



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA



**“EFECTO DEL FOSFATO EN LA PRODUCCIÓN DE
ALCALOIDES EN RAÍCES TRANSFORMADAS”**

OPCIÓN I

(TESIS PROFESIONAL)

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
INGENIERO BIOQUÍMICO

PRESENTA:

JORGE FROYLÁN XOOL TAMAYO

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO
2006

INDICE

CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2	3
ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Catharanthus roseus</i>	3
2.2. CULTIVO DE RAÍCES	3
2.2.1. CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS	5
2.3. METABOLISMO SECUNDARIO	8
2.3.1. METABOLISMO SECUNDARIO DE <i>C. roseus</i>	11
2.3.2. BIOSÍNTESIS DE LOS ALCALOIDES DE <i>C. roseus</i>	11
2.4. EL FÓSFORO	19
2.4.1. CICLO DEL FÓSFORO	19
2.4.2. ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DEL FÓSFORO	21
2.4.3. DEFICIENCIA DEL FÓSFORO.....	21
2.5. OBJETIVOS	23
2.5.1. OBJETIVO GENERAL	23
2.5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	23
2.6. HIPÓTESIS	23
CAPITULO 3	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	24
3.2. MÉTODOS	24
3.2.1. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE <i>C. roseus</i>	24
3.2.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	24
3.2.3. MODIFICACIÓN DE LA FUENTE DE FOSFATO EN EL MEDIO GAMBORG	25
3.2.4. DOSIS-RESPUESTA.....	26
3.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	27
3.3.1. PESO FRESCO	27
3.3.2. PESO SECO	27
3.3.3. VOLUMEN FINAL DEL MEDIO DE CULTIVO	27
3.3.4. PH.....	28
3.3.5. CONDUCTIVIDAD	28
3.3.6. EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES DEL TEJIDO	28
3.3.7. EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES DEL MEDIO DE CULTIVO	28
3.3.8. ALCALOIDES TOTALES	29
3.3.9. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	30
3.4. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA....	30
3.4.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO	30
3.4.2. SUSTRATO 10-OXOGERANIAL	30
3.4.3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	31
3.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32

CAPITULO 4	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO.....	33
4.1.1. PESO FRESCO	33
4.1.2. PESO SECO.....	34
4.1.3. PH.....	35
4.1.4. CONDUCTIVIDAD	36
4.1.5. ALCALOIDES EN EL TEJIDO	37
4.1.6. ALCALOIDES EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	38
4.1.7. ALCALOIDES TOTALES	39
4.1.8. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	40
4.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	41
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

El objetivo de este presente trabajo fue estudiar el efecto del fosfato en la producción de alcaloides en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, así como el efecto que produce en la actividad de la enzima monoterpén (iridodial) ciclase. Previamente se ha reportado que bajas concentraciones de fosfatos aumentan la cantidad de alcaloides, en tanto que un aumento en su concentración produce una disminución en la cantidad de estos compuestos. La baja producción de los alcaloides indólicos diméricos en condiciones naturales, y el elevado precio que alcanzan en el mercado, son algunos de los principales motivos para estudiar la posibilidad de aumentar su producción *in vitro*. Para llevar a cabo este estudio se obtuvieron raíces de 14 días de edad, las cuales fueron transferidas a medios de cultivo con diferentes concentración en la fuente de fosfato: 0, 0.0688, 0.137, 0.275, 0.55, 1.1 y 2.2 mM el cual también se le dio 14 días de tratamiento bajo estas condiciones. La caracterización de los cultivos incluyó la determinación de los pesos fresco y seco, pH, y la determinación de la conductividad del medio de cultivo, así como la cuantificación del contenido de alcaloides en los tejidos, y en el medio de cultivo. Finalmente también se determinó la actividad enzimática de la monoterpén (iridodial) ciclase en las raíces sometidas a los diferentes tratamientos de fosfatos. Se observó que a bajas concentraciones de fosfato las raíces incrementan su producción de alcaloides, mientras que ocurre todo lo contrario cuando existe una mayor concentración de fosfato la producción de alcaloides disminuye. Además, la actividad de la enzima monoterpén (iridodial) ciclase bajo estas condiciones de cultivo se mantuvo constante.