

INDICE

INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I. ANTECEDENTES	
I. 1. <i>Datura stramonium</i>	
I.1.1. Breve descripción de la especie	6
I.1.2. El uso de las daturas en la antigüedad	8
I.1.3. Actividad farmacológica	10
I.2. Los alcaloides derivados del tropano	
I.2.1. Naturaleza química de los alcaloides derivados del tropano.....	13
I.2.2. Factores que afectan el contenido de los alcaloides del tropano en la planta.....	16
I.2.3. La vía de biosíntesis de los alcaloides del tropano.....	17
I.2.3.1. ¿Es la vía simétrica o asimétrica?.....	18
I.2.3.2. Putrescina-N-metiltransferasa	22
I.2.3.3. N-metil-putrescina oxidasa	22
I.2.3.4. La formación del núcleo de tropano a partir de la sal de N-metil-1-pirrolinio.....	23
I.2.3.5. Tropinona reductasa.....	24
I.2.3.6. Origen de la parte ácida de los ésteres del ácido trópico.....	25
I.2.3.7. 6- β -hidroxihiosciamina hidroxilasa	26
I.2.4. Transporte, almacenamiento y recambio de los alcaloides.....	30
I.2.4.1. Transporte y almacenamiento en vacuola de los MS en cultivos de células	30
I.2.4.2. Mecanismos de concentración de MS dentro de las vacuolas.....	33
I.2.4.3. Recambio de MS en cultivos de células en suspensión.....	34
I.3. Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> como estrategia para la producción de alcaloides derivados del tropano	
I.3.1. Sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	36
I.3.2. El cultivo de células en suspensión y su empleo para la producción de alcaloides del tropano	37
I.3.3. El cultivo de raíces para la producción de alcaloides derivados del tropano.....	42

I.3.4. El cultivo de las raíces peludas.....	46
I.3.4.1. Perspectivas para el escalamiento y la producción de MS a partir de raíces peludas	50
I.4. La enfermedad de las raíces peludas	
I.4.1. Introducción.....	52
I.4.2. Genes <i>vir</i> involucrados en el mecanismo de la infección con <i>A. rhizogenes</i>	54
I.4.3. Posible mecanismo para la transferencia del complejo-T del <i>Agrobacterium</i> a las plantas.....	57
I.4.4. El significado de las auxinas en las raíces peludas.....	58
I.4.5. Opinas.....	62
I.4.6. La naturaleza clonal del cultivo de raíces peludas.....	64
I.5. Cultivos fotoautotróficos	
I.5.1. Introducción.....	66
I.5.2. Condiciones de cultivo que afectan la formación de clorofila, el desarrollo de cloroplastos y el crecimiento fotoautotrófico.....	68
I.5.2.1. Intensidad y calidad de la luz.....	68
I.5.2.2. Carbohidratos.....	69
I.5.2.3. Fitorreguladores.....	70
I.5.2.4. Composición de la fase gaseosa.....	71
I.5.2.5. Requerimientos nutricionales.....	72
I.5.3. Inducción del crecimiento fotoautotrófico.....	72
I.5.4. Métodos de selección de cultivos fotoautotróficos.....	73
I.5.4.1. Cambio de nutrición fotoheterotrófica a fotosintética.....	73
I.5.4.2. Cambio secuencial.....	74
I.5.4.3. Inducción directa bajo condiciones fotosintéticas.....	74
I.5.5. Crecimiento fotosintético y fotoautotrófico de células vegetales.....	75
I.5.5.1. Cultivos de células fotoautotróficas.....	75
I.5.5.2. Cultivos de células fotosintéticas	75
I.5.6. Dependencia del crecimiento fotosintético de la presión parcial de CO ₂ y de la densidad de flujo de fotones	75
I.5.7. Metabolismo y estructura de las células fotoautotróficas	76
I.5.8. Asimilación fotosintética de CO ₂	78
I.5.9. Liberación de oxígeno fotosintético	81

I.5.10. Actividad fotorrespiratoria	81
I.5.11. Transportes en membranas	82
I.6. Metabolismo secundario en cultivos fotoautotróficos de células en suspensión	83
I.7. Cultivos de raíces peludas fotoautotróficos	84
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	
II.1 Hipótesis	87
II.2. Diseño experimental	88
II.2.1. Obtención de líneas de raíces normales y clones de raíces peludas	88
II.2.2. Caracterización de las líneas de raíces normales y las clones de raíces peludas	88
II.2.3. Obtención de cultivos de raíces fotoautotróficas	89
II.2.4. Optimización del medio de cultivo para la inducción de la fotoautotrofia	89
II.2.5. Caracterización de los cultivos de raíces durante la inducción de la fotoautotrofia	90
II.3. Metodología	
II.3.1. Manejo del cultivo	
II.3.1.1. Obtención de plántulas de <i>D. stramonium</i>	91
II.3.1.2. Establecimiento de plantas de <i>D. stramonium in vivo</i>	91
II.3.1.3. Obtención y mantenimiento de los cultivos de raíces normales	92
II.3.1.4. Obtención y mantenimiento de los cultivos de raíces peludas	93
II.3.1.5. Obtención y mantenimiento de los cultivos fotoautotróficos	94
II.3.1.6. Optimización de las condiciones para la inducción de la fotoautotrofia	95
II.3.1.7. Determinación de los parámetros de crecimiento	95
II.3.2. Técnicas Analíticas	
II.3.2.1. Cuantificación de alcaloides totales	96
II.3.2.2. Cuantificación de hiosciamina y de escopolamina	96
II.3.2.3. Cuantificación de clorofilas en hojas y en raíces verdes de <i>D. stramonium</i>	98
II.3.2.4. Cuantificación de las tasas de consumo y liberación de oxígeno en tejidos fotosintéticos de <i>D. stramonium</i>	
II.3.2.4.1. Ajuste del oxígrafo	99
II.3.2.4.2. Medición de las tasas fotosintéticas	99
II.3.2.5. Determinación de la fijación de $^{14}\text{CO}_2$	100

II.3.2.6. Ensayos enzimáticos para Rubisco y PEP carboxilasa	101
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION	
III.1. Raíces normales	
III.1.1. Establecimiento del cultivo	103
III.1.2. Caracterización de los cultivos	
III.1.2.1. Caracterización de la línea 1	106
III.1.2.2. Caracterización de la línea 5	107
III.1.2.3. Caracterización de la línea 9	108
III.1.3. Estabilidad en la producción de alcaloides	109
III.1.4. Contenido y productividad de alcaloides en los cultivos de raíces normales	110
III.1.5. Inducción del enverdecimiento en cultivos de raíces normales	113
III.2. Raíces transformadas	
III.2.1. Obtención de las clonas	115
III.2.2. Caracterización de las clonas	
III.2.2.1. Caracterización de la clona N	116
III.2.2.2. Caracterización de la clona T	117
III.2.3. Contenido y productividad de alcaloides	119
III.2.4. Estabilidad en la producción de hiosciamina y de escopolamina en las líneas de raíces transformadas	122
III.3. Cultivos de raíces fotoautotróficas	
III.3.1. Selección del medio para enverdecimiento	123
III.3.2. Caracterización de la clona I en 1% de sacarosa y bajo luz continua	
III.3.2.1. Caracterización del crecimiento y del contenido de alcaloides	125
III.3.2.2. Morfología del tejido enverdecido	127
III.3.2.3. Efecto en la producción de clorofilas y en la actividad fotosintética	128
III.3.3. Efecto de la intensidad luminosa en los cultivos en 1% de sacarosa y luz continua	130
III.3.4. Efecto de la inducción de la fotoautotrofia en la biosíntesis de clorofilas y la relación de clorofilas A/B	131
III.3.5. Efecto de la inducción de la autotrofia sobre las tasas de consumo y de liberación de oxígeno	132
III.3.6. Efecto de la inducción de la fotoautotrofia en las actividades de las enzimas fijadoras de CO ₂ : Rubisco y PEP carboxilasa	134

III.3.7. Fijación del $^{14}\text{CO}_2$	135
III.3.8. Comprobación de la fotoautotrofia	135
III.3.9. Efecto de la inducción de la fotoautotrofia en el contenido y la bioproduktividad de alcaloides derivados del tropano	136
CAPITULO IV. CONCLUSIONES	139
CAPITULO V. BIBLIOGRAFIA	144