

CONTENIDO

| | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| ÍNDICE DE CUADROS..... | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xii |
| ÍNDICE DEL APÉNDICE..... | xv |
| RESUMEN... | xvii |
| ABSTRACT.. | xviii |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 2 |
| 2 . Biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas... | 2 |
| 2.1.1. Alkaloides..... | 3 |
| 2.1.2. Alkaloides bencilisoquinolínicos (ABI's).. | 5 |
| 2.2 <i>Argemone mexicana</i> L..... | 7 |
| 2.2.1. Descripción biológica y taxonomía..... | 7 |
| 2.3 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)..... | 10 |
| Tipos de cultivos de tejidos vegetales. | 10 |
| Cultivo de raíces..... | 12 |
| 2.4. Cultivo de tejidos transformados..... | 13 |
| 2.4.1. <i>Agrobacterium</i> como patógeno de plantas..... | 14 |
| 2.4.2. <i>Agrobacterium</i> en la biotecnología..... | 15 |
| 2.5. Principales aplicaciones de la transformación mediante <i>Agrobacterium</i> | 18 |
| 2.5.1. Transformación de plantas..... | 18 |
| 2.5.2. Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i> <i>rhizogenes</i> | 19 |
| 2.6. Producción de metabolitos secundarios en tejidos transformados. | 23 |
| 2.7. Recapitulación de los antecedentes..... | 27 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III. OBJETIVOS. | 28 |
| 3.1. Objetivo general... | 28 |
| 3.2. Objetivos específicos. | 28 |
| IV. HIPÓTESIS..... | 29 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS... | 30 |
| 5.1. Descripción del área de estudio. | 30 |
| 5.2. Estrategia experimental..... | 31 |
| 5.2.1. Material biológico..... | 33 |
| 5.2.1.1. Cepas de bacterias. | 33 |
| 5.2. 2. Materiales vegetales. | 34 |
| 5.2.2. Procedimientos... | 34 |
| 5.2.2.1. Obtención y mantenimiento de plántulas de <i>A. mexicana</i> en condiciones de esterilidad | 35 |
| 5.2.2.2. Infección con <i>Agrobacterium</i> | 38 |
| 5.2.3. Inducción de un cultivo de raíces normales. | 43 |
| 5.3. Cuantificación de alcaloides..... | 44 |
| 5.3.1. Extracción de alcaloides de los tejidos. | 44 |
| 5.3.2. Extracción de alcaloides liberados al medio de cultivo. | 45 |
| 5.3.3. Cuantificación de los alcaloides berberina y sanguinarina... | 45 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 47 |
| 6.1. Material biológico..... | 47 |
| 6.1.1. Germinación <i>in vitro</i> de las semillas de <i>A. mexicana</i> | 47 |
| 6.1.2. Cultivo de plántulas <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> . | 48 |
| 6.2. Transformación genética..... | 49 |
| 6.2.1. Transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ... | 49 |
| 6.2.2. Transformación con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> | 51 |
| 6.3. Obtención y mantenimiento de cultivos <i>in vitro</i> no transformados de <i>A. mexicana</i> ... | 54 |
| 6.3.1. Obtención y mantenimiento del cultivo de raíces de <i>A.</i> <i>mexicana</i> . | 56 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.4. Cuantificación de alcaloides. | 60 |
| 6.4.1. Cuantificación de alcaloides (berberina-sanguinarina) en el cultivo de callos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> | 60 |
| 6.4.2. Cuantificación de alcaloides (berberina-sanguinarina) en el cultivo de brotes normales <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> | 61 |
| 6.4.3. Cuantificación de alcaloides (berberina-sanguinarina) en el cultivo de brotes transformados <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> | 62 |
| 6.4.4. Cuantificación de alcaloides (berberina-sanguinarina) en el cultivo de raíces <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> | 64 |
| 6.4.5. Cuantificación de alcaloides (berberina-sanguinarina) en el medio de cultivo <i>in vitro</i> de raíces de <i>A. mexicana</i> | 65 |
| VII. CONCLUSIONES... | 67 |
| VIII. LITERATURA CITADA. | 69 |
| IX. APÉNDICES..... | 75 |
| Apéndice 1. Composición de los diferentes medios de cultivo. | 75 |
| Apéndice 2. Estrategias experimentales. | 82 |