



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

CARACTERIZACION CITOGENETICA Y EVALUACION DE
LA PRODUCCION DE ALCALOIDES EN RAICES CULTIVA-
DAS *in vitro* DE *Catharanthus roseus*, CRECIDAS BAJO DIFE-
RENTES CONCENTRACIONES DE ACIDO NAFTALEN
ACETICO.

TESIS

PRESENTADA POR:

JOSE ALBERTO NARVAEZ ZAPATA

EN SU EXAMEN PROFESIONAL

EN OPCION AL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

BIBLIOTECA CICY

MERIDA, YUCATAN, MEXICO

1995

INDICE

Contenido	Página
Indice	i
Lista de figuras	iv
Lista de tablas	v
Lista de fotografías	vi
Resumen	vii
 I. Introducción.	 1
 II. Revisión de literatura.	 3
2.1. <i>Catharanthus roseus</i> .	3
2.1.1. Sistemática de la especie.	3
2.1.2. Distribución y descripción de <i>Catharanthus roseus</i> .	5
2.1.3. <i>Catharanthus roseus</i> como planta medicinal.	6
2.2. Metabolitos secundarios.	6
2.2.1. Descripción y clasificación.	6
2.2.2. Obtención de metabolitos secundarios a partir de cultivos <i>in vitro</i> .	8
2.2.3. Transformación genética con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .	10
2.3. Alcaloides.	10
2.3.1. Generalidades.	10
2.3.2. Distribución en la naturaleza.	11
2.3.3. Clasificación.	14
2.3.4. Alcaloides indólicos.	15
2.4. Fitorreguladores.	16
2.4.1. Descripción y clasificación.	16
2.4.2. Uso de los fitorreguladores en el cultivo de tejidos vegetales.	16
2.5. Crecimiento y división celular.	17
2.5.1. El crecimiento y su evaluación.	17
2.5.2. División celular.	18
2.5.3. Crecimiento y producción de alcaloides.	19
2.6. Citogenética.	20
2.6.1. Citogenética de cultivos <i>in vitro</i> .	20
2.6.2. Cariotipo.	22

2.6.3. Cariotipo de <i>C. roseus</i> .	Página 23
III. Material y métodos.	24
3.1. Cultivo de raíces.	24
3.1.1. Material biológico.	24
3.1.2. Cultivo de raíces normales y transformadas.	24
3.2. Caracterización citogenética y evaluación de la producción de alcaloides en cultivos de raíces crecidas a diferentes concentraciones de ácido naftalen acético.	28
3.2.1. Colecta de material.	28
3.2.2. Análisis a través de un ciclo de cultivo.	28
3.2.3. Análisis a través de las resiembras.	28
3.3. Cuantificación del crecimiento.	29
3.3.1 Evaluación del crecimiento.	29
3.3.2. Medición del peso fresco.	29
3.3.3. Medición del peso seco.	29
3.3.4. Evaluación de la conductividad.	30
3.3.5. Determinación del pH.	30
3.4. Análisis citogenético.	31
3.4.1. Cuantificación del índice mitótico.	31
3.4.2. Determinación del número cromosómico y cariotipo.	33
3.4.3. Análisis de las alteraciones cromosómicas.	34
3.5. Producción de alcaloides.	35
3.5.1. Extracción de alcaloides.	35
3.5.2. Cuantificación de alcaloides.	37
IV. Resultados.	38
4.1. Caracterización de los cultivos de raíces normales a través de un ciclo de cultivo.	38
4.1.1. Medición del peso fresco y seco.	38
4.1.2. Determinación de la conductividad y del pH.	40
4.1.3. Producción de alcaloides en tejido y en el medio de cultivo.	40
4.2. Análisis citogenético.	43
4.2.1 Índice mitótico.	43
4.2.2. Determinación del número cromosómico	45

	Página
4.2.3. Cariotipo.	45
4.2.4. Frecuencia de alteraciones cromosómicas.	50
4.3. Análisis del crecimiento y la producción de alcaloides a través de las resiembras en cultivos de raíces normales.	53
4.3.1. Evaluación del peso fresco y seco.	53
4.3.2. Determinación de la conductividad y del pH.	53
4.3.3. Producción de alcaloides en tejido y en el medio de cultivo.	56
4.4. Análisis del crecimiento y la producción de alcaloides a través de las resiembras en cultivos de raíces transformadas.	59
4.4.1. Evaluación del peso fresco y seco.	59
4.4.2. Determinación de la conductividad y del pH.	62
4.4.3. Producción de alcaloides en tejido y en el medio de cultivo.	62
V. Discusión.	67
5.1. Caracterización de los cultivos de raíces normales a través de un ciclo de cultivo.	67
5.1.1. Determinación del peso fresco y seco.	67
5.1.2. Determinación de la conductividad y del pH.	68
5.1.3. Determinación del índice mitótico.	68
5.1.4. Producción de alcaloides en tejido y medio de cultivo.	70
5.2. Análisis citogenético.	71
5.2.1. Determinación del número cromosómico.	71
5.2.2. Cariotipo.	72
5.2.3. Frecuencia de alteraciones cromosómicas.	73
5.3. Análisis del crecimiento y la producción de alcaloides a través de las resiembras.	74
5.3.1. Determinación del peso fresco y seco.	74
5.3.2. Determinación de la conductividad y del pH.	75
5.3.3. Producción de alcaloides en tejido y medio de cultivo.	75
5.4. Análisis del crecimiento y la producción de alcaloides a través de las resiembras en cultivos de raíces transformadas.	76
5.4.1. Evaluación del peso fresco y seco.	76
5.4.2. Determinación de la conductividad y del pH.	77
5.4.3. Producción de alcaloides en tejido y medio de cultivo.	77
VI. Conclusión.	79
VII. Referencias.	80

RESUMEN

Algunas de las limitantes al emplear el cultivo de tejidos vegetales para la obtención de metabolitos secundarios a nivel comercial, son la baja productividad y el mantenimiento de la misma a través del tiempo. Se ha considerado que una de las razones para la falta de estabilidad en dicha producción, es la variabilidad en el número cromosómico de los cultivos *in vitro*. Esta variabilidad está influenciada por la organización del cultivo, las condiciones de crecimiento y la transformación genética con *Agrobacterium*. En base a la hipótesis de que los cultivos organizados son estables genéticamente, se procedió a conocer el efecto de las auxinas exógenas sobre el complemento cromosómico y la producción de alcaloides en cultivos de raíces normales y transformadas de *C. roseus*. Los resultados indican que los cultivos de raíces normales crecidos bajo dos diferentes concentraciones del ácido naftalen acético presentan cierta variación cromosómica, ya que hubo entre un 77 y 84 % de células diploides ($2n=16$). Se observó que la auxina en mayor concentración induce preferentemente la frecuencia de células tetraploides, mientras que en una menor la de células aneuploides. El cariotipo diploide de estos cultivos presentó la misma fórmula cromosómica que la planta *in vivo* ($6m + 1m + 1st (sat)$). En cuanto a la producción de alcaloides totales a través de los subcultivos, también se presentó variación en un rango de 4.5 a 13 mg/g de P.S. Con un coeficiente de variación (CV) del 50% en estos cultivos de raíces normales. En comparación los cultivos de raíces transformadas mantenidos bajo las mismas concentraciones del fitorregulador presentan una ligera variación (CV= 12%) en la producción de alcaloides totales (4.5 a 9.5 mg/g de P.S.), sin variación cromosómica. Lo anterior sugiere que la transformación confiere una mayor estabilidad a los cultivos de raíces y que la presencia de la auxina puede modificar dicha estabilidad, lo cual tiene un efecto en su productividad de alcaloides.