DOI: https://doi.org/10.53287/txcy7580ba27a

Biosíntesis y mejoramiento de la producción de alcaloides en la familia Amaryllidaceae

Review biosynthesis and enhancement of alkaloid production in the Amaryllidaceae family

José Antonio Ruiz Machicao[1*], Patricia Mollinedo[1]

[1]Carrera de Cs. Químicas, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Universidad Mayor de San Andrés, Campus de Cota Cota. La Paz, Bolivia.
*Autor para correspondencia: jrm.qmc@gmail.com

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7494-1354
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3808-2043

FECHA DE RECEPCIÓN: 31 JULIO 2021 **FECHA DE ACEPTACIÓN: 7 NOVIEMBRE 2021**

RESUMEN

Introducción: La presente revisión bibliográfica referencia diversos estudios que describen la biosíntesis de alcaloides en la familia Amaryllidacea. Se toman en cuenta los procesos enzimáticos que rigen la biosíntesis de los metabolitos secundarios y los métodos de estimulación y mejoramiento de la producción de alcaloides.

Objetivo: Determinar, mediante una amplia revisión bibliográfica, los posibles métodos de mejora de la producción de alcaloides.

Metodología: Se realizo una revisión bibliográfica de los documentos más relevantes sobre la biosíntesis de alcaloides de Amaryllidaceae.

Resultados: En esta revisión, es posible establecer una metodología de mejoramiento de la producción de alcaloides tipo crinina/haemantamina en plantas de la familia Amaryllidaceae nativas de Bolivia y evaluar la posibilidad de aplicarla con éxito para la obtención de mejores rendimientos.

PALABRAS CLAVE: Amryllidaceae, alcaloides, biosíntesis de alcaloides, estimulación, norbelladina.

ABSTRACT

Introduction: The referenced studies in this bibliographic review show the alkaloid biosynthesis in the Amaryllidaceae family. Some of the processes involved in the improvement and stimulation of alkaloid production are also taken into account and the enzymatic processes that rule secondary metabolites synthesis are described.

Objective: To determine, through a bibliographic review, possible methods of improving alkaloid production.

Methods: A wide bibliographic review of the most relevant articles about the Amaryllidaceae family alkaloid production was applied.

Results: It was possible to demonstrate that there is the possibility to stablish and develop a successful method to improve the production of crinine/haemanthamine type alkaloids in the Bolivian native family Amaryllidacea and to evaluate the possibility of applying it successfully to obtain better yields.

KEY WORDS: Amaryllidaceae alkaloids, Alkaloid Biosynthesis, Stimulation, norbelladine.

INTRODUCCIÓN

Las rutas biosintéticas de alcaloides son uno de los retos más grandes que ha tenido la química desde el siglo XX hasta la actualidad debido a su diversidad estructural y a la diversidad de plantas que los producen. Los avances en estudios enzimáticos han significado una gran evolución para la elucidación en las rutas biosintéticas para la formación de alcaloides en la naturaleza: Sin embargo, no todas han sido elucidadas. Solo se conocen algunas de las rutas biosintéticas.

Los alcaloides pueden ser clasificados desde el punto de vista biosintético dentro de los siguientes grupos i) Alcaloides derivados de aminoácidos como arginina, lisina, histidina, triptofano, ácido antranpilico y ácido nicotinico ii) Alcaloides puricos iii) Terpenos aminados iv) alcaloides policetidos. (Roberts & Wink, 1998). Debido al interés especifico

alcaloides derivados de aminoácidos, en adelante se discutirán las rutas biosintéticas de estos.

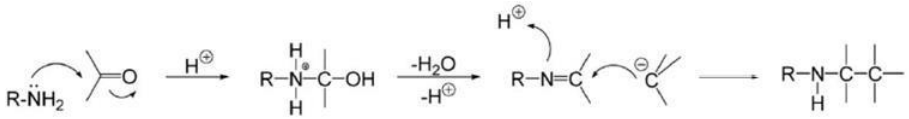
Ruta biosintética general

La ruta básica de la biosíntesis de la mayoría de alcaloides está definida por las siguientes reacciones: i) condensación de un aldehído o cetona con una amina para formar una base de Schiff, ii) el cierre de un anillo acoplado a un sistema aromático y iii) oxidación del grupo hidroxilo de un compuesto fenólico se oxida para formar un radical intermediario altamente reactivo (Cordell, 2011).

i) Reacción de Mannich de una base de Schiff

La formación de una base de Schiff se da cuando una molécula de cetona o un aldehído se condensa con una amina eliminando agua (figura 1). El producto es capaz de atraer nucleófilos de distintas fuentes (Cordell, 2011).

Figura 1 *Mecanismo de la reacción de Mannich*

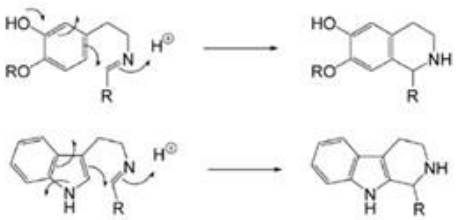


La reacción de Mannich se inicia mediante la adición nucleofílica de la amina al carbonilo del aldehído o cetona para formar el ión iminio. En segundo lugar, se da la enolización por catálisis ácida de un aldehído o cetona y se obtiene un enol que se adiciona al ion iminio para dar el producto final (Base de Schiff).

ii) Condensación de Pictet-Spengler

La base de Schiff puede ser atacada por un anillo aromático, esta reacción se denomina Condensación de Pictet-Spengler (figura 2)

Figura 2. *Mecanismo de la condensación de Pictet-Spengler*

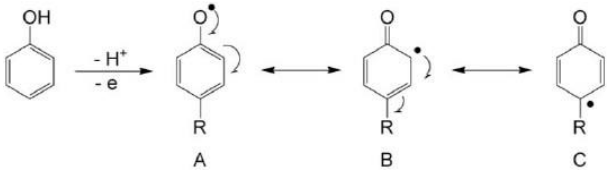


Se trata del cierre de un anillo en una estructura piperidinica por catálisis ácida de una base de Schiff en presencia de un anillo aromático.

iii) Acoplamiento fenólico oxidativo

El grupo hidroxilo de un compuesto fenólico se puede oxidar por la pérdida de un radical hidrógeno formando un radical altamente reactivo que puede unirse a otros radicales para formar una amplia variedad de estructuras mediante enlaces orto-orto, orto-para y para-para (Figura 3).

Figura 3. *Mecanismo del acoplamiento fenólico oxidativo*



Formación de radicales libres y de las especies conjugadas A, B y C por resonancia. Las especies formadas pueden reaccionar entre sí, o con diferentescompuestos para generar nuevas estructuras. Este mecanismo es esencial para la formación de distintos esqueletos de alcaloides.

Estas reacciones son la base de las diferentes rutas de biosíntesis de alcaloides en plantas y que puedan ramificarse dependiendo de los precursores de los grupos de estructuras o esqueletos de alcaloides y los mecanismos específicos de cada especie. (Desgagné-Peenix, 2020).

Ruta biosintética de la norbelladina y 4'O-metilnorbelladina

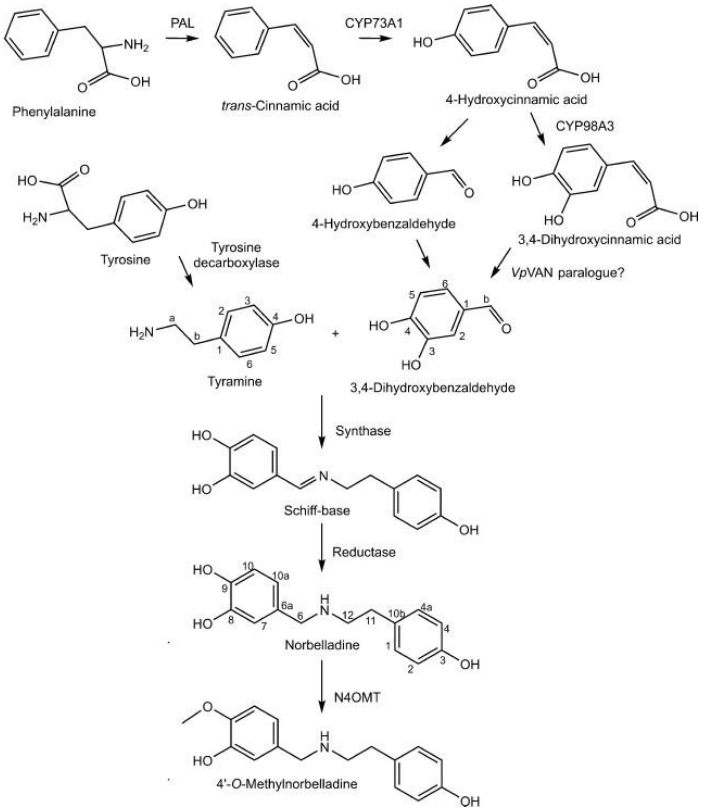
Las reacciones descritas en las figuras 1, 2 y 3 son el núcleo para la formación de fenilalanina

(Ph) y tirosina (Tyr) a partir de los cuales se forman esqueletos precursores como la norbelladina y la 4'O-metilnorbelladina. (Figura 4).

En la figura 4 se describe el mecanismo propuesto por Kilgore y Kutchan para la obtención de

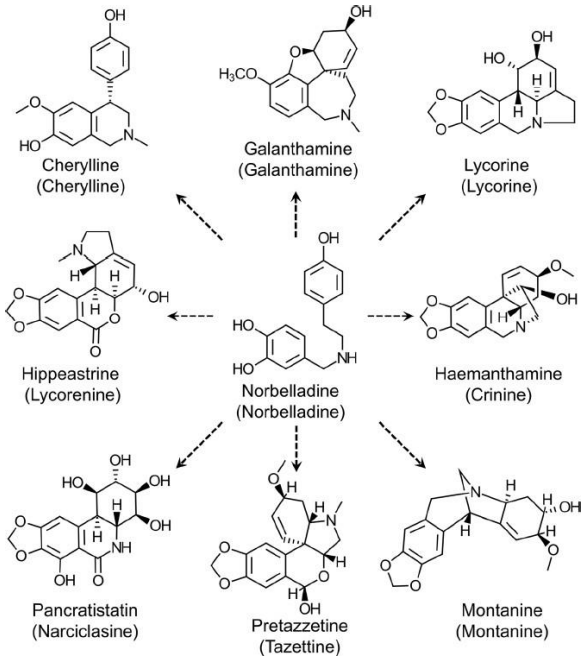
norbelladina y 4’O-metilnorbelladina a partir de Tyr y Ph. A partir de estos se pueden seguir una serie de rutas, que dan como resultado diversas estructuras conocidas de alcaloides típicos de la familia Amaryllidaceae como hemantamina, galantamina y licorina, entre otros. (Cabezas. 2013) La figura 5 muestra algunos de los diferentes esqueletos que se pueden obtener a partir de norbelladina (Desgagné-Peenix, 2020).

Figura 4. *Reacción fenol oxidativa*



Se desarrolla la biosíntesis de precursores norbelladina y 4’O-metilnorbelladina. (Kilgore & Kutchan, 2015).

Figura 5. *Derivados a partir de norbelladina*



Diferentes esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae derivados de norbelladina. (Desgagné-Penix, 2020)

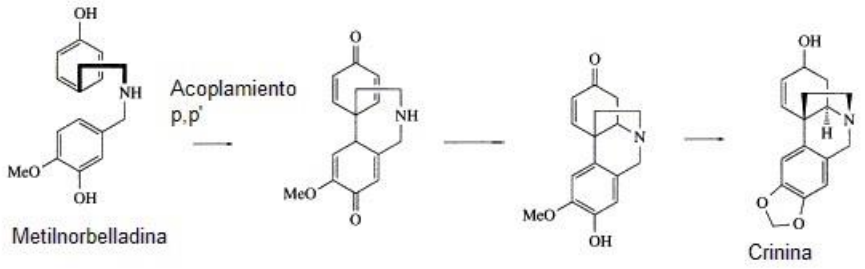
La formación de la estructura del esqueleto de norbelladina, ha sido descrito por diversos autores (Singh et al., 2018; Kilgore, 2015; Cabezas et al., 2013). Una propuesta es la de Kilgore y Kutchan , que muestran que, por un lado, la Ph se transforma en ácido trans cinámico por acción de la L-fenilalanina amino liasa (PAL) y luego se transforma en ácido 4-hidroxicinámico por acción de la trans-cinamato 4- monooxigenasa (CYP73A1). El ácido 4-hidroxicinámico puede transformarse en ácido 3,4- dihidoxicinámico por acción de la hidrogenasa CYP98A3 o convertirse en 4-hidroxibenzaldehido. A partir de ambas estructuras se obtiene 3,4-dihidroxibenzaldehido. Por otro lado, la Tyr se transforma en tiramina por acción de la tirosina decarboxilasa. La tiramina y el 3,4-dihidroxibenzaldehido sufren un acoplamiento para formar una base de Schiff y mediante una enzima reductasa se forma la norbelladina, que, a su vez, se puede transformar en 4'O-metilnorbelladina por acción de la norbelladina 4'O-metiltransferasa (N4OMT). (Ghosal et al. 1988; Liscombe et al., 2012; Singh & Desgagné-Penix, 2014)

Acoplamiento fenol oxidativo para-para de 4'O-metilnorbelladina

Uno de los pasos esenciales en la biosíntesis de alcaloides en la familia Amaryllidaceae es el acoplamiento fenol oxidativo de la 4'O-metilnorbelladina (Desgagné-Penix, 2020) El acoplamiento se puede dar en las posiciones *ortho-para* (*o,p*), dando como resultado esqueletos tipo licorina; en posiciones *para-orto* (*p,o*), resultando en esqueletos tipo galantamina; y en posición *para-para* (*p,p'*), lo que da como resultado estructuras de tipo crinina. El especial interés en compuestos tipo crinina llevan a profundizar en el acoplamiento p,p' de la 4'O-metilnorbelladina.

En la figura 6 se observa el mecanismo general de obtención de crinina donde se muestran las estructuras intermediarias esenciales cuya formación se explica a través de acoplamiento fenol oxidativo *p,p'* de la 4'O-metilnorbelladina. (Berkov, 2020)

Figura 6. *Formación de crinina a través de acoplamiento fenol oxidativo p,p' de la 4'O-metilnorbelladina.*



Se ha reportado por Kilgore et al, el año 2015 que la enzima CYP96T1 y otras enzimas tipo CYP catalizan acoplamientos fenólicos C-C (Cross coupling Carbon-Carbon) para-para, orto- para y para-orto que dan como resultado los esqueletos Noroxomaritidina, Noroxopluviina y N-Dimetilnarwedina, respectivamente. Por otro lado, las publicaciones de Barton, 1963 y Wildman et al. 1962 demuestran mediante incorporación de Ph dopada con C^{14} que la Noroxomaritidina es un precursor de la hemantamina y que la N-dimetilnarwedina es un precursor de la Galantamina. (Barton et al., 1963; Wildman & Fales, 1963).

Según Singh y Desgagné, 2014, se han descubierto una serie de enzimas responsables de los acoplamientos C-C en la biosíntesis de alcaloides y se ha visto que ellas pertenecen

al citocromo P450 de las plantas (Sato, 2011). Por ejemplo, el CYP450s cataliza una serie de reacciones de monooxigenación/hidroxilación, participando en acoplamientos fenólicos C-C.

Ikezawa, (2008), describe que la enzima CYP80G2 participa en la formación de alcaloides tipo aporfina y otra enzima, la salatudirina sintasa, cataliza un acoplamiento *para-orto* en la biosíntesis de alcaloides tipo morfina. (Bastida et al., 2011). No se han descrito enzimas específicas que intervengan en el acoplamiento orto-para, que genera alcaloides tipo licorina. Sin embargo, se describe que la enzima CYP96T1, juega un papel importante en el acoplamiento C-C, en la susutitucion *para-para* del anillo bencénico, que da como resultado (10bR,4aS)-noroxomaritidina y (10bS,4aR)-noroxomaritidina, ambos precursores de alcaloides tipo crinia/haemantamina que son de interés dentro de la familia Amarilladeceae (Lopez et al., 2002; Elgorashi & van Staden, 2009; Singh & Desgagné-Penix 2017).

Genética de la biosíntesis de alcaloides

Estudios llevados por Boycheva et al. 2014 han encontrado grupos de genes (gene clusters) en distintas especies como *Avena spp., Oryza sativa, Sorghum bicolor, Manihot esculenta, Papaver somniferum, Solanum spp*, entre otros (Boycheva et al., 2014) que son responsables de la síntesis de alcaloides. Se postula que estos grupos de genes como los reportados en (Chu et al., 2011) juegan un papel importante en la biosíntesis de alcaloides, ya que se sabe que estos grupos de genes, son activados como un mecanismo de adaptación o defensa para las plantas en condiciones medio ambientales extremas. (Walton, 2000).

Además, se conoce que la síntesis de alcaloides de las especies de la familia Amaryllidaceae tiene una gran dependencia de las condiciones medioambientales y, por ende, es posible una alteración del metabolismo secundario de estas plantas al exponerla a distintos tipos de estrés. (Takos et al., 2011; Takos & Rook, 2013).

La expresión de la información genética en la transcripción y traducción del ARN aislado de*N. pseudonarcissus,* ha logrado desarrollar una base de datos del transcriptoma de

especie. Mediante técnicas de secuenciación BLASTx (Basic Local Alignment Search Tool) se ha logrado analizar y encontrar tres secuencias de nucleótidos candidatas de la síntesis de alcaloides. Entre ellas, la secuencia más larga, de 492bp, ha sido denominada *N. Pseudonarcissus norbelladina sintasa* y el reporte de Signh et al, 2018 ha determinado que codifica una proteína de 163 aminoácidos de peso molecular aproximado de 19kDa.

Por otro lado, mediante extracción y secuenciado ARN de *N. papyraceus,* se ha obtenido el transcriptoma de esta especie y mediante análisis por BLASTx, se han obtenido las enzimas codificantes de alcaloides. La comparación de secuencias codificantes entre distintas especies ha dado como resultado que *N. papyraceus* comparte un 57% de pares homologas de una variante del gen codificante de tiramina decarboxilasa 1 (TYDC1), con la especie *N. pseudonarcissus* y 90% de pares homólogos a un segundo tipo de gen codificante de tiramina decarboxilasa 2 (TYDC2). También se ha visto que *N. papyraceus* tiene un 70% de genes homólogos con TYDC de *Papaver somniferum.* (Hotchandani et al., 2019).

El análisis BLASTx del transcriptoma de ARN de *N. papyraceus* ha logrado identificar dos variantes de tiramina decarboxilasa TYDC, tres variantes completas de codificadores de fenilalanina amonio liasa PAL, al igual que diversas variantes de codificantes de hidrolasa de ácido cinámico C4H, cumarato-CoA ligasa 4CL y de hidroxicinamoil transferasa. (Hotchandani et al., 2019).

Estimulación de la producción de alcaloides

Algunas rutas biosintéticas de alcaloides pueden ser estimuladas con elicitores fúngicos, iones metálicos y radiación UV como, por ejemplo, la síntesis de alcaloides tipo indol en la *especie Catharantus roseus* (Facchini, 2006). Las enzimas TYDC y PAL, tirosina decarboxilasa y fenilalanina amonia liasa, respectivamente, se pueden estimular por tratamiento con elicitores fúngicos para estimular la ruta biosintética de Fachinni, 1996. Este procedimiento ha sido efectivo en pruebas en *Papaver somniferum.* (Luca, 1996) y en Catharanthus roseus (Binder, 2009).

Baldi en 2009 reporta que los elicitores fúngicos promueven la formación de metabolitos secundarios en general. Por otro lado, Pasquali et al. 1992 reportan que algunos elicitores fúngicos estimulan la expresión de genes TYDC y estrictosidina sintasa STR, mediante la activación de factores de transcripción pre existentes (Pasquali et al., 1992). Además, algunas pruebas muestran una mayor producción de enzimas modificadoras de la pared celular vegetal (Menke et al., 1999) y, al mismo tiempo, se observa que plantas tratadas con enzimas TYDC y STR han mostrado un incremento de actividad enzimática codificada por CYTD y STR. (Vázquez-Flota et al., 2000). Del mismo modo, reportes de Zhou, et al. 2020 muestran que algunos elicitores fúngicos tienen un efecto positivo en la acumulación de alcaloides de la especie perteneciente a la familia Amaryllidaceae *Lycoris radiata.*

La producción de enzimas codificadas por TYDC y C4H, pueden ser estimuladas por exposición a la luz. (Vázquez-Flota et al., 2000) (Power et al., 1990) verifican una mayor acumulación de intermediarios de las rutas biosintéticas de alcaloides en plantas irradiadas (Power et al., 1990). Se estima que la regulación de algunas enzimas inducidas por exposición a la luz se da a nivel de la transcripción, es decir en la regulación de la cantidad de ARNm producido. (St-Pierre & De Luca, 1995).

CONCLUSIONES

La biosíntesis de alcaloides de la familia Amaryllidacea, concretamente de alcaloides tipo crinina/hemantamina, se conoce y depende de precursores y procesos enzimático específicos (Desagné-Penix, 2020; Kilgore y Kutchan, 2015 y Liscombe et al., 2012). Se ha determinado que la biosíntesis de alcaloides de estructura molecular tipo crinina, siguen una ruta biosintética que tiene como precursor común la norbelladina y la metilnorbelladina como intermediarios principales. Dichos precursores siguen un acoplamiento fenólico para-para que permite la formación de las moléculas de interés. (Berkov, 2020). Además, se tiene una propuesta del proceso enzimático que permite este acoplamiento donde la enzima principal es CYP96T1 (Kilgore et al., 2015).

Bajo la evidencia citada, se establece que es posible que se mejore la capacidad productora de alcaloides de plantas de la familia Amaryllidaceae mediante la aplicación de diversos métodos.

Los estudios de Luca, (1996) respecto de esta ruta biosintética proponen que la estimulación de una mayor producción de este tipo de alcaloides en plantas de la familia Amaryllidacea, podría darse por la estimulación de la actividad de las enzimas TYDC y PAL que influyen en el proceso de biosíntesis de la norbelladina. De esta manera, el método más sencillo de estimulación de dichas enzimas en el de exposición de la planta a luz UV (Facchini, 2006).

Por otro lado, un método que ha mostrado buenos resultados en la estimulación de la producción de alcaloides es el tratamiento con elicitores fúngicos. (Pasquali et al., 1992). Este método permite la expresión de distintos genes de manera simultánea y la activación de mecanismos de transcripción que son propios de la planta. (Menke et al., 1999).

En vista de la evidencia citada y del potencial que tienen los alcaloides tipo crinia/hemantamina como medicamentos, se propone la potenciación de la síntesis y almacenamiento de este tipo de alcaloides en plantas de la familia Amaryllidacea mediante los métodos previamente citados. Además, entre las plantas de mayor interés de esta familia, en Bolivia se encuentran las especies *Stenomesson spp.* Las cuales se conocen por producir alcaloides tipo crinina/hmantamina.

BIBLIOGRAFÍA

Baldi, A., Srivastava, A. K., Bisaria, V. S. (2009) Fungal Elicitors for Enhanced Production of Secondary Metabolites in Plant Cell Suspension Cultures. SOILBIOL, vol 18.

Barton. D. H. R., Kirby. G. W., Taylor. J. B., Thomas. G. M. (1963) Phenol oxidation and biosynthesis. Part VI. The biogenesis of Amaryllidaceae alkaloids. *J Chem Soc* 866: 4545–4558

Bastida. J., Berkov. S., Torras. L., Pigni. N. B., de Andrade. J. P., Viladomat, F. (2011). Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In Recent Advances in Pharmaceutical Sciences. Trivandrum, India: Transworld Research Network.

Berkov, S., Bastida, J. (2020) Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. The Alkaloids: Chemistry and Biology 83, 113-185.

Binder, B., Peebles. C., Shanks. J., San. K. (2009) The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. Byotechnology Progress. https://doi.org/10.1002/btpr.97

Boycheva. S., Daviet. L., Wolfender. J. L. (2014) The rise of operon-like gene clusters in plants. Trends Plant Sci. 7. 447–459.

Cabezas. F., Pigni. N., Bastida. J., Codina. C., Viladomat F. (2013) Análisis de contenido alcaloidico de *Caliphruria subdentata* Baker (amarryllidaceae) por el método CG-EM. Revista Latinoamericana de Química, 41 (1), 68-73.

Chu. H. Y., Wegel. W., Osbourn. A. (2011). From hormones to secondary metabolism: the emergence of metabolic gene clusters in plants. *The Plant Journal* 66. 66-79.

Cordell. G, A., (2011), Alkaloids and their biosynthesis, Phytochemistry and Pharmacognosy, Encyclopedia of Life Support Systems, 4-5.

Desgagné-Peenix. I. (2020), Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants, Springer Nature, 5.

Elgorashi. E. E., van Staden. J., (2009). Bioactivity and Bioactive Compounds of African Amaryllidaceae, chapter 8.

Facchini. P. J., Johnson. A. G., Poupart. J., De Luca. V. (1996). Uncoupled Defense Gene Expression and Antimicrobial Alkaloid Accumulation in Elicited Opium. The Alkaloids, Vol. 63.

Facchini. P. J., (2006). Regulation of alkaloid biosynthesis in plants. Alkaloids Chem Biol. 63:1-44

Ghosal. S., Shanthy. A., Singh. S. K., (1988). Isocraugsodine, an n-arylidenephenethylamine from *Crinum aszaticum* and its e-z isomerism. Phylochemistry, 27 (6), 1849-1852.

He, S. M., Song, W. L., Cong, K., Wang, X., Dong, Y., Cai, J., (2017). Identification of candidate genes involved in isoquinoline alkaloids biosynthesis in *Dactylicapnos scandens* by transcriptome analysis. Scientific Reports-Nature 7:9119.

Hotchandani. T., Villers. J., Desgagné-Penix. I. (2019). Developmental Regulation of the Expression of Amaryllidaceae Alkaloid Biosynthetic Genes in *Narcissus papyraceus*, Genes 10, 594 (Basel).

Ikezawa. N., Iwasa. K., Sato. F. (2008). Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C-C phenol coupling of (S)-reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells. *Journal of Biological Chemistry*, 14, 8810-8821.

Kilgore. M. B., Kutchan. T. M. (2015) The Amaryllidaceae Alkaloids: biosynthesis and mechanism for enzyme discovery. *Phytochem reviews*, 15(3), 317-337.

Liscombe. D. K., Louie. G. V., Noel. J. P., (2012). Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. *Nat. Prod. Rep*. 29, 1238

Lopez. S., Bastida. J., Viladomat. F., Codina F. (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life sciences*, 71(21), 2521–2529.

Menke. F. L., Parchmann. S., Mueller. M. J., Kijne. J. W., Memelink. J. (1999). Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol,* 119(4), 1289-1296.

Pasquali. G., Goddijn. O. J. M., de Waal. A. (1992). Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant molecular biology*, 18(6), 1121–1131.

Power. R., Kurz. W. G. W., De Luca. V. (1990). Purification and characterization of acetylcoenzyme A: Deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase from *Catharanthus roseus*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 279(2), 370-376.

Roberts, M. F., Wink, M. (1998) Alkaloids Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications, Springer Science, New York, U.S.A, 2-4.

Sato. F. (2011). Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Archives of biochemestry and biophysics*, 507(1), 194-203.

Singh. A., Desgagné-Penix. I., (2014) Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today* 1(3),114-120

Singh. A., Desgagné-Penix. I., (2017). Transcriptome and metabolome profiling of *Narcissus pseudonarcissus* 'King Alfred' reveal components of Amaryllidaceae alkaloid metabolism. *Sci Rep* 7, 17356

Singh, A., Massicotte, M. A., Garand, A., Tousignant, L., Ouellette, V., Bérubé, G., & Desgagné-Penix, I. (2018). Cloning and characterization of norbelladine synthase catalyzing the first committed reaction in Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis. *BMC plant biology*, *18*(1), 1-12.

St-Pierre. B., De Luca. V., (1995). A Cytochrome P-450 Monooxygenase Catalyzes the First Step in the Conversion of Tabersonine to Vindoline in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*. 109(1):131-139.

Takos. A. M., Knudsen. C., Lai. D., (2011). Genomic clustering of cyanogenic glucoside biosynthetic genes aids their identification in Lotus japonicus and suggests the repeated evolution of this chemical defence pathway. *Plant Journal*, 68(2):273–286.

Takos, A. M., Rook, F. (2013) Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International journal of molecular sciences* 14, 11713–11741

Vázquez-Flota. F.A., St-Pierre. B., De Luca. V. (2000). Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry*, 55(6):531-536

Walton, J. (2000) Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fungal genetics and biology*, 30(3), 167–171.

Wildman. H. C., Fales. H. M. (1962). Biosynthesis in the Amaryllidaceae in *Sprekelia formosissim*a the incorporation of 3-c14-tyrosine*. J Am Chem Soc* 84(4), 681–682

Zhou, J., Liu, Z., Wang, S., Li, J., Li, Y., Chen, W., Wang, R. (2020) Fungal endophytes promote the accumulation of Amaryllidaceae alkaloids in *Lycoris radiata*. Environmental microbiology, 22, 1421-1434. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14958