

ÍNDICE

RESUMEN	1
CAPITULO 1. INTRODUCCION	2
CAPITULO 2. ANTECEDENTES	4
2.1. <i>Catharanthus roseus</i>	4
2.2. Cultivo de raíces	4
2.2.1. Cultivo de raíces transformadas	7
2.3. Cultivo de tejidos fotoautotróficos	11
2.3.1. Cultivos de raíces peludas fotoautotróficas	13
2.3.2. Factores ambientales y nutritivos que influencian el desarrollo de un cultivo fotoautotrófico	14
2.3.2.1. Inducción del crecimiento fotoautotrófico	14
2.3.2.2. Luz	15
2.3.2.3. Aereación	17
2.3.2.4. Carbohidratos	18
2.4. Metabolismo secundario	19
2.4.1. Metabolismo secundario en cultivo de tejidos de <i>Catharanthus roseus</i>	21
2.4.2. Biosíntesis de los alcaloides de <i>Catharanthus roseus</i>	24
2.4.3. Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa	32
2.4.4. Fosfoenolpiruvato carboxilasa	36
2.4.5. 3-Hidroxi-3metylglutarylCoA reductasa	37
CAPITULO 3. MATERIALES Y METODOS	41
3.1. Objetivos	41
3.2. Plan de trabajo	41
3.2.1. Selección y caracterización de cultivos heterotróficos de raíces peludas de <i>C. roseus</i>	41
3.2.2. Obtención de cultivos fotoautotróficos de raíces peludas de <i>C. roseus</i>	42
3.2.3. Optimización de las condiciones para la inducción de la fotoautotrofia	43
3.3. Metodología	43

3.3.1. Obtención de las líneas celulares de <i>Catharanthus roseus</i>	43
3.3.2. Mantenimiento de los cultivos de raíces transformadas de <i>C. roseus</i>	44
3.3.3. Obtención y mantenimiento de los cultivos fotoautotróficos	44
3.3.4. Determinación de los parámetros de crecimiento	44
3.4. Técnicas analíticas	45
3.4.1. Cuantificación de clorofilas en hojas y raíces transformadas de <i>Catharanthus roseus</i>	45
3.4.2. Medición de las tasas fotosintéticas	45
3.4.3. Ensayos enzimáticos para rubisco y PEP carboxilasa	46
3.4.4. Determinación de proteínas	47
3.4.5. Ensayos enzimáticos para HMGR	48
CAPITULO 4. RESULTADOS	50
4.1. Caracterización de los cultivos	50
4.1.1. Caracterización de las líneas LM2, A2, A3, A3B y J1 de raíces transformadas de <i>Catharanthus roseus</i>	50
4.2. Caracterización de las clonas A3B y J1 en 1, 0.3 y 0.3% de sacarosa + 2% de CO₂, bajo luz continua	61
4.2.1. Caracterización del crecimiento	61
4.2.2. Producción de clorofilas	66
4.2.3. Respiración	68
4.2.4. Actividad fotosintética	72
4.2.5. Actividad enzimática de rubisco y PEP carboxilasa	75
4.2.6. Efecto en la actividad enzimática de la HMGR	78
CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFIA	83

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de líneas fotoautotróficas de raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, con el objeto de estudiar el comportamiento de las enzimas rubisco, PEP carboxilasa y HMGR durante el proceso de diferenciación celular. Previamente se ha reportado que se requiere de la presencia de cloroplastos para que se lleve a cabo la biosíntesis de vindolina, el cual forma parte de los alcaloides bisindólicos vincristina y vinblastina, ambos de gran importancia económica. Debido a que hasta ahora no se ha descrito la presencia de estos alcaloides en raíces de *C. roseus*, se piensa que es el resultado de la falta de cloroplastos en las mismas, por lo que cinco diferentes líneas de raíces transformadas fueron sometidas a un proceso de enverdecimiento. Las líneas que mejor respuesta dieron al tratamiento, se seleccionaron para llevar a cabo el estudio de regulación enzimática de la biosíntesis de los alcaloides indólicos durante la diferenciación celular de las raíces. La diferenciación de las líneas se realizó reduciendo gradualmente la concentración de sacarosa ($3\% \rightarrow 1\% \rightarrow 0.3\%$ sac. $\rightarrow 0.3\%$ sac. + $0.3\% \text{ CO}_2 \rightarrow 2\% \text{ CO}_2$). También se cambiaron las condiciones de incubación, ya que se pasaron las raíces de oscuridad a luz continua ($35 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), sin agitación a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ en el medio B₅ (sales de Gamborg). Se observó que bajo tales condiciones de cultivo, las raíces iniciaron su enverdecimiento, aumentando el contenido de clorofilas a medida que se disminuía la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Además, la actividad enzimática de la enzima PEP carboxilasa disminuyó a medida que se disminuyó la concentración de sacarosa, mientras que el proceso inverso ocurrió para la enzima rubisco. Por otra parte, la actividad de la HMGR llegó a ser casi 4 veces mayor a una concentración de 0.3% de sacarosa teniendo dos picos de actividad (día 7 y 21 de cultivo), en comparación con la encontrada en condiciones heterotróficas.