

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION 1

CAPITULO 1: ANTECEDENTES

1.1	GENERALIDADES	5
1.2	DESCRIPCION DE LA PLANTA	6
1.3	CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	7
1.4	RAICES TRANSFORMADAS	8
1.5	VIAS METABOLICAS EN PLANTAS	10
1.6	SINTESIS DE ALCALOIDES INDOLICOS	11
1.7	ESTRICTOSIDINA SINTASA EN <i>C. roseus</i>	12
1.8	PROBABLES SITIOS DE REGULACION METABOLICA DE LOS ALCALOIDES INDOLICOS EN <i>C. roseus</i>	14
1.9	CLONACION DE GENES	15

CAPITULO 2: OBJETIVO 21

CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

3.1	MATERIAL BIOLOGICO	22
3.1.1	CLONA DE ADNc DE SSS	
3.1.2	BIBLIOTECA DE ADNc DE RAICES TRANSFORMADAS DE <i>C. roseus</i>	
3.1.3	<i>E. coli</i> Y1090	
3.2	DISEÑO EXPERIMENTAL	24
3.3	METODOS	
3.3.1	OBTENCION DE LA SONDA	
3.3.1.1	PROPAGACION DE LA CLONA DE SSS PARA LA EXTRACCION DEL PLASMIDO	25
3.3.1.2	AISLAMIENTO DEL PLASMIDO	25
3.3.1.3	CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS	27
3.3.1.4	CORTE DEL PLASMIDO	27
3.3.1.5	ELECTROFORESIS DE ADN	27
3.3.1.6	PURIFICACION Y OBTENCION DE LA SONDA DE SSS	27
3.3.1.7	MARCAJE DE LA SONDA CON ^{32}P [dCTP]	28
3.3.2	TAMIZADO DE LA BIBLIOTECA DE ADNc	
3.3.2.1	CRECIMIENTO DE <i>E. coli</i> Y1090	29
3.3.2.2	PLAQUEO	29
3.3.2.3	PREPARACION DE LAS MEMBRANAS PARA HIBRIDIZAR	31
3.3.2.4	HIBRIDACION CON LA SONDA MARCADA	30
3.3.2.5	REVELADO DE LAS PELICULAS	32
3.3.2.6	AISLAMIENTO DE LAS CLONAS PUTATIVAS POSITIVAS	32

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.1	AISLAMIENTO DEL PLASMIDO	34
4.1.2	CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS	35
4.1.3	CORTE DEL PLASMIDO	35
4.1.4	PURIFICACION Y MARCAJE DE LA SONDA DE SSS	39
4.2	TAMIZADO PRIMARIO DE LA BIBLIOTECA DE ADNc	39
4.3	PURIFICACION DE LAS CLONAS PUTATIVAS POSITIVAS	44

CAPITULO 5: CONCLUSION

46

ANEXO

47

BIBLIOGRAFIA

50

RESUMEN

Las raíces transformadas de *Catharanthus roseus* cultivadas *in vitro* tienen la capacidad de sintetizar y acumular alcaloides indólicos de manera muy similar al de una planta completa. Si bien se han invertido muchos esfuerzos en el estudio de los aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de la síntesis de los alcaloides, aún se está lejos de tener un panorama completo. En el presente trabajo se decidió utilizar una estrategia molecular para el inicio del estudio de la estrictosidina sintasa, una de las enzimas claves involucradas en la biosíntesis de los alcaloides en raíces transformadas de *C. roseus*. Esta estrategia consistió principalmente en la hibridización de una sonda homóloga de esta enzima marcada radiactivamente, proveniente de la parte aérea de la planta, con una biblioteca de ADN complementario obtenido de raíces transformadas de *C. roseus* en su etapa de máxima producción de alcaloides. De los resultados observados en las autorradiografías, se identificaron y aislaron las clonas que dieron señales positivas. Lo que indica que el gen de la estrictosidina sintasa se encuentra representado dentro de la biblioteca de ADN complementario de raíces transformadas de *C. roseus*.