



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACION CITOGENETICA DE RAICES CULTIVADAS in vitro DE
Datura stramonium PRODUCTORAS DE ALCALOIDES DERIVADOS DEL
TROPANO.**

TESIS

PRESENTADA POR

JOSE ALFREDO RUIZ SOSA

**EN SU EXAMEN PROFESIONAL
EN OPCION AL TITULO DE**

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

BIBLIOTECA CICY

MERIDA, YUCATAN, MEXICO.

1993

INDICE

Indice	i
Lista de figuras	v
Lista de cuadros	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCION	1
Capítulo I	
ANTECEDENTES	2
I.1.Sistemática de <i>Datura stramonium</i>	2
I.2.Metabolitos secundarios	2
I.2.1.Alcaloides	4
I.2.1.1.Alcaloides derivados del tropano	4
I.3.Obtención de metabolitos secundarios a partir de cultivos <i>in vitro</i>	6
I.3.1.Transformación con <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	7
I.4.El crecimiento y su evaluación	8
I.4.1.División celular	9
I.5.Crecimiento y producción de alcaloides	11
I.6.Citogenética de cultivos <i>in vitro</i>	12
I.6.1.Estabilidad genética de cultivos transformados	13
I.7.Cariotipo	14
I.7.1.Cariotipo de <i>Datura stramonium</i>	15
OBJETIVOS	16
HIPOTESIS	16

Capítulo II

MATERIALES Y METODOS

II.1.Material biológico	17
II.1.1.Plantas de <i>Datura stramonium</i>	17
II.1.2.Cultivo de raíces normales (RN)	19
II.1.3.Cultivo de raíces transformadas (RT)	22
II.2.Técnicas analíticas	22
II.2.1.Determinación del índice mitótico (I.M.)	22
II.2.2.Cuantificación del contenido de alcaloides	23
II.2.3.Análisis de alteraciones cromosómicas	25
II.2.4.Análisis de cariotipos	25
II.2.5.Evaluación del crecimiento	27
II.2.5.1.Medición del peso fresco	27
II.2.5.2.Medición del peso seco	28
II.2.5.3.Medición del pH	28
II.2.5.4.Medición de la conductividad	28
II.2.5.5.Evaluación del I.M.	28
II.2.5.6.Evaluación del crecimiento de meristemas radiculares primarios	28
II.2.5.7.Evaluación del crecimiento y desarrollo de raíces	29
II.3.Metodología	29
II.3.1.Ciclo de 26 h	29
II.3.2.Estabilidad cromosómica	29
II.3.3.Curva de crecimiento	30

Capítulo III

RESULTADOS 31

III.1.Obtención de plantas de <i>Datura stramonium</i>	31
III.2.Ciclo de 26 h	32
III.3.Estabilidad cromosómica	37
III.3.1.Frecuencia de alteraciones cromosómicas	37
III.3.2.Cariotipo	40
III.4.Patrón de crecimiento de las líneas T y N	46
III.4.1.Crecimiento y producción de alcaloides	49
III.4.2.Crecimiento meristemático	52
III.4.3.Crecimiento y desarrollo de raíces a partir de zonas meristemáticas	54

Capítulo IV

DISCUSION 58

IV.1.Obtención de plantas de <i>Datura stramonium</i>	58
IV.2.Patrón de división celular a lo largo de un día en la fase exponencial de crecimiento en cultivos <i>in vitro</i>	59
IV.3.Producción de alcaloides en la fase exponencial de cultivos <i>in vitro</i> a lo largo de un día	60
IV.4.Estabilidad genética de los cultivos	61
IV.5.Patrón de crecimiento de cultivos <i>in vitro</i> a través de un ciclo de cultivo	63
IV.6.Relación entre división celular y producción de alcaloides	64
IV.7.Patrón de crecimiento y desarrollo de raíces normales vs raíces transformadas	65

CONCLUSIONES

66

REFERENCIAS

67

RESUMEN

Se ha determinado que los cultivos celulares desorganizados tienen una producción inestable de metabolitos secundarios. Existen ejemplos de estos cultivos en diferentes especies y se ha sugerido que la variación genética es uno de los principales factores que contribuyen a esta inestabilidad. El cultivo de órganos se ha utilizado como una alternativa para reducir estos problemas, ya que el grado de diferenciación y de organización celular que implica un cultivo de este tipo favorece la síntesis de metabolitos secundarios. Los cultivos de raíces obtenidos por transformación con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* muestran un espectro de metabolitos secundarios cualitativa y cuantitativamente similar al de la planta madre con una producción estable aún después de varios años.

Con relación al metabolismo secundario, se ha reportado que la máxima producción de éstos compuestos puede ocurrir en la fase estacionaria o en la fase logarítmica de crecimiento, inmediatamente después de cada división celular.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la estabilidad genética de cultivos *in vitro* de raíces de *Datura stramonium* y establecer la relación entre la división celular y la producción de alcaloides derivados del tropano a lo largo de un ciclo de crecimiento. El estudio refiere a dos cultivos diferentes de raíces, uno de raíces transformadas y otro de raíces normales.

Los resultados indican, que tanto el cariotipo como el número cromosómico diploide ($2n = 24$), se mantiene en los cultivos transformados igual que en las plantas (control). En contraste, en el cultivo de raíces normales, cuyo crecimiento requiere de auxinas exógenas, aunque el número diploide ($2n = 24$) se presenta en una alta frecuencia, el cariotipo muestra una variación a nivel morfológico. También se observa una variación en el número cromosómico, el cual se presenta en un rango de 20 a 51 cromosomas. El análisis de las alteraciones cromosómicas en ambos cultivos *in vitro*, señala daños a nivel de centrómero y de rompimientos cromosómicos con valores menores al 0.01 %. El control

no presenta anormalidades celulares. La frecuencia de división celular expresada como índice mitótico, a lo largo de un ciclo de crecimiento, presenta "poblaciones celulares" con un patrón determinado de crecimiento en tiempos específicos de la fase logarítmica de cada cultivo. El análisis del contenido de los alcaloides hiosciamina y escopolamina a lo largo de dicho ciclo, sugiere que no hay una relación directa con la división celular.