



---

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**LICENCIATURA EN BIOLOGIA**

ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO DE RAICES  
TRANSFORMADAS DE *Catharanthus roseus* (L.) G.  
DON MEDIANTE LA INTEGRACION DEL pRi DE  
*Agrobacterium rhizogenes*.

**T E S I S**

**PRESENTADA POR:**

**Romualdo Ciau Uitz**

**BIBLIOTECA CICY**

**EN SU EXAMEN PROFESIONAL  
EN OPCION AL TITULO DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

**MERIDA, YUCATAN, MEXICO.**

**1 9 9 2**

# INDICE

|                                                                         | PAGINAS |
|-------------------------------------------------------------------------|---------|
| INTRODUCCION.....                                                       | 1       |
| CAPITULO I. ANTECEDENTES.....                                           | 4       |
| I.1. <i>Catharanthus roseus</i> (L) G. DON.....                         | 4       |
| I.1.1. Generalidades.....                                               | 4       |
| I.1.2. Usos de la planta.....                                           | 6       |
| I.1.3. Producción de alcaloides indólicos.....                          | 6       |
| I.2. ALCALOIDES INDOLICOS.....                                          | 7       |
| I.2.1. Naturaleza.....                                                  | 7       |
| I.2.2. Biosíntesis.....                                                 | 9       |
| I.2.3. Importancia comercial.....                                       | 12      |
| I.3. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....                              | 13      |
| I.3.1. Generalidades.....                                               | 13      |
| I.3.2. Estructura del plásmido Ri.....                                  | 14      |
| I.3.3. Mecanismo de transformación genética.....                        | 16      |
| I.3.3.1. Colonización y ataque a la célula vegetal.....                 | 17      |
| I.3.3.2. Procesamiento y transferencia del ADN-T.....                   | 17      |
| I.3.3.3. Integración y expresión del ADN-T.....                         | 19      |
| I.3.3.4. Limitación en el rango de especies hospederas.....             | 20      |
| I.3.3.5. Eficiencia de la transformación vía <i>Agrobacterium</i> ..... | 21      |
| I.3.4. La enfermedad de las raíces peludas (hairy roots).....           | 21      |

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| I.3.5. Importancia biotecnológica de las raíces peludas.....           | 23 |
| CAPITULO II. OBJETIVOS.....                                            | 24 |
| II.1. OBJETIVO GENERAL.....                                            | 24 |
| II.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....                                       | 24 |
| CAPITULO III. HIPOTESIS.....                                           | 26 |
| CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS.....                                 | 27 |
| IV.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....                                         | 27 |
| IV.2. MATERIAL BIOLOGICO.....                                          | 27 |
| IV.3. CEPAS BACTERIANAS Y SU MANTENIMIENTO.....                        | 28 |
| IV.4. MANEJO DEL MATERIAL BIOLOGICO.....                               | 30 |
| IV.4.1. Desinfestación y germinación de semillas.....                  | 30 |
| IV.4.2. Infección de explantes.....                                    | 31 |
| IV.4.2.1. Preparación del inóculo bacteriano.....                      | 31 |
| IV.4.2.2. Preparación de los explantes.....                            | 31 |
| IV.4.2.3. Inoculación de los explantes.....                            | 32 |
| IV.4.2.4. Estimación del tamaño del inóculo.....                       | 32 |
| IV.4.3. Obtención de las raíces transformadas.....                     | 32 |
| IV.4.3.1. Cosecha y obtención de cultivos axénicos.....                | 32 |
| IV.4.3.2. Selección y escalamiento de las raíces.....                  | 33 |
| IV.4.3.3. Propagación.....                                             | 33 |
| IV.4.3.4. Mantenimiento de las líneas establecidas.....                | 33 |
| IV.5. TECNICAS ANALITICAS.....                                         | 33 |
| IV.5.1. Caracterización del crecimiento de las líneas establecidas ... | 33 |
| IV.5.2. Comprobación de la transformación.....                         | 34 |
| IV.5.2.1. Aspectos morfológicos y fisiológicos.....                    | 34 |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IV.5.2.2. Hibridización molecular.....                                             | 34 |
| IV.5.2.2.1. Aislamiento y purificación del ADN bacteriano.....                     | 35 |
| IV.5.2.2.2. Aislamiento y purificación del ADN vegetal.....                        | 36 |
| IV.5.2.2.3. Nick translation. Marcaje de las sondas con biotina .....              | 37 |
| IV.5.2.2.4. Dot blot. Prehibridización.....                                        | 37 |
| IV.5.2.2.5. Dot blot. Hibridización y revelado.....                                | 38 |
| IV.5.3. Síntesis de alcaloides indólicos.....                                      | 39 |
| IV.5.3.1. Extracción.....                                                          | 39 |
| IV.5.3.2. Determinación del patrón de alcaloides indólicos.....                    | 40 |
| IV.5.3.2.1. Cromatografía de capa fina (TLC).....                                  | 40 |
| IV.5.3.2.2. Tinción de bandas.....                                                 | 40 |
| IV.5.3.2.3. Identificación.....                                                    | 40 |
| IV.5.3.3. Cuantificación.....                                                      | 41 |
| IV.5.3.3.1. Alcaloides totales.....                                                | 41 |
| CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSION.....                                            | 52 |
| V.1. OBTENCION DE MATERIAL BIOLOGICO.....                                          | 52 |
| V.2. INFECCION DE EXPLANTES.....                                                   | 54 |
| V.2.1. Infectividad de las cepas de <i>A. rhizogenes</i> en <i>C. roseus</i> ..... | 54 |
| V.2.2. Efecto de la concentración del inóculo sobre la infectividad .....          | 55 |
| V.2.3. Efecto del tipo de explante sobre la infectividad .....                     | 56 |
| V.3. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE RAICES                                     |    |
| TRANSFORMADAS .....                                                                | 56 |
| V.3.1. Raíces transformadas obtenidas.....                                         | 56 |
| V.3.2. Líneas seleccionadas.....                                                   | 58 |
| V.3.3. Condiciones de cultivo.....                                                 | 60 |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| V.4. ASPECTOS MORFOLOGICOS.....                             | 61 |
| V.4.1. Características macroscópicas.....                   | 61 |
| V.4.2. Características microscópicas.....                   | 61 |
| V.4.3. Variación morfológica.....                           | 63 |
| V.5. COMPROBACION DE LA TRANSFORMACION.....                 | 63 |
| V.6. CARACTERIZACION DEL CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS ..     | 65 |
| V.6.1. Tipos de crecimiento.....                            | 65 |
| V.6.2. Efecto del inóculo inicial sobre el crecimiento..... | 65 |
| V.6.3. Efecto del pH inicial sobre el crecimiento.....      | 66 |
| V.6.4. Indices de crecimiento de las líneas.....            | 69 |
| V.6.5. Curvas de crecimiento.....                           | 71 |
| V.6.5.1. Curva de crecimiento de la línea A2.....           | 72 |
| V.6.5.2. Curva de crecimiento de la línea A4.....           | 75 |
| V.6.5.3. Curva de crecimiento de la línea A5.....           | 78 |
| V.6.6. La conductividad como estimador de crecimiento.....  | 80 |
| V.7. PRODUCCION DE ALCALOIDES INDOLICOS.....                | 81 |
| V.7.1. Patrón de alcaloides en placas de TLC.....           | 83 |
| V.7.2. Alcaloides identificados.....                        | 83 |
| V.7.3. Comparación con plantas.....                         | 84 |
| V.8. LA ESTABILIDAD DE LAS LINEAS.....                      | 85 |
| V.9. LAS RAICES TRANSFORMADAS Y OTROS TIPOS DE CULTIVO ..   | 85 |
| CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....                              | 89 |
| CAPITULO VII. LITERATURA CITADA.....                        | 91 |

## INTRODUCCION

Desde hace más de un siglo los químicos han descubierto, aislado y caracterizado una infinidad de sustancias provenientes de los organismos vivientes. En esa gran diversidad de sustancias se han encontrado compuestos que no son esenciales para el metabolismo primario: crecimiento y reproducción de los organismos. A estos compuestos se les ha dado el nombre de "metabolitos secundarios" (Vining, 1990).

En un principio el término "metabolito secundario" o "producto secundario" fue acuñado por los fisiólogos vegetales para los compuestos de las plantas, sin embargo, esta terminología se ha extendido a todos los organismos vivientes (Scragg, 1990). Así mismo, se pensaba que estos compuestos no tenían una función esencial en el mantenimiento de la vida pero que conferían ciertas ventajas adaptativas; en la actualidad se conoce que estos compuestos sirven como defensas químicas o que juegan un papel ecológico muy importante. De esta forma, pueden funcionar como antibióticos, ser inhibidores enzimáticos, surfactantes, o bien ser sustancias captadoras de luz (Nahrstedt, 1989; Vining, 1990).

En el reino vegetal se produce un amplio rango de metabolitos secundarios, muchos de los cuales, tales como colorantes, fragancias, saborizantes, aceites, alcaloides, y otros son de interés comercial (Sahai y Knuth, 1985).

Por otra parte, los cultivos de células vegetales en medios sólidos y líquidos fueron originalmente establecidos para el estudio de la fisiología y la bioquímica de las plantas sin tener los problemas técnicos que implica el trabajar con la planta completa; sin embargo, con el descubrimiento de que estos cultivos