

RESUMEN

En este trabajo se analizó la distribución tisular de sanguinarina y berberina en *Argemone mexicana* en diversas etapas de desarrollo y en función de la distribución de los transcritos involucrados en la síntesis de alcaloides. El trabajo incluyó tres componentes: el desarrollo de un método para el análisis y cuantificación de los alcaloides; el análisis detallado de la distribución de los alcaloides en diferentes tejidos y etapas de desarrollo, y en función de la distribución de transcritos, la elaboración de un transcriptoma representativo. El método cromatográfico resultó confiable, reproducible y redujo el tiempo de análisis comparado con otros métodos. Por otro lado, la capacidad de sintetizar sanguinarina apareció desde etapas muy tempranas del desarrollo, mientras que la formación de berberina requirió el desarrollo del tejido fotosintético. La capacidad biosintética de las raíces, evaluada por la acumulación relativa de transcritos, disminuyó conforme el desarrollo de la planta avanzó, aumentando en las partes aéreas, independientemente del patrón de distribución de alcaloides. Finalmente, se seleccionaron los tejidos más representativos para la elaboración de un transcriptoma en el que se encontraron 19 transcritos relacionados con la síntesis de alcaloides. La disponibilidad de este transcriptoma representará una valiosa herramienta para el análisis de los procesos que gobiernan la síntesis de alcaloides en esta planta.

ABSTRACT

The distribution of sanguinarine and berberine was analyzed in *Argemone mexicana* tissues through different stages of development and according to transcripts' abundance of genes involved in the biosynthetic process. This work included three components: the development of a chromatographic method for alkaloid detection and quantitation; a detailed study of alkaloids' distribution through different tissues and stages of development, complemented with the transcriptional profiles associated to alkaloid synthesis and the generation of a transcriptomic collection from radicles and aerial tissues of developing seedlings. The chromatographic method was reliable, reproducible and reduced the time needed for analysis compared to other reported methods. On the other hand, the synthetic capability to produce sanguinarine was present from early developmental stages, whereas that of berberine initiated after the development of photosynthetic tissues. Alkaloid biosynthesis in underground tissues, estimated as the relative accumulation of transcripts, decreased along plant development, in contrast to the observed increase in the aerial parts, independently of alkaloids distribution. Finally, tissues from seedlings at two stages of development were selected based on their alkaloids' profiles to prepare cDNA libraries that were used for massive sequencing and the generation of a *de novo* representative transcriptome. A total of 19 transcripts involved in alkaloids' biosynthesis were identified in this process, suggesting that, besides these, those involved in the regulation of the biosynthetic pathway could also be present. This transcriptome represents a valuable tool that will allow the study of processes regulating alkaloids' biosynthesis in this plant.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
<i>Argemone mexicana</i>	3
Alcaloides presentes en <i>A. mexicana</i>	4
Importancia de los ABIs	5
Distribución taxonómica de los ABIs	5
Ruta biosintética de los ABIs	7
Regulación de la síntesis de ABIs	13
Distribución de los ABIs en la anatomía de las plantas	13
Distribución de los ABIs en los tejidos de <i>A. mexicana</i>	14
Síntesis de ABIs en <i>A. mexicana</i>	15
Herramientas de genómica funcional en el estudio de los alcaloides	16
Herramientas de genómica funcional para el estudio de los ABIs	18
Recapitulación de los antecedentes	19
OBJETIVOS	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL Y DE LAS HERRAMIENTAS UTILIZADAS	23
Estrategia experimental	23
Material biológico	24
Análisis químicos	24
Análisis moleculares	24
Análisis de los transcriptomas	24

MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Obtención del material vegetal.....	25
Análisis fitoquímicos	26
Extracción de los alcaloides	26
Cromatografía en Capa Fina (CCF)	27
Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)	27
Cromatografía de gases masas (CG-EM)	28
Análisis moleculares.....	28
Extracción de ARN	28
Análisis RT-PCR	28
PCR cuantitativo (qPCR).....	29
Construcción de las bibliotecas del ARNm de los transcriptomas.....	30
Secuenciación de las bibliotecas del ARNm.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
Desarrollo de métodos cromatográficos para el análisis de los alcaloides en tejidos de <i>A. mexicana</i>.....	31
Optimización del método CLAE.....	31
Validación del método CLAE-DAD	33
<i>Linealidad y límites de detección del método CLAE</i>	<i>33</i>
<i>Precisión del método CLAE.....</i>	<i>34</i>
<i>Exactitud del método CLAE.....</i>	<i>35</i>
Identificación de los ABIs en los tejidos de <i>A. mexicana</i>	35
<i>Identificación de los alcaloides en plantas adultas de <i>A. mexicana</i></i>	<i>35</i>
<i>Identificación de los alcaloides por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)</i>	<i>39</i>
Cuantificación de los alcaloides por CLAE-DAD.....	42
<i>Contenido de alcaloides en plantas adultas de <i>A. mexicana</i></i>	<i>42</i>
<i>Contenido de alcaloides en tres etapas de desarrollo de <i>A. mexicana</i></i>	<i>44</i>
Recapitulación.....	46
Modulación de la biosíntesis de los alcaloides en un ciclo de desarrollo de <i>A. mexicana</i>.....	48

Perfil de acumulación de los alcaloides durante diferentes etapas de desarrollo.....	48
Análisis transcripcional en la síntesis de los alcaloides de <i>A. mexicana</i>	52
<i>Distribución de los transcritos ABIs en los tejidos de la planta adulta</i>	52
<i>Distribución de los transcritos en etapas tempranas de desarrollo</i>	53
<i>Análisis de los niveles de expresión relacionada con la síntesis de alcaloides durante el desarrollo de A. mexicana</i>	56
<i>Expresión de genes ABIs en las plántulas y plantas juveniles</i>	57
<i>Expresión de genes ABIs en los tejidos de plantas adultas de A. mexicana</i>	58
Resumen.....	60
Correlación entre la transcripción y acumulación de los alcaloides	62
Obtención del transcriptoma a partir de plántulas en desarrollo de <i>A. mexicana</i>	64
Estrategias generales empleadas para obtener los transcriptomas	64
Obtención del transcriptoma de plántulas en desarrollo de <i>A. mexicana</i>	66
Secuenciación masiva.....	68
Reestructuración de las lecturas por calidad	71
Proceso de ensamblado <i>de novo</i> del transcriptoma de <i>A. mexicana</i>	73
Anotación funcional del transcriptoma AMXT-1	76
<i>Anotación funcional general</i>	76
<i>Identificación de genes del metabolismo secundario en el transcriptoma de A. mexicana</i>	78
<i>Identificación de los transcritos ABIs en KEGG y UNIREF100</i>	79
<i>Anotación funcional de los transcritos ABIs con BLAST LOCAL</i>	81
Integración de los transcritos ABIs de <i>A. mexicana</i>	82
Reensamblado del transcriptoma AMXT-1	87
Anotación funcional del transcriptoma AMXT-EI.....	89
<i>Anotación funcional de los transcritos ABIs en el transcriptoma robusto</i>	90
Integración de las posibles isoformas en la ruta de síntesis de los ABIs	93
Estrategias para la obtención de mayor cobertura de los transcritos ABIs	98

Recapitulación de los resultados.....	99
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	103
REFERENCIAS	105
ANEXOS.....	115
Lista de abreviaturas	115
Índice de figuras.....	122
Índice de tablas	127
Lista de reactivos	129
PUBLICACIÓN	131