



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN
ESCUELA DE QUIMICA

ESTABLECIMIENTO DE UNA LINEA CELULAR
DE Catharanthus roseus (L.) G. DON EN SUSPENSION

TESIS

PRESENTADA POR:

BEATRIZ MARCELA MENDEZ ZEEL

EN SU EXAMEN PROFESIONAL
EN OPCION AL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

BIBLIOTECA CICY
2063

MERIDA, YUCATAN, MEXICO.
1986.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
CAPITULO I: ANTECEDENTES	3
A. Breve historia del cultivo de tejidos	3
B. Transformación e ingeniería genética	4
C. Bases y definiciones en el cultivo de tejidos vegetales	7
D. Ventajas y limitaciones del cultivo de tejidos <u>in vitro</u>	9
E. Requerimientos nutricionales del cultivo de tejidos <u>in vitro</u>	9
F. Cultivo de células vegetales	10
1. Inducción del cultivo	10
2. Mantenimiento del cultivo	10
3. Células en suspensión	11
4. Cultivo de protoplastos	12
5. Tejidos haploides	13
G. La planta	14
1. Taxonomía	14
2. Descripción botánica	15
3. Distribución geográfica	16
4. Utilidad de la especie	17
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS	19
A. Objetivos	19
B. Diseño experimental	19
C. Justificación	20
D. Hipótesis	21
E. Materiales	22
1. Material biológico	22
2. Material de vidrio	22
3. Instrumentos	22
4. Accesorios	22
5. Reactivos	23

	Pág.
F. Métodos	23
1. Preparación de soluciones concentradas (stock)	23
2. Indicaciones para la preparación del medio de cultivo sólido	24
3. Indicaciones para la preparación del medio de cultivo líquido	25
4. Esterilización de material	25
5. Esterilización del tejido	25
6. Siembra del material biológico en la campana de flujo laminar estéril, en medio sólido	26
7. Incubación del material sembrado en medio sólido	27
8. Inducción y resiembra de células en suspensión	27
9. Incubación de los medios con células en suspensión	27
10. Procedimientos de evaluación del crecimiento de los cultivos	28
 CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
A. Inducción de callos de <u>C. albus</u> y <u>C. roseus</u>	31
1. Inducción de callos de <u>C. albus</u> y <u>C. roseus</u> a partir de hoja de plantas adultas	31
2. Inducción de callos a partir de plántulas crecidas bajo condiciones estériles	37
3. Inducción de callos a partir de meristemo apical y floral	40
B. Mantenimiento de callos de <u>C. roseus</u>	42
C. Inducción de células en suspensión de <u>C. roseus</u>	48
D. Mantenimiento de células en suspensión de <u>C. roseus</u>	51
 Apéndice I	58
Apéndice II	59
Apéndice III	62
Bibliografía	65

INTRODUCCION

Catharanthus roseus es una planta que pertenece a la familia de las Apocinaceae y que produce entre otros, dos tipos de alcaloides que se utilizan como anticancerígenos: la vincristina (VCR) y la vincoleucoblastina (VLB) (1), cuya obtención es muy costosa aun a nivel industrial, un kilogramo de estos alcaloides tiene un valor en el mercado de 25 millones de dólares (2). Para obtener 1 g de VCR, se necesitan 500 kilogramos de hoja seca de C. roseus (1).

El proceso de extracción es costoso y difícil, por lo que se han buscado otras alternativas, tales como el cultivo de tejidos in vitro.

La producción de VCR y VLB por medio de esta técnica ha sido muy estudiada, sin embargo los resultados obtenidos hasta ahora han sido poco fructíferos, ya que hasta el momento sólo se han encontrado dos líneas celulares en cultivo de tejidos que contengan estos alcaloides o al menos uno de ellos (3-8). (En un primer trabajo se reportó la presencia de VLB en cultivo de tejidos vegetales, fue el de Hofmann y colaboradores (9), con un contenido de 0.00013%. Recientemente, Reyes y colaboradores han reportado la presencia de

VLB y VCR en cantidades significativamente mayores (10).

Nosotros nos proponemos abordar el problema con un enfoque completamente nuevo. Partiendo de la hipótesis de que los alcaloides se sintetizan en cloroplastos, al igual que el triptofano que es su precursor inmediato, y de que esta síntesis requiere de una gran cantidad de poder reductor en la forma de NADPH, el cual también se sintetiza en el cloroplasto durante la fotosíntesis, nos hemos propuesto obtener cultivos de tejidos de C. roseus con actividad fotosintética. Si nuestra hipótesis es correcta, estos cultivos fotosintéticos deberán producir mayores cantidades de alcaloides.

Esta tesis reporta la obtención de cultivos de callos y células en suspensión de C. roseus.