencial morfogénético *in vitro* de explantes de hojas, hipocótilos y raíces de *Digitalis thapsi*. En *D. lanata* han sido establecidos protocolos tanto de organogénesis como de embriogénesis somática (Tewes *et al.*, 1982; Dietrich *et al.*, 1986). Mientras que en *D. minor* se han descrito protocolos de regeneración vía organogénesis a partir del tratamiento con reguladores del crecimiento; así como de la inoculación de explantes foliares con *Agrobacterium tumefaciens* (Sales *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Producción *in vitro* de cardenólidos

La producción comercial de glucósidos cardiotónicos en especies de *Digitalis* mediante la agricultura tradicional, ha sido un proceso ineficaz y fuertemente afectado por factores bióticos y abióticos (Sales *et al.*, 2011; Linares, 2015). En consecuencia, el cultivo *in vitro* comenzó a desarrollarse en especies de *Digitalis* desde hace varias décadas, por las ventajas asociadas a sus facilidades de automatización para la producción de cardenólidos (Pérez-Alonso *et al.*, 2016). Sin embargo, dentro de los métodos de producción de biomasa, los intentos de producción mediante cultivos celulares en biorreactores fracasaron (Hagimori *et al.*, 1980; Hagimori *et al.*, 1982b). El estudio de las condiciones necesarias para incrementar la producción de cardenólidos se convirtió, por tanto, en una prioridad.

Varios trabajos describieron la baja productividad de las células indiferenciadas (Hirota y Furuya, 1977; Garve *et al.*, 1980; Hagimori *et al.*, 1980). Los resultados alcanzados por estos autores, conjuntamente con el hecho de que las partes verdes de la planta sean las de mayor producción de cardenólidos (Stuhlemmer y Kreis, 1996); condujeron al estudio del efecto de la luz, la presencia de cloroplastos y la diferenciación celular en la productividad de *D. purpurea* (Hagimori *et al.*, 1982a). Estos investigadores dilucidaron que la organogénesis era el factor primario determinante en la síntesis de cardenólidos; mientras que la luz estimula la biosíntesis una vez que los tejidos productores ya están

formados. Estudios posteriores en *D. lanata* confirmaron estas observaciones al demostrar que durante la síntesis de *novo* de cardenólidos en brotes cultivados en la oscuridad, esta ruta anabólica se incrementaba considerablemente al transferir los brotes a la luz (Eisenbeiß *et al.*, 1999).

En resumen, varios métodos de cultivo *in vitro* de células y tejidos en individuos del género *Digitalis*, han sido descritos para la producción de cardenólidos. Son ejemplos de ellos: cultivo de suspensiones celulares (Kreis *et al.*, 1986), cultivos embriogénicos (Lindemann y Luckner, 1997), cultivo de raíces (Yoshimatzu *et al.*, 1990) y cultivo de brotes (Erdei *et al.*, 1981; Hagimori *et al.*, 1983). Sin embargo, los rendimientos obtenidos en estas investigaciones son significativamente menores que en condiciones de campo; lo cual ha impedido su aplicación a escala comercial (Hagimori *et al.*, 1980; Pérez-Alonso *et al.*, 2016).

En este sentido, han sido ensayadas diversas estrategias biotecnológicas con el objetivo de incrementar la producción de cardenólidos en *Digitalis* spp. Destacan entre estas alternativas: cambios en la composición nutricional y de los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo (Hagimori *et al.*, 1983; Gavidia y Pérez-Bermúdez, 1997; Mohammed *et al.*, 2015), la biotransformación (Alfermann *et al.*, 1985), la adición de precursores y/o elicitores (Hagimori *et al.*, 1982a; Patil *et al.*, 2013; Pérez-Alonso *et al.*, 2014a), el cultivo de células y órganos en sistemas inmersión temporal (Jeong *et al.*, 2006; Pérez-Alonso *et al.*, 2009) y la transformación genética (Sales *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2014). Estas estrategias pueden emplearse independientemente o integrarse para lograr la sobreproducción de cardenólidos en especies de *Digitalis* (Pérez-Alonso *et al.*, 2016).

De todas, la estrategia más viable hasta el momento, es la producción de biomasa de *D. purpurea* a partir de sistemas de inmersión temporal, pues combina las bondades del cultivo *in vitro* y los requerimientos de diferenciación celular necesarios para obtener altos niveles de cardenólidos (Pérez-Alonso *et al.*, 2009). Además, reduce las desventajas de otras técnicas convencionales de propagación vegetativa *in vitro* como: los problemas de asfixia e hiperhidricidad, los daños mecánicos, la complejidad del equipamiento, los costos de producción y la eficiencia de la micropropagación (Berthouly y Etienne, 2005). Del mismo modo, brindan la posibilidad de regular o manipular el ambiente *in vitro*, así como otros parámetros primordiales de cultivo que pueden influir sobre la producción de biomasa y la acumulación de los metabolitos (Wilken *et al.*, 2005).

Actualmente, existe un mayor conocimiento de las herramientas empleadas para la transformación genética, por lo que el número de transformaciones exitosas se ha

incrementado (Shi *et al.*, 2012). En este sentido, en *D. purpurea* se han descrito dos protocolos de modificación genética; sin embargo, hasta la fecha no se ha transformado esta especie con un gen de interés. En el siguiente acápite solo se abordará esta estrategia por ser la de mayor relevancia para la presente investigación.

### 2.4 Transformación genética en *Digitalis* spp.

La ingeniería metabólica permite la manipulación de rutas biosintéticas de interés para modificar los niveles de determinados metabolitos; ya sea por adición de precursores, modificación de condiciones de cultivo o transformación genética (Verpoorte, 2007). Se considera una ciencia en desarrollo y cada vez genera mayor interés en la comunidad científica, debido a la importancia económica (química, farmacéutica y alimenticia) de los metabolitos secundarios. En consecuencia, se han desarrollado las bases de la biología molecular y las técnicas de la ingeniería genética con el objetivo de incrementar la cantidad y calidad de estos compuestos (Li y Vederas, 2009; Wang *et al.*, 2011).

Respecto a la biosíntesis de cardenólidos, la adición de precursores como la progesterona al medio de cultivo produce un aumento significativo de la biosíntesis (Hagimori *et al.*, 1982b), pero su alto costo hace esta estrategia inviable en la práctica. Como resultado, la transformación genética con un gen involucrado en la biosíntesis de este precursor o su canalización hacia la ruta de biosíntesis de los cardenólidos aparece como una alternativa promisoriosa para obtener plantas con una productividad elevada (Izquierdo *et al.*, 2010).

No es menos cierto, que la transformación genética es una técnica de mejoramiento con amplias potencialidades de uso en la ingeniería metabólica. Ha sido aplicada con diversos objetivos que incluyen la obtención de resistencia a plagas y enfermedades, la expresión de proteínas foráneas de interés farmacológico, estudios funcionales, entre otros. Su aplicación en cultivos que producen metabolitos secundarios, puede estar encaminada al silenciamiento de genes involucrados en rutas que comparten los mismos precursores; o al aumento de su producción a partir de la sobreexpresión de proteínas claves en la ruta biosintética que los origina (Capell y Christou, 2004; Giuliano *et al.*, 2008). Esta última, se considera la opción más viable para el caso de la Digital, en consecuencia con los estudios realizados acerca de las enzimas involucradas en la síntesis del núcleo esteroide de los cardenólidos y la selección de genes candidatos para la transformación (Izquierdo *et al.*, 2010; Kreis y Müller-Uri, 2013).

Como ventaja adicional, este enfoque permitiría, en combinación con otras técnicas tales como la producción en sistemas de inmersión temporal y/o la elicitación; propagar

masivamente plantas transformadas con una productividad más uniforme que la registrada en condiciones naturales (Pérez-Alonso *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta el momento existen solo unos pocos antecedentes de transformación genética en *Digitalis* y solamente dos protocolos exitosos para la producción de plantas transgénicas en *D. purpurea* (Verma *et al.*, 2016).

Para el desarrollo de una estrategia para la obtención de plantas genéticamente modificadas que produzcan cantidades mayores de algún compuesto de interés, es necesario establecer varias condiciones. En primer lugar, un sistema de regeneración que permita obtener plantas a partir de una o pocas células. Un protocolo que posibilite la transferencia del ADN foráneo a las células vegetales, unido a un sistema de selección eficiente para identificar las células que contienen el o los transgenes. Por último, se precisa de un gen candidato para el carácter que se quiere modificar (Izquierdo *et al.*, 2010).

Por su parte, el empleo de genes reporteros es una forma de selección visual, que permite bajo determinada condición o ensayo sencillo, observar su presencia por expresión de alguna característica fenotípica o actividad enzimática (Miki y McHugh, 2004). Dentro de los más utilizados se encuentra el gen *uidA*, también conocido por *gusA*. El gen *uidA* codifica para la subunidad A de la  $\beta$ -glucuronidasa; enzima que actúa sobre el sustrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónico (X-Gluc) formando un producto azul fácilmente visible (Jefferson *et al.*, 1987b). Los métodos de selección fenotípica son muy útiles ya que constituyen un primer y rápido tamizaje de las plantas regeneradas. Sin embargo, es necesario además verificar la inserción de la construcción transgénica en el genoma hospedero. La técnica más utilizada para esto es la amplificación de los transgenes basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) sobre ADN extraído de la planta transformada (Gachet *et al.*, 1998). Otras técnicas, que además permiten saber el número de copias insertadas, son la hibridación del ADN por Southern y el PCR cuantitativo (Anand *et al.*, 2003).

### **2.4.1 Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

La transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* L., es el método más usado para la introducción de genes foráneos en células vegetales (Deo *et al.*, 2010). Este sistema satisface requerimientos básicos para la aplicación comercial como son: obtener una mayor eficiencia de transformación, mayor control de la expresión de genes y una integración más precisa del transgén (Komari *et al.*, 2004). No obstante, la principal limitante radica en la necesidad de transformar un gran número de explantes con

el objetivo de obtener plantas transgénicas que satisfagan los criterios comerciales (Pérez-Alonso, 2013).

La eficiencia de la transformación de tejidos vegetales por *A. tumefaciens* depende en gran medida de una serie de factores (Kumar *et al.*, 2011). Uno de los más importantes es la virulencia de la cepa bacteriana utilizada. De manera general existen cepas con virulencia baja, moderada o alta (Hellen *et al.*, 2000). Varios autores refieren las ventajas de cepas altamente virulentas en cuanto a la eficiencia de la transformación (Komari *et al.*, 2004). Otro factor estudiado y muy relacionado con la virulencia de la cepa es la adición de acetosiringona al medio de co-cultivo. Esta sustancia de naturaleza fenólica induce la expresión de los genes *vir*, los que codifican la mayor parte de las proteínas necesarias para el procesamiento, transporte y entrada al núcleo vegetal del ADN plasmídico (Rogowsky *et al.*, 1987).

Los primeros trabajos sostenidos de transformación en el género *Digitalis* se realizaron en la especie *Digitalis minor*. En un primer intento, Sales *et al.* (2002) describieron la regeneración eficiente de la planta a partir de explantes de hojas inoculadas con la cepa 82.139 de *A. tumefaciens*. Durante el proceso de inoculación, el transgén reportero *uidA* fue detectado en los tumores inducidos por la bacteria. Sin embargo, ni los brotes y raíces regenerados, ni las plantas obtenidas resultaron transformadas.

Posteriormente, este mismo grupo de investigadores publicó un sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* en la especie; pero esta vez, utilizando las cepas EHA105 y AGL1 que contenían el transgén reportero *uidA* y genes marcadores de selección. Los explantes de partida utilizados fueron discos de hojas de plantas cultivadas *in vitro*, empleando acetosiringona como estimulante de la virulencia bacteriana en la fase de co-cultivo (Sales *et al.*, 2003). Dicho sistema de transformación fue empleado para obtener plantas de *D. minor* que sobreexpresaban el dominio catalítico de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa de *Arabidopsis thaliana*. Algunas de las líneas obtenidas presentaron un mayor contenido de cardenólicos (hasta un 40%) tanto *in vitro* como en condiciones de invernadero. Sin embargo, los efectos pleiotrópicos de esta enzima sobre el metabolismo esteroideo ponen en duda su aplicabilidad en la transformación de otras especies del género (Sales *et al.*, 2007).

En cuanto a *D. purpurea*, Saito *et al.* (1990) lograron la transferencia de ADN foráneo al genoma de la especie a través de la transformación de discos foliares con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* y obtuvieron raíces transgénicas. Estos autores no aplicaron selección durante este periodo y solo después de formadas la raíces las transfirieron a un

medio de cultivo selectivo con kanamicina, lo que trajo como consecuencia que solo siete clones expresaran los genes introducidos. Además, no lograron regenerar plantas completas. Basados en estas experiencias se desarrolló un protocolo para la regeneración de *D. purpurea* a partir de explantes foliares de plantas cultivadas *in vitro* (Occeguera, 2008).

Consecutivamente, se han elaborado dos protocolos de transformación en *D. purpurea* mediante *A. tumefaciens*, vía organogénesis directa (Li *et al.*, 2014) e indirecta (Pérez-Alonso *et al.*, 2014b), a partir de explantes foliares de plantas cultivadas *in vitro*. El primer protocolo, empleó las cepas GV2260 y GV3101 de *A. tumefaciens* transformadas con el plásmido pBI12; mientras que el segundo, evaluó las cepas EHA105 y C58C1RifR (pMP90) de dicha bacteria transformadas con pTJK136. Los vectores binarios utilizados en ambos casos contienen el gen de selección *nptII* y el gen reportero *uidA*.

Los análisis moleculares realizados en estas investigaciones, permitieron comprobar la obtención de plantas que expresan simultánea y establemente los genes *uidA* y *nptII*, que codifican para las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa y neomicina fosfotransferasa II, respectivamente. Este último, posibilita que las células vegetales transgénicas sean resistentes a antibióticos aminoglucósidos como neomicina, kanamicina (Kn) y geneticina (G-418) (Padilla y Burgos, 2010). Por lo cual se pueden emplear dichos antibióticos como agentes selectivos durante el proceso de formación de callos (Bevan *et al.*, 1983). En cuanto a la evaluación visual del producto de catálisis de la  $\beta$ -glucuronidasa, este ensayo permitió a Pérez-Alonso *et al.* (2014b) analizar la expresión transitoria y estable de la enzima y comparar ambas cepas. Como resultado, la cepa C58C1RifR (pMP90) fue seleccionada como más eficiente para la transformación, debido a la significativa superioridad en la regeneración de los explantes transformados (518 líneas transgénicas), en comparación con la cepa EHA105 (24 líneas).

Además, Li *et al.* (2014) alcanzaron una eficiencia de transformación de 0,62 brotes resistentes/explante con la cepa GV3101 y utilizaron como agente selectivo kanamicina (100 mg L<sup>-1</sup>). Estos autores no especifican en su trabajo, si ocurrieron o no escapes del proceso de selección. Por su parte, Pérez-Alonso *et al.* (2014b) utilizan G-418 (70 mg L<sup>-1</sup>) para la selección de transformantes, con una eficiencia de 6,92 líneas por explante foliar inicial para las plantas transformadas con la cepa C58C1RifR (pMP90). Sin embargo, estos últimos autores obtuvieron líneas que no contenían ambos genes, lo que se corresponde a escapes durante el proceso de selección con G-418.

En consecuencia, Verma *et al.* (2016) analizan la eficiencia de ambos protocolos y proponen su empleo para estudios de ingeniería metabólica con el objetivo de dilucidar las rutas de biosíntesis de cardenólidos y potenciar genotipos mejorados de *D. purpurea* sobreproductores de estos metabolitos. En la presente investigación, se empleará el protocolo descrito por Pérez-Alonso *et al.* (2014b) durante el cual se puede desarrollar el proceso de selección en la fase de formación de callos; razón que reduce la aparición de escapes luego del evento selectivo.

### 2.4.2 Genes marcadores de selección en *Digitalis* spp.

En los sistemas de transformación un paso crítico es la selección de células, tejidos y plantas transformados, pues incluso en los sistemas más eficientes, solo una pequeña cantidad de células es transformada (Rosellini, 2011). Por lo tanto, se hace imprescindible la identificación de las células transformadas de las no transformadas utilizando sistemas de selección. Hasta el momento, la mayoría de los sistemas de selección se basan en la adición de antibióticos o herbicidas a los medios de cultivo y la transferencia a las células vegetales de genes marcadores de selección (GMS) que confieren resistencia a estos (Miki y McHugh, 2004).

Los GMS pueden clasificarse en positivos o negativos. Los positivos son empleados en las transformaciones genéticas pues permiten el crecimiento y desarrollo del tejido transformado. Sin embargo, los negativos son útiles en investigaciones básicas y aplicadas, pues confieren una desventaja selectiva a las células que lo expresan al causar su muerte. También, pueden ser clasificados en condicional o no, si la selección requiere la presencia/ausencia de sustratos externos (Miki y McHugh, 2004). De ellos, los más comúnmente empleados son positivos y condicionales, puesto que permiten el crecimiento de los tejidos transformados con la condición de que existan antibióticos, herbicidas u otros compuestos normalmente tóxicos para las plantas (Padilla y Burgos, 2010).

Por su parte, Rosellini (2012) publica un listado donde relaciona los GMS descritos hasta la fecha y los concentra en dos grandes grupos atendiendo al tipo de selección (positiva o negativa) en la cual se emplean. Adicionalmente, incorpora una nueva clasificación en dependencia del nivel al que confieren resistencia. De ahí, que los GMS primarios se usan para la selección celular durante la fase de formación de callos y regeneración; mientras que los GMS secundarios confieren la resistencia a nivel tisular pero no a nivel

celular. Por esta razón, el empleo de estos últimos no es recomendable para la obtención de plantas transgénicas.

Dentro de los siete tipos de GMS positivos, los de uso más frecuente en los vectores de transformación son los de tipo I, correspondiente a aquellos genes que actúan a través de la detoxificación química de fitotoxinas. El gen *nptII* (o *neo*) es el más universal de los GMS pues se encuentra referido en aproximadamente 1100 artículos científicos; incluso la mayoría de las plantas transgénicas existentes en el mercado contiene este gen (Rosellini, 2012). El *nptII* codifica para la neomicina fosfotransferasa II, enzima que confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos tales como kanamicina, neomicina, paromomicina y geneticina (Fralely *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983; Padilla y Burgos, 2010). Por su parte, el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hpt*), es otro de los GMS más populares y ha sido mencionado en más de 490 investigaciones registradas en la *Web of Science* (Rosellini, 2012). Este gen confiere resistencia a higromicina B, un aminoglucósido tóxico a la célula vegetal debido a que inhibe la síntesis proteica (Blochlinger y Diggelmann, 1984; Miki y McHugh, 2004).

La determinación de la concentración mínima inhibitoria del agente selectivo hace más efectivo el sistema de transformación (Sreeramanan *et al.*, 2006; Deo *et al.*, 2010). En este sentido, Chong-Pérez *et al.* (2008) determinaron la concentración mínima inhibitoria de G418 durante el proceso de formación de callos de *D. purpurea* ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) y fue aplicada en un protocolo de transformación de la especie (Izquierdo, 2010). Sin embargo, se obtuvieron plantas que no contenían ninguno de los transgenes, por lo que constituían escapes del proceso de selección. Estas evidencias experimentales demostraron la necesidad de modificar este proceso, por lo que posteriormente Pérez-Alonso *et al.* (2014b) comprobaron que la concentración mínima inhibitoria de G418 durante el proceso de formación de callos era de  $70 \text{ mg L}^{-1}$ .

Otras investigaciones como la realizada por Kairúz *et al.* (2013) en esta misma especie; permitieron seleccionar concentraciones mínimas letales de higromicina B en la formación de callos ( $12 \text{ mg L}^{-1}$ ) y la multiplicación de brotes ( $75 \text{ mg L}^{-1}$ ). El esquema de selección propuesto por estos autores se recomienda para futuros trabajos de transformación genética en *D. purpurea*.

Aunque la mayoría de los GMS empleados son seguros para la salud humana y al medio ambiente y han sido aprobados por agencias regulatorias (Ferradini *et al.*, 2011), una parte importante del público se opone al uso generalizado de los genes de resistencia a herbicidas y antibióticos (Ramessar *et al.*, 2007). Por tal razón, se han desarrollado

diversas estrategias (co-transformación, transposición, recombinación homóloga y recombinación sitio-específica) con el objetivo de eliminar estos genes marcadores del genoma de la planta, luego del proceso de selección (Upadhyaya *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

### 2.5 Genes de interés para la transformación genética en *Digitalis purpurea*

La selección de genes candidatos para la transformación genética no es una tarea fácil. El análisis de la siempre creciente cantidad de datos biológicos generados en la actualidad ha revelado una relación compleja entre los diferentes *loci* y los caracteres fenotípicos, de manera que varios *loci* pueden tener diferentes grados de influencia en cada carácter (Mcmullen *et al.*, 1998). Esta realidad ha impulsado el desarrollo de enfoques que abarcan diferentes fuentes de datos para resolver el problema, como la búsqueda de genes candidatos para la caracterización de *loci* con influencia fenotípica cuantitativa (QTL, del inglés: *quantitative trait loci*) (Pflieger *et al.*, 2001). Este tipo de enfoques, sin embargo, requieren de un volumen de datos genómicos y/o fenotípicos con los que no se cuenta por el momento para las especies de *Digitalis* en relación con su producción de cardenólidos. La selección del candidato óptimo para obtener plantas transformadas altamente productivas debe basarse, por lo tanto, en la información existente sobre los pocos genes conocidos que influyen en las rutas de biosíntesis y degradación de estos metabolitos (Izquierdo *et al.*, 2010).

El paso clave de la ruta de biosíntesis de cardenólidos es la reducción esteroespecífica del doble enlace  $\Delta^{4,5}$  de la progesterona, resultando el primer compuesto en el que aparece la conformación  $5\beta$  característica de estos metabolitos (Gavidia *et al.*, 2007). La reacción es catalizada por la progesterona- $5\beta$ -reductasa (P5 $\beta$ R); enzima que ha sido aislada y caracterizada en *D. purpurea* (Gärtner *et al.*, 1994). Por lo que, en principio, un gen codificante para esta enzima sería el candidato más promisorio a sobreexpresar en la especie para aumentar su productividad. Sin embargo, la existencia de al menos dos isoformas de este gen con funciones presuntamente diferentes genera dudas sobre los efectos que su sobreexpresión podría traer.

Varios estudios han clonado genes que codifican para esta actividad enzimática en diferentes especies de *Digitalis* y se han expresado funcionalmente en *Escherichia coli* (Herl *et al.*, 2006b; Herl *et al.*, 2006a; Gavidia *et al.*, 2007; Herl *et al.*, 2008). Conformemente, se determinó que la actividad P5 $\beta$ R está codificada por al menos dos genes (*p5 $\beta$ r* y *p5 $\beta$ r2*) en *D. purpurea*; elemento que reafirma la complejidad del contexto

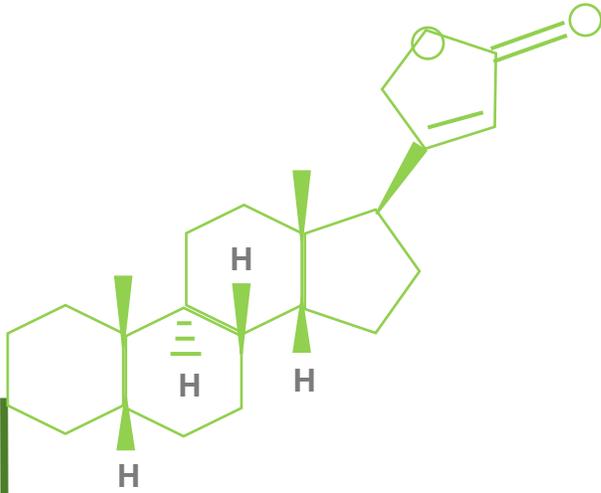
de la ruta de los cardenólidos. Estos dos genes tienen patrones de expresión diferentes: *p5βr* aparece como constitutivo ante diversas condiciones de estrés, mientras que *p5βr2* presenta una expresión basal mínima, y es altamente inducido por etileno y peróxido de hidrógeno. Además, la expresión de *p5βr2* está directamente correlacionada con los niveles de cardenólidos, a diferencia de *p5βr* (Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010). En consecuencia, estos autores proponen que *p5βr* pudiera tener otras funciones fisiológicas mientras que *p5βr2* sería el responsable de la producción de glucósidos cardiotónicos. Por otro lado, la comparación de los parámetros cinéticos del producto génico de *p5βr* (Gavidia *et al.*, 2007) y *p5βr2* (Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010), indicó que el primero exhibe una especificidad más alta hacia el NADPH y la progesterona que *p5βr2*.

En este sentido, resulta atractiva la transformación de *D. purpurea* con uno de los genes codificantes para la P5βR. Aunque se requieren estudios funcionales de estos genes para determinar bajo qué señales regulatorias debe ubicarse el transgén y qué efectos sobre la viabilidad de la planta podría traer su sobreexpresión (Izquierdo *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se ha descrito la función del gen *vep1* en *A. thaliana*, ortólogo de esta pareja de genes en *D. purpurea*. Según Jun *et al.* (2002) está involucrado con la diferenciación vascular debido al fenotipo anormal mostrado por una línea mutante de este gen (locus At4g24220); de ahí que sea denominado *vep1* (del inglés *Vein patterning 1*). Posteriormente, Herl *et al.* (2009) demostraron que *vep1* también codifica una proteína con actividad P5βR, la cual muestra aproximadamente un 70% de similitud con la secuencia aminoacídica de la P5βR presente en *D. lanata*. Es posible, por lo tanto, que alguno de los dos ortólogos de *Digitalis* (*p5βr* y *p5βr2*) tenga también influencia en la morfogénesis u otro proceso fisiológico, y su sobreexpresión pueda traer consigo alguna alteración fisiológica no deseable. Esta hipótesis es, además, sustentada por el hecho de que estos dos genes tienen patrones de expresión diferentes. Las razones antes mencionadas, ponen en tela de juicio el argumento de que la reducción 5β de la progesterona es una reacción absolutamente comprometida con la síntesis de glucósidos cardiotónicos (Izquierdo *et al.*, 2010).

Existen evidencias científicas que señalan al gen *vep1* como el candidato a seleccionar para la transformación de *D. purpurea* con el objetivo de maximizar la producción de cardenólidos. En principio, porque la eficiencia catalítica del producto del gen *vep1* (actividad específica/Km) es 50 veces mayor que la de la *p5βr* de *D. lanata* (Herl *et al.*, 2009; Bauer *et al.*, 2010). En segundo lugar, porque el patrón de expresión de *vep1* en *A. thaliana* se aproxima a la superposición de los patrones de expresión de la pareja de

genes ortólogos de *D. purpurea* en las mismas condiciones (Izquierdo, 2010). Por último, los estudios comparativos a partir de datos de otras especies modelo como *A. thaliana*, aparecen como una alternativa viable para estudiar las diferencias funcionales entre estos, dada la escasez de datos genómicos y de expresión en *D. purpurea* (Das y Schöffner, 2016).



● Capítulo 3

● MATERIALES Y MÉTODOS



### Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biología Molecular y Mejora genética II del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; en el período comprendido desde septiembre de 2016 hasta marzo del 2018.

#### Procedimientos generales del cultivo *in vitro*

Los instrumentos utilizados para la manipulación aséptica del material vegetal fueron esterilizados en estufa a una temperatura de 180 °C durante dos horas antes de cada sesión de trabajo. Dichos instrumentos se mantuvieron en estas condiciones mediante el uso de un esterilizador eléctrico con microesferas de cuarzo. Todas las operaciones de disección y transferencias de los explantes se realizaron en cabina de flujo laminar vertical. Los medios y frascos de cultivo se esterilizaron en autoclave vertical a 121 °C y 1,2 kg cm<sup>-1</sup> de presión durante 20 min.

#### Medios de cultivo

Para el desarrollo de los experimentos, se empleó como medio de cultivo basal la siguiente formulación: 4,3 g de sales minerales del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS), con 4,0 mg L<sup>-1</sup> de hidrocloreuro de tiamina; 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol; 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 3,0 g L<sup>-1</sup> de Gelrite® (Duchefa, Haarlem, Países bajos) como agente gelificante. Antes de la esterilización en autoclave, el pH de los medios de cultivo a emplear en cada etapa de la transformación fue ajustado según su finalidad. En cada acápite se aclararán las modificaciones realizadas al medio de cultivo basal.

Por su parte, la formación de callos fue inducida en medio de cultivo semisólido de formación de callos (medio de cultivo basal con 4,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), en lo adelante medio de cultivo de formación de callos (MFC). A partir de segmentos de hojas de 1,0 cm<sup>2</sup> de área, obtenidos de plantas cultivadas *in vitro* después del cuarto subcultivo y, colocados con la superficie adaxial en el medio de cultivo semisólido.

#### Material vegetal

En esta investigación se utilizó como material vegetal plantas *in vitro* obtenidas a partir de semillas de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold (Fig. 1). Las semillas fueron adquiridas en la empresa Pharmasaat GmbH (Alemania). Estas fueron desinfectadas

según el protocolo propuesto por (Erdei *et al.*, 1981). Las semillas fueron germinadas y cultivadas *in vitro* en medio de cultivo semisólido siguiendo la metodología descrita por Pérez-Alonso *et al.* (2009).



**Figura 1.** Semillas (A) y plantas (B) de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold

### 3.1 Comparación de los agentes selectivos higromicina B y geneticina durante el proceso de formación de callos de *D. purpurea*

Para comparar los agentes selectivos higromicina B y geneticina durante la formación de callos, se diseccionaron segmentos foliares de plantas cultivadas *in vitro*. Posteriormente, una muestra de estos explantes fueron inoculados con las cepas C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pCAMBIA1301) y C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pAthspA2-vep1) de *Agrobacterium tumefaciens* como se describe en el acápite 3.2. El empleo del vector binario pCAMBIA1301 permitió comprobar las condiciones de transformación, mediante la determinación de la expresión transitoria y estable de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Por su parte, la inoculación de explantes con el vector binario pAthspA2-vep1 fue utilizado para comprobar la funcionalidad de este plásmido en *D. purpurea*.

El resto de los explantes no fue inoculado con la bacteria y se emplearon como controles del experimento. Adicionalmente, se tomaron explantes foliares procedentes de cuatro líneas transformadas anteriormente con el vector pAthspA. Este vector posee en su estructura los genes marcadores de selección *nptII* y *hpt*, codificantes para las enzimas neomicina fosfotransferasa II e higromicina fosfotransferasa, respectivamente (Chong-Pérez *et al.*, 2012). Dichas líneas fueron analizadas fenotípicamente en estudios anteriores, y todos los explantes fueron capaces de formar callos en presencia de geneticina e higromicina B. Además, se confirmó la presencia de ambos genes marcadores de selección mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como describe Pérez-Alonso *et al.* (2014b), en el material vegetal empleado en este estudio.

### Capítulo 3: Materiales y Métodos

Los segmentos foliares procedentes tanto de plantas germinadas *in vitro* como de líneas transformadas, fueron colocados con la superficie adaxial en MFC en estado semisólido. A este medio de cultivo se le adicionó 200 mg L<sup>-1</sup> de timentina en el caso de los tratamientos inoculados con *Agrobacterium* para eliminar remanentes de la bacteria. El experimento fue desarrollado en microplacas de cultivo celular *Thermo Scientific*<sup>TM</sup> (España, 930186) que poseen 24 pocillos con un volumen total de 1,0 mL y un área de cultivo de 1,9 cm<sup>2</sup>. Todo el proceso de formación de callos se efectuó en condiciones de oscuridad total y a 27±2°C de temperatura durante seis semanas; con subcultivos a medio de cultivo fresco cada 15 días. Los tratamientos considerados para cumplir el objetivo se describen en la Tabla II. El tamaño de la muestra para cada tratamiento fue de 24 explantes foliares.

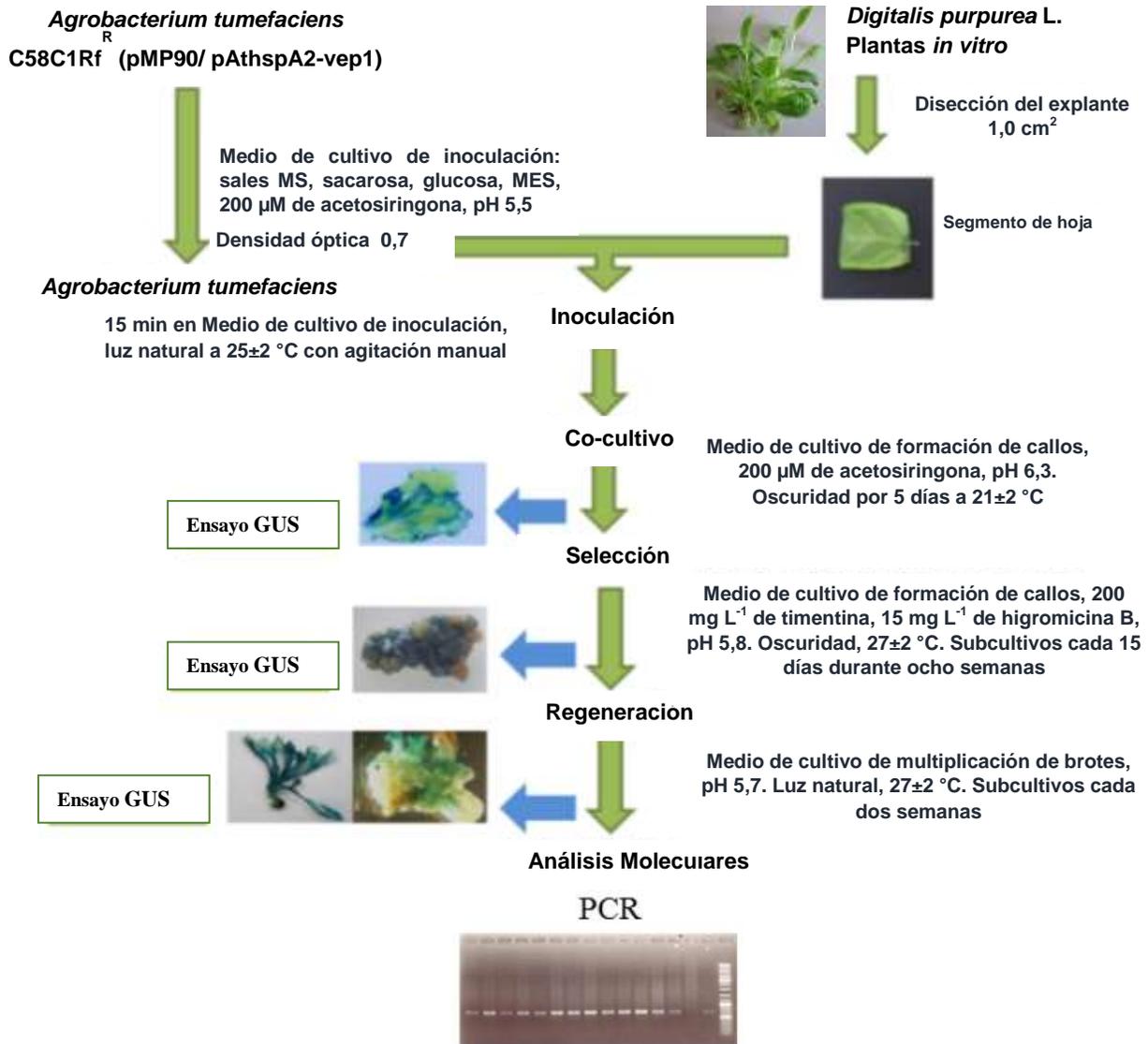
**Tabla II.** Tratamientos diseñados para comparar los agentes selectivos higromicina B y geneticina.

No.	Origen del explante	Concentración del agente selectivo
1	Plantas germinadas no inoculadas	Sin antibióticos
2	Plantas germinadas no inoculadas	70 mg L <sup>-1</sup> de geneticina
3	Plantas germinadas no inoculadas	15 mg L <sup>-1</sup> de higromicina B
4	Líneas transformadas con pAthspA	Sin antibióticos
5	Líneas transformadas con pAthspA	70 mg L <sup>-1</sup> de geneticina
6	Líneas transformadas con pAthspA	15 mg L <sup>-1</sup> de higromicina B
7	Explantes transformados con pCAMBIA 1301	15 mg L <sup>-1</sup> de higromicina B
8	Explantes transformados con pAthspA2-vep1	15 mg L <sup>-1</sup> de higromicina B

Se evaluó el efecto de los antibióticos higromicina B y geneticina en la formación de callos a los 15, 30 y 45 días de iniciado el experimento, mediante la toma de fotografías con una cámara digital CANON. Se determinó el área del explante (cm<sup>2</sup>) con formación de callos empleando el programa *Image-Pro Plus* versión 6.0. Se definió la velocidad de crecimiento de los callos en 30 días como la diferencia de las áreas de los mismos a los 45 y 15 días ( $A_{45}-A_{15}$ ). Para la confección de gráficos y el análisis estadístico de los datos experimentales se empleó el programa *STATISTICA* versión 12.0 para Sistema Operativo *Windows*. Se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Se utilizaron las pruebas estadísticas Tablas de contingencia 2x2, U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis y comparación de medias *a posteriori*, todas para una significación de 0,05.

### 3.2 Transformación de explantes foliares de *D. purpurea* vía *A. tumefaciens*

Para dar cumplimiento a este objetivo se seleccionó el protocolo de transformación genética de *D. purpurea* vía organogénesis indirecta propuesto por Pérez-Alonso *et al.* (2014b). A modo de resumen, se muestra en la figura 2 el protocolo seleccionado con las modificaciones realizadas en la presente investigación.



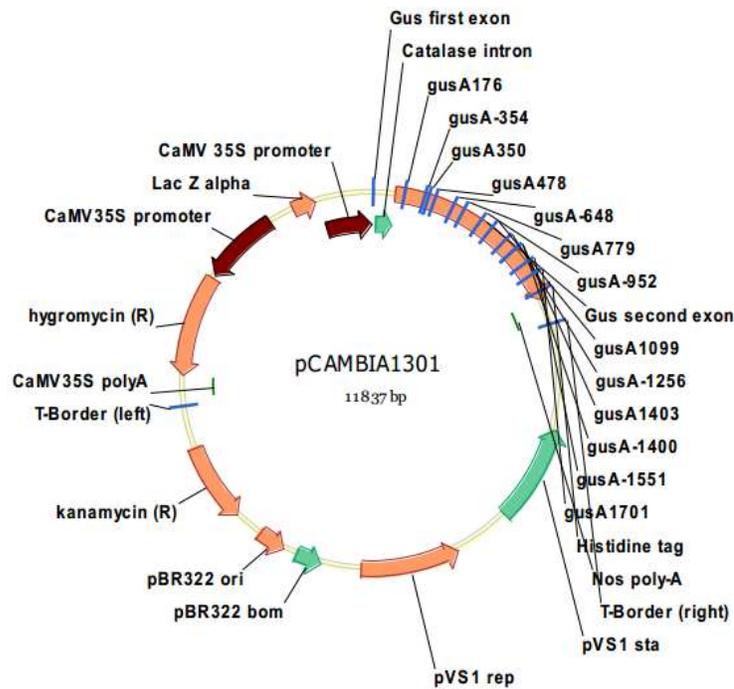
**Figura 2.** Protocolo para la transformación genética de *Digitalis purpurea* L. mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, empleando como vector de transformación pAthspA2-vep1. Tomado de Pérez-Alonso *et al.* (2014b) con modificaciones.

### Cepas bacterianas y plásmidos empleados

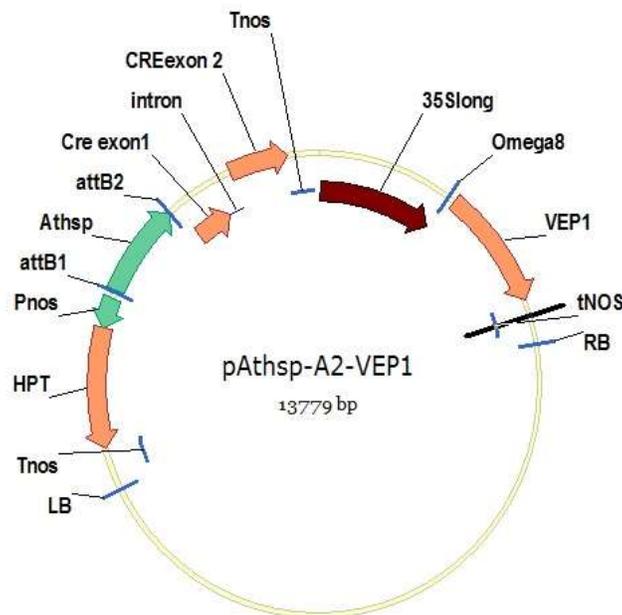
Se empleó la cepa de *A. tumefaciens* C58C1Rf<sup>R</sup>, con el plásmido auxiliar pMP90 (Koncz y Schell, 1986). Se introdujeron indistintamente los plásmidos pCAMBIA1301 (CAMBIA, Camberra, Australia) y pAthspA2-vep1 como vectores de transformación. La cepa de *A. tumefaciens* C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90) fue transformada con los vectores de transformación antes mencionados. La transformación de explantes foliares se realizó a partir de células competentes preparadas según la metodología propuesta por Höfgen y Willmitzer (1988). A 500 µL de cultivo de células competentes se añadirán 100 µL de agua y 10 µL del plásmido (1 µg). Luego de homogenizar con cuidado se sometió la mezcla a la siguiente secuencia de choques térmicos: 5 min en hielo, 5 min en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) y 5 min a 37 °C. Este procedimiento se realizó por duplicado. El cultivo se dejó enfriar durante 10 min en hielo, se añadió 1,0 mL de medio de cultivo Luria- Bertani (LB, 10 g L<sup>-1</sup> de triptona; 5,0 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura; 10 g L<sup>-1</sup> de cloruro de sodio (NaCl)) y se incubó a 28 °C por 4 h. Posteriormente, 400 µL del cultivo se inocularon en placas de Petri con medio de cultivo semisólido LB con kanamicina y rifampicina ambas a 50 mg L<sup>-1</sup>. Se incubaron a 28 °C durante 16 a 48 horas y se seleccionaron las colonias aisladas al azar para chequear la transformación mediante el aislamiento de ADN plasmídico y la digestión con enzimas de restricción.

El vector binario pCAMBIA1301 (Fig. 3) posee resistencia a kanamicina (Kn<sup>R</sup>), contiene el gen *hpt* codificante para la higromicina fosfotransferasa (E.C 2.7.1.119) bajo el control del promotor y terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S). Adicionalmente, posee el gen de la β-glucuronidasa de *Escherichia coli* (*uidA*) con el intrón *st-ls1* de la papa (*Solanum tuberosum* L.) lo cual permite que este gen se exprese sólo en células eucariotas. Además, el gen reportero *uidA* se encuentra bajo el control del promotor CaMV 35S y el terminador de la nopalina sintetasa (*nos*).

El vector binario pAthspA2-vep1 (Fig. 4) de 13 779 pb también Kn<sup>R</sup>, contiene un sistema de escisión sitio específico Cre/*lox*; el cual a su vez posee en uno de sus sitios *lox* el gen marcador de selección *hpt* bajo el control del promotor y el terminador de la nopalina sintetasa (*nos*). Esta región de recombinación sitio-especifica Cre/*lox* puede ser activada mediante golpe térmico. Adicionalmente, presenta el gen de interés en la transformación (*vep1*) bajo el control del promotor fuerte y constitutivo CaMV 35S, el terminador del gen *nos* y el potenciador de la traducción omega 8.



**Figura 3.** Vector de transformación pCAMBIA 1301. *hpt*: gen de la higromicina fosfotransferasa; *Gus*: gen reportero *uidA* que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli*; CaMV 35S: promotor del virus del mosaico de la coliflor; *tnos*: terminador y señales de poliadenilación de la nopalina sintetasa; *gusint*: intrón *caster bean catalase*. LB y RB: bordes izquierdo y derecho, respectivamente, del ADN-T.



**Figura 4.** Vector de transformación pAthspA2-vep1. LB y RB: bordes izquierdo y derecho, respectivamente, del ADN-T; *Tnos*: terminador y señales de poliadenilación de la nopalina sintetasa; *hpt*: gen de la higromicina fosfotransferasa; *vep1*: gen codificante de la enzima P5 $\beta$ R de *Arabidopsis thaliana*; 35S: promotor del gen *vep1*.

### Inoculación y Co-cultivo

Antes de la transformación, se aisló una colonia de cada cepa de *A. tumefaciens* crecida en medio de cultivo semisólido LB con 50 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina y kanamicina. Cada colonia se inoculó en 3,0 mL de medio de cultivo LB líquido con los mismos antibióticos. Los pre-cultivos se incubaron por 16 h a 28 °C. Posteriormente se inocularon 100 µL del pre-cultivo crecido por separado en 50 mL de medio de cultivo líquido YEP (10 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura; 10 g L<sup>-1</sup> de bactopectona; 5,0 g L<sup>-1</sup> de NaCl; pH 7,0) con 50 mg L<sup>-1</sup> de kanamicina y se mantuvieron toda la noche en agitador orbital *Shaker Incubator* (FLY-111B) a 150 rpm. Después de 16 h, las células fueron colectadas por centrifugación a 3000 g a 4 °C por 10 min y el precipitado se resuspendió en medio de cultivo de inoculación (sales MS al 100%; 2% de sacarosa (m/v); 1,98 g L<sup>-1</sup> de D(+)-glucosa; 3,9 g L<sup>-1</sup> de ácido 2-[N-morfolino]etano sulfónico (MES); 200 µM de acetosiringona; pH 5,5) hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0,7.

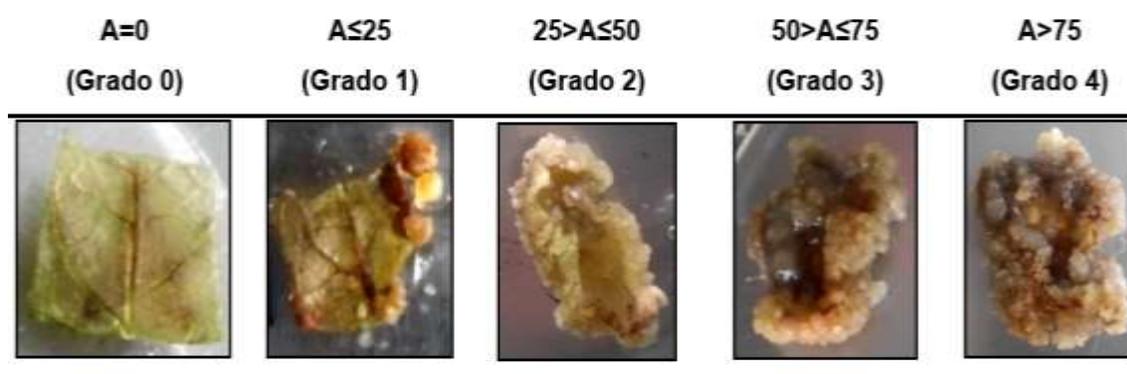
A partir de las plantas cultivadas *in vitro* se diseccionaron los segmentos de hojas de aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup> de área. Fueron inoculados 25 y 125 segmentos foliares con las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pC1301) y C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pAthspA2-vep1), respectivamente. La inoculación se produjo en tubos falcon de 50 mL que contenían 25 mL de medio de inoculación y 15 µL de acetosiringona. En cada tubo falcon se sumergieron 25 explantes por tratamiento. A continuación, los explantes sumergidos en medio de inoculación se mantuvieron durante 15 min con agitación manual y posteriormente se secaron por contacto con papel de filtro (Waltman®) estéril. Posteriormente, estos explantes se transfirieron a placas de Petri de 9 mm con medio de co-cultivo (medio de cultivo basal con 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); 200 µM de acetosiringona y pH 6,3). Todas las placas fueron selladas con Parafilm® y colocadas en la oscuridad por cinco días a 21±2 °C.

### Selección de plantas transformadas de *D. purpurea*

Los explantes co-cultivados fueron lavados tres veces en MFC líquido con 200 mg L<sup>-1</sup> de timentina, a fin de disminuir los remanentes de la bacteria. Luego fueron secados por contacto con papel de filtro estéril. Posteriormente, los explantes se colocaron en placas de Petri con la superficie adaxial en MFC semisólido con 200 mg L<sup>-1</sup> de timentina y 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina B como agente selectivo. Se situaron cinco explantes por placa de Petri y el experimento fue replicado. Se mantuvo en medio de cultivo selectivo en condiciones

de oscuridad a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C durante ocho semanas, con subcultivos a medio de cultivo fresco cada 15 días.

Los tratamientos considerados durante el proceso de selección fueron: explantes transformados con pCAMBIA1301 y con pAthspA2-vep1 en MFC con  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de higromicina B, segmentos foliares no inoculados sin antibiótico (Control positivo) y segmentos foliares no inoculados con  $15 \text{ mg L}^{-1}$  higromicina B (Control negativo). La formación de callos se evaluó a la cuarta semana de iniciada la fase de selección, teniendo en cuenta: número de explantes que formaron callos y por ciento del explante con formación de callos. Esta última evaluación se realizó de manera cualitativa, empleando la escala descriptiva de grados propuesta por Kairúz *et al.* (2013) como se muestra en la figura 5. Consecuentemente se distribuyeron rangos del 0-4, desde la no formación de callos en el explante (grado 0), hasta el 100 % de la superficie del explante con proliferación de callos (grado 4). Además, se tuvieron en cuenta características



morfológicas de los callos favorables para la regeneración como fueron la constitución y la coloración.

**Figura 5.** Escala descriptiva empleada para evaluar el efecto de concentraciones variables de higromicina B, sobre discos foliares de *Digitalis purpurea* en medio de cultivo semisólido de formación de callos. Tomado de Kairúz *et al.* (2013).

#### **Observación histoquímica del producto de expresión de la $\beta$ -glucuronidasa (Ensayo GUS)**

A partir del ensayo histoquímico GUS (Jefferson *et al.*, 1987a) se observó la actividad de la enzima  $\beta$ - glucuronidasa en los fragmentos de hojas transformados con el vector pCAMBIA1301, en diferentes momentos del protocolo luego del proceso de co-cultivo. Los tejidos analizados fueron colocados a  $37$  °C en una solución tampón que contenía  $1,0$  mM de la sal de ciclohexilamonio del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónico (sustrato de la enzima; comercialmente X-Gluc, Duchefa, Haarlem, Países bajos),  $100$  mM de

$\text{Na}_3\text{PO}_4$  (pH 7,0); 0,5 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_4$  y 0,1% (v/v) de Tritón X-100. Simultáneamente se sometieron al mismo tratamiento explantes no transformados que fueron usados como control negativo.

Posterior a la incubación todas las muestras fueron sumergidos en etanol al 70% (v/v) durante 2 h para eliminar las clorofilas y otros pigmentos foliares. El análisis del ensayo se realizó por evaluación visual y fotográfica al estereoscopio óptico marca NOVEL, aumento 10x. La expresión transitoria y estable del gen reportero *uidA* se determinó de forma cualitativa, clasificándose como positiva si se observa alguna porción del tejido teñido de azul. Este tipo de análisis molecular permitió comprobar la inserción del gen *uidA* de forma rápida y detectable; así como demostrar la eficiencia de las condiciones de transformación en sus diferentes etapas.

### 3.3 Regeneración de plantas transgénicas de *D. purpurea* con el gen *vep1*

Para la regeneración los callos seleccionados con higromicina B, fueron fragmentados y transferidos a medio de cultivo basal al cual se le adicionó 0,5  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético (AIA), 4,4  $\mu\text{M}$  de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y pH 5,7 (en lo adelante medio de cultivo de multiplicación de brotes, MMb) (Pérez-Alonso *et al.*, 2014b). Los cultivos fueron incubados en cámara de crecimiento con luz natural y temperatura controlada de  $27 \pm 2$  °C. Se realizaron subcultivos cada dos semanas en frascos con 30 mL de MMb fresco (Pérez-Alonso *et al.*, 2009). Las plantas regeneradas, cada una de las cuales fue considerada una línea, fueron mantenidas en MMb. En esta fase del estudio se evaluó el número de líneas regeneradas por explante inoculado, valor que representa la eficiencia de transformación del protocolo desarrollado.

#### Extracción de ADN genómico vegetal

Fragmentos de tejidos de las líneas regeneradas, obtenidos a partir de los explantes inoculados con la cepa C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pAthspA2-vep1) de *Agrobacterium*, fueron sometidos a la extracción de ADN genómico. La metodología de extracción de ADN descrita a continuación se basó en el protocolo propuesto por Khayat *et al.* (2004) con algunas modificaciones.

Se tomaron 100 mg de tejido vegetal de plantas cultivadas *in vitro* y se maceraron con nitrógeno líquido en tubos eppendorf (2,0 mL) hasta obtener un polvo fino. Se adicionó 1 mL de buffer de extracción [4% (m/v) CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio); 10 mM Tris-HCl/pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA (ácido etilén-diamino-tetracético); 2% (m/v)

PVP 10 000; 10 mM mercaptoetanol] y se homogenizó empleando el agitador tipo MISTRAL® (LAB-LINE INSTRUMENTS, 1190-1CE) durante unos segundos. Las muestras fueron colocadas a 55 °C durante 30 min y posteriormente centrifugadas (Eppendorf, Alemania, Lot: 5415D) a 5 000 rpm y 4 °C, durante 5 min. Se colectó el sobrenadante y se le adicionó RNAsa (200 µg mL<sup>-1</sup> de concentración final) por 15 min a 37 °C. El extracto fue mezclado con igual volumen de cloroformo y luego centrifugado en iguales condiciones. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionó igual volumen de 2-isopropanol frío. Las muestras se mantuvieron toda la noche a -20 °C y posteriormente se centrifugaron a 11 000 rpm y 4 °C, durante 15 min. El precipitado resultante se lavó con 500 µL de etanol 70% (v/v), se centrifugó según las condiciones anteriormente mencionadas y fue secado en campana por 15 min. El precipitado se resuspendió en 30 µL de agua desionizada. Luego de obtenido el ADN genómico, su integridad fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y como criterio de pureza se determinaron las razones de absorbancia a 260/230 nm y 260/280 nm y la concentración mediante un espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemania).

#### **Análisis mediante Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las líneas regeneradas**

La presencia de los transgenes en las plantas regeneradas fue comprobada por PCR empleando ADN genómico extraído de las mismas. Como control positivo de las reacciones de PCR se utilizó ADN plasmídico extraído a partir de las cepa DH5α-pAthspA2-vep1. En el caso del control negativo se utilizó ADN de plantas sin transformar. En el control de contaminación se sustituyó el ADN por un volumen equivalente de agua desionizada.

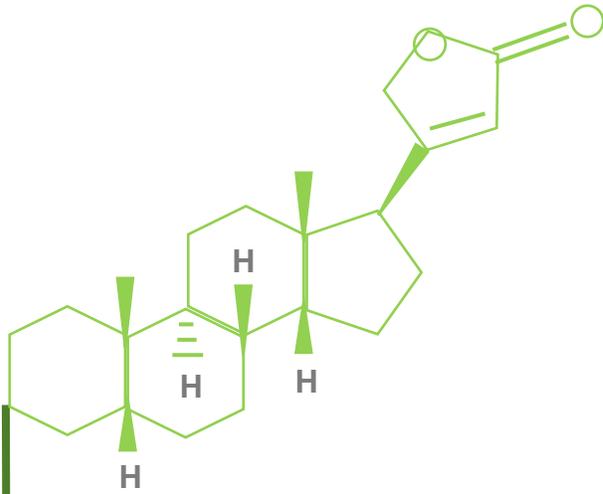
Se realizaron reacciones de PCR para amplificar fragmentos de los genes presentes en el vector de transformación: *hpt*, *vep1* y el promotor fuerte y constitutivo 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (*p35S*). La secuencia de reacciones y de los cebadores empleados para la amplificación de los transgenes mediante PCR, se describen en la Tabla III.

La amplificación fue efectuada en un volumen de reacción final de 20 µL, que contenía 100 ng de ADN genómico; 0,4 µM de cada cebador; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada desoxirribonucleótido; 0,25 unidades de Top Taq ADN polimerasa (QUIAGEN, Alemania) y tampón de reacción de esta enzima (QUIAGEN, Alemania). Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en el equipo de control térmico programable *Mastercycler* (Eppendorf, Alemania).

**Tabla III.** Cebadores y programa utilizados en la detección por PCR de los transgenes. Las secuencias están escritas en el sentido 5' a 3' (leído de izquierda a derecha).

	<i>vep1</i>	<i>hpt</i>	<i>p35S</i>
<b>Talla del Amplicón (pb)</b>	1 200	713	1305
<b>Cebador</b>	GGA-ATT-CTC-AAG-	GAC-GTC-TGT-CGA-	GAG-GAA-GGG-TCT-
<b>Reverso</b>	GTA-CGA-TCT	GAA-GTT-TCT	TGC-GAA-GGA-TAG-TG
<b>Cebador Directo</b>	CGG-ATC-CAT-GAG-TTG-GTG-GTG	GTC-TGC-TGC-TCG-ATA-CAA-GCC	GAC-TCT-AGC-CCA-ATC-CCA-CA
<b>Programa</b>	I. 94 °C, 3'	I. 94 °C, 3'	I. 94 °C, 3'
	II. 94 °C, 30"	II. 94 °C, 30"	II. 94 °C, 30"
	III. 65 °C, 30"	III. 58 °C, 30"	III. 58 °C, 30"
	IV. 72 °C, 90"	IV. 72 °C, 80'	IV. 72 °C, 90"
	V. 72 °C, 10'	V. 72 °C, 10'	V. 72 °C, 10'
	VI. 4 °C, ∞	VI. 4 °C, ∞	VI. 4 °C, ∞

Los productos de la reacción fueron analizados visualmente mediante electroforesis con *EZ vision ONE* (6x, Biotechnology Lot: 3567CO72) a 100 V durante 1 h en gel de agarosa al 1% (p/v) con tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x (0,09 M Tris-borato, 0,002 M EDTA, pH 8). Como marcador de peso molecular se usó el *Mass Ruler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, Alemania). Luego se observó en un transiluminador *Gel Imaging Analysis System* (WD-9413A, China) mediante la incidencia de luz ultravioleta (UV).



## ● Capítulo 4

# ● RESULTADOS



**Capítulo 4: RESULTADOS****4.1 Comparación de los agentes selectivos higromicina B y geneticina durante el proceso de formación de callos de *D. purpurea***

Para comparar los agentes selectivos higromicina B y geneticina durante la formación de callos, se colocaron fragmentos foliares de plantas de *D. purpurea* en medio de cultivo semisólido de formación de callos (MFC) con 70 mg L<sup>-1</sup> de geneticina o 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina B, como se explica en el acápite 3.1. El experimento se efectuó en condiciones de oscuridad total a 27±2°C de temperatura durante poco más de seis semanas, con subcultivos cada 15 días. Se determinó el área del explante (cm<sup>2</sup>) donde se produjo formación de callos previo a cada subcultivo, a los 15, 30 y 45 días de iniciado el experimento.

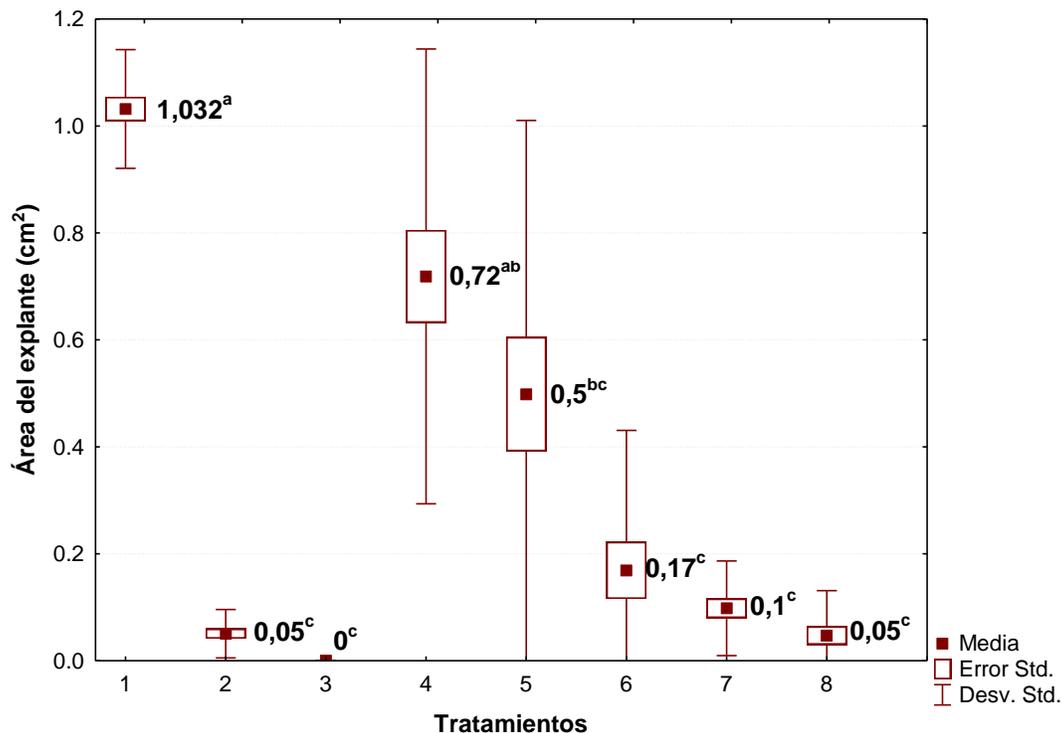
Luego de transcurridos 15 días de cultivo en las condiciones antes descritas, todos los tratamientos presentaron formación de callos en al menos siete explantes, excepto el tratamiento 3 (Tabla IV). Al comparar los ocho tratamientos, en cuanto al número de segmentos foliares sobre los que se produjo formación de callos, no se encontraron diferencias significativas entre los explantes sin presión de selección (tratamiento 1), las líneas transformadas con y sin agente selectivo (tratamientos 4, 5, 6) y las transformadas con el vector pCAMBIA1301 (tratamiento 7). Contrario a los resultados esperados, tampoco fue posible establecer diferencias con el tratamiento 2 (segmentos foliares procedentes de plantas no transformadas), lo cual implica que las concentraciones de geneticina no fueron suficientes para producir la inhibición de la formación de callos en todos los explantes. El crecimiento de callos en los segmentos foliares transformados con el vector pAthspA2-vep1, fue significativamente inferior con respecto a los tratamientos restantes. Solo fue posible inhibir totalmente la formación de callos en los tejidos no transformados en presencia de higromicina B.

La determinación del área del explante con formación de callos, permitió realizar un análisis cuantitativo de las diferencias de cada tratamiento (Fig. 6). Los valores medios de área más elevados se manifestaron en los explantes cultivados sin presión de selección (tratamientos 1 y 4). No se encontraron diferencias significativas entre las líneas transgénicas seleccionadas con geneticina o higromicina B (tratamientos 5 y 6). Mientras que los restantes tratamientos no tuvieron diferencias significativas entre ellos.

**Tabla IV.** Número de segmentos foliares con formación de callos por tratamiento, luego de 15 días en medio de cultivo semisólido de formación de callos.

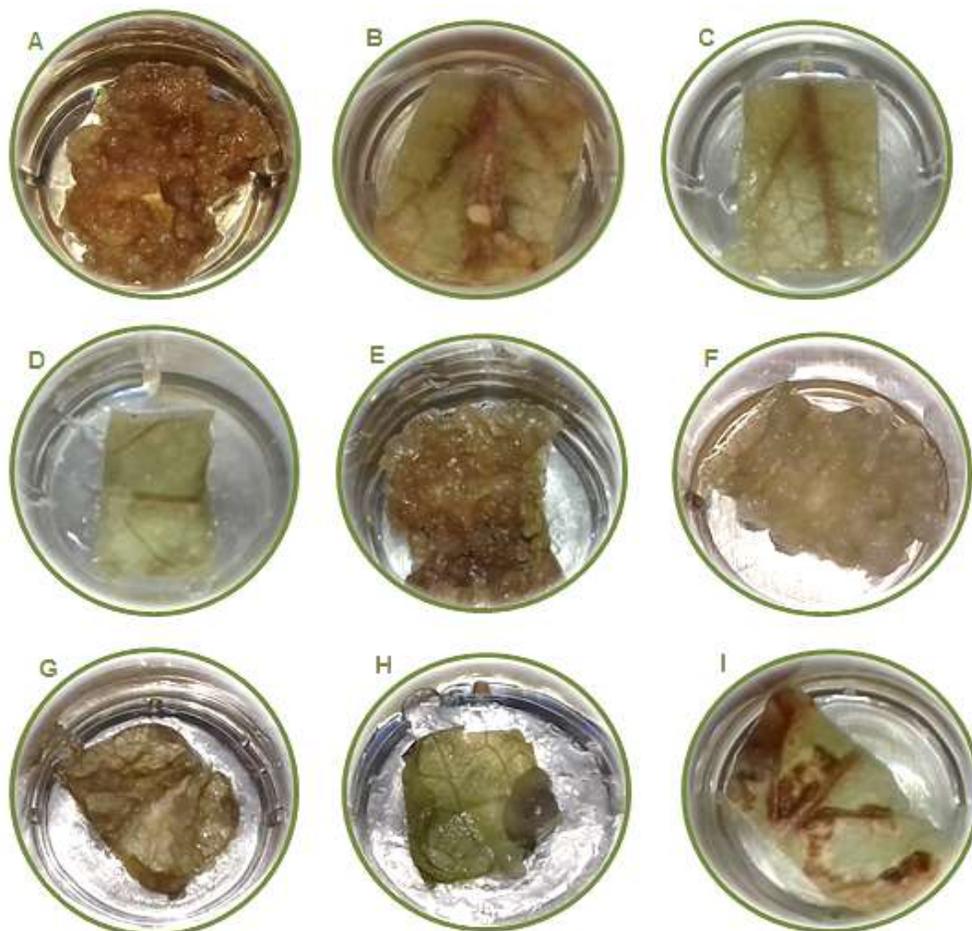
No.	Origen del explante	Antibiótico empleado en la selección	No. explantes que formaron callos*
1	Discos foliares de plantas germinadas no inoculadas	Sin antibiótico	24 <sup>a</sup>
2	Discos foliares de plantas germinadas no inoculadas	70 mg L <sup>-1</sup> de geneticina	17 <sup>a</sup>
3	Discos foliares de plantas germinadas no inoculadas	15 mg L <sup>-1</sup> de higromicina B	0 <sup>c</sup>
4	Discos foliares de líneas transgénicas transformadas con pAthspA	Sin antibiótico	22 <sup>a</sup>
5	Discos foliares de líneas transgénicas transformadas con pAthspA	70 mg L <sup>-1</sup> de geneticina	12 <sup>a</sup>
6	Discos foliares de líneas transgénicas transformadas con pAthspA	15 mg L <sup>-1</sup> de higromicina B	10 <sup>a</sup>
7	Discos foliares transformados con pCAMBIA 1301	15 mg L <sup>-1</sup> de higromicina B	17 <sup>a</sup>
8	Discos foliares transformados con pAthspA2-vep1	15 mg L <sup>-1</sup> de higromicina B	7 <sup>b</sup>

\*Valores con letras no comunes difieren estadísticamente según las Tablas de contingencia de 2x2



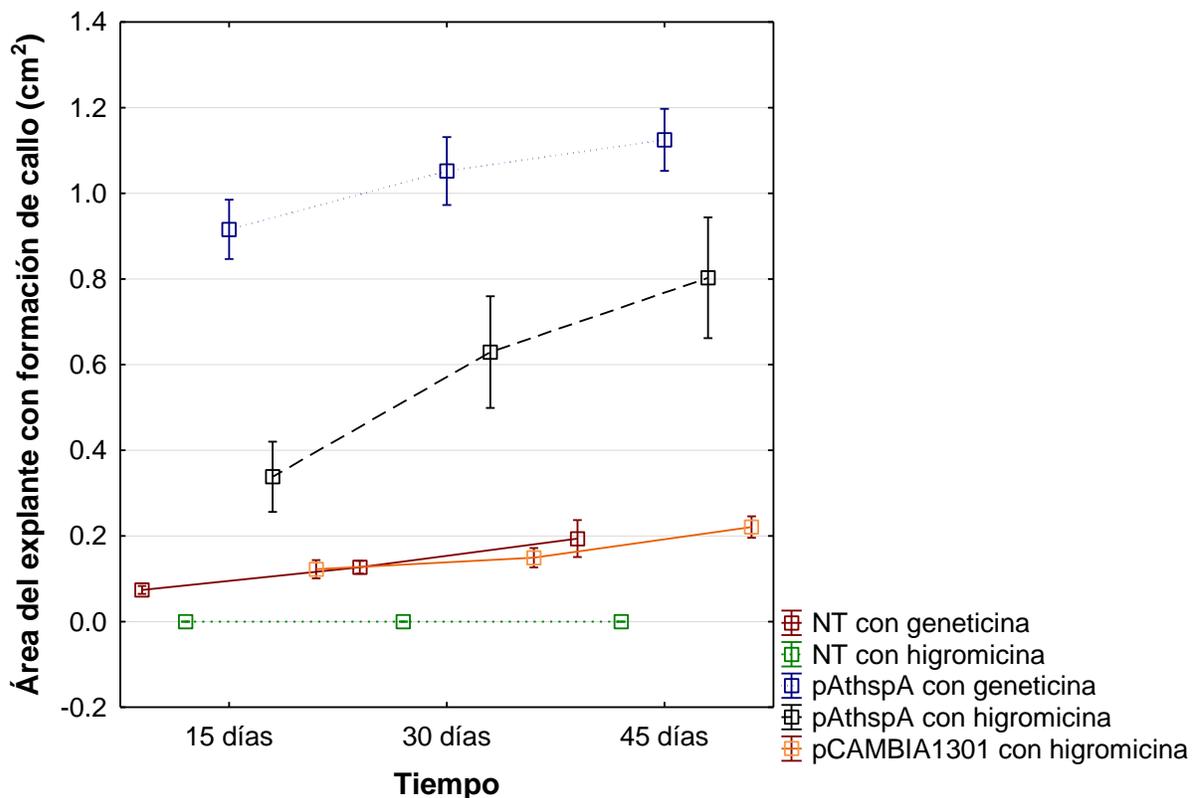
**Figura 6.** Área del explante (cm<sup>2</sup>) con formación de callos luego de 15 días en medio de cultivo semisólido con 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina B (3, 6, 7, 8), con 70 mg L<sup>-1</sup> de geneticina (2, 5) o sin presión de selección (1 y 4). Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para p<0.05 según la prueba de Kruskal-Wallis y comparación de medias a *posteriori*.

Consecuentemente, los callos de los tratamientos 1 y 4 cubrían entre un 75-100% del área del explante (Fig. 7A y E). En los segmentos foliares procedentes de plantas no inoculadas expuestos a la selección con geneticina, fue posible observar pequeños callos en los bordes o las nervaduras, o la ausencia total de estos (Fig. 7B y C). A diferencia de los controles negativos seleccionados con higromicina B (Fig. 7D), en los cuales no se produjo formación de callo en ninguno de los segmentos. Las líneas transgénicas tuvieron la capacidad de crecer selectivamente en presencia de ambos agentes selectivos (Fig. 7F y G). La diferenciación del tejido transformado con las cepas C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pCAMBIA1301) y C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pAthspA2-vep1) empleando higromicina B, dio origen a callos aislados o en pequeños grupos (Fig. 7 H e I). Además, la formación de callos con el vector que contiene el gen *vep1*, fue menor en área y cantidad de callos.



**Figura 7.** Segmentos foliares de *Digitalis purpurea* L. luego de 15 días en medio de cultivo semisólido de formación de callos con geneticina 70 mg L<sup>-1</sup> e higromicina 15 mg L<sup>-1</sup>, según los tratamientos. **A:** plantas no transformadas (NT) sin selección, **B** y **C:** plantas NT con geneticina con presencia y ausencia de callos, respectivamente, **D:** plantas NT con higromicina B. **E, F** y **G:** líneas transgénicas sin selección, con geneticina o higromicina B, respectivamente. **H** e **I:** explantes con higromicina B transformados con los vectores pCAMBIA1301 o pAthspA2-vep1, respectivamente.

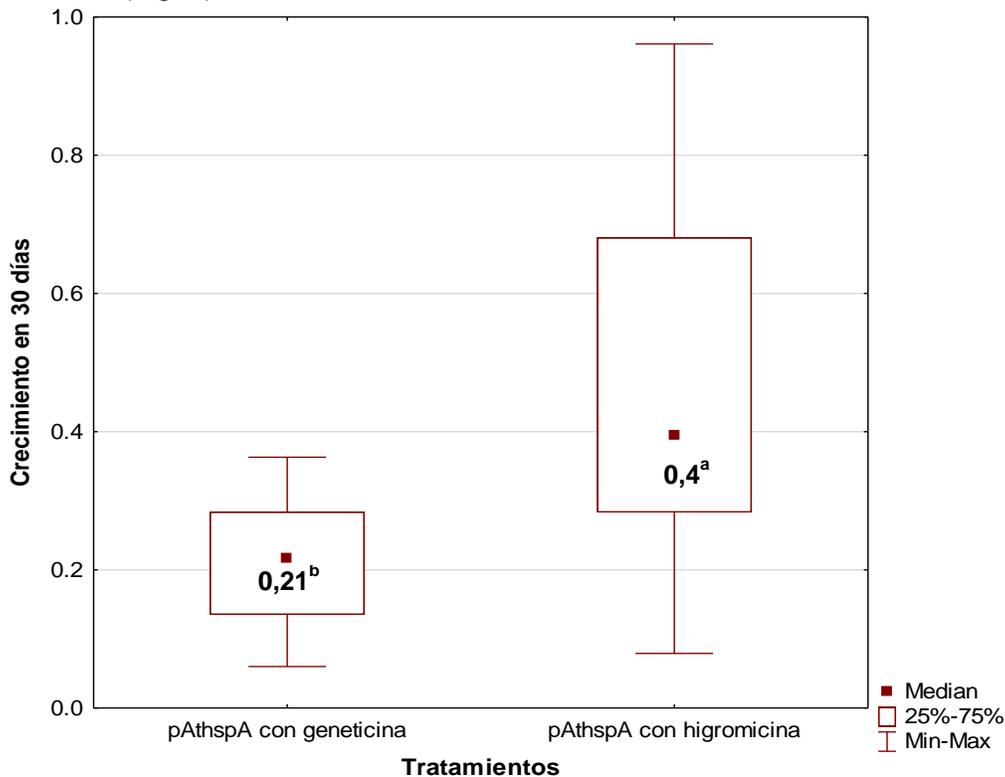
Mediante la determinación del área del segmento foliar con proliferación de callos a los 15, 30 y 45 días en MFC, fue posible representar en la Figura 8 el crecimiento asociado a la multiplicación de los mismos en medio de cultivo selectivo. Los explantes procedentes de plantas no transformadas en selección con higromicina B (tratamiento 3), se mantuvieron sin formación de callos durante todos los subcultivos en los que se produjeron las evaluaciones. Esto confirma el efecto fitotóxico de la higromicina B sobre los segmentos foliares de *D. purpurea*. Mientras que en los segmentos procedentes de plantas no transformadas en selección con geneticina, se produjo un crecimiento del área foliar con callos de forma prácticamente constante. Esto implica que, a pesar de mantener la selección durante varios subcultivos, la concentración de geneticina utilizada no fue suficiente para inhibir la formación de callos. Este resultado es similar al obtenido en los explantes transformados con el vector pCAMBIA1301, durante la selección con higromicina B. Aunque en este último tratamiento inicialmente se observa un crecimiento lento del tejido con formación de callos, el cual se acelera a partir de los 30 días.



**Figura 8.** Representación gráfica del crecimiento de los callos de acuerdo a las áreas del explante donde se produjo su formación, determinadas a los 15, 30 y 45 días de transcurrido el experimento. NT: explante no transformado.

Por su parte, los explantes transgénicos que poseen el ADN-T del vector pAthspA mostraron un incremento del área media con proliferación de callos, con respecto a los tratamientos control y a los segmentos de hojas transformados con los vectores pCAMBIA1301 y pAthspA2-vep1 (Fig. 8). Al comparar numéricamente la formación y multiplicación de callos de los explantes transgénicos en selección con geneticina o higromicina B, es posible notar que en el primero se produce mayor formación de callos a los 15 días. Sin embargo, la diferencia entre los valores medios del área con formación de callos es superior en los explantes transgénicos seleccionados con higromicina B en las sucesivas evaluaciones, en comparación con iguales explantes seleccionados con geneticina.

Con el objetivo de determinar si la presencia de los agentes selectivos empleados genera diferencias en la velocidad de crecimiento de los callos inducidos. Se determinó la velocidad de crecimiento en 30 días mediante la diferencia entre el área del explante con callo ( $\text{cm}^2$ ) luego de transcurrido este tiempo ( $A_{45 \text{ días}} - A_{15 \text{ días}}$ ). La velocidad de crecimiento de los callos resistentes a higromicina B es significativamente superior a igual explantes con geneticina (Fig. 9).



**Figura 9.** Velocidad de crecimiento en 30 días de los callos formados a partir de los explantes transgénicos que contienen el vector pAthspA cultivados en MFC con geneticina  $70 \text{ mg L}^{-1}$  e higromicina B  $15 \text{ mg L}^{-1}$ . Medias con letras no comunes difieren estadísticamente según prueba de Mann-Whitney  $p < 0,05$ .

En la Figura 10 se muestra el crecimiento de un callo en los tres momentos donde se realizaron las evaluaciones, para los explantes transgénicos seleccionados con higromicina B (Fig.10A) y con geneticina (Fig.10B). Además, se confirmó la presencia de los genes marcadores de selección *nptII* y *hpt*, en el genoma de las plantas transgénicas con pAthspA, mediante PCR.



**Figura 10.** Callos formados a partir de discos foliares de plantas transgénicas de *D. purpurea*, a los 15, 30 y 45 días de cultivados en medio selectivo con 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina B (A) y 70 mg L<sup>-1</sup> de geneticina (B).

En este estudio se demuestra que aunque se emplee una concentración de geneticina cuatro veces o más superior a la de higromicina B, esta no impide la aparición de escapes. Por otro lado, la expresión estable del gen *hpt* en los discos foliares procedentes de plantas transgénicas, permitió la diferenciación eficiente de células transformadas de las no modificadas y permitió que el tejido transformado creciera selectivamente. Estos aspectos permiten elegir al gen *hpt* como marcador de selección eficiente para la transformación de *D. purpurea* con un gen de interés.

#### 4.2 Transformación de explantes foliares de *D. purpurea* vía *A. tumefaciens*

Para la transformación genética de segmentos foliares de *D. purpurea* vía *A. tumefaciens*, se desarrolló el protocolo descrito en el acápite 3.2. Durante el proceso de selección se consideraron los siguientes tratamientos: explantes transformados con los vectores pCAMBIA1301 y pAthspA2-vep1 y segmentos foliares no inoculados con antibiótico (Control negativo). Los tres tratamientos diseñados permitieron evaluar el efecto

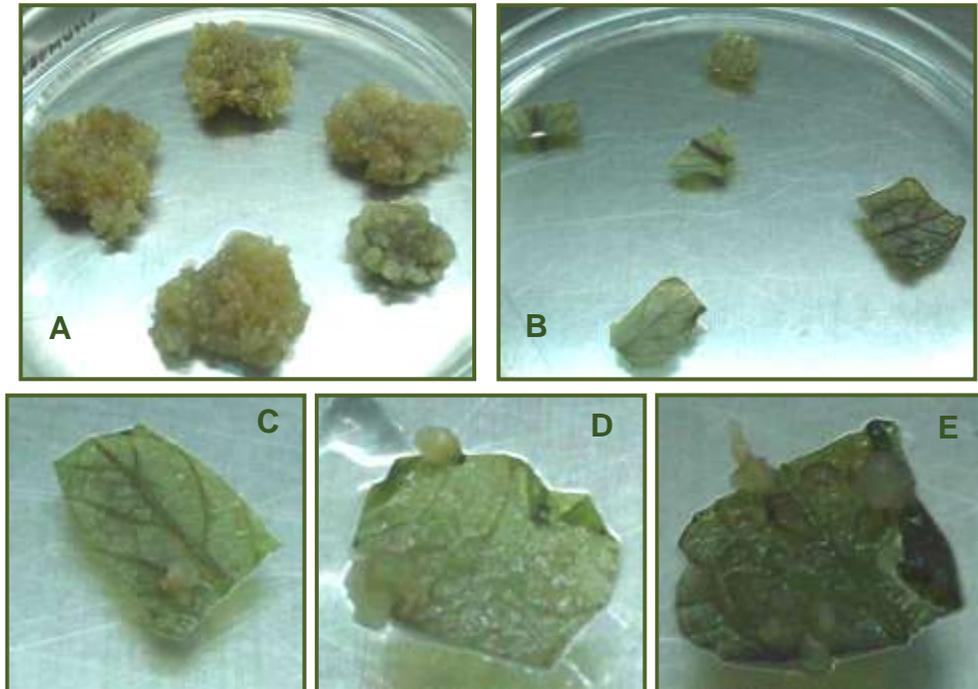
(formación de callos) de 15 mg L<sup>-1</sup> del agente selectivo higromicina B, en contraste con un tratamiento que no contenía antibiótico en su medio de cultivo (Control positivo). Luego de transcurridas cuatro semanas de cultivo de los discos foliares en las condiciones antes descritas; se determinó el número de explantes que formaron callos y el área del explante en la cual se observó esta característica. Para evaluar este último aspecto se aplicó la escala descriptiva presentada en Materiales y Métodos.

Como se muestra en la Tabla V, el número de explantes con formación de callos en el tratamiento correspondiente a la transformación con el vector pAthspA2-vep1 fue superior a la cantidad de segmentos transformados con pCAMBIA1301 que mostraron esta característica. Por otro lado, en la mayoría de los explantes incluidos en el Control positivo se produjo proliferación de callos en más de un 75% del área del disco foliar. A diferencia de los restantes tratamientos, en los cuales se evidenció una disminución de los grados medios (asociados a la formación de callos por área del explante) según la escala descriptiva, hasta que no se obtuvieron callos.

**Tabla V.** Número de explantes foliares con formación de callos por tratamiento en correspondencia con cada una de las categorías de la escala descriptiva.

No.	Tratamientos	No. de explantes que formaron callos (%)	Área del explante en la cual se observó formación de callos (A %)				
			A=0 (Grado 0)	A≤25 (Grado 1)	25>A≤50 (Grado 2)	50>A≤75 (Grado 3)	A>75 (Grado 4)
1	Control positivo	15 (100 %)				2	13
2	Control negativo	0 (0 %)	15				
3	pCAMBIA1301 con higromicina B	14 (56 %)	11	6	3	1	
4	pAthspA2-vep1 con higromicina B	89 (71.2 %)	36	27	20	42	

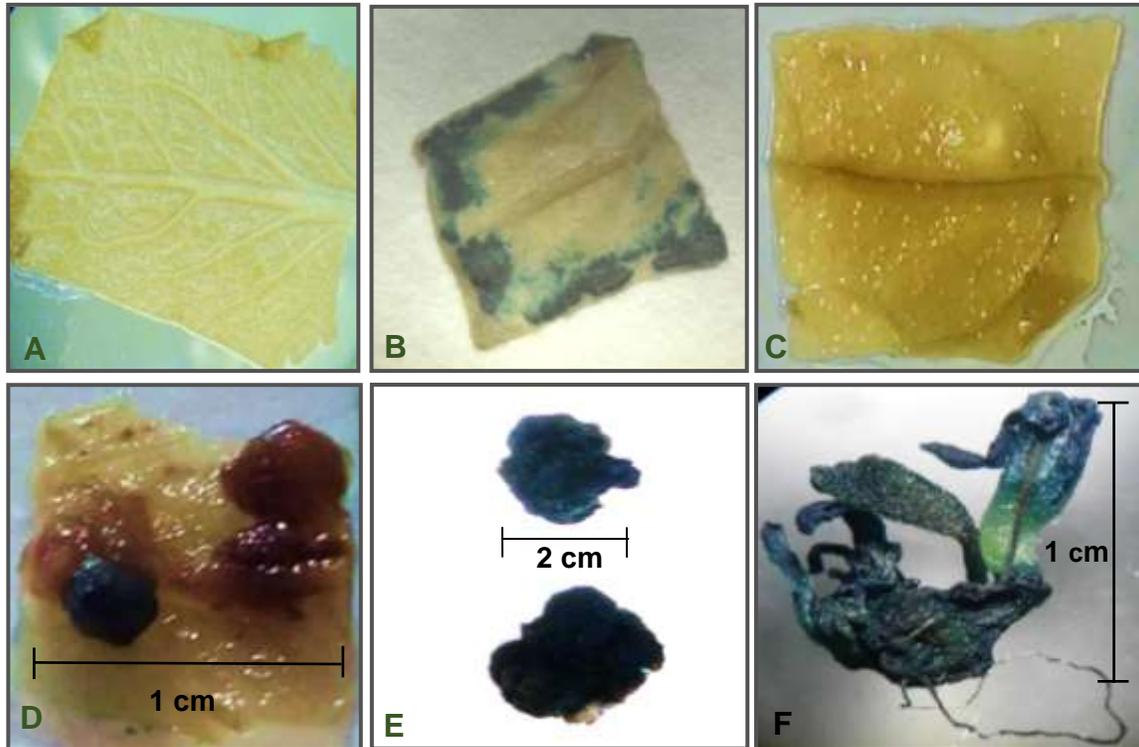
De modo similar a los observado en el experimento de selección anteriormente descrito en el acápite 4.1, los callos del Control positivo fueron compactos, blanquecinos y con mayor crecimiento que los sometidos a presión de selección (Fig. 11A). En los explantes no transformados en medio de cultivo con higromicina B, se observó la efectividad del proceso de selección con este antibiótico (Fig. 11B). Mientras que en los inoculados con los vectores binarios, se produjo la formación de callos en zonas puntuales, cercanas a las nervaduras y los bordes del segmento foliar (Fig. 11C, D y E).



**Figura 11.** Callos formados a partir de segmentos foliares de *D. purpurea* a la cuarta semana de cultivo en MFC con  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de higromicina B. **A:** Callo no transformados sin selección, **B:** explante no transformado en medio selectivo. **C, D, E:** explantes transformados con el vector pAthspA2-vep1 en selección.

Luego de ocho semanas en MFC fueron seleccionados 89 explantes con callos correspondientes a los segmentos foliares transformados con el vector pAthspA2-vep1, los cuales representan el 71,2% de los explantes inicialmente inoculados. A partir de este periodo y antes de la transferencia a MMb, un 33% de los callos formados no fueron transferidos a regeneración por presentar fenolización, constitución acuosa y/o ausencia de crecimiento; así como aparición de contaminación bacteriana o fúngica.

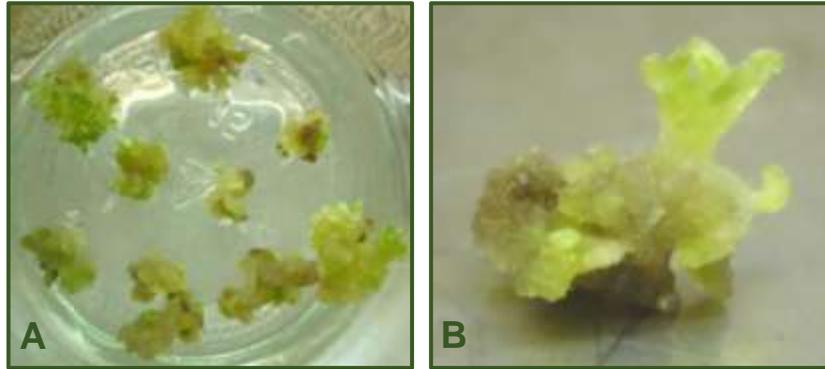
La expresión de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa fue determinada en diferentes fases del protocolo de transformación de *D. purpurea* con la cepa C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pCAMBIA1301) de *A. tumefaciens*. En este estudio se observó la expresión GUS transitoria en discos foliares luego del proceso de co-cultivo (Fig. 12A y B) y en diez segmentos de hojas elegidos al azar con y sin formación de callos luego de 45 días en MFC con higromicina B (Fig. 12C y D). Además, se analizó la actividad estable de la enzima en callos seleccionados con higromicina B a los 15 días de cultivo en medio de regeneración y en plantas regeneradas (Fig. 12E y F). En todos los casos se detectó cualitativamente la expresión del gen reportero *uidA*. Este resultado es un indicador de la eficiencia de las condiciones de transformación y de la inserción estable del ADN-T en el genoma de las células de *D. purpurea*.



**Figura 12.** Actividad transitoria y estable de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en explantes de *Digitalis purpurea* L. en diferentes fases del protocolo de transformación vía *A. tumefaciens*. **A:** explante no inoculado, **B:** segmento foliar luego del co-cultivo con la cepa C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pCAMBIA1301). **C y D:** explantes transformados con el vector pCAMBIA1301 luego de 45 días en medio selectivo con 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina B. **E:** callo seleccionado con higromicina B luego de 15 días en medio de regeneración. **F:** planta regenerada.

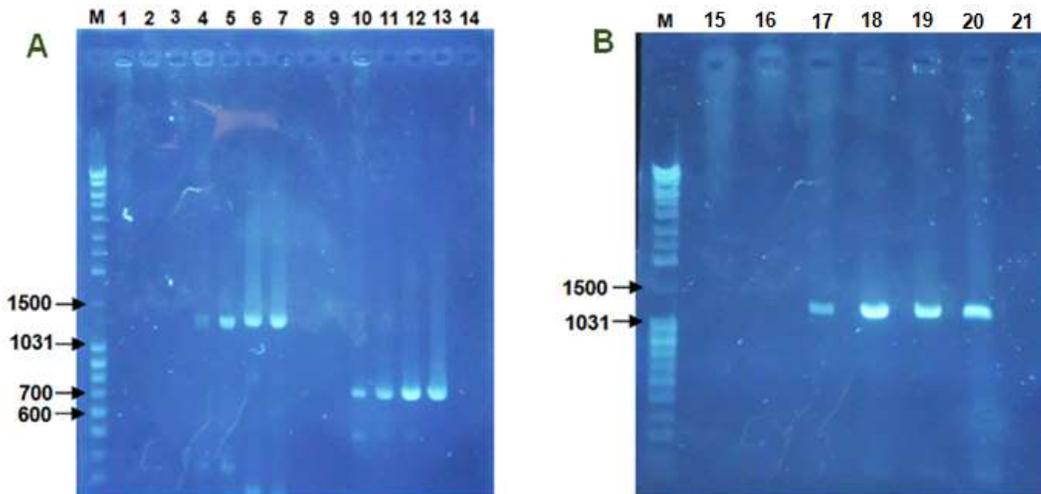
#### 4.3 Regeneración de plantas transgénicas de *D. purpurea* con el gen *vep1*

Ocurrido el proceso de selección de los discos foliares transformados con el vector pAthspA2-*vep1*, solo fue posible transferir a medio de cultivo de regeneración 57 callos por las causas antes referidas. Para ello se fragmentaron en segmentos de 2-3 mm y fueron transferidos a medio de cultivo de multiplicación de brotes (MMb). Parte de estos segmentos de callos, se tornaron acuosos, necróticos y no dieron origen a plantas. Mientras que otros se engrosaron y adoptaron una coloración verde (Fig. 13A). Luego de transcurridos entre 6-8 subcultivos a medio de cultivo fresco, fue posible obtener 24 plantas regeneradas (Fig. 13B). Estas tuvieron un crecimiento lento y al alcanzar entre tres y cinco cm de altura, fueron transferidas a medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, para su elongación.



**Figura 13.** Plantas de *D. purpurea* regeneradas a partir de callos provenientes de segmentos foliares transformados con la cepa C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90) de *A. tumefaciens* que contiene el vector pAthspA2-vep1. **A:** callos con brotes a los 60 días en medio de cultivo de regeneración. **B:** planta regenerada.

Las plantas regeneradas de la transformación con el vector pAthspA2-vep1 de más rápido crecimiento fueron seleccionadas y empleadas para aislar muestras de ADN genómico siguiendo el protocolo propuesto por Khayat *et al.* (2004). Para confirmar la presencia de los transgenes en el genoma de las plantas regeneradas, se amplificaron los genes: *hpt*, *p35S* y *vep1*, por PCR empleando cebadores específicos (Fig. 14). Todas las plantas analizadas fueron positivas a la presencia de los tres transgenes evaluados.



**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) del producto de PCR realizado a las muestras de ADN de plantas *in vitro* de *Digitalis purpurea* L. **A:** Producto de amplificación con cebadores específicos del gen *p35S* (carriles del 1 a 7) y *hpt* (carriles del 8 a 14). **B:** Producto de amplificación del gen *vep1*. **(M):** Marcador de peso molecular *Mass Ruler™ DNA Ladder Mix*. Carriles 1, 8 y 15: planta germinada; carriles 2, 9 y 16: plantas regeneradas no transformadas; carriles 3, 14 y 21: control negativo de contaminación; carriles 7, 13 y 20: control positivo. Los restantes carriles corresponden a plantas regeneradas resultantes de la transformación con el vector pAthspA2-vep1.

En la Tabla VI se resumen los resultados del proceso de transformación genética de *D. purpurea* mediante *A. tumefaciens* con el vector pAthspA2-vep1. En este experimento la eficiencia de regeneración de las plantas transformadas fue de 42,1% y la eficiencia de transformación de 19,2%. Todas las líneas analizadas fueron transgénicas, por lo que no se detectaron escapes del proceso selectivo con higromicina B.

**Tabla VI.** Efecto de la cepa C58C1Rif<sup>R</sup> (pMP90/pAthspA2-vep1) de *A. tumefaciens* en la regeneración y eficiencia de la transformación en líneas de *Digitalis purpurea*.

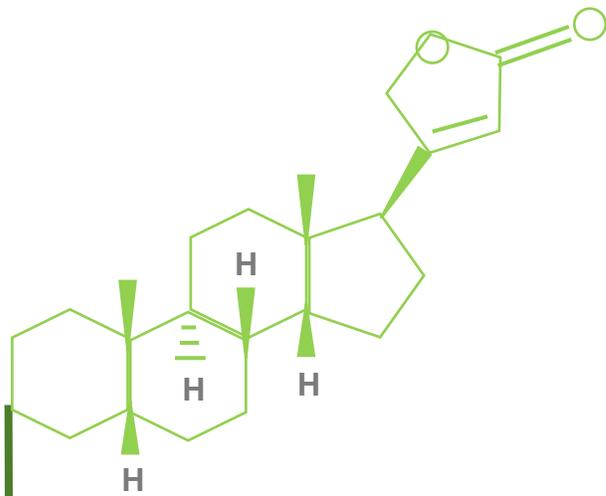
No. de explantes transformados	No. de callos transferidos a medio de regeneración	No. de líneas regeneradas (%) <sup>a</sup>	Líneas positivas (%) <sup>b</sup>		Eficiencia (%) <sup>c</sup>
			<i>hpt</i>	<i>vep1</i>	
125	57	24 (42,1%)	100%	100%	19,2%

**Leyenda:**

**a:** Eficiencia de regeneración (%) dado por la cantidad de plantas regeneradas, del total de callos transferidos a medio de cultivo para la regeneración.

**b:** Frecuencia (%) de explantes positivos del total analizado

**c:** Eficiencia de transformación (%) calculado por la relación entre las plantas regeneradas positivas y el total de explantes transformados.



- Capítulo 5
- DISCUSIÓN



## Capítulo 5: DISCUSIÓN

### 5.1 Comparación de los agentes selectivos higromicina B y geneticina durante el proceso de formación de callos de *D. purpurea*

Un paso decisivo para establecer una tecnología de transformación es la obtención de un método y agente para seleccionar células transformadas de las no transformadas, pues en la mayoría de los casos solo la menor fracción de los tejidos resultan modificados (Li *et al.*, 2013). Los protocolos descritos para la transformación genética de plantas generalmente incluyen el uso de genes marcadores de selección (Deo *et al.*, 2010). Tal es el caso de los genes *nptII* y *hpt* que codifican para la neomicina fosfotransferasa II e higromicina fosfotransferasa, respectivamente (Rosellini, 2012). La primera de estas enzimas confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos como la geneticina y la kanamicina, constituyendo estos agentes selectivos los más empleados en eventos transgénicos de *D. purpurea*. Sin embargo, se desconocen las potencialidades de la higromicina B como agente selectivo en la obtención de plantas transgénicas de esta especie.

Con el objetivo de elegir un gen marcador de selección (GMS) eficiente para la transformación de *D. purpurea* con un gen de interés, se desarrolló un sistema de selección en el cual se utilizaron los GMS condicionales positivos *hpt* y *nptII*. En este sentido, se diseñaron tratamientos en los que se adicionó al medio de cultivo los antibióticos Higromicina B o geneticina durante el proceso de formación de callos. Se realizaron mediciones del área con proliferación de callos a los 15, 30 y 45 días de cultivados los explantes foliares en MFC con 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina B o 70 mg L<sup>-1</sup> de geneticina.

El rendimiento de los GMS positivos en términos de eficiencia de transformación y selección varía ampliamente y en la mayoría de los casos no alcanza la eficiencia de los sistemas de selección basados en antibióticos o herbicidas (Rosellini, 2012). Como señalaron Miki y McHugh (2004), no se puede suponer que la resistencia de las plantas a un agente selectivo conferido por un gen específico, dará como resultado un buen sistema de selección solo porque las células altamente resistentes sobreviven. Para ser eficiente, una GMS debe permitir el crecimiento selectivo y la diferenciación de los tejidos transformados, además de proporcionar resistencia a un sustrato adicionado al medio. También, es un factor importante que influye en la eficacia de la selección, la presencia de escapes (es decir, la regeneración de células no transformadas contiguas a las células transformadas en explantes inoculados) (Li *et al.*, 2013).

Transcurridos 15 días en MFC, la mayoría de los tratamientos presentaron formación de callos en al menos siete de sus explantes. Como era de esperar, en el control negativo con higromicina B, no se observó esta característica en ninguno de los segmentos durante todos los subcultivos en los que se produjo la evaluación. Este resultado en particular, coincide con los alcanzados por Kairúz *et al.* (2013) al evaluar el efecto de igual concentración del antibiótico sobre la formación de callos a partir de discos foliares de *D. purpurea*. Resultado similar, también fue logrado por Verma *et al.* (2011) durante la estandarización del protocolo de transformación genética de banano var. 'Williams' (AAA) mediada por *A. tumefaciens*.

Al mismo tiempo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de discos foliares con proliferación de callos entre los explantes sin presión de selección (tratamiento 1), las líneas transgénicas con y sin agente selectivo (tratamientos 4, 5, 6) y las transformadas con el vector pCAMBIA1301 (tratamiento 7). Por su parte, los valores medios de área más elevados a los 15 días se manifestaron en los controles positivos (tratamientos 1 y 4); mientras que las líneas transgénicas seleccionadas con geneticina o higromicina B (tratamientos 5 y 6) no mostraron diferencias significativas entre ellas. Estos resultados se corresponden con la resistencia adquirida por las líneas transgénicas a estos antibióticos, debido a la presencia en su genoma de los transgenes *hpt* y *nptII* que le ofrecen esta propiedad.

Por otro lado, era de esperar que el crecimiento de callos procedentes de explantes foliares transformados con los vectores pCAMBIA1301 y pAthspA2-vep1 (tratamientos 7 y 8), no fuera solo diferente al de las líneas transgénicas sino también entre ellos. En principio, porque son explantes recién transformados con ambas cepas bacterianas de *Agrobacterium* y están siendo seleccionados por vez primera. En segundo lugar, porque el tamaño de los vectores de transformación está relacionado con la capacidad de *Agrobacterium* de transferir el ADN-T al núcleo de la célula vegetal con mayor eficiencia (Cho y Bong, 2006). En este sentido, mientras más grande sea el plásmido empleado, más compleja será su inserción al genoma vegetal y, por tanto, es menos frecuente que ocurra el proceso de multiplicación de callos. De ahí, que la cantidad de explantes transformados con pAthspA2-vep1 en los cuales se observó formación de callos fue significativamente inferior con respecto a los restantes tratamientos.

Adicionalmente, durante los siguientes subcultivos algunos de los callos formados en los explantes transformados con pAthspA2-vep1 se necrosaron. Según describen Verma *et al.* (2016), la oxidación y necrosis de los explantes es un fenómeno que se presenta en el

cultivo de tejidos vegetales, como respuesta a condiciones de estrés en el medio de cultivo o en el ambiente en el que se encuentra el explante. Luego, la pérdida de los callos formados en el primer periodo puede deberse a la continuidad del proceso de selección, a la liberación de compuestos tóxicos de las células no transformadas o a la inserción del ADN-T en regiones del genoma vegetal que impiden el desarrollo del explante. La respuesta del hospedero ante la infección bacteriana puede ser otro elemento a considerar (Deo *et al.*, 2010).

Contrario a los resultados esperados en el control negativo seleccionado con geneticina (tratamiento 2), se observaron pequeños callos en más del 50% de los explantes. Característica que se mantuvo prácticamente constante a los 30 y 45 días de evaluado el experimento. Esto implica que a pesar de mantener la selección durante varios subcultivos, la concentración de geneticina empleada no fue suficiente para inhibir en su totalidad tanto la diferenciación celular como la proliferación del tejido indiferenciado. Por tanto, se puede corroborar que en las condiciones experimentales de este estudio existe inhibición del crecimiento de las células no transformadas pero no ocurrió en el 100% de los explantes. Además, los callos formados no se multiplicaron en los siguientes subcultivos o mostraron crecimiento inferior a los restantes tratamientos.

La formación de pequeños callos en el control negativo seleccionado con geneticina, puede estar relacionada con las diferencias en las condiciones experimentales del cultivo *in vitro* (Padilla y Burgos, 2010), específicamente entre los recipientes empleados durante el proceso de selección. En este estudio se utilizaron microplacas de cultivo celular, a diferencia de las investigaciones previas en la especie en las cuales desarrollaron el esquema de selección con geneticina en pomos de cristal o placas Petri. Por otro lado, este resultado puede corresponderse con problemas en la disolución del agente selectivo que afectara su difusión total en el medio de cultivo. También, se ha observado que los explantes foliares en presencia de geneticina durante los primeros días del cultivo en MFC, se curvan ligeramente de manera tal que se forman callos aislados en aquellas zonas que no están en contacto con el medio selectivo.

En este caso, los resultados son contradictorios a los obtenidos por Pérez-Alonso *et al.* (2014b), quienes a igual concentración del agente selectivo lograron a los 28 días de cultivo un 100% de segmentos foliares de *D. purpurea* sin proliferación de callos. Además, estos autores recomendaron para eventos futuros de transformación genética en la especie, el empleo de 70 mg L<sup>-1</sup> de geneticina como la concentración mínima inhibitoria para sus condiciones experimentales.

Otros autores refieren a la geneticina como muy efectiva en diferentes sistemas de transformación genética como *Saccharum officinarum* L. (Breyer *et al.*, 2014), *Allium cepa* L. (Eady *et al.*, 2000), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Tadesse *et al.*, 2003), *Triticum aestivum* L. (Xue *et al.*, 2011), *Brassica napus* L. (Boszoradova *et al.*, 2011) y *Oryza sativa* L. (Nandy y Srivastava, 2012). Su empleo es frecuente como una alternativa para la kanamicina en monocotiledóneas, como por ejemplo, el arroz, que son altamente resistentes al mismo (Rosellini, 2012). También, concentraciones bajas de este antibiótico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) fueron efectivas para inhibir la regeneración de brotes no transformados de *Citrus aurantifolia* Swing (Peña *et al.*, 1997). Igualmente, ha sido utilizado para la selección de células transformadas de *Musa* spp. en concentraciones de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (Chong-Pérez *et al.*, 2012). Sin embargo, la geneticina no ha sido efectiva para la selección en *Zea mays* (Spencer *et al.*, 1990) y *Elaeis guineensis* Jacq. (Parveez *et al.*, 1996). Del mismo modo, Pérez-Alonso *et al.* (2014b) obtuvieron plantas de *D. purpurea* que no contenían ninguno de los genes transferidos vía *A. tumefaciens*, por lo que constituían escapes del proceso de selección con este antibiótico.

Comúnmente se encuentra que algunos sistemas de selección condicional positiva serán más efectivos en ciertas especies de plantas y sistemas de regeneración que otros (Zuraida *et al.*, 2013). Las investigaciones antes referidas muestran la variedad en las concentraciones mínimas inhibitorias de geneticina donde la susceptibilidad del tejido al antibiótico está en dependencia de las especies y genotipos empleados. También, depende del tipo de explante, estado físico del medio y las etapas de cultivo que se desarrollan en un protocolo para la transformación genética (Padilla y Burgos, 2010).

A partir de la determinación del área de la hoja con proliferación de callos a los 15, 30 y 45 días de iniciado el cultivo en MFC; fue posible conocer el crecimiento asociado a la multiplicación de los callos en presencia de los agentes selectivos. Los explantes transgénicos que poseen el ADN-T del vector pAthspA (tratamientos 5 y 6), mostraron un incremento significativo del área media con proliferación de callos, en relación a los tratamientos control y al tejido inoculado en proceso de selección. Asimismo, al comparar los segmentos transgénicos con geneticina e higromicina B según la cantidad de explantes y el área media en la que se produce formación de callos, fue posible notar que a los 15 días con geneticina se obtienen resultados más elevados. No obstante, los callos cultivados con higromicina B manifiestan un crecimiento más rápido luego del primer subcultivo a medio de cultivo fresco.

La formación de callos ocurre de modo natural en la planta, como respuesta de protección ante diversos factores bióticos y abióticos, debido a la modificación del equilibrio endógeno de los reguladores de crecimiento. En este caso es provocado por la adición de una auxina sintética (2,4-D) al medio de cultivo, que conlleva a un crecimiento desordenado (Verma *et al.*, 2011). Sin embargo, estos resultados pudieran deberse a que la presión de selección ejercida por la geneticina en la concentración evaluada, es menor que la generada por la higromicina B, por eso es probable que la formación de callos en los explantes tratados con geneticina se produzca más rápido. En este sentido, se conoce que la higromicina B posee una toxicidad más elevada para las plantas (Padilla y Burgos, 2010), de ahí que se emplee en una concentración menor que la geneticina. El gen de *Escherichia coli aphIV (hpt)* codifica para la enzima higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a este aminoglucósido en bacterias, hongos, células vegetales y animales. Es usual su empleo como gen marcador de selección cuando el gen *nptII* no ha sido efectivo (Miki y McHugh, 2004).

Además, la higromicina B es mucho más efectiva que la kanamicina y la geneticina para la selección de tejidos de arroz transformados porque no hay resistencia innata. Lo que proporciona una fuerte discriminación entre las células transformadas y las no transformadas (Christou y Ford, 1995). Del mismo modo, Joersbo y Okkels (1996), trabajando con cotiledones de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), encontraron que la higromicina B era 20 y 30 veces más tóxica que la kanamicina y la neomicina, respectivamente. Otro aspecto positivo, es que la higromicina B no parece inhibir la regeneración ni afectar la fertilidad de las plantas transgénicas (Zuraida *et al.*, 2013).

Por otro lado, al analizar la velocidad de crecimiento en 30 días de los callos formados a partir de los explantes transgénicos seleccionados con higromicina B (Tratamiento 6), fue significativamente superior a los mismos en presencia de geneticina (Tratamiento 5). Esto implica no solo que el GMS *hpt* puede ser empleado en la diferenciación de células transformadas de las no modificadas. Sino que es capaz de permitir el crecimiento selectivo del tejido transformado. En tal sentido, Breyer *et al.* (2014) aseveran que una selección eficiente aumenta los eventos de transformación y por ende existe una mayor probabilidad de regeneración de plantas transgénicas.

De igual manera, según afirma Li *et al.* (2013) el empleo de GMS positivos va acompañado comúnmente de un efecto de toxicidad de las células no transformadas durante su proceso de senescencia. Estos posibles efectos perjudiciales pueden generar condiciones de estrés abiótico en las células transformadas, de conjunto con la presión

selectiva que inicialmente ejerce el antibiótico presente en el medio de cultivo. De esta forma, la sensibilidad al estrés en los callos formados, unido a los mecanismos de respuesta adaptativa a estas condiciones, pudiera acelerar la formación y multiplicación de callos en los explantes seleccionados con higromicina B a partir del primer subcultivo a medio de cultivo fresco. En tal sentido, según Cho y Bong (2006), para responder a las condiciones de estrés deben desencadenarse numerosos eventos multifactoriales, que pueden agruparse en dos procesos: biosíntesis de moléculas adaptativas y unión o acoplamiento de moléculas a estructuras organizadas. El primero va a estar dirigido a la protección de macromoléculas y membranas, mientras que el segundo puede estar asociado a cambios del flujo de metabolitos. Posibilitando, de manera conjunta, contrarrestar los efectos del estrés y la aclimatización. Estudios posteriores son necesarios para comprobar esta hipótesis.

En la mayoría de los sistemas de transformación, es posible la obtención de un número de escapes y quimeras, a pesar del diseño correcto del proceso de selección (Padilla y Burgos, 2010). Aunque la aparición de este fenómeno es difícil de evitar en un esquema de selección, la efectividad del agente selectivo es vital para minimizar la proliferación del tejido no transformado. En este estudio se demuestra que aunque se emplee una concentración de geneticina cuatro veces o más superior a la de higromicina B, esta no impide la aparición de escapes. Consecuentemente, el empleo de higromicina B reduciría notablemente los costos asociados al uso de estos agentes (G418 46.00 Euro/g e higromicina B 108.40 Euro/g; Duchefa, 2018). Teniendo en cuenta el precio de ambos antibióticos y su efectividad como agentes selectivos, es recomendable la adición de higromicina B al medio de cultivo, durante el proceso de formación de callos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se confirma la elección del gen *hpt* como marcador de selección ideal para la transformación de segmentos de hojas de plantas de *D. purpurea* con un gen de interés.

Aunque los callos formados en este experimento no se transfirieron a medio de cultivo de multiplicación de brotes, pues no era objetivo de esta investigación. Estudios previos confirman que aquellos callos acuosos, pequeños y de coloración oscura, no son friables, por lo que no tienen las características de los callos usualmente empleados para regenerar brotes y/o raíces. No obstante, en estudios posteriores se podría extender este diseño hasta la fase de regeneración de plantas, de manera tal que se describan otros resultados que permitan seleccionar el esquema de selección más eficiente para un evento transgénico en la especie.

### 5.2 Transformación de explantes foliares de *D. purpurea* vía *A. tumefaciens*

Para la obtención de plantas transgénicas de *D. purpurea* se transformaron discos foliares vía *A. tumefaciens*, empleando el vector binario pAthspA2-vep1. Como control de las condiciones de transformación se utilizaron explantes transformados con el vector binario pCAMBIA1301. Adicionalmente, se emplearon segmentos foliares sin transformar en presencia de higromicina B (Control negativo) y en ausencia de este agente selectivo (Control positivo). Los segmentos de hojas transformados fueron seleccionados durante ocho semanas en MFC suplementando con 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina B, con subcultivos cada 15 días. A la cuarta semana de iniciado el proceso de formación de callos, se evaluó el número de explantes con callos y el área que cubren los mismos por explante en los diferentes tratamientos.

Durante las cuatro primeras semanas en el proceso de selección con higromicina B en los explantes no transformados no se observó formación de callos. Este elemento corrobora los resultados alcanzados en el acápite anterior y confirma la efectividad de la concentración utilizada de este antibiótico como agente selectivo. Si no existe una inhibición total de la formación de callos, aumenta la probabilidad de que se produzcan escapes del proceso selectivo (Kairúz *et al.*, 2013). Los resultados alcanzados se corresponden con los esperados para llevar a cabo un sistema de selección eficiente.

Por su parte, en los segmentos de hojas no transformados cultivados sin presión de selección se produjo formación de callos en el 75-100% de su área. El empleo de un control sin transformar no sometido a selección, permite comprobar las condiciones del medio de cultivo y la capacidad de los explantes para formar callos. Consecuentemente, el resultado esperado es que se produzca una formación normal de dichas estructuras sobre el explante, asegurando que además de la presencia del agente selectivo, no existan otros efectos inhibitorios que impidan la regeneración a partir de tejido transformado.

Sin embargo, en los explantes transformados con los vectores binarios y sometidos a selección con higromicina B, se observó la formación de callos aislados o en pequeños grupos. Estos se localizaron en zonas puntuales, próximas a los márgenes y las nervaduras del segmento foliar. Los explantes correspondientes a estos tratamientos, mantuvieron una gran variabilidad en los resultados, desde fragmentos que no formaron callos (Grado 0), hasta la aparición de los mismos entre un 50-75% de su área (Grado 3).

Contrario a lo esperado y a las evidencias experimentales descritas en el acápite 4.1, se produce formación de callos en mayor porcentaje de explantes transformados con el vector pAthspA2-vep1, que con los inoculados con el plásmido pCAMBIA1301.

Luego de transcurrido el periodo de co-cultivo del tejido vegetal con la bacteria (cinco días), se realizó la determinación histoquímica del producto de expresión transitoria de  $\beta$ -glucuronidasa, en discos de hojas inoculados y co-cultivados con el plásmido pCAMBIA1301 que contiene el gen *uidA* y un control sin transformar. Los niveles de expresión de esta enzima están asociados a la aparición de un precipitado de color azul, que se produce por la acción de la enzima sobre su sustrato (X-Gluc). De acuerdo a los resultados esperados, fue posible observar puntos azules en los bordes de los discos transformados, a diferencia del control que no presentó tinción. La localización del producto de catálisis de la  $\beta$ -glucuronidasa, se corresponde con las zonas del explante donde se realizaron cortes, favoreciendo la interacción con *A. tumefaciens*. Este patrón es comúnmente observado en protocolos de transformación genética que utilizan este tipo de explante (Pérez-Alonso *et al.*, 2014b).

En los callos formados sobre los explantes transformados con el vector pCAMBIA1301 luego de 45 días en medio de cultivo con higromicina B, fue posible detectar la actividad estable de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. A diferencia de los explantes donde no se produjo la proliferación de callos. Esto implica que los callos seleccionados con higromicina B, no solo pueden poseer la cualidad de ser resistentes a este agente, sino que también pueden contener y expresar otro gen de manera simultánea. Resultados similares fueron alcanzados por Li *et al.* (2014) y Pérez-Alonso *et al.* (2014b), durante el desarrollo de un protocolo de transformación de *D. purpurea* en el que lograron expresar al unísono los genes *nptII* y *uidA*. En este sentido, Rosellini (2012) asevera que es frecuente el empleo de genes que confieren resistencia a antibióticos o a herbicidas, conjuntamente con genes cuyo grado de expresión puede ser visualizado por técnicas de espectrofotometría o por ensayos histoquímicos. Esta ventaja puede ser aprovechada para la inserción y expresión de un gen de interés con el objetivo de potenciar la síntesis de cardenólidos.

No obstante, se observaron pequeñas zonas de callo GUS-negativo. Las razones de esto pueden ser problemas difusionales del sustrato, o que dentro de un mismo callo pueden coexistir células transformadas y no transformadas. Las células transformadas pueden contribuir a la degradación del agente selectivo permitiendo que las células no transformadas adyacentes se expongan a niveles subletales del mismo, y por tanto puedan proliferar (Padilla y Burgos, 2010). Este fenómeno se ha descrito como “efecto

protector” de las células no transformadas por las transformadas y es la principal causa de que existan escapes del proceso selectivo (Cervera *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2013).

Los genes reporteros más comúnmente introducidos en plantas genéticamente transformadas son los codificantes para la proteína verde fluorescente (*gfp*) y la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (*uidA*). Estos son empleados para el análisis de patrones de expresión gobernados por diversos promotores, permitiendo el reconocimiento y seguimiento visual del tejido transformado (Kavita y Burma, 2008). La expresión transitoria de la enzima codificada por el gen *uidA*, permite comprobar la inserción del mismo de forma rápida y detectable en la célula vegetal, demostrando la eficiencia de las condiciones de transformación y su aplicabilidad. Esto se debe a que este implica la transferencia del ADN-T al núcleo, la conversión de la simple cadena del ADN-T a la forma de doble cadena competente para la transcripción y la expresión de los transgenes a partir de las moléculas de ADN-T no integradas (Gelvin y Kim, 2007). La evaluación de la actividad transitoria es un parámetro que difiere en cuanto a la manera en la que se realiza. En otras investigaciones, esta se ha evaluado mediante el conteo de puntos y manchas azules (De Clercq *et al.*, 2002; Pérez-Alonso *et al.*, 2014b), por conteo de zonas teñidas en general (De Bondt *et al.*, 1994) u otros métodos (Charest *et al.*, 2004).

Además, se ha relacionado la expresión transitoria con la obtención de transformantes estables. Al respecto, Komari *et al.* (2004) refiere que los transformantes estables nunca se han obtenido eficientemente bajo condiciones en las que la expresión transitoria ha sido limitada. En *Oryza sativa* L., las condiciones que favorecen un alto nivel de expresión de los marcadores después del co-cultivo están generalmente asociadas con una alta frecuencia en la obtención de transformantes estables (Hiei *et al.*, 1994). En el caso del maíz (*Zea mays* L.) se determinaron con gran facilidad condiciones favorables para un alto nivel de expresión transitoria, sin embargo, se obtuvo un bajo número de transformantes estables (Ishida *et al.*, 1996).

Resultaron del proceso de selección con 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina B, 89 explantes con callos correspondientes a los segmentos transformados con el vector pAthspA2-vep1, los cuales representan el 71,2% de los explantes inicialmente inoculados. Este valor es un indicador de la eficiencia de las condiciones de transformación. En este caso, resulta imposible comparar los resultados alcanzados con otras investigaciones, debido a la inexistencia de protocolos de modificación genética en la especie que hayan empleado este esquema de selección. Por tanto, constituye el primer trabajo que describe un

protocolo de transformación de *D. purpurea* empleando como agente selectivo la higromicina B y al gen *hpt* como marcador de selección.

Sin embargo, un gran número de experimentos de transformación en *Oryza sativa* L., que abarca tanto el bombardeo de partículas como los procedimientos mediados por *Agrobacterium*, han empleado este sistema de selección. El primer informe de transformación de alta eficiencia de arroz usando *Agrobacterium* involucró la selección con higromicina B (Hiei *et al.*, 1994). También se aplicó en la primera transformación exitosa mediada por *Agrobacterium* de cultivares de arroz Indica y Javanica (Dong y McHughen, 1993).

### 5.3 Regeneración de plantas transgénicas de *D. purpurea* con el gen *vep1*

Los callos correspondientes al control positivo que fueron transferidos a medio de cultivo de multiplicación de brotes (MMb), aumentaron de tamaño, se engrosaron y adoptaron una coloración verde. Estas características morfológicas favorables les permitieron la formación de brotes y/o raíces. Mientras tanto, no todos los callos procedentes de explantes transformados con pCAMBIA1301 lograron regenerar plantas. Este resultado puede estar asociado a la pérdida por contaminación de material transformado, la producción de eventos de modificación en menor número o en zonas del genoma que afecten la viabilidad celular, así como diferencias en los patrones de expresión de los genes marcadores de selección, gobernados por diferentes promotores.

De manera similar a la descrita en el acápite anterior, se observó en callos y plantas regeneradas, la expresión estable del gen reportero *uidA* durante el proceso de multiplicación de brotes. Este resultado es un indicador de la integración funcional del ADN-T en el genoma de las células de *D. purpurea* inoculadas con el plásmido pCAMBIA1301 y de las condiciones de transformación (Gelvin y Kim, 2007). En este sentido, Tiwari y Tuli (2012) señalan al ensayo histoquímico GUS como un análisis simple pero eficiente para la identificación de plantas transgénicas del maní (*Arachis hypogaea* L.).

En el caso de los fragmentos de callos originados de discos foliares inoculados con el plásmido pAthspA2-vep1 y transferidos a MMb, se observaron características morfológicas diferentes. Algunos se mantuvieron oscuros, acuosos y frágiles, no experimentaron proliferación o engrosamiento apreciable, por lo que no resultaron en botes. Sin embargo, los restantes se tornaron más sólidos, compactos, engrosados y de un verde intenso, asociado a una mayor presencia de clorofilas y a la formación de brotes

morfogenéticos. Se obtuvieron 24 plantas regeneradas a partir de 57 callos transferidos a MMb, lo que representa una eficiencia de regeneración de un 42,1%. Entre las plantas regeneradas no transformadas y las transformadas con el vector pAthspA2-vep1 no se observaron diferencias fenotípicas. No obstante, el patrón de crecimiento de las plantas modificadas genéticamente fue más lento. De modo similar describen Sales *et al.* (2007) sus resultados en la especie *D. minor*, con la única divergencia de que estos autores no observaron diferencias en los patrones de crecimiento y desarrollo entre las líneas regeneradas.

Según Li *et al.* (2013), la exposición prolongada a condiciones de selección rigurosas puede dar como resultado un retraso en el crecimiento de las células transformadas seleccionadas y, en consecuencia, una baja eficiencia de regeneración de las plantas modificadas genéticamente. Se ha observado que en sistemas de selección en los que se destruyen células no transformadas, las células senescentes pueden inhibir el suministro de nutrientes a las células transformadas o excretar compuestos tóxicos, afectando negativamente la capacidad de las células transformadas para proliferar y diferenciarse en plantas genéticamente modificadas.

A partir de los resultados anteriores, se seleccionaron las plantas regeneradas de más rápido crecimiento, para confirmar la presencia por PCR de los transgenes *p35S*, *hpt* y *vep1* en el genoma de las células vegetales. La amplificación del gen que confiere resistencia a higromicina B (*hpt*), en todas las plantas analizadas por PCR, confirma la eficiencia del esquema de selección propuesto y corrobora la ausencia de escapes durante este proceso. De igual modo, fue posible confirmar en todas las muestras la inserción del gen *vep1* de *A. thaliana* codificante para una proteína con actividad progesterona-5 $\beta$ -reductasa, así como la presencia del promotor largo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S). La amplificación de este último en las líneas regeneradas de *D. purpurea*, reafirma la integración funcional de gran parte del casete de expresión del gen de interés al genoma vegetal, ya que su expresión está bajo el control de este promotor fuerte y constitutivo.

En este sentido, se requieren de análisis moleculares posteriores que permitan confirmar la integración funcional del gen *vep1* en el genoma de las líneas transformadas. Un factor importante a analizar en un sistema de transformación es el número de insertos. Por lo general es deseable la inserción de una sola copia debido a que se minimiza así la probabilidad de que el inserto interrumpa alguna secuencia funcional y por tanto afecte la viabilidad o el desarrollo de la planta. Además, el uso de promotores fuertes como CaMV-

35S y el del gen de la nopalina sintetasa (*nos*) puede alterar los niveles de expresión de genes cercanos físicamente (Vaucheret y Fagard, 2001). Por otra parte, cuando la integración de múltiples copias se combina con perfiles complejos de integración puede ocasionar silenciamiento del transgen (De Buck *et al.*, 2007) y su expresión volverse inestable (Kutty *et al.*, 2011). Estos aspectos confirman la preferencia por líneas transformadas con el mínimo de transgenes insertados en su genoma (Liu *et al.*, 2012). Además, el número de copias del transgén es un parámetro importante si tenemos en cuenta que las agencias regulatorias prefieren plantas transgénicas con una simple inserción del gen (Chetty *et al.*, 2012).

En consecuencia, la eficiencia de transformación resultante fue de 19, 2%. Aunque no existen trabajos comparables en *D. purpurea* con las mismas condiciones de este protocolo, estos resultados son muy superiores a los obtenidos en *D. minor* por Sales *et al.* (2003) quienes lograron 22 líneas transgénicas a partir de 178 explantes foliares inoculados. Además, son inferiores a los alcanzados por Pérez-Alonso *et al.* (2014b) al regenerar 518 plantas a partir de 75 segmentos foliares inoculados con la cepa C58C1RifR (pMP90) de *A. tumefaciens*. Sin embargo, estos últimos investigadores emplearon un vector binario de menor tamaño, que el utilizado en este trabajo.

Aunque las plantas regeneradas procedentes de explantes transformados con el vector pAthspA2-vep1, resultaron en su totalidad positivas a la presencia de los transgenes *p35S*, *hpt* y *vep1*, existe la probabilidad de que se puedan obtener plantas regeneradas sin la inserción de estos. Como resultado del “efecto protector” de las células transformadas sobre las no transformadas descrito con anterioridad, es posible que si proliferan células no transformadas en los callos pueden dar lugar a plantas durante el proceso de regeneración. Este riesgo puede ser reducido si se aplica presión selectiva durante esta etapa. Con el peligro de que una dosis de antibióticos aplicada exógenamente podría simular un ataque de patógeno, induciendo de ese modo una reacción de defensa e hipermetilación del ADN, con la consiguiente muerte celular y una menor capacidad de regeneración del callo (Schmitt *et al.*, 1997). La elección de adicionar o no higromicina B en las concentraciones recomendadas durante el proceso de regeneración, debe considerarse en trabajos posteriores. Hasta el momento, la concentración de higromicina B propuesta en este trabajo durante la formación de callos es suficiente.

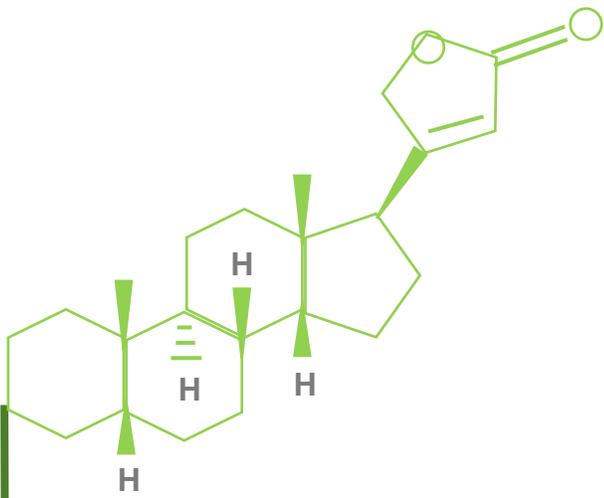
Los sistemas de transformación eficientes en plantas, son esenciales en el análisis funcional de genes involucrados en los diferentes mecanismos fisiológicos, bioquímicos y

moleculares de las rutas metabólicas (Pérez-Alonso *et al.*, 2016). Al respecto, Sales *et al.* (2007) informaron del empleo del sistema de transformación descrito en el 2003 para obtener plantas de *D. minor* que sobre-expresaban el dominio catalítico de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR1S) de *A. thaliana*. Algunas de las líneas obtenidas presentaron un mayor contenido de cardenólidos (hasta un 40%) tanto *in vitro* como en condiciones de invernadero.

De igual manera, otros sistemas de transformación en especies de interés farmacológico han sido descritos en la literatura. Zhu *et al.* (2009) establecieron un sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* para *Dioscorea zingiberensis* Wright a partir de callos, el cual puede favorecer la introducción y expresión de genes que incrementen la producción de la diosgenina. Este metabolito es un precursor para la síntesis de varias drogas esteroidales de actividad androgénica, antiinflamatoria y anticonceptiva.

Este constituye el primer informe de la transformación genética de plantas del género *Digitalis*, con un gen involucrado en la biosíntesis de cardenólidos. Dada las propiedades catalíticas de esta enzima, su expresión podría potenciar la producción de estos metabolitos secundarios y su cultivo *in vitro* en países donde no es posible realizarlo en condiciones naturales, como Cuba. Además, la obtención de plantas transgénicas de *D. purpurea* que expresan el gen *vep1* de *A. thaliana*, posibilitará de conjunto con otras herramientas biotecnológicas, la potenciación de la producción de cardenólidos *in vitro* de forma estable y uniforme. De esta manera, podrían sustituirse las importaciones asociadas a la compra de la digoxina, como medicamento necesario en el Sistema Nacional de Salud para tratar la insuficiencia cardíaca y otras patologías del corazón.

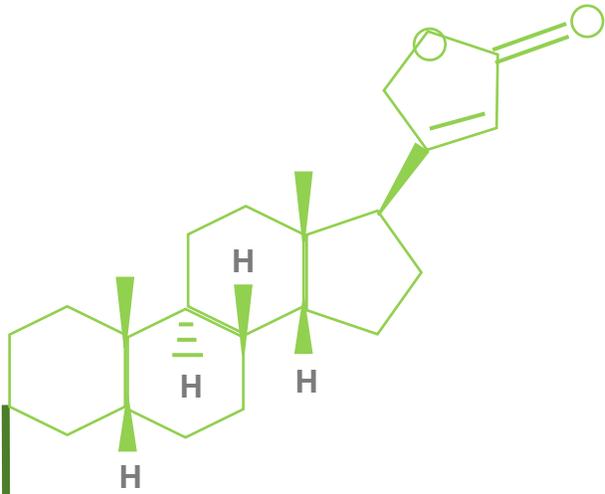
Con respecto al empleo de organismos transgénicos, la presencia del gen marcador de selección puede ser motivo de preocupación pública. A pesar de la ausencia de evidencias científicas de algún riesgo significativo para la salud humana (Ferradini *et al.*, 2011). En este sentido, la existencia del sistema de escisión sitio específico Cre/lox activado por golpe térmico en el vector de transformación empleado, permitirá no solo obtener plantas transgénicas de *D. purpurea* con un gen de interés, sino además libres de genes marcadores de selección.



# CONCLUSIONES

**CONCLUSIONES**

1. La selección con  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de higromicina B durante el proceso de formación de callos procedentes de segmentos foliares de *D. purpurea*, es más eficiente que la realizada con  $70 \text{ mg L}^{-1}$  de geneticina.
2. Se transformaron segmentos foliares de *D. purpurea* con el gen *vep1* de *A. thaliana*, vía *A. tumefaciens*.
3. Se obtuvieron plantas transgénicas que contienen el gen *vep1* de *Arabidopsis thaliana* L.

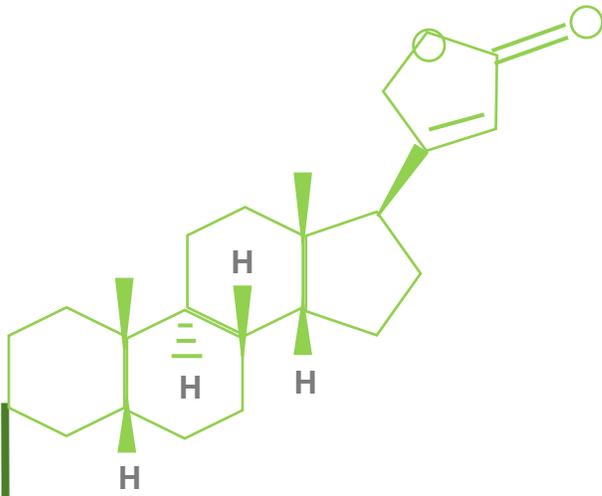


# ● RECOMENDACIONES



**RECOMENDACIONES**

1. Confirmar la integración del gen de interés en el genoma de las plantas regeneradas de *D. purpurea* mediante Hibridación de Southern.
2. Analizar la expresión del transcrito correspondiente al gen *vep1* mediante qRT-PCR.
3. Cuantificar el contenido de cardenólidos de las plantas transgénicas regeneradas de *D. purpurea*, en comparación con las no transformadas.



● REFERENCIAS  
● BIBLIOGRÁFICAS



**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Agrawal, A. A., Petschenka, G., Bingham, R. A., Weber, M. G. y Rasmann, S. (2012): Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions *New Phytology*. 194: 28–45.
- Alfermann, A. W., Spieler, H. y Reinhard, E. (1985): Biotransformation of cardiac glycosides by *Digitalis* cell cultures in air lift reactors. En: Neumann, K. H. *et al.* (eds.), *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*. pp. 316-322. Berlin: Springer-Verlag.
- Alfonso, I., Alonso, L., Alonso, P., Calvo, D. M., Cruz, M. A., Delgado, I., Domínguez, J. L., Furones, J. A., Gracia, A. J., García, O., González, Y., Jiménez, G., Leyva, C. y Lima, M. (2011): *Formulario Nacional de Medicamentos*. Ed. Ciencias Médicas, La Habana, Cuba, 402 pp.
- Anand, A., Zhou, T., Trick, H. N., Gill, B. S., Bockus, W. W. y Muthukrishnan, S. (2003): Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany*. 54: 1101-1111.
- Aperia, A. (2007): New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *Journal of INTERNAL MEDICINE*. 261(1): 44–52
- Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Provaznik, I. y Kizek, R. (2013): From Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cardiac glycosides to cytotoxicity and cancer treatment. *Anti-Cancer Agents in Medical Chemistry*. 13(7): 1069–1087.
- Bauer, P., Munkert, J., Brydziun, M., Burda, E., Muller-Uri, F., Groger, H., Muller, Y. A. y Kreis, W. (2010): Highly conserved progesterone 5β-reductase genes (P5βR) from 5β-cardenolide-free and 5β-cardenolide producing angiosperms. *Phytochemistry*. 71: 1495-1505.
- Berthouly, M. y Etienne, H. (2005): Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide, A. K. y Preil, W. (eds.), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. pp. 165-195. Dordrecht: Springer.
- Bevan, M., Flavell, R. B. y Chilton, M. D. (1983): A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*. 394: 184-187.
- Blochlinger, K. y Diggelmann, H. (1984): Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells *Molecular and Cellular Biology*. 4: 2929-2931.
- Boszoradova, E., Libantova, J., Matusikova, I., Poloniova, Z., Jopcik, M., Berenyi, M. y Moravcikova, J. (2011): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of economically important oilseed rape cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Culture*. 107: 317-323.
- Bräuchler, C., Meimberg, H. y Heubl, G. (2004): Molecular phylogeny of the genera *Digitalis* L. and *Isoplexis* (Lindley) Loudon (Veronicaceae) based on ITS and trnL-F sequences. *Plant Systematic Evolution*. 248: 111–128.
- Breyer, D., Kopertekh, L. y Reheul, D. (2014): Alternatives to Antibiotic Resistance Marker Genes for In Vitro Selection of Genetically Modified Plants— Scientific

- Developments, Current Use, Operational Access and Biosafety Considerations. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 33:4: 286-330.
- Cacho, M., Morán, M., Herrera, M. T. y Fernández-Tárrago, J. (1991): Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 25(2): 117-123.
- Capell, T. y Christou, P. (2004): Progress in plant metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. 15: 148–154.
- Čellárová, E. y Honcariv, R. (1991): The influence of n-[2-isopentenyl] adenine on shoot differentiation in *Digitalis purpurea* l. Tissue cultures. *Acta Biotechnologica*. 11: 331–334.
- Cervera, M., Pina, J. A., Juárez, J., Navarro, L. y Peña, L. (1998): *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration *Plant Cell Reports*. 18(3): 271-278.
- Charest, P. J., Caléro, N., Lachance, D., Datla, R. S. S., Duchêsne, L. C. y Tsang, E. W. T. (2004): Microprojectile-DNA delivery in conifer species: factors affecting assessment of transient gene expression using the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene *Plant Cell Reports*. 12(4): 189-193.
- Chaturvedi, H. y Jain, M. (1994): Restoration of regeneration potentiality in prolonged culture of *Digitalis purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 38: 73–75.
- Chetty, V. J., Ceballos, N., García, D., Narváez-Vásquez, J., López, W. y Orozco-Cárdenas, M. L. (2012): Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports*.
- Cho, E. K. y Bong, H. C. (2006): Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*. 25: 349–358.
- Chong-Pérez, B., Pérez-Alonso, N., Occeguera, Z., Capote, A., Pérez, A. y Jiménez, E. A. (2008): Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Genética G418 en el proceso de formación de callos de *Digitalis purpurea* L. *Biología Aplicada*. 8(2): 115–118.
- Chong-Pérez, B., Kosky, R. G., Reyes, M., Rojas, L., Ocaña, B., Tejeda, M., Pérez, B. y Angenon, G. (2012): Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of Biotechnology*. 159: 265-273.
- Christou, P. y Ford, T. L. (1995): Recovery of chimeric rice plants from dry seed using electric discharge particle acceleration. *Annual Botanic*. 75: 449–454.
- Corduan, G. y Spix, C. (1975): Haploid callus and regeneration of plants from anthers of *Digitalis purpurea* L. *Planta*. 124(1): 1-11.
- Das, M. y Schäffner, A. R. (2016): Running head: Expressologs identify functional orthologs. *Plant Physiology Preview*. DOI:10.1104/pp.15.01207.
- De Bondt, A., Eggermont, K., Druart, P., Vil, M., Goderis, I., Vanderleyden, J. y Broekaert, W. F. (1994): *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps *Plant Cell Reports*. 13(10): 587-593.

## Referencias Bibliográficas

- De Buck, S., Peck, I., De Wilde, C., Marjanac, G., Nolf, J., De Paepe, A. y Depicker, A. (2007): Generation of single-copy T-DNA transformants in *Arabidopsis* by the CRE/loxP recombination-mediated resolution system. *Plant Physiology*. 45: 11171-11182.
- De Clercq, J., Zambre, M., Montagu, M. V., Dillen, W. y Angenon, G. (2002): An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray *Plant Cell Reports*. 21: 333-340.
- Deo, P. C., Tyagi, A. P., Taylor, M., Harding, R. y Becker, D. (2010): Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*. 28: 27-40.
- Diettrich, B., Steup, C., Neumann, D., Scheibner, H., Reinbothe, C. y Luckner, M. (1986): Morphogenetic capacity of cell strains derived from filament, leaf and root explants of *Digitalis lanata*. *Plant physiology - Growth and development*. 124(5): 441-453.
- Dobler, S., Petschenka, G. y Pankoke, H. (2011): Coping with toxic plant compounds—The insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides. *Phytochemistry*. 72: 1593– 1604.
- Dong, J. Z. y McHughen, A. (1993): Transgenic flax plants from *Agrobacterium* mediated transformation: incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants. *Plant Science*. 91: 139–148.
- Eady, C. C., Weld, J. J. y Lister, C. E. (2000): *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Reports*. 19: 376–381.
- Einbond, L. S., Wu, H.-a., Su, T., Chang, G.-C., Panjikaran, M., Wang, H. y Goldsberry, S. (2010): Digitoxin activates EGR1 and synergizes with paclitaxel on human breast cancer cells. *Journal of Carcinogenesis*. 9: 10.
- Eisenbeiß, M., Kreis, W. y Reinhard, E. (1999): Cardenolide biosynthesis in light- and dark-grown *Digitalis lanata* shoot cultures. *Plant physiology and biochemistry*. 37(1): 13-23.
- Elbaz, H. A., Stueckle, T. A., Tse, W., Rojanasakul, Y. y Dinu, C. Z. (2012): Digitoxin and its analogs as novel cancer therapeutics *Experimental Hematology & Oncology*. 1(4).
- Erath, J. W., Vamos, M. y Hohnloser, S. H. (2016): Effects of digitalis on mortality in a large cohort of implantable cardioverter defibrillator recipients: results of a long-term follow-up study in 1020 patients. *European Heart Journal – Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2: 168–174.
- Erdei, I., Kiss, Z. y Maliga, P. (1981): Rapid clonal multiplication of *Digitalis lanata* in tissue culture. *Plant Cell Reports*. 1: 34-35.
- Ferradini, N., Nicolìa, A., Capomaccio, S., Veronesi, F. y Rosellini, D. (2011): Assessment of simple marker-free genetic transformation techniques in alfalfa. *Plant Cell Reports*. 30: 1991–2000.
- Ferriar, J. (1799): *An Essay on the Medical Properties of Digitalis purpurea, or foxglove* Manchester, Inglaterra.

- Feussner, J. R. y Feussner, D. J. (2010): Reassessing the efficacy of digitalis: from routine treatment to evidence-based medicine. *The American Journal of the Medical Sciences*. 339: 482-484.
- Finsterbusch, A., Lindemann, P., Grimm, R., Eckerskorn, C. y Luckner, M. (1999):  $\Delta$  5-3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase from *Digitalis lanata* Ehrh. a multifunctional enzyme in steroid metabolism? *Planta*. 209: 478-486.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Gallup, G. R., Goldberg, S. B., Hoffman, N. L. y S.C., W. (1983): Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*. 80: 4803-4807.
- Frohne, D. y Pfander, H. J. (2005): *Poisonous Plants*. Manson Publishing, Cambridge.
- Furuya, T., Kawaguchi, K. y Hirotsu, M. (1973): Biotransformation of progesterone by suspension cultures of *Digitalis purpurea* cultured cells *Phytochemistry*. 12: 1621–1626.
- Gachet, E., Martin, G. G., Vigneau, F. y Meyer, G. (1998): Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science & Technology*. 9: 380-388.
- Gärtner, D. E. y Seitz, H. U. (1993): Enzyme activities in cardenolide-accumulating, mixotrophic shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. *Journal Plant Physiology*. 141: 269–275.
- Gärtner, D. E., Keilholz, W. y Seitz, H. U. (1994): Purification, characterization and partial peptide microsequencing of progesterone 5 $\beta$ -reductase from shoot cultures of *Digitalis purpurea*. *European Journal of Biochemistry*. 225: 1125–1132.
- Garve, R., Luckner, M., Vogel, E., Tewes, A. y Nover, L. (1980): Growth, morphogenesis and cardenolide formation in long-term cultures of *Digitalis lanata* *Planta Medica*. 40: 92-103.
- Gavidia, I. y Pérez-Bermúdez, P. (1997): Cardenolides of *Digitalis obscura*: the effect of phosphate and manganese on growth and productivity of shoot-tip cultures. *Phytochemistry*. 45: 81–85.
- Gavidia, I., Tarrío, R., Rodríguez-Trelles, F., Pérez-Bermúdez, P. y Seitz, H. (2007): Plant progesterone 5 $\beta$ -reductase is not homologous to the animal enzyme. Molecular evolutionary characterization of P5 $\beta$ R from *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry*. 68(6): 853-864.
- Gelvin, S. B. y Kim, S.-I. (2007): Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. *Bioch et Bioph Acta*. 1769: 410-421.
- Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P. y Taylor, M. A. (2008): Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Biotechnology*. 26(3): 139–145.
- Hagimori, M., Matsumoto, T. y Kisaki, T. (1980): Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture I. Determination of digitoxin and digoxin contents in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several *Digitalis* species by radioimmunoassay. *Plant and Cell Physiology*. 21(8): 1391-1404.

## Referencias Bibliográficas

- Hagimori, M., Matsumoto, T. y Obi, Y. (1982a): Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture III. Effects of Nutrients on Digitoxin Formation by Shoot-Forming Cultures of *Digitalis purpurea* L. Grown in Liquid Media. *Plant and Cell Physiology*. 23(7): 1205-1211.
- Hagimori, M., Matsumoto, T. y Obi, Y. (1982b): Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture: II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. Grown in liquid media. *Plant Physiology*. 69(3): 653-656.
- Hagimori, M., Matsumoto, T. y Obi, Y. (1983): Effects of mineral salts, initial pH and precursors on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Agricultural and Biological Chemistry*. 47: 565–571.
- Hallberg, P., Lindbäck, J., Lindahl, B., Stenestrand, U. y Melhus, H. (2007): Digoxin and mortality in atrial fibrillation: a prospective cohort study. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 63: 959–971.
- Hallböök, H., Felth, J., Eriksson, A., Fryknäs, M., Bohlin, L. y Larsson, R. (2011): Ex vivo activity of cardiac glycosides in acute leukaemia. *PLoS ONE*. e15718.
- Hellen, R., Mullineaux, P. y Klee, H. (2000): A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors an update. *Trends Plant Science*. 5: 446-451.
- Herl, V., Fischer, G., Müller-Uri, F. y Kreis, W. (2006a): Molecular cloning and heterologous expression of progesterone 5 $\beta$ -reductase from *Digitalis lanata* Ehrh. *Phytochemistry*. 67(3): 225-231.
- Herl, V., Fischer, G., Müller-Uri, F. y Kreis, W. (2006b): Molecular cloning and expression of progesterone 5 $\beta$ -reductase (P5 $\beta$ R) from *Isoplexis canariensis*. *Planta Medica*. 72: 1163–1165.
- Herl, V., Albach, D. C., Müller-Uri, F., Bräuchler, C., Heubl, G. y Kreis, W. (2008): Using progesterone 5 $\beta$ -reductase, a gene encoding a key enzyme in the cardenolide biosynthesis, to infer the phylogeny of the genus *Digitalis*. *Plant Systematic Evolution*. 271: 65–78.
- Herl, V., Fischer, G., Reva, V. A., Stiebritz, M., Y.A., M., Müller-Uri, F. y Kreis, W. (2009): The VEP1 gene (At4g24220) encodes a short-chain dehydrogenase/reductase with 3-oxo-D4,5-steroid 5 $\beta$ -reductase activity in *Arabidopsis thaliana* L. . *Biochimie*. 91: 517–525.
- Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, M., Hernalsteens, J. P., Van Montagu, M. y Schell, J. (1983): Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal*. 2: 987-995.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. y Kumashiro, T. (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. . *Plant Journal*. 6: 271-282.
- Hirotsu, M. y Furuya, T. (1977): Restoration of cardenolide-synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of *Digitalis purpurea* *Phytochemistry*. 16(5): 610-611.
- Hirotsu, M. y Furuya, T. (1980): Biotransformation of digitoxigenin by cell suspension cultures of *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry*. 19: 531–534.
- Höfgen, R. y Willmitzer, L. (1988): Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation, . *Nucleic Acids Research*. 16: 9877.

- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. y Kumashiro, T. (1996): High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol.* 14: 745-750.
- Izquierdo, Y., Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. A. (2010): Metabolismo de cardenólidos y transformación genética de *Digitalis*. Potencialidades y retos. *Biotecnología Vegetal.* 10(3): 131–141.
- Izquierdo, Y. N. (2010) Transformación genética de *Digitalis purpurea* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y análisis de genes candidatos para la sobreproducción de cardenólidos. In: *Instituto de Biotecnología de las Plantas*. Santa Clara, Villa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. y Bevan, M. W. (1987a): GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants *EMBO Journal.* 6: 901-907.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. y Bevan, M. W. (1987b): GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal.* 6(13): 3901-3907.
- Jeong, C.-S., Chakrabarty, D., Hahn, E. J., H, L. y Paek, K. Y. (2006): Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochemistry Engineering Journal.* 27: 252–263.
- Joersbo, M. y Okkels, F. T. (1996): Calcium reduces toxicity of aminoglycoside antibiotics in sugar beet explants *in vitro*. *Physiol Plant.* 97: 245–250
- Johansson, S., Lindholm, P., Gullbo, J., Larsson, R., Bohlin, L. y Claeson, P. (2001): Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. *Anticancer Drugs.* 12: 475–483.
- Jun, J. H., Ha, C. M. y Nam, H. G. (2002): Involvement of the VEP1 gene in vascular strand development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology.* 43: 323–330.
- Kairúz, E., Pérez-Alonso, N., Capote, A., Pérez, A., Jiménez, E. y Chong-Pérez, B. (2013): Concentración mínima letal de higromicina B en la formación de callos y multiplicación de brotes de *Digitalis purpurea* L. *Biotecnología Vegetal.* 13(1): 23 - 31.
- Kaplan, J. H. (2005): Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review Biochememistry.* 71: 511–535.
- Karuppusamy, S. (2009): A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicine Plants Research.* 3: 1222-1239.
- Kavita, P. y Burma, P. K. (2008): A comparative analysis of green fluorescent protein and glucuronidase protein-encoding genes as a reporter system for studying the temporal expression profiles of promoters. *Journal of Biosciences.* 33: 337-343.
- Khayat, E., Duvdevani, A., Lehav, E. y Ballesteros, B. A. (2004): Somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). Genetic mechanism, frequency, and application as a tool for clonal selection. En: Jain, S. M. y Swennen, R. (eds.),

- Banana improvement: Cellular, molecular biology, and induced mutation*. pp. 99–109. Plymouth, UK: Science Publishers Inc.
- Komari, T., Ishida, Y. y Hiei, Y. (2004): Plant transformation technology: *Agrobacterium*-mediated transformation. En: Christou, P. y Klee, H. (eds.), *Handbook of plant biotechnology 1*. pp. 233-261. London: Wiley.
- Koncz, C. y Schell, J. (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*. 204(3): 383-396.
- Kothari, S., Joshi, A., Kachhwaha, S. y Ochoa-Alejo, N. (2010): Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advance*. 28: 35–48.
- Kreis, W., May, U. y Reinhard, E. (1986): UDP-glucose:digitoxin 162-O-glucosyltransferase from suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. *Plant Cell Reports*. 5: 442-445.
- Kreis, W., Hensel, A. y Stuhlemmer, U. (1998): Cardenolide biosynthesis in foxglove. *Planta Medica*. 64: 491-499.
- Kreis, W. y Müller-Uri, F. (2010): Biochemistry of Plant Secondary metabolism. En: Wink, M. (ed.), *Biochemistry of sterols, cardiac glycosides, brassinosteroids, phytoecdysteroids and steroid saponins*. Sheffield: CRC Press.
- Kreis, W. y Müller-Uri, F. (2013): Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms: new concepts and experimental approaches. En: Bach, T. J. y Rohmer, M. (eds.), *Cardenolide aglycone formation in Digitalis*. pp. 425-438. New York: Springer Science+Business Media.
- Kumar, V., Campbell, L. M. y Rathore, K. S. (2011): Rapid recovery- and characterization of transformants following *Agrobacterium* mediated T-DNA transfer to sorghum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 104: 137-146.
- Kutty, P. C., Parveez, G. K. A. y Huyop, F. (2011): *Agrobacterium tumefaciens* infection strategies for greater transgenic recovery in *Nicotiana tabacum* cv TAPM26 I. *Journal Agricultural Research*. 6: 119-133.
- Leu, W. J., Chang, H. S., Chan, S. H., Hsu, J. L., Yu, C. C. y Hsu, L. C. (2014): Reevesioside A, a cardenolide glycoside, induces anticancer activity against human hormone-refractory prostate cancers through suppression of c-myc expression and induction of G1 arrest of the cell cycle. *PLoS ONE*. e87323.
- Li, C. W., Lee, S. H. y Chan, M. T. (2013): Utilization of the plant methionine sulfoxide reductase B genes as selectable markers in *Arabidopsis* and tomato transformation. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 113: 555–563.
- Li, J. W. y Vederas, J. C. (2009): Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? . *Science*. 325: 161-165.
- Li, Y., Gao, Z., Piao, C., Lu, K., Wang, Z. y Cui, M.-L. (2014): A stable and efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of the medicinal plant *Digitalis purpurea* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172: 1807–1817.
- Lin, C.-H., Chang, G.-C., Lai, Y.-H., Lin, C.-H., Chen, M.-H., Chang, G.-C., Tsai, M.-F. y Chen, J. J. W. (2015): Digoxin suppresses tumor malignancy through inhibiting multiple Src-Related signaling pathways in non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*. 10 (5): e0123305.

## Referencias Bibliográficas

- Linares, J. C. (2015): La Digital. Su historia y su rol actual. *Revista Médica de Rosario*. 81: 32-39.
- Lindemann, P. y Luckner, M. (1997): Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*. 46: 507-513.
- Liu, M., Lu, S., Liu, L., Tan, J. y Guo, Z. (2012): *Agrobacterium*-mediated transformation of centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides* [Munro] Hack.). *Plant Cell, Tiss and Organ Culture*.
- López-Lázaro, M., Pastor, N., Azrak, S. S., Ayuso, M. J., Austin, C. A. y Cortés, F. (2005): Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *Journal Natural Products*. 68: 1642–1645.
- Malcolm, S. y Zalucki, M. (1996): Milkweed latex and cardenolide induction may resolve the lethal plant defence paradox. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 80(1): 193-196.
- McConkey, D. J., Lin, Y., Nutt, L. K., Ozel, H. Z. y Newman, R. A. (2000): Cardiac glycosides stimulate  $Ca^{2+}$  increases and apoptosis in androgen-independent: metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Research*. 60: 3807–3812.
- Mcmullen, M. D., Byrne, P. F., Snook, M. E., Wiseman, B. R., Lee, E. A., Widstrom, N. W. y Coe, E. H. (1998): Quantitative trait loci and metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(5): 1996-2000.
- Melero, C. P., Medarde, M. y San Feliciano, A. (2000): A Short Review on Cardiotonic Steroids and Their Aminoguanidine Analogues. *Molecules*. 51-81.
- Miki, B. y McHugh, S. (2004): Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal Biotechnology*. 107: 193-232.
- Mohammed, A., Yücesan, B., Demir-Ordu, Ö., Cihangir, C., Eker, İ., Kreis, W. y Gürel, E. (2015): *In vitro* regeneration and cardenolide determination of an endemic foxglove, *Digitalis cariensis* (Aegean Foxglove). *Plant Tissue Culture*. 51: 438-444.
- Munz, P. A. y Keck, D. D. (1973): Foxglove. *A California Flora*. pp. 654. USA: University of California Press.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15: 473-497.
- Murphy, S. A. (2013): When 'digoxin use' is not the same as 'digoxin use': lessons from the AFFIRM trial. *European Heart Journal*. 34: 1465-1467.
- Nandy, S. y Srivastava, V. (2012): Marker-free site-specific gene integration in rice based on the use of two recombination systems. *Plant Biotechnology Journal*. 904-912.
- NationMaster (2017) *Heart disease deaths*. [En línea] Disponible desde: [www.nationmaster.com/country-info/stats/Health/Heart.disease-deaths](http://www.nationmaster.com/country-info/stats/Health/Heart.disease-deaths). [Consultado: 27 de marzo de 2017].
- NCBI (2017) NCBI Taxonomy. In: *National Center for Biotechnology Information*. U.S. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA: National Library of Medicine.
- Neczypor, W. (1969): Alkaloid content of some native sources of *Vinca minor* L. (evergreen) under field conditions. *Pharmazie*. 24(5): 273-274.

## Referencias Bibliográficas

- Newman, R. A., Yang, P., Hittelman, W. N., Lu, T., Ho, D. H. y Ni, D. (2006): Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 5: 167–181.
- Nolte, E., Sobel, A., Wach, S., Hertlein, H., Ebert, N. y Müller-Uri, F. (2015): The new semisynthetic cardenolide analog 3-β-[2-(1-Amantadine)-1-on-ethylamine]-digitoxigenin (AMANTADIG) efficiently suppresses cell growth in human leukemia and urological tumor cell lines. *Anticancer Research*. 35: 5271–5275.
- Occeguera, Z. (2008) Regeneración de plantas vía embriogénesis somática y estudio de agentes selectivos para la transformación genética de *Digitalis purpurea* L. In: *Instituto de Biotecnología de las Plantas*. Villa Clara, Cuba: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, pp. 68.
- Oksman-Caldentey, K. M. y Inze, D. (2004): Plant cell factories in the postgenomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Science*. 9: 433-440.
- Olmstead, R. G., Wolfe, A. D., Young, N. D., Elisons, W. J. y Reeves, P. A. (2001): Disintegration of the *Scrophulariaceae*. *American Journal of Botany*. 88: 348–361.
- OMS, O. M. d. I. S. (2015) *Enfermedades Cardiovasculares*. [En línea] Disponible desde: [www.who.int/en/](http://www.who.int/en/). [Consultado: 27 de marzo de 2017].
- ONEI (2015) Anuario Estadístico de Cuba 2015. Salud Pública y Asistencia Social. La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Estadística e Información de la República de Cuba.
- Padilla, I. M. G. y Burgos, L. (2010): Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on *in vitro* plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports*. 29: 1203-1213.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D. y Hahn, E. J. (2005): Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tiss and Organ Culture*. 81: 287-300.
- Parsaeimehr, A., Sargsyan, E. y Vardanyan, A. (2011): Expression of secondary metabolites in plants and their useful perspective in animal health. *ABAH Bioflux*. 3: 115-124.
- Parveez, G., Chowdhury, M. y Saleh, N. M. (1996): Determination of minimal inhibitory Concentration of selection agents for Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) transformation. *Asia Pacific Journal Molecular Biology Biotechnology*. 4: 219-228.
- Patil, J. G., Ahire, M. L., Nitnaware, K. M., Panda, S., Bhatt, V. P. y Kishor, P. B. K. (2013): *In vitro* propagation and production of cardiotoxic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 2379–2393.
- Peña, L., Cervera, J., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J. A. y Navarro, L. (1997): Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing): Factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports*. 16: 731-737.
- Pérez-Alonso, N., Wilken, D., Gerth, A., Jahn, A., Nitzsche, H. M., Kerns, G., Capote-Perez, A. y Jiménez, E. A. (2009): Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 99: 151–156.

## Referencias Bibliográficas

- Pérez-Alonso, N. (2013) Sistema de Inmersión Temporal, Elicitación y Transformación genética en *Digitalis purpurea* L. In: *Instituto de Biotecnología de las Plantas*. Santa Clara, Villa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- Pérez-Alonso, N., Arana, F., Capote, A., Pérez, A., Sosa, R., Mollineda, A. y Jiménez, E. (2014a): Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante elicitores. *Revista Colombiana Biotecnológica*. 16(1): 51-61.
- Pérez-Alonso, N., Chong-Pérez, B., Capote, A., Pérez, A., Izquierdo, Y., Angenon, G. y Jiménez, E. (2014b): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Digitalis purpurea* L. *Plant Biotechnol Rep*. 8: 387–397.
- Pérez-Alonso, N., Chong-Pérez, B., Capote, A., Pérez, A., Gerth, A., Angenon, G. y Jiménez, E. (2016): Biotechnological Approaches for Biomass and Cardenolide Production in *Digitalis purpurea* L. En: Mohan, S. (ed.), *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*. pp. 81-100. New York: Springer Science+Business Media.
- Pérez-Bermúdez, P., Brisa, M. C., Cornejo, M. J. y Segura, J. (1984): *In vitro* morphogenesis from excised leaf explants of *Digitalis obscura* L. *Plant Cell Reports*. 3: 8-9.
- Pérez-Bermúdez, P., García, A. M., Tuñón, I. y Gavidia, I. (2010): *Digitalis purpurea* P5-beta-R2, encoding steroid 5-beta-reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. *New Phytologist*. 185(3): 687-700.
- Pflieger, S., Lefebvre, V. y Causse, M. (2001): The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding*. 7(4): 275-291.
- Piñol, M. T., Palazón, J. y Cusidó, R. M. (2008): Introducción al metabolismo secundario. En: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal*. pp. 323-348. Madrid, España: Mc Graw Hill Interamericana.
- Prassas, I. y Diamandis, E. P. (2008): Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7: 926–935.
- Prassas, I., Karagiannis, G. S., Batruch, I., Dimitromanolakis, A., Datti, A. y Diamandis, E. P. (2011): Digitoxin-induced cytotoxicity in cancer cells is mediated through distinct kinase and interferon signaling networks. *Molecular Cancer Therapy*. 10: 2083–2093.
- Radzyukevich, T. L., Lingrel, J. B. y Heiny, J. A. (2009): The cardiac glycoside binding site on the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 2 isoform plays a role in the dynamic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(8): 2565–2570.
- Rahimtoola, S. H. (2004): *Digitalis* therapy for patients in clinical heart failure. *Current Problems in Cardiology*. 109: 2942–2946.
- Ramessar, K., Peremarti, A., Gómez-Galera, S., Naqvi, S., Moralejo, M., Muñoz, P., Capell, T. y Christou, P. (2007): Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. *Transgenic Research*. 16: 261-280.
- Repke, K. R. H., Schönfeld, W., Weiland, J., Megges, R. y Hache, A. (1989): *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, 435-502 pp.

- Richard, S. C., Orduñez, P., Ferrer, I., Bernal, J. L. y Espinosa-Brito, A. (2006): Cardiovascular disease and associated risk factors in Cuba: prospects for prevention and control. *American Journal of Public Health*. 96(1): 94–101.
- Riganti, C., Campia, I., Polimeni, M., Pescarmona, G., Ghigo, D. y Bosia, A. (2009): Digoxin and ouabain induce P-glycoprotein by activating calmodulin kinase II and hypoxia-inducible factor-1 in human colon cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 240: 385–392.
- Roca-Pérez, L., Boluda, R. I., Gavidia, I. y Pérez-Bermúdez, P. (2004): Seasonal cardenolide production and Dop5 $\beta$ r gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry*. 65: 1869-1878.
- Rocha, S. C., Pessoa, M. T., Neves, L. D., Alves, S. L., Silva, L. M. y Santos, H. L. (2014): 21-Benzylidene digoxin: a proapoptotic cardenolide of cancer cells that up-regulates Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and epithelial tight junctions. *PLoS ONE*. 9: e108776.
- Roden, D. (2001): Drugs effecting renal and cardiovascular system. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw Hill, New York.
- Rogowsky, P. M., Close, T. J., Chimera, J. A., Shaw, J. J. y Kado, C. I. (1987): Regulation of the vir genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58 *The Journal of Bacteriology*. 169(11): 5101-5112.
- Roig, J. T. (2012): *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. Ed. Científico-Técnica, La Habana, Cuba, 372 pp.
- Rosellini, D. (2011): Selectable marker genes from plants: reliability and potential. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*. 47: 222-233.
- Rosellini, D. (2012): Selectable markers and reporter genes: a well furnished toolbox for plant science and genetic engineering. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 31(5): 401–453.
- Saito, K., Yamazaki, M., Shimomura, K., Yoshimatsu, K. y Murakoshi, I. (1990): Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes and production of cardioactive glycosides. *Plant Cell Reports*. 9: 121-124.
- Sales, E., Nebauer, S. G., Arrillaga, I. y Segura, J. (2002): Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. *Journal of Plant Physiology*. 159(1): 9-16.
- Sales, E., Segura, J. y Arillaga, I. (2003): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. *Planta Medica*. 69: 143-147.
- Sales, E., Muñoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I. y Segura, J. (2007): Enhancement of cardenolide and phytosterol levels by expression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in transgenic *Digitalis minor* *Planta Medica*. 73: 605-610.
- Sales, E., Müller-Uri, F., Nebauer, S. G., Segura, J., Kreis, W. y Arillaga, I. (2011): *Digitalis*. En: Kole, C. (ed.), *Wild crop relatives: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops*. pp. 73-112: Springer-Verlag
- Sato, F., Inai, K. y Hashimoto, T. (2007): Metabolic engineering in alkaloid biosynthesis: case studies in tyrosine- and putrescine-derived alkaloids. En: Verpoorte, R. et al. (eds.), *Applications of plant metabolic engineering*. pp. 145-173: Springer.

## Referencias Bibliográficas

- Schmitt, F., Oakeley, E. J. y Jost, J. P. (1997): Antibiotics induce genomewide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants *Journal Biology Chemistry*. 272: 1534–1540.
- Seidel, S., Kreis, W. y Reinhard, E. (1990):  $\Delta^5$ - $3\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -ketosteroid isomerase ( $3\beta$ -HSD), a possible enzyme of cardiac glycoside biosynthesis, in cell cultures and plants of *Digitalis lanata* Ehrh. *Plant Cell Reports*. 8: 621-624.
- Seitz, H. U. y Gärtner, D. E. (1994): Enzymes in cardenolide-accumulating shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 38(2): 337-344.
- Shi, S., Ma, F., Li, Y., Feng, F. y Shang, Z. (2012): Overexpression of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GLDH) in Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolor) via particle bombardment-mediated transformation. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*. 48: 1-6.
- Shiratori, O. (1967): Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: *in vitro* and *in vivo* studies. *Japanese Journal of Cancer Research*. 58: 521–528.
- Spencer, T., Gordon-Kamm, W. J., Daines, R. J., Start, W. G. y Lemaux, P. G. (1990): Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theor. Applied Genetic*. 79: 625-631.
- Sreeramanan, S., Maziah, M., Abdullah, P. y Rosli, M. (2006): Potential selectable marker for genetic transformation in banana. *Biotechnology*. 5: 189-197.
- Stuhlemmer, U. y Kreis, W. (1996): Cardenolide formation and activity of pregnane-modifying enzymes in cell suspension cultures, shoot cultures and leaves of *Digitalis lanata*. *Plant Physiology Biochemistry*. 34: 85-91.
- Sutor, R., Hoelz, H. y Kreis, W. (1990): Lanatoside 15'-O-acetylerase from *Digitalis* (*Scrophulariaceae*) plants and cell cultures. *Journal Plant Physiology*. 136: 289-294.
- Tadesse, Y., Sagi, L., Swennen, R. y Michel, J. (2003): Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. *Plant Cell Tiss Organ Culture*. 75: 1-18.
- Tewes, A., Wappler, A., Peschke, E. M., Garve, R. y Nover, L. (1982): Morphogenesis and embryogenesis in long-term cultures of *Digitalis*. *Z. Pflanzenphysiologie*. 106: 311-324.
- Thomas, R., Gray, P. y Andrews, J. (1990): *Digitalis*: its mode of action, receptor, and structure-activity relationships. *Advances in Drug Research*. 19: 311-562.
- Tiwari, S. y Tuli, R. (2012): Optimization of factors for efficient recovery of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.
- Trenti, A., Grumati, P., Cusinato, F., Orso, G., Bonaldo, P. y Trevisi, L. (2014): Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2. *Biochemistry Pharmacology*. 89: 197–209.
- Turumtay, H., Akyüz, E., E., K., Sahin, H., Sandallı, C. y Yazıcı, Z. A. (2016): Three seasonal comprehensive evaluation process of *Digitalis trojana* Ivan's phenolics. *Industrial Crops and Products*. 94: 160–166.

## Referencias Bibliográficas

- Upadhyaya, C., Nookaraju, A., Gururani, M., Upadhyaya, C., Kim, D., Chun, S. y Park, S. (2010): An update on the progress towards the development of marker-free transgenic plants. *Botanical Studies*. 51: 277–292.
- Vanisree, M. y Tsay, H.-S. (2007): Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. En: Kayser, O. y Quax, W. (eds.), *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*. pp. 267-285. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Vaucheret, H. y Fagard, M. (2001): Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics*. 17(1) 29-35.
- Verma, S. K., Yucesan, B., Gurel, S. y Gurel, E. (2011): Indirect somatic embryogenesis and shoot organogenesis from cotyledonary leaf segments of *Digitalis lamarckii* Ivan., an endemic medicinal species. *Turkey Journal Biology*. 35: 743–750.
- Verma, S. K., Das, A. K., Cingoz, G. S. y Gurel, E. (2016): *In vitro* culture of *Digitalis* L. (Foxglove) and the production of cardenolides: an up-to-date review. *Industrial Crops and Products*. 94: 20–51.
- Verpoorte, R. (2007). En: Verpoorte, R. *et al.* (eds.), *Applications of plant metabolic engineering*. pp. xi-xxi: Springer.
- Wang, Y., Yau, Y. Y., Perkins-Balding, D. y Thomson, J. G. (2011): Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant Cell Reports*. 30: 267-285.
- Warren, B. (2005): *Digitalis purpurea*. *Am J Cardiol*. 95: 544.
- Wen, S., Chen, Y., Lu, Y., Wang, Y., Ding, L. y Jiang, M. (2016): Cardenolides from the *Apocynaceae* family and their anticancer activity. *Fitoterapia*. 112: 74-84.
- Werner, K. (1965): Taxonomie und Phylogenie der Gattungen *Isoplexis* (Lindl.) Benth. and *Digitalis* L. *Feddes Repert species*. 70: 109-135.
- Wilken, D., Jiménez, E., Hohe, A., Jordan, M., Gómez, R., Schmeda, G. y Gerth, A. (2005): Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. En: Hvoslef-Eide, A. K. y Preil, W. (eds.), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. pp. 525-537. Dordrecht: Springer.
- Winnicka, K., Bielawski, K., Bielawska, A. y Miltyk, W. (2007): Apoptosis-mediated cytotoxicity of ouabain, digoxin and proscillaridin A in the estrogen independent MDA-MB-231 breast cancer cells. *Archive of Pharmacal Research*. 30(10): 1216–1224.
- Withering, W. (1785): *An Account of the Foxglove, and Some of its Medical Uses*. Cambridge University Press.
- Xue, G. P., Way, H. M., Richardson, T., Joyce, P. A., Drenth, J. y McIntyre, C. L. (2011): Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. *Molecular Plant*. 4: 697-712.
- Yoshimatzu, K., Satake, M., Shimomura, K., Sawada, J. y Terao, T. (1990): Determination of cardenolides in hairy root cultures of *D. lanata* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Natural Products*. 53: 1498-1502.

## **Referencias Bibliográficas**

---

- Zhu, Q., Wu, F., Ding, F., Ye, D., Chen, Y., Li, Y. y Zhifan, Y. (2009): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dioscorea zingiberensis* Wright, an important pharmaceutical crop. *Plant Cell, Tiss and Organ Culture*. 96: 317-324.
- Ziff, O. J., Lane, D. A., Samra, M., Griffith, M., Kirchhof, P., Lip, G. Y. H., Steeds, R. P., Townend, J. y Kotecha, D. (2015): Safety and efficacy of digoxin: systematic review and meta-analysis of observational and controlled trial data. *BMJ*. 351: 4451-4458.
- Zuraida, A. R., Rahiniza, K., Zulkifli, A. S., Alizah, Z., Zamri, Z. y Aziz, A. (2013): Hygromycin as selective marker in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of indica rice MR 219. *Journal Tropical Agriculture and Food Science*. 41(1): 71-79.