**Enhancing cardenolides production by *vep1* gene expression in transgenic *Digitalis purpurea* L.**

**POTENCIACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CARDENÓLIDOS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *DIGITALIS PURPUREA* L. QUE EXPRESAN EL GEN *VEP1***

Elizabeth Kairúz Hernández-Díaz1,2,\*, Naivy Pérez-Alonso2,5, Alina Capote2, Anabel Pérez2, Adrian Espinosa Antón1, Elio Jiménez3, Geert Angenon4, Borys Chong-Pérez2,6

**1** 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. CP 54 830 \* Email address: kairuzhd@uclv.edu.cu

**2** Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

3Florida Crystals Corp, 25550 State Road 880 Atlantic Sugar Mill Rd, Belle Glade, FL 33430, USA

4Laboratory of Plant Genetics, Institute for Molecular Biology and Biotechnology, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, B-1050 Brussels, Belgium

5Botanical Solutions SpA, Ave. Quilin 3550, Santiago de Chile, Chile

6Sociedad de Investigación y Servicios BioTECNOS Ltda, Camino a Pangal km 2,5, San Javier, Chile

**ABSTRACT**

Metabolic engineering of *Digitalis purpurea* L. has risen as a powerful biotechnological tool to enhance *in vitro* cardenolides biosynthesis. On this goal, antibiotic selection systems and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation protocols have been developed. In this work, *Arabidopsis thaliana* L. *vep1* gene was expressed in cardenolides-producing *D. purpurea* plants. Hygromycin B was efficiently used as the selectable marker in calli induction and multiplication media. PCR analysis confirmed *hpt* and *vep1* genes on genomic DNA of transformed plants. Also, *vep1* transcriptional activity was measured by reverse transcription-quantitative PCR. Cardenolides content in transgenic lines was quantified by HPLC and compared with non-transgenic plants. Transgenic lines produced significantly higher digitoxin and digoxin concentrations than non-transgenic plants. Genetic transformation allowed to enhance cardenolides production with higher efficiency than other biotechnological strategies. Biomass and uniform cardenolides production *in vitro* will contribute to obtaining widely use drugs, as digoxin, in countries were *D. purpurea* is not cultivated.

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens,*digitoxine, genetic transformation, *hpt*, Progesterone-5β-reductase

**RESUMEN**

La ingeniería metabólica es una prometedora herramienta biotecnológica a emplear para potenciar la biosíntesis de cardenólidos *in vitro* en *Digitalis purpurea* L. Con este objetivo se han desarrollado esquemas de selección con antibióticos y protocolos de transformación vía *Agrobacterium tumefaciens*. En este trabajo se expresó el gen *vep1* de *Arabidopsis thaliana* L. en plantas de *D. purpurea*. Se empleó eficientemente la higromicina B como agente selectivo durante el proceso de inducción y multiplicación de callos. La inserción de los transgenes *hpt* y *vep1* en el genoma de la planta transformada fue confirmada por PCR. Además, se determinó la actividad transcripcional del gen *vep1* mediante amplificación en cadena de la polimerasa cuantitativa del reverso transcripto. El contenido de cardenólidos de las líneas transgénicas fue cuantificado por HPLC y comparado con plantas germinadas *in vitro*. Las líneas transgénicas produjeron concentraciones de digitoxina y digoxina significativamente superiores, con respecto a las plantas no transformadas. La transformación genética permitió potenciar la producción de cardenólidos con mayor eficiencia que otras estrategias biotecnológicas empleadas con este objetivo. La producción uniforme de biomasa y cardenólidos *in vitro*, permitirá obtener medicamentos imprescindibles como la digoxina, en países donde existen limitaciones para su cultivo.

**Palabras clave:** *Agrobacterium tumefaciens,*digitoxina, *hpt*, Progesterona-5β-reductasa, transformación genética