

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Familia Apocynaceae.	3
2.2. <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg) Hansen & Wunderlin.....	3
2.3. Clasificación taxonómica.	5
2.4. Distribución geográfica.	5
2.5. Usos tradicionales de <i>P. andrieuxii</i>	6
2.6. Investigaciones realizadas de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	7
2.7. Cultivo de tejidos vegetales.....	10
2.8. Transformación genética de plantas	11
2.9. Transformación mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	12
2.10. Plásmido Ri.....	12
2.11. Mecanismo de infección de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	14
2.12. Genes <i>Rol</i>	17
2.13. Gen <i>RolA</i>	18
2.14. Gen <i>RolB</i>	19
2.15. Gen <i>RolC</i>	21
2.16. Gen <i>RolD</i>	22
2.17. Terpenos.....	24
2.18. Ruta del Mevalonato (MVA)	28
2.19. Ruta del 2-C-metil-D- eritritol 4-fosfato (MEP)	29
2.20. Ácido Betulínico.....	30
2.21. Urechitol.....	32

3. JUSTIFICACION	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1. Objetivo general.....	35
4.2. Objetivos específicos.....	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1. Propuesta experimental.....	36
5.2. Material vegetal	37
5.3. Adaptación a condiciones de invernadero.....	37
5.4. Inducción de estado de floración	38
5.5. Colecta de material vegetal.....	38
5.6. Preparación de extractos de hoja.....	39
5.7. Cuantificación de Ácido betulínico por HPLC.....	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Inducción de floración.....	41
6.2. Preparación de extractos de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	44
6.2.1. Extractos de hoja de plantas sin florear.	44
6.2.2. Extractos de hoja de plantas en floración.....	45
6.3. Cuantificación de extractos por HPLC.....	46
6.4. Detección y cuantificación de extractos.....	48
6.5. Cuantificación de las muestras de plantas antes de floración.	50
6.6. Cuantificación de las muestras de plantas en floración.....	51
6.7. Cuantificación de antocianinas.....	54
6.8. Cambios morfológicos en hojas.....	55
7. DISCUSIÓN.	56
8. CONCLUSIONES.....	60
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.	61
9. BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Müll. Arg) Hansen & Wunderlin : A) hojas y flores, B) Vainas inmaduras, C) Vainas maduras, D) semillas con vilano y D1) desprovistas de vilano.....	4
Figura 2. Mapa de distribución de <i>Pentalinon andrieuxii</i> . Tomado de Global Biodiversity Information (https://www.gbif.org/species/3618330).	6
Figura 3. A) Detección de Ácido betulínico (BA) en diferentes órganos y estadios de plantas silvestre de <i>P. andrieuxii</i> , B) detección de Urechitol A (UA) en diferentes órganos y estadios de plantas de <i>P. andrieuxii</i> silvestre (Hiebert-Giesbrecht, 2016). ...	9
Figura 4. Estructura del plásmido Ri de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> , tomado de (Chandra, 2012).	14
Figura 5. Mecanismo de infección de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> , tomado de (Citovsky et al., 2007).	16
Figura 6. Proceso de integración del T-DNA de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> a la célula vegetal (Tzfira y Citovsky, 2006).	17
Figura 7. Clasificación de terpenos de acuerdo a las unidades de isoprenos en su estructura, tomado de (Dewick, 2009).	26
Figura 8. Rutas de biosíntesis de precursores de terpenoides (isoprenoides). Tomado de (Moses et al., 2013).	27
Figura 9. Ruta metabólica del Mevalonato (MVA)	28
Figura 10. Ruta metabólica del 2-C-metil-D- eritritol 4-fosfato (MEP).....	29
Figura 11. Estructura química del ácido betulínico. tomado de (Moghaddam et al., 2012).	30
Figura 12. Estructuras de los urechitales, A) Urechitol A, B) Urechitol B. Tomado de (Yam-Puc et al., 2009).	33
Figura 13. Plantas de <i>Pentalinon andrieuxii</i> en cuarto de fisiología vegetal antes de adaptación.....	37
Figura 14. Plantas de <i>Pentalinon andrieuxii</i> en Invernadero de bioseguridad Tipo II	38

Figura 15. Primera planta que se sometió a floración, A) Planta control con 1 semana de fuera del cubículo, B) Planta control con 1 mes fuera del cubículo.	41
Figura 17. A) y A1) Primeras 9 plantas en florear después de 3 semanas ha condiciones ambientales normales de temperaturas e iluminación, B) y B1) Plantas en cubículo, ya en estado de floración.....	42
Figura 16. Distribución de plantas para experimento de floración.....	42
Figura 18. Plantas floreando pasado el mes y medio del experimento de floración, A) plantas con 2 semanas en el cubículo, B) plantas con 1 un mes en el cubículo.	43
Figura 19. Pedúnculos de flores de <i>Pentalinon andrieuxii</i> , como se observa no hay formación de vaina.	43
Figura 20. Primera curva de estándar de AB, para muestras con área bajo la curva menores a 6,000,000.	47
Figura 21. . Segunda curva de estándar de AB a 0.5 %, para muestras con área bajo la curva mayores a 6,000,000.	47
Figura 22. Gráfica de la concentración de ácido betulínico antes de floración de las plantas de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	51
Figura 23. Gráfica de la concentración de ácido betulínico en floración de las plantas de <i>Pentalinon andrieuxii</i> transformadas.....	53
Figura 24. Gráfico de acumulación de antocianinas, en Verde el control negativo y en Azul plantas trasformadas.....	54
Figura 25. Cambios morfológicos en hojas de <i>Pentalinon andrieuxii</i> , A) Control silvestre campo, B) Control Silvestre regenerado de in vitro, C, D, E, F, G) Plantas trasformadas.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	5
Tabla 2. Especies donde se ha aislado ácido betulínico. Tomado de (de los Santos, 2019).....	31
Tabla 3. Relación de plantas sometidas a inducción de floración, ✓: Planta que si floreció, x : Plantas que no florecieron, *: Planta del primer ensayo.	41
Tabla 4. Extractos de hoja de plantas sin florear, C/M : código de la muestra, P.V.SM : peso del vial sin muestra, P.V.CM : peso vial con muestra, P.F.M : peso final de la muestra, P.S.I : peso seco inicial	44
Tabla 5. Extractos de hoja de plantas en estado floración, C/M : código de la muestra, P.V.SM : peso del vial sin muestra, P.V.CM : peso vial con muestra, P.F.M : peso final de la muestra, P.S.I : peso seco inicial, * planta que no floreció.	45
Tabla 6. Datos para cálculos de ejemplo, datos antes de floración.....	48
Tabla 7. Resultados de la cuantificación de AB de las muestras antes de floración, las plantas con las iniciales H y A : Plantas transformadas provenientes de explante de hoja, plantas con iniciales W y G : Plantas transformadas provenientes de explante de hipocótilo.....	50
Tabla 8. . Resultados de la cuantificación de AB de las muestras en floración, las plantas con las iniciales H y A : Plantas transformadas provenientes de explante de hoja, plantas con iniciales W y G : Plantas transformadas provenientes de explante de hipocótilo.....	52
Tabla 9. Concentración de antocianinas	54

ABREVIATURAS

AB: ácido betulínico.

MVA: Ruta del mevalonato.

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento.

UA: Urechitol A.

Rol: Rooting locus.

T-DNA: ADN de Trasferencia.

Plásmido Ri: Plásmido Root-inducing.

MEP: Ruta del 2-C-metil-D- eritritol 4-fosfato.

Gps: gramos de peso seco.

RESUMEN

La transformación genética de plantas es una herramienta que se ha ido desarrollando en el transcurso de los últimos años, que permite realizar modificaciones en el genoma de las plantas que han sido utilizadas como modelos de estudio. Las modificaciones que adquieren son diversas, entre éstas están la resistencia al estrés por causas ambientales, la resistencia a patógenos o herbicidas, la producción de pigmentos que naturalmente no son sintetizados por la planta y la sobreproducción de metabolitos secundarios (MS), entre otros.

Pentalinon andrieuxii es una planta utilizada en la medicina tradicional yucateca para el tratamiento de diferentes enfermedades: contra las mordeduras de serpientes, es usado para aliviar los dolores de cabeza y los disturbios nerviosos. Una de las aplicaciones importantes que tiene esta planta es para el tratamiento de la “úlceras del chiclero”, la cual es una enfermedad cutánea que es provocada por un protozoo del género *Leishmania*. Estudios revelan que *P. andrieuxii* produce compuestos como esteroides y el ácido betulínico (AB), un triterpeno pentacíclico tipo lupano que exhibe una gran variedad de propiedades como anticancerígena y leishmanicida, respectivamente.

En este estudio se analizaron plantas transformadas vía *Agrobacterium rhizogenes*, para detectar y cuantificar la producción de AB en dos estadios diferentes, esto es antes de la floración y durante la floración; antes de la floración las plantas **M, D, A y C** mostraron el aumento de AB, la más significativa fue la **M** la cual aumentó 15 veces más la producción de ácido betulínico con respecto al control silvestre de campo, la planta de origen de hipocótilo **L** fue la que mostró más producción de AB aumentando 3.5 veces. **I, H y K** no tuvieron aumento en la acumulación de ácido betulínico con respecto al control silvestre de campo.

En el estadio de floración la planta **D** mostró un aumento significativo en la sobreproducción de AB, acumulando 19.3 veces más AB, la planta **M** produjo 16.9 veces más AB, la planta **L** produjo 17.5 veces más AB, con respecto al control de campo; de manera general las plantas **H, B, C, E, F, G y N** mostraron un aumento en

la producción de AB, comparado con su producción antes de floración, la planta **A** mostró una disminución aproximada del 40 % en su producción de AB con respecto a su producción antes de la floración, y a las plantas **I, J, K** no se les detectó AB. Con base a los resultados obtenidos la transformación con los genes *rol* tiene un efecto muy positivo para la sobreproducción de ácido betulínico, además se encontró que hay una diferencia positiva en la mayoría de las plantas en la acumulación de AB entre el estado de la floración y antes de la floración.