

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 5 |
| II.1 SIMBIOSIS MICORRÍZICA | 5 |
| II.1.1 Concepto y clasificación | 5 |
| II.2 MICORRIZAS VESICULO-ARBUSCULARES (MVA) | 8 |
| II.2.1 Fisiología de las MVA | 9 |
| II.2.2 Importancia de las micorrizas | 13 |
| II.2.3 Factores que influencian a las micorrizas | 17 |
| II.2.4 Fuentes de propágulo de las MVA | 18 |
| II.3 MICORRIZACIÓN <i>in vitro</i> | 20 |
| II.4 <i>Catharanthus roseus</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL | 21 |
| II.5 METABOLITOS SECUNDARIOS | 23 |
| II.5.1 Alcaloides | 24 |
| II.6 CULTIVO DE ÓRGANOS PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS | 25 |
| II.6.1 Raíces transformadas (Hairy roots) | 26 |
| II.7 IMPORTANCIA DE <i>Catharanthus roseus</i> COMO MODELO DE MICORRIZACIÓN <i>in vitro</i> | 28 |
| III. OBJETIVO GENERAL | 30 |
| III.1 METAS | 30 |
| IV. HIPÓTESIS | 32 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| V.1 MATERIAL BIOLÓGICO | 33 |
| V.2 MATERIAL INOCULANTE | 33 |
| V.3 MÉTODOS | 34 |
| V.3.1 Mantenimiento de raíces transformadas | 34 |
| V.3.1.1 Establecimiento de raíces transformadas bajo condiciones mínimas de fósforo | 35 |
| V.3.2 Cuantificación de alcaloides totales | 35 |
| V.3.3 <i>Catharanthus roseus</i> en condiciones silvestres | 38 |
| V.3.3.1 Metodología de tinción de raíces | 38 |

| | |
|--|-----------|
| V.3.4 Establecimiento de un cepario | 39 |
| V.3.5 Obtención de esporas asépticas | 41 |
| V.3.5.1 Extracción de esporas | 41 |
| V.3.5.2 Asepcia de esporas | 42 |
| V.3.6 Germinación de esporas | 43 |
| V.3.6.1 Efecto de la temperatura de incubación y el medio de cultivo sobre la germinación de esporas. | 43 |
| V.3.7 Colecta de esporas de duna costera | 44 |
| V.3.8 Inoculación <i>in vitro</i> | 44 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 47 |
| VI.1 ESTABLECIMIENTO DE RAICES TRANSFORMADAS BAJO CONDICIONES MÍNIMAS DE FÓSFORO | 47 |
| VI.1.1 Efecto de diferentes concentraciones de fósforo sobre el crecimiento. | 47 |
| VI.1.2 Cuantificación de alcaloides totales. | 49 |
| VI.2 <i>Catharanthus roseus</i> EN CONDICIONES SILVESTRES | 50 |
| VI.2.1 Colecta de esporas de duna costera | 50 |
| VI.2.2 Determinación de la asociación micorrízica | 52 |
| VI.3 ESTABLECIMIENTO DEL CEPARIO | 54 |
| VI.3.1 Evaluación del % de infección | 54 |
| VI.3.2 Densidad de las esporas. | 54 |
| VI.4 OBTENCIÓN DE ESPORAS ASÉPTICAS | 55 |
| VI.4.1 Extracción de esporas | 55 |
| VI.5 GERMINACIÓN DE ESPORAS | 56 |
| VI.6 INOCULACIÓN <i>in vitro</i> | 59 |
| VII. CONCLUSIÓN | 65 |
| APÉNDICE A | 67 |
| APÉNDICE B | 70 |
| APÉNDICE C | 72 |
| REFERENCIAS | 85 |

RESUMEN

En la naturaleza las micorrizas vesículo-arbusculares otorgan una amplia gama de beneficios a las plantas hospederas (Mukerji, et. al.; 1988), debido principalmente a que las hifas de éstas se extienden dentro del suelo considerablemente más que los pelos radiculares aumentando de este modo la zona de absorción de los nutrientes presentes en el suelo. Entre los principales beneficios se encuentran en mejoramiento del estado nutricional, una mayor resistencia al estrés hídrico, menor incidencia de ataques patogénicos (Siqueira, 1988) y además ayudan a disminuir la erosión del suelo.

En los últimos años, la tecnología de raíces transformadas (hairy roots) ha despertado gran interés debido a las ventajas que éstas presentan con respecto a otros tipos de cultivos vegetales *in vitro*. Estas raíces se obtienen mediante la inserción de una parte del genoma T-DNA del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* en el genoma vegetal. Tales raíces presentan una elevada estabilidad genética, gran capacidad de ramificación y producción de biomasa lo cual representa un modelo ideal para la producción masiva de inóculo (Bécard y Piché, 1992), así como una alta producción de metabolitos secundarios (Loyola-Vargas y Mirand-Ham, 1995).

Catharanthus roseus ha sido uno de los modelos más estudiados en cultivo de tejidos vegetales en cuanto a la obtención de metabolitos secundarios, puesto que esta

especie produce una gran variedad de alcaloides indólicos, compuestos farmacológicamente activos (Naaranlathi, et. al., 1989; Van Der Heijden et. al., 1989).

La micorrización *in vitro* juega un papel importante en la absorción de fósforo por parte de la planta hospedera, sin embargo este elemento influye directamente en la acumulación de alcaloides en la planta, es por eso que se tiene el interés de inducir la micorrización *in vitro* en raíces transformadas de *C. roseus*. Por otro lado, la micorrización *in vitro* representa un reto importante, ya que se podrá utilizar como modelo para el estudio de dicha asociación y además permitirá estudiar su efecto en la acumulación de alcaloides.