

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE  
PLANTAS

Efecto del fotoperíodo sobre la síntesis de alcaloides  
en cultivos de brotes de *Catharanthus roseus*

Tesis que para obtener el grado de Maestro en  
Ciencias presenta:

Freddy Daniel Campos Tamayo

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México  
2004





## **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. bajo la asesoría del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota.

Este trabajo fue apoyado económicamente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante el convenio 31608-B, beca para estudios de maestría para Freddy Daniel Campos Tamayo (CONACyT 165090) y con fondos del PIFOP

A mi asesor Dr. Felipe Vázquez Flota, por la paciencia y la ayuda durante la realización de este trabajo.

Al grupo del laboratorio, Cinthya, Elizabetha, Lupita, Mildred, Miriam y Yuriana, porque hicieron del laboratorio un buen lugar para trabajar y por brindarme su ayuda incondicional.

A mis compañeros de clase y amigos, Ana Luisa, Ana Ly, Clelia, Cristina, Diana, Erika, Inés, Manuela, Juan, Juan Manuel y Roberto.



## **Dedicatorias**

A mis padres Alfonso y Bertha, por todo su cariño, apoyo y consejos durante mi formación académica y como persona.

A Yoli, por todo su amor, cariño, comprensión, ayuda y porque siempre ha estado a mi lado en los momentos más importantes de mi vida.

A mis hermanos Patricia, Alfonso, Leticia, Lorena y Ana Cristina porque siempre han estado junto a mí para apoyarme he impulsarme a seguir adelante.

A mis sobrinos Sheyla, Eduardo, Marianela, Jorge, Marisol y Alfonso porque con sus pequeñeces dan grandes alegrías y grandes momentos en la vida.



## Abreviaturas

6-BAP	6-bencilaminopurina
Abs	Absorbancia
ADNc	ADN complementario
B5	Medio Gamborg
CAS	Sulfato cérico amónico
CoA	Coenzima A
CytP450	Citocromo P450
D <sub>4</sub> H	Desacetoxivindoline 4-hidroxilasa
DAT	Acetil-CoA:4-O-deacetilvindolina 4-O-acetiltransferasa
DXPS	1-desoxi- $\alpha$ -xilulosa-5-fosfato sintasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa
IPP	Isopentil pirofosfato
LAMT	Ácido logánico metil trasferasa
MS	Murashige y Skoog
NMT	AdoMet:2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina- <i>N</i> -metiltransferasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RF	Índice de retardamiento
SLS	Secologanina sintasa
EST	Estrictosidina sintasa
TDC	Triptofano descarboxilasa





## Contenido

Resumen	
Summary	
Introducción	1
<b>Capítulo I Antecedentes</b>	<b>5</b>
Generalidades sobre los alcaloides	5
Definición, origen y función de los alcaloides	6
Origen biosintético y distribución de los alcaloides	7
Descripción de <i>Catharanthus roseus</i>	8
Síntesis de alcaloides en <i>Catharanthus roseus</i>	9
Formación de la porción indólica	10
Formación de la porción terpénica	10
Formación de la estrictosidina	11
Formación de los alcaloides tipo Corinante, Iboga y Aspidosperma	12
Transformación de la tabersonina en vindolina	13
Formación de los alcaloides diméricos	15
Regulación de la síntesis de vindolina	16
Compartimentalización celular de la ruta de síntesis de vindolina en <i>Catharanthus roseus</i>	18
Alcaloides en cultivos <i>in vitro</i> de <i>Catharanthus roseus</i>	19
Efecto de los reguladores del crecimiento sobre la síntesis de alcaloides	20
Efecto de los inductores fúngicos y el jasmonato sobre la síntesis de alcaloides	20
Ingeniería metabólica para la síntesis de alcaloides de <i>Catharanthus roseus</i>	21
Activación transcripcional de la síntesis de alcaloides en <i>Catharanthus roseus</i>	21
Cultivo de brotes	22



Hipótesis	24
Justificación	24
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24
Diseño experimental	25
Referencias	26
<b>Capitulo II Efecto del régimen de luz sobre la formación de brotes en <i>Catharanthus roseus</i></b>	<b>31</b>
Introducción	31
Materiales y métodos	32
Resultados y discusión	35
Conclusiones	40
Referencias	40
<b>Capitulo III Efecto de las condiciones de luz sobre la síntesis de alcaloides en brotes de <i>Catharanthus roseus</i></b>	<b>43</b>
Introducción	43
Materiales y métodos	44
Resultados y discusión	47
Referencias	54
<b>Capitulo IV Conclusiones generales y perspectivas</b>	<b>55</b>
Conclusiones	55
Perspectivas	56
Apéndice 1	57
Apéndice 2	59
Referencias	63



## Índice de Tablas y Figuras

### Tablas

<b>Tabla I.</b> Aplicaciones, fuente y precios de algunos utilizados en formulaciones médicas vigentes	6
<b>Tabla II.</b> Secuencia de los iniciadores utilizados en las RPC	60

### Figuras

<b>Figura 1.1</b> Flor de <i>Catharanthus roseus</i>	8
<b>Figura 1.2.</b> Ruta de síntesis de alcaloides monoterpen-indólicos en <i>Catharanthus roseus</i>	13
<b>Figura 1.3.</b> La transformación de tabersonina en vindolina	16
<b>Figura 1.4.</b> Esquema de la regulación de las enzimas involucradas en las primeras y últimas etapas de la síntesis de vindolina	18
<b>Figura 1.5.</b> Esquema del diseño experimental	25
<b>Figura 2.1.</b> Curva de crecimiento en peso fresco	37
<b>Figura 2.2.</b> Formación de brotes por racimo	38
<b>Figura 3.1.</b> Contenido de alcaloides	48
<b>Figura 3.2.</b> Contenido de ajmalicina, catarantina y vindolina	49
<b>Figura 3.3.</b> Actividad específica de TDC	49
<b>Figura 3.4.</b> Actividad específica de la D4H	50
<b>Figura 3.5.</b> Actividad específica de la DAT	51
<b>Figura 3.6.</b> Contenido de vindolina por racimo	52
<b>Figura A1.</b> Contenido de ajmalicina en los brotes en un ciclo de cultivo	57
<b>Figura A2.</b> Contenido de catarantina en los brotes en un ciclo de cultivo	58
<b>Figura A3.</b> Contenido de vindolina en los brotes en un ciclo de cultivo	58
<b>Figura A4.</b> Amplificación de los transcritos de TDC	61
<b>Figura A5.</b> Amplificación de los transcritos de DAT	62



## Resumen

*Catharanthus roseus* produce más de 200 alcaloides, muchos de ellos con aplicaciones farmacéuticas. Entre los más importantes están los dímeros vinblastina y vincristina que se utilizan como agentes antitumorales. Estos compuestos se forman por la condensación de las subunidades de catarantina y vindolina. Debido al alto costo que pueden alcanzar y a las bajas cantidades producidas en plantas de campo se han intentado producirlos en cultivos celulares. Sin embargo, esto no ha sido posible debido a que los cultivos celulares pierden la capacidad de sintetizar vindolina, pero no catarantina. Diversos estudios muestran que el potencial genético para la biosíntesis de vindolina no está perdido, pero sólo es reprimido en cultivos celulares, ya que su acumulación reaparece junto con la regeneración de brotes. En este trabajo se obtuvieron brotes a partir de plántulas germinadas de semillas inmaduras de *Catharanthus roseus*. Los brotes obtenidos se cultivaron bajo regímenes de iluminación continua y en fotoperíodo (16 h). El régimen de luz tuvo un efecto principalmente en la ganancia de masa pero no sobre la capacidad de formación de brotes.

El patrón de alcaloides, tanto en los brotes de fotoperíodo como en luz continua, fue similar al de las hojas de plantas maduras. Vindolina fue el alcaloide mayoritario con menores acumulaciones de ajmalicina y catarantina. El régimen de luz no produjo diferencias notables en los niveles de estos alcaloides.

Se analizaron tres enzimas, triptofano descarboxilasas (TDC), desacetoxivindolina 4-hidroxilasas (D4H) y desacetilvindolina acetil CoA acetiltransferasa (DAT). Se encontró una relación entre la ocurrencia de la actividad de la DAT, la acumulación de vindolina y la formación de brotes.





## Summary

*Catharanthus roseus* produces more than 200 alkaloids, including the powerful cytotoxic agents vinblastine and vincristine. These compounds are dimers formed from the condensation of catharanthine and vindoline. Due to the high cost that these drugs can reach and to the low amounts produced in field grown plants, cell culture technology has been proposed to produce them in cell cultures. However, despite many years of efforts, this has not been possible because *in vitro* cell cultures are not able to form vindoline. However, catharanthine the potential to produce catharanthine remains unchanged. Further studies have show that the genetic potential for the biosynthesis of vindoline is not lost, but only repressed in cell cultures, since vindoline accumulation reappears concomitantly with shoot regeneration.

In this work, *in vitro* shoots cultures were obtained from *Catharanthus roesus* seedlings, germinated from immature seeds. The shoot cultures were cultivated in either under continuous light or a 16 h photoperiod. Light treatment had an effect both on growth and vindoline accumulation.

Regardless the light regime, the alkaloid pattern observed in extracts obtained from the *in vitro* shoots was similar to that of the leaves of mature plants. Vindoline was the main alkaloid, with smaller accumulations of ajmalicine and catharanthine. Light treatment did not produce remarkable differences in the total amount of these alkaloids.

Three biosynthetic enzymes, tryptophan decarboxyase (TDC), deacetoxyvindoline - hydroxylase (D4H) and deaceylvindoline acetylCoA acetyltransferase (DAT) were analyzed in the cultured shots. An interesting relationship between DAT activity, vindoline accumulation and shoot formation was noticed in photoperiod shoots.



## INTRODUCCIÓN

Las plantas elaboran una gran variedad de compuestos de bajo peso molecular que aparentemente no son indispensables para su crecimiento y desarrollo. Estos compuestos se denominan productos naturales o metabolitos secundarios, y si bien no participan directamente en el crecimiento y desarrollo de los organismos que los producen, sí les confieren ciertas ventajas adaptativas. Estos productos tienen una actividad biológica importante en otros organismos y pueden participar en la defensa contra herbívoros (insectos, vertebrados), bacterias y hongos. Más aún, algunos de estos compuestos proporcionan ventajas en la competencia con otras plantas por luz, agua, nutrientes y en la atracción de polinizadores (Wink, 1999).

Los grupos de metabolitos secundarios más abundantes son los terpenoides, derivados del isopentenil pirofosfato, los fenilpropanoides, derivados de la fenilalanina, y los alcaloides, derivados de diferentes aminoácidos. En su forma más sencilla, los alcaloides se definen como metabolitos secundarios de carácter básico con efectos fisiológicos en organismos diferentes a los que los producen (Roberts y Wink, 1998). Hasta hace algunos años, los alcaloides eran considerados como productos de desecho del metabolismo nitrogenado de las plantas. Sin embargo, ahora se acepta que la síntesis de los alcaloides y su acumulación son procesos finamente regulados en la célula vegetal.

La mayoría de los alcaloides solamente se sintetizan en ciertos tejidos, y por lo general, en respuesta a condiciones ambientales y de desarrollo bien definidas. De este modo, actualmente se considera que la síntesis de los alcaloides es una manifestación del grado de especialización de un tejido y que forma parte del sistema de interacción de la planta con su entorno (Croteau, *et al.*, 2000).

Debido a los efectos fisiológicos que provocan en organismos diferentes a aquellos que los producen, los alcaloides han sido utilizados a lo largo de la historia como medicamentos, estimulantes o venenos. Por ello, representan productos con interés comercial (Roberts y Wink, 1998). No obstante, frecuentemente los rendimientos que se obtienen de las plantas en campo son muy variables. Debido a la dependencia de la acumulación de alcaloides de las condiciones ambientales, se ha intentado producirlos mediante alternativas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos y de células *in vitro*.

El cultivo *in vitro* de células vegetales representa una alternativa para producir alcaloides con importancia comercial. Sin embargo, la variabilidad que se genera durante la proliferación de cultivos de células *in vitro* ha dificultado la identificación y el

aislamiento de líneas celulares con una capacidad biosintética idéntica o superior de la que se encuentra en las plantas que les dieron origen.

Durante los últimos años, se ha generado evidencia que apoya la hipótesis de que es indispensable cierto grado de diferenciación para que se lleve a cabo la síntesis de ciertos metabolitos secundarios (Flores y Filner, 1985). Esta relación es más evidente en cultivos *in vitro*, ya que con frecuencia la capacidad biosintética se pierde, o al menos se altera, durante el proceso de dediferenciación de un tejido en callos o células en suspensión (Moreno-Valenzuela *et al.*, 1998). La modificación de esta capacidad ocurre tanto al nivel cuantitativo como cualitativo (Endo *et al.*, 1987).

La importancia del nivel de organización celular para la síntesis de metabolitos secundarios no sólo ocurre en cultivos *in vitro* (Lindsey y Yeoman, 1983), sino también en la planta completa (Nessler y Mahlberg, 1978). Esto parece estar asociado con los efectos tóxicos de estos compuestos. Algunas plantas evitan estos efectos acumulando los alcaloides en células especializadas (Mersey y Cutler, 1986).

*Catharanthus roseus* produce más de 200 alcaloides, muchos de ellos con aplicaciones farmacéuticas, como son los dímeros vinblastina y vincristina que se utilizan como agentes antitumorales. Estos compuestos se forman por la condensación de las subunidades de catarantina y vindolina. Los bajos rendimientos de producción obtenidos de la planta, así como su elevado costo económico, han despertado el interés para producirlos mediante el cultivo *in vitro*. Sin embargo, esto no se ha logrado ya que, si bien la desorganización tisular propia de callos y de células en suspensión no afecta la síntesis de catarantina, sí ocasiona la pérdida de la capacidad de síntesis de vindolina (Van der Heijden *et al.*, 1989). Estas observaciones sugieren que la síntesis de vindolina requiere cierto grado de diferenciación celular que no parece ser necesaria para la síntesis de los demás alcaloides (De Luca *et al.*, 1988). Con el fin de superar este inconveniente, se han utilizado cultivos *in vitro* con un mayor grado de organización tisular, como el cultivo de brotes (Krueger *et al.*, 1982). Sin embargo, aunque estos cultivos recuperan la capacidad de síntesis de vindolina, los niveles producidos pueden variar de manera significativa entre diferentes lotes (Krueger *et al.*, 1982; Hirata *et al.*, 1990). Esto puede estar relacionado con fallas en la coordinación con la que se expresan las enzimas involucradas en las diferentes etapas de la síntesis de vindolina. Esta coordinación temporal es de gran importancia en la acumulación de vindolina en plántulas en determinadas etapas de desarrollo.

En plántulas de *Catharanthus roseus* germinadas a partir de semillas, la transición de la oscuridad a la luz juega un papel fundamental en la expresión coordinada de las enzimas que participan en las primeras y últimas etapas de la síntesis de vindolina

(Vázquez-Flota y De Luca, 1998). Recientemente, se generó un cultivo de brotes de *Catharanthus roseus* en el laboratorio (Hernández-Domínguez *et al.*, 2004). Este cultivo, que tiene la capacidad de acumular vindolina, se ha mantenido en condiciones de luz continua.

Con el fin de caracterizar el metabolismo de los alcaloides, particularmente el de la vindolina en estos cultivos, en este trabajo se procedió a la adaptación del cultivo de brotes a condiciones de fotoperíodo en una primera etapa. Posteriormente, este cultivo fue comparado con aquel que se mantuvo en condiciones de luz continua. Esta comparación incluyó la dinámica de la acumulación de alcaloides, así como la determinación de las actividades de las enzimas que participan en la síntesis de los alcaloides.

Este trabajo está organizado en cinco capítulos. El capítulo 1 corresponde a los antecedentes, en donde se incluye la bibliografía más relevante. El capítulo 2 contiene la hipótesis, justificación y objetivos, así como la descripción de las técnicas analíticas. Los resultados, se presentan como artículos en los capítulos 3 y 4. El capítulo 3 incluye la obtención del cultivo y su caracterización, mientras que el capítulo 4 se contiene los resultados de los análisis de los alcaloides y de las actividades enzimáticas. Por último, se presentan las conclusiones generales y las perspectivas.

## Referencias

**Croteau R, Kutchan TM and Lewis NG** (2000) Natural products (Secondary Metabolites) In Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Buchanan B. Jones R. Eds American Society of Plant Physiologists. Pp:1250-1316.

**De Luca V, Alvarez Fernandez J, Campbell D and Kurz WGW** (1988) Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Plant Physiol. **86**: 447-450.

**Endo T, Goodbody A and Misawa M** (1987) Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. Planta Medica, **53**: 479-482.

**Flores HE and Filner P** (1985) Metabolic relationship of putrescine, GABA and alkaloid in cell and root cultures of Solanaceae en: Neumann KH., Barz W. and Reinhard E. Primary and secondary metabolism in plant cell cultures. Heidelberg: Springer-Verlag pp: 174-186.

**Hernandez-Dominguez E, Campos-Tamayo F and Vázquez-Flota F** (2004) Vindoline síntesis in *in vitro* shoot cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnol. Lett., **26**: 671-674.

**Hirata K, Horiuchi M, Ando T, Miyamoto K and Miura Y** (1990) Vindoline and catharanthine production in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. J. Ferm. Bioeng., **70**:193-195.

**Krueger RJ, Carew DP, Lui JHC and Staba EJ** (1982) Initiation, maintenance and alkaloid content of *Catharanthus roseus* leaf organ cultures. Planta Medica, **45**: 56-57.

**Lindsey K and Yeoman MM** (1983) The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. J. Exp. Bot., **34**: 1055-1065.

**Mersey BG and Cutler AJ** (1986) Differential distribution of specific indole alkaloids in leaves of *Catharanthus roseus*. Can.J. Bot. **64**: 1039-1045

**Nessler CL and Mahlberg PG** (1978) Ontogeny and cytochemistry of alkaloids vesicles in laticifers of *Papaver somniferum* L. Am. J. Bot., **64**: 541-551.

**Roberts M and Wink M** (1998) Alkaloid biochemistry, ecology and medical applications. Plenum Press New York, pp: 238-262

**Van der Heijden R, Verpoorte R and Ten Hoopen JG** (1989) Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. Plant Cell Tiss. Org. Cult., **18**: 231-280.

**Vázquez-Flota F and De Luca V** (1998) Developmental and light regulation of deacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.). Plant Physiol, **117**: 1351-1361.

**Wink M** (1999) Biochemistry of plant secondary metabolism, Annual Plant Review, Vol. 2, CRC Academic Press, Boca Raton; pp: 1-7.

**Moreno-Valenzuela OA, Galaz-Avalos RM, Minero-Garcia Y and Loyola-Vargas V** (1998) Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy roots. Plant Cell Reports, **18**: 99-104.

# CAPITULO I

## ANTECEDENTES

### Generalidades sobre los alcaloides

Dentro de los metabolitos secundarios, los alcaloides representan uno de los grupos más diversos por su origen biosintético, por sus estructuras y por los efectos fisiológicos que producen en diferentes organismos. Si bien las plantas son la fuente más importante de estos compuestos, otros organismos, incluyendo a ciertos animales, también pueden sintetizarlos a partir de estructuras más sencillas. Debido a los poderosos efectos fisiológicos que ejercen en el ser humano, los alcaloides y las plantas que los producen han ocupado un lugar preponderante en diferentes culturas a lo largo de la historia. Hoy en día, un importante número de alcaloides continúan utilizándose como medicamentos para el tratamiento de diferentes enfermedades (Tabla I), ya sea como formulaciones de patente o como infusiones, emplastos y otros tipos de aplicaciones tradicionales (Roberts y Wink, 1998).

Hasta finales de 2001, NAPRALERT enlistaba más de 20,000 alcaloides obtenidos de las plantas (NAPRALERT es la base de datos de la Universidad de Chicago que recopila la información sobre las plantas medicinales, sus usos y su composición química). El origen biosintético de la gran mayoría de los alcaloides conduce directamente a los aminoácidos. Sin embargo, la enzimología completa de las rutas de síntesis solamente ha sido establecida para menos de 10 alcaloides. El perfeccionamiento de las metodologías de cultivo *in vitro* de células vegetales durante la década de los 80's y en particular, la de la inducción del metabolismo secundario con derivados fúngicos redundó en el descubrimiento de muchas de las enzimas que participan en estas vías, así como de los mecanismos que regulan sus actividades.

Una de las rutas de síntesis de alcaloides mejor conocida es la que conduce a la formación de vindolina en *Catharanthus roseus*. El aislamiento de los genes correspondientes a algunas de las enzimas involucradas en este proceso ha permitido el análisis de su regulación, así como conocer cuáles son los factores que lo controlan, y mas aún, el descubrimiento de los sofisticados requerimientos de tipos celulares especializados en la síntesis y la acumulación de los mismos (De Luca y St-Pierre, 2000).

**Tabla I.** Aplicaciones, fuente y precios de algunos alcaloides utilizados en formulaciones médicas vigentes

<b>Alcaloide</b>	<b>Fuente</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Precio*</b>
Ajmalicina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antiarrítmico	37.00
Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Anticolinérgico	3.50
Emetina	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Emético	26.30
Escopolamina	<i>Hyoscyamus níger</i>	Sedante	17.30
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Antitusivo	17.00
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico	340.00
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Antitabaquismo	1.00
Quinina	<i>Cinchona officinalis</i>	Antimalarial	0.50
Sanguinarina	<i>Eschscholtzia californica</i>	Antibacterial	48.00

\*Precios al mayoreo en dólares americanos por gramo estimado en 1990  
Tomado de Verpoorte *et al.*, 1993.

### **Definición, origen y funciones de los alcaloides**

A diferencia de otros grupos de metabolitos secundarios, los alcaloides no pueden definirse con base en una estructura química común. Por ello, se ha intentado definirlos considerando su carácter básico, la presencia de nitrógeno en sus estructuras y la actividad fisiológica que pueden ejercer en organismos diferentes a aquellos que los producen. Aún teniendo en cuenta lo anterior, no es posible enunciar una definición que incluya a todos los compuestos que, por muchos años, han sido considerados como alcaloides.

Pelletier define a los alcaloides como “compuestos cíclicos que contienen nitrógeno en un estado de oxidación negativo y que tienen una distribución limitada en los organismos vivos” (Pelletier, 1970). Esta definición incluye a todos los compuestos con nitrógeno no cíclico que tienen efectos fisiológicos y elimina el requerimiento del comportamiento básico.

El comportamiento químico del átomo de nitrógeno da lugar a 4 tipos de compuestos:  
**a)** aminas secundarias o terciarias, protonadas a pH < 7.0 y por lo tanto hidrofílicas,



pero desprotonadas y lipofílicas a  $\text{pH} > 8.0$ . Este grupo incluye la mayoría de los alcaloides, los denominados "clásicos" o verdaderos; **b**) aminas cuaternarias, muy polares y con carga a todos los valores de  $\text{pH}$ . Pueden aislarse como sales (berberina, sanguinarina); **c**) aminas neutrales que incluyen los alcaloides tipo amida (capsaicina, colchicina); y **d**) *N*-óxidos, muy solubles en agua. Aún es frecuente encontrar algunas clasificaciones basadas en la posición del nitrógeno dentro de la estructura del alcaloide. Así, los alcaloides verdaderos son aquellos que contienen nitrógeno heterocíclico, mientras que los protoalcaloides son los que no contienen nitrógeno heterocíclico, sino como parte de una extensión aminada. Finalmente, los pseudoalcaloides son aquellos terpenoides (principalmente diterpenos y esteroides) y policétidos con nitrógeno heterocíclico, obtenidos por una transaminación.

### **Origen biosintético y distribución de los alcaloides**

La mayoría, pero no todos los alcaloides, son derivados de aminoácidos. De acuerdo a su origen biosintético, los alcaloides pueden agruparse como: a) derivados de aminoácidos (ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptofano y antranilato), b) alcaloides purínicos, c) terpenos aminados y d) alcaloides policétidos, en donde el nitrógeno se introduce en una cadena policétida mediante reacciones de transaminación.

Como ya se indicó, las plantas superiores son la fuente principal de los alcaloides, pero también se han encontrado en musgos (*Lycopodium* spp.), colas de caballo (*Equisetum* spp.), hongos e invertebrados marinos. Los alcaloides tienen una amplia distribución en las angiospermas, ya que se estima que entre el 20 y 30% de ellas los contienen.

## Descripción de *Catharanthus roseus*

**Familia:** Apocinácea

**Género:** *Catharanthus*

**Especie:** *Catharanthus roseus*



**Figura 1.1.** Flores terminales de *Catharanthus roseus* (G Don) de la variedad *Little Delicada*.

*Catharanthus roseus* (Fig. 1.1) pertenece a la familia de las Apocináceas. En México se le conoce con diversos nombres comunes como teresita o vicaria. Es originaria de Madagascar, aunque se cultiva en todo el mundo (Halevy, 1985). Esta planta es un arbusto perenne, pequeño y erguido de 30 a 60 cm de altura, común de las regiones tropicales. La planta es apreciada tanto por sus flores como por sus brillantes hojas verdes, las cuales son ovales con una nervadura central blanca. Las flores pueden ser rosadas, malvas o blancas con ojo central carmín (Fuente, 1990). Los extractos de *Catharanthus roseus* han sido usados para el tratamiento de la diabetes, contra el cáncer, para la regulación menstrual, problemas estomacales o indigestiones. También para detener hemorragias, o contra afecciones de la garganta y de los ojos, lavados vaginales y para combatir el acné (Wood *et al.*, 1997). Sin embargo, la principal aplicación médica de esta planta se relaciona con su capacidad para producir los alcaloides citotóxicos vinblastina y vincristina, que se utilizan en tratamientos contra diferentes tipos de cáncer. Alrededor de 200 alcaloides monoterpen-indólicos han sido aislados de esta planta, incluyendo a los diméricos (Mersey y Cutler, 1986). Todos estos alcaloides son derivados del triptófano y de la secologanina, un derivado terpénico formado a partir del geraniol. A continuación, se presenta una breve revisión de esta ruta de síntesis.

## Síntesis de alcaloides en *Catharanthus roseus*

Como ya se mencionó, los alcaloides de *Catharanthus* pertenecen a la familia de los monotermen-indólicos. Para aportar la porción indólica de este tipo de alcaloides, la primera reacción consiste en la descarboxilación del triptofano, catalizada por la triptofano descarboxilasa (TDC) (E. C. 4.1.1.28), generando la triptamina (Fig. 1.2). Este compuesto es uno de los dos sustratos para la formación de la estrictosidina (Aerts *et al.*, 1992; De Luca, 1993). La porción terpénica proviene del isopentenilpirofosfato (IPP) que mediante una serie de reacciones enzimáticas se convierte en secologanina. La secologanina se condensa con la triptamina formando la estrictosidina, por acción de la estrictosidina sintasa (EST). Este último compuesto puede considerarse como el primer alcaloide monotermen-indólico.

Si bien el esqueleto de la porción indólica permanece sin cambios, diferentes rearrreglos intramoleculares en la porción terpénica dan como resultado los diversos tipos de alcaloides de esta familia: los Corinante (ajmalicina), los Iboga (catarantina) y los Aspidosperma (vindolina) (Fig. 1.2).

### Formación de la porción indólica

La formación de triptamina a partir del triptofano sólo requiere la participación de una enzima, la TDC. La TDC es una enzima citosólica, y si bien ha sido detectada en todas las partes de las plántulas en desarrollo, predomina en los cotiledones. En las plantas maduras predomina en las raíces y en las hojas más jóvenes (Alvarez-Fernández *et al.*, 1989). También se le detecta fácilmente en los cultivos celulares de *Catharanthus roseus* (Roberts y Wink, 1998). Esta enzima es un homodímero de 110 kDa que está formada por dos subunidades idénticas de 54 kDa, conteniendo una molécula de piridoxal fosfato y una de pirroquinolina por monómero. Es codificada por un sólo gen en *Catharanthus roseus*, pero por dos genes en *Camptotheca acuminate* (Facchini *et al.*, 2000).

En plántulas en desarrollo, la actividad de la TDC está bajo una regulación muy estricta, ya que sólo puede detectarse por un breve período de entre 24 a 36 horas y solamente después de 5 o 6 días de germinación. Esto sugiere que la actividad de la enzima es necesaria sólo por ese breve período y que debe existir un mecanismo de regulación que restrinja su actividad a ese período y a los cotiledones (Alvarez-Fernández *et al.*, 1989). Conforme avanza el desarrollo de las plántulas, la actividad de la enzima reaparece, pero solamente cuando ya se han formado las primeras hojas verdaderas y en los ápices de las raíces (De Luca *et al.*, 1998).

## Formación de la porción terpénica

La formación de la strictosidina requiere del aporte de la secologanina, que se forma del geraniol que a su vez, proviene del isopentil pirofosfato (De Luca, 1993). Hasta hace unos años se creía que el IPP provenía de la ruta del mevalonato (Chapell, 1995a y 1995b) y que la enzima clave para la síntesis del mismo era la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR). Esta enzima se encarga de convertir el 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA en mevalonato. La HMGR ha sido detectada en plántulas etioladas, cultivo de raíces y células en suspensión (Van der Heijden *et al.*, 1994). En la actualidad se sabe que existe una vía alterna para la síntesis de IPP y que ésta es independiente de la ruta del mevalonato. En esta vía, el IPP se origina de la condensación del piruvato y del gliceraldehído 3-fosfato, los cuales se condensan en 1-desoxixilulosa-5-fosfato por la acción de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXPS) (Rohmer *et al.*, 1993). La vía alterna para la síntesis de IPP también se ha encontrado en plantas. Esta ruta es la principal que sintetiza IPP para la formación de isoprenoides en los plástidos, como son los monoterpenos, diterpenos, carotenos y plastoquinonas (Lange *et al.*, 1998; McCaskill y Croteau, 1998). De acuerdo a Contin y colaboradores (1998), el geraniol que es utilizado para la formación de la secologanina proviene principalmente de esta vía alterna. No obstante, estos autores sugieren que la vía del mevalonato también podría participar en la síntesis de este monoterpeno, aunque en un menor grado (Contin *et al.*, 1998).

El primer paso para la formación de la secologanina involucra la conversión del geraniol (o de su isómero, el nerol) en sus respectivos derivados 10-hidroxilados. El 10-hidroxi-geraniol se forma en una reacción catalizada por la geraniol 10-hidroxilasa, una monooxigenasa dependiente del citocromo P450 localizada en la membrana de las provacuolas (Madyastha *et al.*, 1977; Madyastha y Coscia, 1979). El hidroxigeraniol requiere ser reducido a 10-oxogeraniol, que después se transforma en iridodial. Algunas de estas enzimas se han caracterizado principalmente en *Rauwolfia serpentina*, pero no en *Catharanthus roseus* (De Luca, 1993). El iridodial es transformado en ácido logánico por medio de reacciones que involucran la formación del ácido 7-desoxilogánico. El ácido logánico es O-metilado en su grupo carboxilo para producir la loganina por acción de la ácido logánico metiltransferasa (LAMT). Esta enzima ha sido purificada parcialmente (Madyastha y Coscia, 1979). La formación de la secologanina involucra la apertura del anillo de ciclopentano. Esta reacción es catalizada por la secologanina sintasa (SLS), que fue recientemente caracterizada en células en suspensión de *Lonicera japónica*, como una monooxigenasa dependiente de citocromo P450 (Yamamoto *et al.*, 2000). Esta

enzima sólo acepta a la loganina como sustrato para dar como único producto a la secologanina (Yamamoto *et al.*, 2000).

### Formación de la strictosidina

La condensación de la triptamina con la secologanina es catalizada de modo esteroespecífico por la strictosidina sintasa (EST, EC 4.3.3.2) (Fig. 2). Si bien la actividad de esta enzima sólo ocurre en las plantas de las familias de las Apocináceas y las Rubiáceas, se han reportado genes similares en *Arabidopsis* y en *Solanum* (De Luca y St-Pierre, 2000). La EST ha sido aislada de cultivos de células de *Rauwolfia serpentina* (Hampp y Zenk, 1988) y de *Catharanthus roseus* (Pfitzner y Zenk, 1989). También ha sido purificada a partir de cultivos de raíces de *Catharanthus roseus* (De Waal *et al.*, 1995). A pesar de que en *Catharanthus roseus* sólo existe un gen para esta proteína (Pasquali *et al.*, 1992), existen de 4 a 6 isoformas, lo que sugiere modificaciones post-traduccionales de un precursor común. Estas diferencias se deben a diversos grados de glucosilación (De Waal *et al.*, 1995; Pfitzner y Zenk, 1989). Las 6 isoformas de la EST de cultivos de raíces, mostraron diferencias en sus puntos isoelectrónicos (pI), en su masa molecular y su grado de glucosilación. No obstante, tales diferencias no se correlacionaron con la distribución diferencial en tejidos o etapas de desarrollo. Las diferentes isoformas no fueron notoriamente distintas en sus parámetros cinéticos. Esto indica que las modificaciones postraduccionales no son mayormente relevantes para las propiedades catalíticas (De Waal *et al.*, 1995). La secuencia de aminoácidos obtenida a partir del ADNc de la strictosidina sintasa de *Catharanthus roseus* corresponde a una proteína de 39 kDa (McKnight *et al.*, 1990; Pasquali *et al.*, 1992). Esta enzima se ha logrado expresar en tabaco utilizando un ADNc con un péptido señal putativo de 31 aminoácidos (<biblio>). La proteína así expresada tuvo actividad catalítica y por pruebas de inmunolocalización se encontró en el interior de la vacuola, lo que coincide con estudios de fraccionamiento celular realizados en cultivos en suspensión de *Catharanthus roseus* y *Tabernaemontana divaricata* (Stevens *et al.*, 1993).

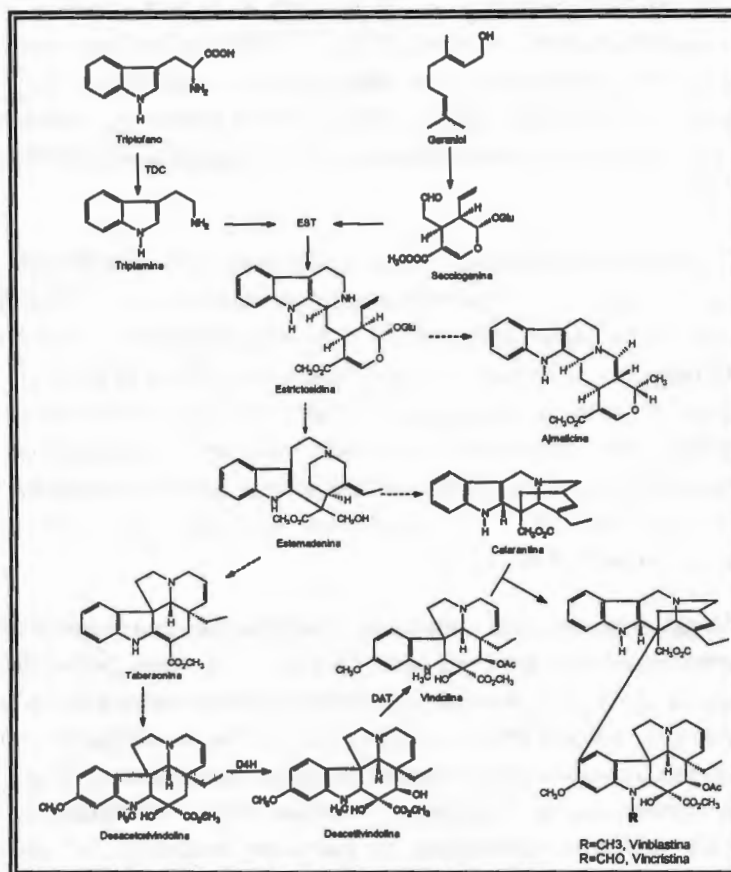
El gen de la strictosidina sintasa presenta una secuencia específica en su promotor que interactúa con factores transcripcionales específicos y cuya transcripción se induce por el tratamiento con inductores fúngicos. Este mecanismo involucra la participación del ácido jasmónico y la fosforilación de proteínas (Memelink *et al.*, 2001).

La strictosidina conserva la unidad de glucosa que aportó la secologanina. Para continuar la síntesis de los alcaloides, ésta debe ser eliminada en una reacción catalizada por una glucosidasa específica, denominada strictosidina  $\beta$ -D-glucosidasa

(SGD). Esta enzima ha sido purificada (Luijendijk *et al.*, 1998) y clonada (Geerlings *et al.*, 2000), a partir de cultivos en suspensión de *Catharanthus roseus*. Dicha glucosidasa consiste en una sola cadena polipeptídica de 63 kDa que puede formar complejos de 4, 8 y 12 monómeros, con diferentes grados de glucosilación (Luijendijk *et al.*, 1998). Gracias a la tinción específica de los productos que esta enzima forma, fue posible localizarla y está asociada con el tonoplasto (Geerlings *et al.*, 2000). Tanto la actividad enzimática, como las mayores cantidades del transcrito de *sgd*, se localizaron en hojas y raíces (Geerlings *et al.*, 2000).

### **Formación de los alcaloides tipo Corinante, Iboga y Aspidosperma.**

La strictosidina puede convertirse por medio de reacciones enzimáticas sencillas en ajmalicina y otros alcaloides del tipo Corinante, mientras que otras reacciones más complejas dan lugar a la transformación de la strictosidina en estemadenina, que se ha propuesto como el precursor común para los alcaloides tipo Iboga, como catarantina y los tipo Aspidosperma, como la tabersonina y la vindolina (Fig. 1.2). La tabersonina, es un intermediario tardío que por medio de seis pasos enzimáticos da lugar a la formación de vindolina.



**Figura 1.2.** Ruta de síntesis de alcaloides monoterpeno-indólicos en *Catharanthus roseus*. TDC, triptófano descarboxilasa; EST, estricosidina sintasa; D4H, desacetilvindolina hidroxilasa; DAT, desacetilvindolina acetil CoA acetiltransferasa.

### Transformación de la tabersonina en vindolina

Las dos primeras reacciones involucradas en esta etapa son catalizadas por las enzimas tabersonina 16 hidroxilasa (16-OH) y la 16-hidroxitabersonina O-metiltransferasa (De Luca *et al.*, 1998). La tercera reacción es una hidroxilación, catalizada por una enzima que aún no ha sido caracterizada.

La tabersonina 16 hidroxilasa (16-OH) cataliza una hidroxilación en el C 16 de la tabersonina. El producto de esta reacción es 16-hidroxitabersonina (Fig. 1.3). Esta enzima requiere oxígeno molecular como sustrato y al NADPH como cofactor. La

enzima se encuentra asociada a la membrana del retículo endoplásmico y se inhibe en presencia de CO<sub>2</sub>, citocromo c y miconazol, lo que la clasifica como una mono-oxigenasa dependiente del citocromo P450. En plantas, las hidroxilasas dependientes del citocromo P450 participan en la biosíntesis de alcaloides, de ácidos grasos, de flavonoides y de otros compuestos, como el ácido giberélico, polifenoles, esteroides, terpenos, así como en la desintoxicación de compuestos xenobióticos (Donaldson y Luster, 1991).

En la segunda reacción participa una O-metiltransferasa, que cataliza la transferencia de un grupo metilo del S-adenosilmetionina (SAM) a la 16-hidroxitabersonina, generando la 16-metoxitabersonina (Fig. 1.3). Esta enzima se localiza en el citosol. En la siguiente reacción participa una hidroxilasa que cataliza la adición de un grupo OH en la posición 2 de la 16-metoxitabersonina, resultando en la hidratación del doble enlace 2,3 (Fig. 1.3). Esta enzima no ha sido totalmente caracterizada. El producto de esta reacción, la 2,3-dihidro-16-metoxitabersonina, puede detectarse tanto en partes aéreas como en las raíces de la plantas, así como en cultivos de células en suspensión (Balsevich *et al.*, 1986).

Las tres últimas enzimas de la síntesis de vindolina son una N-metiltransferasa (NMT), la desacetoxivindolina 4-hidroxilasa (D4H) y la desacetilvindolina acetil-CoA acetiltransferasa (DAT). La enzima 2,3-dihidro-16-metoxitabersonina-N-metiltransferasa (NMT) cataliza la adición de un grupo metilo sobre el nitrógeno indólico de la 2,3-dihidro-16-metoxitabersonina, formando la desacetoxivindolina (Fig. 1.3). Si bien la enzima se localiza en la membrana tilacoidal de los cloroplastos, la NMT se ha detectado en elevadas actividades en plántulas etioladas, así como en plántulas expuestas a la luz, con cloroplastos totalmente desarrollados. Su masa molecular aproximada es 60 kDa, con una elevada especificidad por sus sustratos y no requiere de cofactores.

La desacetoxivindolina 4-hidroxilasa (D4H) es la penúltima enzima de esta parte de vía. La enzima cataliza una reacción en la cual se convierte la desacetoxivindolina en desacetilvindolina, por la adición de un grupo OH en el carbono 4 (Fig. 1.3). Esta enzima pertenece a la familia de dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, ya que requiere del ascorbato y de iones de hierro para estar totalmente activa, así como de oxígeno molecular como sustrato. Tiene una masa molecular de 45.5 kDa y se localiza en el citosol. Los análisis de Southern blot muestran que el gene *d4h* está presente como copia única en el genoma de *Catharanthus roseus*. La D4H parece estar regulada por el estado de desarrollo, el medio ambiente y de modo tejido específico. Es interesante notar que en plántulas etioladas se detectaron bajos niveles de la



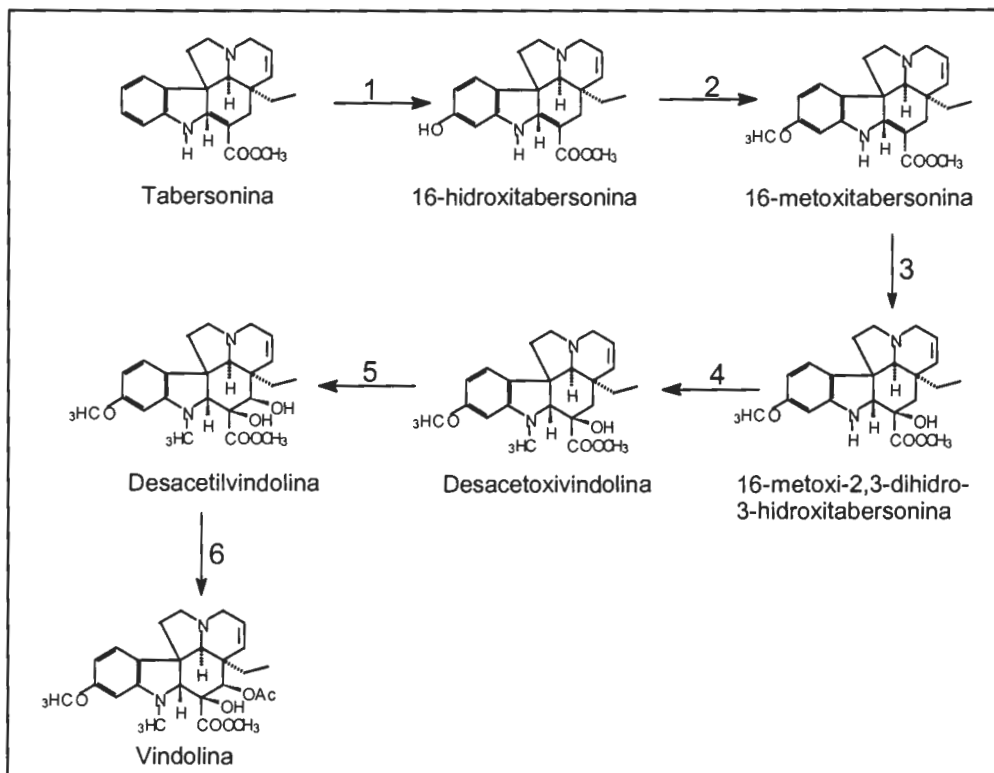
actividad enzimática de D4H, aun cuando se habían encontrado cantidades importantes de los transcritos. Posteriormente, al exponer las plántulas a la luz por 24 h, la actividad enzimática se incrementó entre cuatro y ocho veces, aún y cuando los niveles del transcrito no aumentaron de manera significativa. Esto sugiere que esta enzima presenta un tipo de regulación post-transcripcional (Vázquez-Flota y De Luca, 1998a). La enzima sólo ocurre en las partes aéreas de las plántulas en desarrollo y plantas maduras y está ausente en cultivo de tejidos (Vázquez-Flota *et al.*, 1997). La luz es un factor que activa esta enzima mediante la participación del fitocromo. Además, se han caracterizado tres isoformas que al parecer resultan de modificaciones post-traduccionales (Vázquez Flota y De Luca, 1998a).

Finalmente, la última reacción en la conversión de desacetilvindolina en vindolina (Fig. 1.3) está catalizada por la acetil-CoA: desacetilvindolina acetiltransferasa (DAT). Esta enzima pertenece a la misma familia que la cloranfenicol-O-acetiltransferasas, las cuales son responsables de un gran número de reacciones de acilación en el metabolismo secundario de plantas.

Al igual que en el caso de la D4H, el fitocromo también participa en la activación por luz de esta enzima. La DAT es un monómero de 45 kDa y su gen se presenta como una copia única en el genoma de *Catharanthus roseus*. La enzima ocurre en las partes aéreas de plántulas y plantas maduras, y está ausente en cultivos de tejidos (St-Pierre *et al.*, 1998).

### **Formación de los alcaloides diméricos**

La vindolina se acopla con la catarantina para formar la anhidrovinblastina (AVBL), el primer alcaloide dimérico (Endo *et al.*, 1987). Se ha propuesto que esta reacción es catalizada por una peroxidasa vacuolar con actividad específica de AVBL sintasa (Sottomayor *et al.*, 1998). La localización de esta peroxidasa en la vacuola coincide con la compartimentalización de los alcaloides diméricos en este organelo (McCaskill *et al.*, 1998, Sottomayor *et al.*, 1998).



**Figura 1.3.** La transformación de tabersonina en vindolina requiere de seis enzimas; 1) tabersonina 16-hidroxilasa; 2) 16-hidroxitabersonina O-metiltransferasa; 3) hidroxilasa no caracterizada; 4) N-metiltransferasa; 5) desacetoxivindolina 4-hidroxilasa; 6) desacetilvindolina acetil-CoA acetiltransferasa.

### Regulación de la síntesis de vindolina

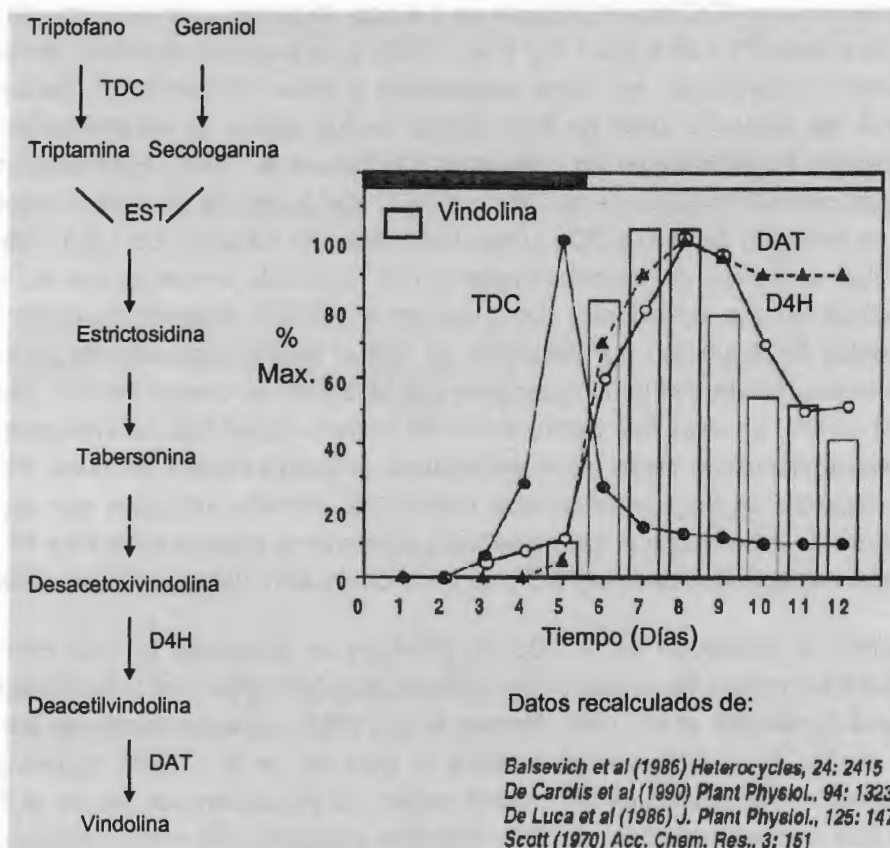
Debido a su costo, así como a los bajos rendimientos obtenidos de las plantas, se ha intentado producir los alcaloides diméricos utilizando alternativas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro*. Esto aún no ha sido posible ya que, a pesar de que dichos cultivos pueden acumular cantidades elevadas de catarantina, no son capaces de sintetizar la vindolina (De Luca, 1993). Por ello, la regulación de la síntesis de la vindolina ha recibido un especial interés (De Luca y Laflamme, 2001).

Por la posición que ocupan al principio y al final de la ruta de síntesis de la vindolina, gran parte de los estudios realizados se han enfocado a las enzimas TDC, EST, D4H y DAT. Dichos estudios se han realizado en plántulas en desarrollo, debido a que es posible inducir la síntesis de vindolina por medio de la exposición a la luz de plántulas

germinadas en la oscuridad o etioladas (De Luca y Laflamme, 2001). En la oscuridad, la actividad de la TDC ocurre después de 5-6 días de germinación en forma de un pico que dura entre 12 y 24 h (De Luca *et al.*, 1988). Bajo estas condiciones, se acumulan ajmalicina, catarantina, así como tabersonina y otros intermediarios tardíos de la síntesis de vindolina, pero no ésta última. La luz induce la transformación de la tabersonina en vindolina en los cotiledones (De Luca *et al.*, 1988). Esta transformación coincide con la activación de la D4H y la DAT, que ocurre de 24 a 48 h después del pico de actividad de la TDC (De Luca *et al.*, 1988; De Carolis y De Luca, 1994) (Fig. 1.4). Así, la síntesis de vindolina presenta una regulación ambiental por luz y tejido-específica en los cotiledones (De Luca *et al.*, 1988). Además, también existen elementos de regulación por desarrollo, ya que si bien la expresión de las enzimas involucradas en los primeras reacciones puede ocurrir en etapas menos avanzadas del desarrollo, aquellas que participan en las últimas etapas sólo ocurren después de que se ha alcanzado cierto grado de madurez (Vázquez-Flota y De Luca, 1998a). A este respecto, se debe enfatizar que cuando las plántulas etioladas son expuestas antes de los cinco días a la luz, no se logra mantener el periodo entre 24 y 48 h entre las máximas actividades de la TDC y las de la D4H y DAT (Vázquez-Flota, 1998).

El patrón de activación de la TDC en plántulas en desarrollo es muy complejo e involucra elementos de control transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona (Alvarez-Fernández *et al.*, 1989, Roewer *et al.*, 1992). La acumulación de transcritos para la TDC y la EST coinciden entre sí (Roewer *et al.*, 1992), sugiriendo una coordinación transcripcional para estos genes. La regulación por luz de la D4H, al igual que lo observado para la TDC, involucra elementos de control transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona, y requiere la participación del fitocromo (Vázquez-Flota y De Luca, 1998a). La acumulación del transcrito de la DAT también se induce por la luz, y como en el caso de la D4H, está mediada por el fitocromo (Aerts *et al.*, 1992; St-Pierre *et al.*, 1998).

Además de la luz, la aplicación de metil jasmonato a plántulas induce las actividades de la TDC, EST, D4H y DAT en diferentes medidas, pero siempre manteniendo la separación temporal entre las actividades de las enzimas involucradas en las reacciones tempranas (TDC y EST) y las tardías (D4H y DAT). Así, el jasmonato parece participar en la modulación de eventos regulatorios previamente desencadenados por el proceso de desarrollo en sí (Aerts *et al.*, 1994, 1996; Vázquez-Flota *et al.*, 1998b).



**Figura 1.4.** Esquema de la regulación de las enzimas involucradas en las primeras y últimas etapas de la síntesis de vindolina. Mismas abreviaturas que en la Figura 1.2.

### Compartimentalización celular de la ruta de síntesis de vindolina en *Catharanthus roseus*

Entre los alcaloides mayoritarios de *Catharanthus roseus*, sólo la vindolina y los diméricos se acumulan exclusivamente en las partes aéreas. Los demás alcaloides se encuentran distribuidos en todos los tejidos de la planta madura (Balsevich y Bishop, 1989). De este modo, la ajmalicina y la serpentina (tipo Corinante) se acumulan principalmente en las raíces. Casi el 60% del total de la catarantina (tipo Iboga) en una planta se encuentra en las raíces y el resto, en las hojas (Deus Neumann *et al.*, 1987).

Esta distribución en diferentes tejidos coincide con la localización diferencial de las enzimas involucradas en la síntesis de los alcaloides. Pero además de la separación en tejidos, dichas enzimas también se distribuyen diferencialmente en los diversos tipos celulares que forman un tejido. Mediante las técnicas de inmunocitoquímica y de hibridación *in situ* de los ARN correspondientes, TDC, EST (St-Pierre *et al.*, 1999) y SLS (Irmler *et al.*, 2000), han sido localizadas únicamente en la epidermis de las hojas, mientras que aquellos correspondientes a D4H y DAT, únicamente se detectaron en células especializadas, denominadas idioblastos, así como en células laticíferas (St-Pierre *et al.*, 1999). Estas células, que se asocian con la síntesis de productos naturales, están dispersas entre las células del mesófilo, pero no muestran ningún tipo de conexión con las células de la epidermis. Esta distribución fue similar en plántulas en desarrollo, aún en condiciones de crecimiento en oscuridad (Vázquez-Flota *et al.*, 2000). La distribución de estas enzimas, junto con la no conexión de la epidermis y las células laticíferas y los idioblastos, sugiere la movilización (salida) de un intermediario post-estrictosidina de la epidermis. No ha podido ser establecido, si este compuesto llega de manera directa a los tipos celulares que expresan la D4H y la DAT, o si se requiere de la participación de otros tipos celulares, (St-Pierre *et al.*, 1999).

En cortes de raíces, los transcritos correspondientes a TDC, EST y SLS solamente fueron detectados en los ápices terminales. De modo interesante, aún cuando estos tejidos también contienen idioblastos, los transcritos correspondientes a D4H y DAT no lograron ser detectados (St-Pierre *et al.*, 1999; Irmler *et al.*, 2000; Vázquez-Flota *et al.*, 2000).

Además de la distribución en diferentes tipos celulares, las enzimas involucradas en la síntesis de alcaloides, también están distribuidas a través de diferentes organelos, que incluyen el citosol, la vacuola, el tonoplasto, el cloroplasto y el retículo endoplásmico (De Luca y St-Pierre, 2000). De este modo, la síntesis de vindolina puede llegar a involucrar la participación de diferentes tejidos, tipos celulares y organelos, lo que hace evidente que se requiera de un sofisticado mecanismo de coordinación de cada una de estas partes.

### **Alcaloides en cultivos *in vitro* de *Catharanthus roseus***

Los cultivos *in vitro* de *Catharanthus roseus* han sido de gran utilidad en el estudio del metabolismo de los alcaloides monoterpén-indólicos. En estos sistemas, la capacidad de síntesis de vindolina se pierde al no encontrarse las actividades de D4H y DAT (Balsevich *et al.*, 1986; De Luca *et al.*, 1988), lo que a su vez está relacionado con la falta de los tipos celulares que las expresan (St-Pierre *et al.*, 1999). La pérdida de la

capacidad de síntesis de vindolina en cultivos *in vitro* puede recuperarse al inducir la formación de brotes a partir de los callos (Constabel *et al.*, 1982). Aunque existen varios reportes sobre la presencia de vindolina en cultivos desorganizados, los niveles en los que ésta se produce son de dos a tres órdenes de magnitud menores que los encontrados en plantas completas (Van der Heijden *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1995). También se han reportado líneas de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* con una producción estable de vindolina (Bhadra *et al.*, 1993; O'Keefe *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de que los niveles producidos fueron mayores que en los cultivos desorganizados, fueron aún mucho menores que en las plantas intactas.

Las estrategias empleadas para promover la acumulación de alcaloides en *Catharanthus roseus* incluyen la inducción de líneas celulares a partir de individuos seleccionados, el rastreo y selección de líneas celulares, la optimización de la composición del medio, el empleo de reguladores del crecimiento y de inductores, entre otras (Van der Heijden *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1995).

### **Efecto de los reguladores del crecimiento sobre la síntesis de alcaloides**

La presencia de 2,4-D en el medio de cultivo tiene un efecto inhibitorio sobre la síntesis de alcaloides en células en suspensión (Van der Heijden *et al.*, 1989). Este efecto también se presenta con otras auxinas y se relaciona con la supresión de la transcripción de los genes *tdc* y *est* (Goddijn *et al.*, 1992; Pasquali *et al.*, 1992). Efectos similares se han observado en cultivos de raíces (Goddijn *et al.*, 1992); no obstante, en plántulas la aplicación de ácido indolbutírico promueve la actividad de la TDC (Aerts *et al.*, 1992). Estas diferencias ilustran la importancia del grado de organización de los tejidos en la regulación del metabolismo de los alcaloides.

### **Efecto de los inductores fúngicos y el jasmonato sobre la síntesis de alcaloides**

La aplicación de homogenados de *Phytium aphanidermatum* (Eilert *et al.*, 1987; Roewer *et al.*, 1992) y de extracto de levadura (Pasquali *et al.*, 1992) condujo a la inducción de las actividades de TDC y de EST. La activación transcripcional de los genes *tdc* y *est* ocurrió dentro de los primeros 15 minutos del tratamiento, lo que sugiere la participación de una corta cadena de señalización entre el estímulo y la respuesta (Pasquali *et al.*, 1992). La aplicación de jasmonato o de alguno de sus precursores también produjo la activación de la TDC y la EST, de modo similar al observado con los inductores fúngicos (Menke *et al.*, 1999b). De hecho, el jasmonato participa en la mediación del estímulo desencadenado por los inductores fúngicos que también requiere la fosforilación de proteínas (Menke *et al.*, 1999b).

## **Ingeniería metabólica para la síntesis de alcaloides de *Catharanthus roseus***

La adición de triptofano a un cultivo en suspensión de *Catharanthus roseus* dió como resultado neto un aumento de la poza de la triptamina, pero sin modificar la producción de alcaloides (Facchini y Di Cosmo, 1991). En contraste, en otra línea celular, la aplicación de triptofano triplicó el contenido inicial de alcaloides. Más aún, en una tercera línea celular, el triptofano tuvo efectos negativos sobre la producción de alcaloides (Zenk *et al.*, 1977). La adición de triptamina a cultivos *in vitro* también ha producido resultados ambiguos en la acumulación de alcaloides. Se han reportado efectos, tanto negativos (Döller *et al.*, 1976) como positivos (Krueger y Carew, 1978). La adición de secologanina también ha dado resultados variables. En algunas líneas celulares se logró estimular la acumulación de alcaloides, mientras que en otras no se observó ningún efecto (Zenk *et al.*, 1977, Krueger y Carew 1978; Facchini y DiCosmo, 1991; Moreno, 1993). Estos resultados sugieren que la disponibilidad de precursores no basta para activar la síntesis de los alcaloides, y que al parecer, se requiere de alguna señal adicional.

El aislamiento de algunos genes correspondientes a las enzimas involucradas en la síntesis de los alcaloides ha permitido el desarrollo de estrategias basadas en la sobreexpresión de los mismos. Así, se han introducido a cultivos en suspensión las secuencias que codifican para la TDC y la EST controladas por un promotor constitutivo (el 35S del virus del mosaico de la coliflor) (Canel *et al.*, 1998). Los resultados mostraron que la alta actividad de la TDC no conduce necesariamente a la acumulación de alcaloides. Al contrario, la alta actividad de TDC ocasionó una disminución del crecimiento celular (Canel *et al.*, 1998). Sin embargo, la expresión constitutiva de EST en líneas celulares sí llevó a una acumulación de alcaloides seis veces mayor que los cultivos no transformados. Si bien estos resultados son muy interesantes, es importante señalar que no todas las líneas transformadas con el gene *est* se comportaron de la misma manera y que en algunas, no se observaron diferencias en comparación con los controles. Estas observaciones sugieren que el aumento en la actividad de esta enzima no es el único factor que controla la síntesis de los alcaloides (Canel *et al.*, 1998; Whitmer *et al.*, 1998).

### **Activación transcripcional de la síntesis de alcaloides en *Catharanthus roseus***

Recientemente se han identificado regiones en los promotores de los genes *tdc* y *est* que responden al tratamiento con inductores fúngicos y con jasmonato (Ouwkerk y Memelink, 1999a, 1999b; Pasquali *et al.*, 1999). Estas regiones interactúan con factores transcripcionales. De modo interesante, los factores transcripcionales que interaccionan con los elementos *cis* del promotor de *tdc*, también lo hacen con

regiones regulatorias (enhancers) de los promotores de *est* (Pasquali *et al.*, 1999), sugiriendo la posible participación de estos factores en coordinación en la expresión de *tdc* y *est*. En el promotor de *est* también se han identificado dos regiones que son responsables de la inducción por inductores y jasmonato (Menke *et al.*, 1999a; van der Fits *et al.*, 2000). Una de estas regiones contiene un elemento GCC, que se ha denominado como caja JERE (por **J**asmonate and **E**licitor **R**esponsive **E**lements; Van der Fits y Memelink, 2001). La caja JERE interactúa con dos factores transcripcionales que responden al jasmonato y que se han denominado ORCA's (por **O**ctadecanoic **R**esponsive **C**atharanthus **A**P-2 domain proteins; Menke *et al.*, 1999a, Van der Fits *et al.*, 2000). La expresión de *orca2* y de *orca3* se induce rápidamente en respuesta al jasmonato y pueden transactivar la expresión de *est* mediante su unión a JERE (Menke *et al.*, 1999a; Van der Fits y Memelink, 2001).

Se han transformado cultivos celulares de *Catharanthus roseus* con ORCA3 resultando en la activación transcripcional de los genes *tdc*, *est*, y *d4h*, mientras que los genes de *g10h*, *sgd* y *dat* no se vieron afectados (Van der Fits y Memelink, 2001). La activación de estos genes del metabolismo secundario ocurrió en coordinación con la activación del gen de la antranilato sintasa que participa en la síntesis del triptofano. De este modo, ORCA3 puede activar genes del metabolismo secundario, así como a genes del metabolismo primario, cuyos productos se envían a las rutas secundarias (Van der Fits y Memelink, 2001). Si bien las líneas en las que ORCA3 se expresaba de manera continua acumulaban grandes cantidades de triptamina, no acumularon mayores cantidades de alcaloides. Esto posiblemente se debió a que no se logró la expresión de *g10h* (Van der Fits y Memelink, 2001), lo que sugiere que existe una limitante de precursores terpénicos y la ocurrencia de otros factores transcripcionales que activen esta rama metabólica.

### **Cultivo de brotes**

A pesar de todos los esfuerzos realizados por diversos grupos de investigación para producir los alcaloides diméricos en cultivos *in vitro*, las hojas de *Catharanthus roseus* siguen representando la única fuente principal de éstos. Aún cuando los cultivos no diferenciados acumulan catarantina, la síntesis de vindolina se ve afectada al grado que no se produce. El problema de los tejidos desdiferenciados parece estar relacionado precisamente con la ausencia de organización celular (St-Pierre *et al.*, 1999). Debido a esta situación, se ha propuesto el establecimiento de cultivos *in vitro* con potencial morfogénico, como el cultivo de brotes, como una alternativa (Krueger *et al.*, 1982). En estos cultivos, se forman todos los tejidos aéreos manteniendo la morfología macroscópica (Krueger *et al.*, 1982).



Diversas líneas de cultivos de brotes muestran un patrón de alcaloides similar al de las hojas de plantas maduras y los cotiledones de plántulas en desarrollo, siendo la vindolina el alcaloide mayoritario, con cantidades menores de ajmalicina y catarantina (Endo *et al.*, 1987, Hirata *et al.*, 1987). No obstante, un problema asociado con este sistema de cultivo es el elevado grado de variación en las cantidades de vindolina entre diferentes lotes, que puede ser de hasta seis veces (Hirata *et al.*, 1990). Dicha variabilidad podría estar relacionada con fallas en la activación coordinada de las enzimas que participan en las reacciones tempranas y tardías de la síntesis de vindolina. La coordinación en plántulas en desarrollo, ocurre gracias a la participación de la luz como señal ambiental (De Luca *et al.*, 1988). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre el metabolismo de los alcaloides en este tipo de cultivos.

## **Hipótesis**

Si la luz tiene un papel central en la coordinación de la expresión de las enzimas involucradas en las reacciones tempranas y tardías de la síntesis de vindolina, en plántulas de *Catharanthus roseus* formadas a partir de embriones (semillas). Entonces, es posible que este efecto también se presente en plántulas formadas a partir de yemas meristemáticas (brotes).

## **Justificación**

Durante las primeras etapas del desarrollo, la activación coordinada de las enzimas involucradas en las etapas tempranas (TDC y EST) y tardías (D4H y DAT) es de gran relevancia en la regulación de la síntesis de vindolina. La luz representa la señal ambiental que permite dicha activación coordinada.

Por otra parte, aunque los cultivos de brotes *in vitro* tienen la capacidad de producir vindolina, los niveles de acumulación pueden variar hasta seis veces en diferentes lotes de cultivo. Es posible que esta variación esté relacionada con la falta de coordinación entre las enzimas que participan en las primeras y en las últimas reacciones de la síntesis de este alcaloide. Debido a que la luz controla dicha coordinación, es de esperarse que el régimen de iluminación afecte las enzimas mencionadas en los cultivos de brotes. Puesto que no hay reportes de estudios sobre el efecto de la luz en la síntesis de vindolina en cultivos de brotes de *Catharanthus roseus*, este trabajo representa una primera aproximación para conocer cómo este factor ambiental incide sobre el metabolismo de los alcaloides en dicho sistema.

## **Objetivo general**

Estudiar el efecto del régimen de luz, fotoperíodo e iluminación continua, sobre la síntesis de alcaloides en brotes cultivados *in vitro* de *Catharanthus roseus*.

## **Objetivos particulares**

Establecer y caracterizar de un cultivo de brotes de *Catharanthus roseus* en fotoperíodo y en iluminación continua.

Analizar el patrón cualitativo y cuantitativo de alcaloides durante un ciclo de cultivo en brotes mantenidos en fotoperíodo y en iluminación continua.

Determinar las actividades enzimáticas de la TDC, la D4H y la DAT durante un ciclo de cultivo en ambas condiciones de iluminación.

## Diseño experimental

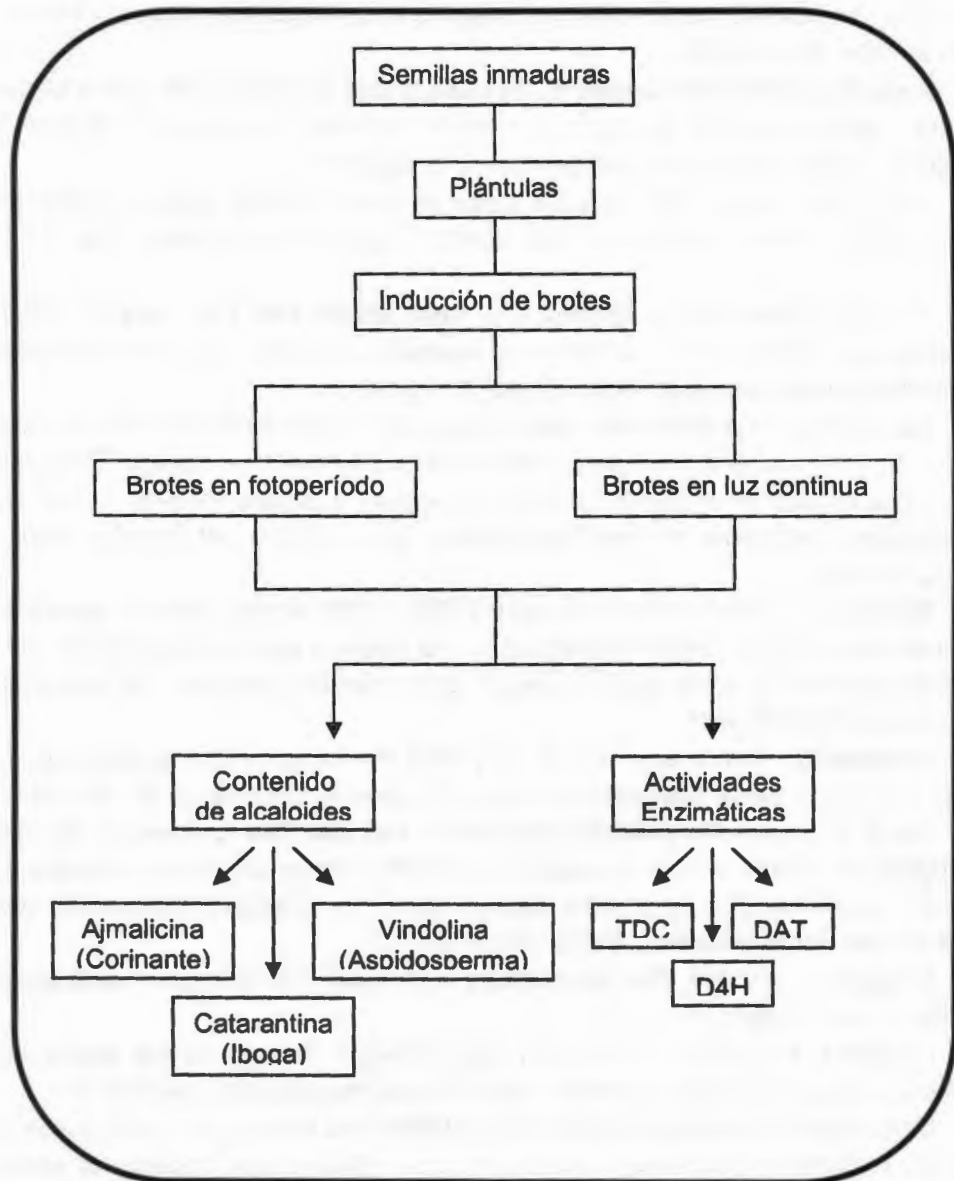


Figura 1.5. Diagrama del diseño experimental seguido en este trabajo.

## Referencias

**Aerts RJ, Schafer A, Hesse M, Baumann TW and Slusarenko A** (1996) Signaling molecules and the synthesis of alkaloids in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry*, **42**: 417-422.

**Aerts RJ, Gisi D, De Carolis E, De Luca V and Baumann TW** (1994) Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloid in *Catharanthus* and *Chinchona* seedlings. *Plant J*, **5**: 635-643.

**Aerts RJ, Alarco AM and De Luca V** (1992) Auxins induce tryptophan decarboxylase activity in radicles of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, **100**: 1014-1019.

**Alvarez-Fernandez J, Owens TG, Kurz WGW and De Luca V** (1989) Immunological detection and quantitation of tryptophan decarboxylase in developing *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol*, **91**:79-84.

**Balsevich J and Bishop G** (1989) Distribution of catharanthine, vindoline and 3',4' -anhydrovinblastine in the aerial parts of some *Catharanthus roseus* plants and the significance therefore in relation to alkaloid production in cultured cells. In *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Kurz W.G.W. (ed) Springer-Verlag, Berlin, pp.149-153.

**Balsevich J, De Luca V and Kurz WGW** (1986) Altered alkaloid pattern in dark grown seedlings of *Catharanthus roseus*. The isolation and characterization of 4-deacetoxyvindoline: A novel indole alkaloid and proposed precursor of vindoline. *Heterocycles*, **24**: 2415-2421.

**Bhandra R, Vani S and Shank JV** (1993) Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol and Bioeng*, **41**: 581-592.

**Canel C, Lopes-Cardoso M, Whitmer S, van der Fits L, Pasquali G, van der Heijden R, Hoge J and Verpoorte R** (1998) Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta*, **205**: 414-419.

**Chappel J** (1995a) The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol*, **107**: 1-6.

**Chappell J** (1995b) Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**: 521-547.

**Constabel F, Gaudet-IaPrairie P, Kurz WGW and Kutney JP** (1982) Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. XII. Biosynthetic capacity of callus from original explants and regenerated shoots. *Plant Cell Rep*, **1**: 139-142.

**Contin A, Van de Heijden R, Lefeber A and Verpoorte R** (1998) The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Lett*, **434**: 413-416.

**De Carolis E and De Luca V** (1994) 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: Biochemical characterization. *Phytochemistry*, **36**: 1093-1107.

**De Luca V** (1993) Ezymology of indole alkaloid biosynthesis. In *Methods in Plant Biochemistry of Secondary Metabolims*. Lea P.J. (ed) Academic Press, London, pp. 345-368.

**De Luca V and Laflamme P** (2001) The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, **4**: 225-233.

**De Luca V and St-Pierre B** (2000) The cell and developmental biology of alkaloids biosynthesis. *Trends Plant Sci*, **5**: 168-173.

**De Luca V, Alvarez-Fernández J, Campbell D and Kurz WGW** (1988) Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, **86**: 447-450.

**De Luca V, St-Pierre B, Vázquez-Flota F and Laflamme P** (1998) Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: The establishment of a model system. In: *Cellular Integration of Signaling Pathway in Plant Development*. Loschiavo F., Rainkhel N., Last R. and Morelli G. (eds) NATO ASI series, Springer Verlag, Berlin, pp. 171-187.

**De Waal A, Meijer AH and Verpoorte R** (1995) Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: purification and characterization of multiple forms. *Biochem J*, **306**: 571-580.

**Deus-Neumann B, Stocking J and Zenk MH** (1987) Radioimmunoassay for the quantitative determination of catharanthine. *Planta Medica*, **53**:184-187.

**Döllner G, Alfermann AW and Reinhard E** (1976) Produktion von indolalkaloiden in Callus-kulteren Von *Catharanthus roseus*. *Plant Med*, **30**: 14-20.

**Donaldson RP and Luster DG** (1991) Multiple form of plant cytochromes P-450. *Plant Physiol*, **96**: 669-674.

**Eilert U, de Luca V, Constabel Fand Kurz WGW** (1987) Elicitor-mediated induction of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase in cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Arch Biochem Biophys*, **25**: 491-497.

**Endo T, Goodbody A and Misawa M** (1987) Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica*, **53**: 479-482.

**Facchini PJ and Di Cosmo F** (1991) Secondary metabolite biosynthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Immobilized by adhesion to glass fibers. *Appl Microbiol Biotechnol*, **35**: 382-392.

**Facchini PJ, Huber-Allanach KI and Tari LW** (2000) Plant aromatic L-amino acid decarboxylase: evolution, biochemistry, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry*, **54**: 121-138.

**Fuente Moreno LL** (1990) Caracterización de los alcaloides indólicos presentes en líneas celulares normales y habituadas de *Catharanthus roseus*, Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UADY, Mérida Yucatán.

**Geerlings A, Martinez-Lozano M, Memelink J, van der Heijden R and Verpoorte R** (2000) Molecular cloning and analysis of strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. J Biol Chem, **275**: 3051-3056.

**Goddijn OJM, De Kam RJ, Zenetti A, Schilperoort RA and Hoge JHC** (1992) Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. Plant Mol Biol, **18**: 113-1120.

**Halevy H A** (1985) Handbook of flowering plants, Vol. II CRC Press, Boca Ratón, pp: 120-125.

**Hampp N and Zenk M** (1988) Homogeneous strictosidine synthase from cell suspension cultures of *Rauwolfia serpentina*. Phytochemistry, **27**: 3811-3815.

**Hirata K, Horiuchi M, Ando T, Miyamoto K and Miura Y** (1990) Vindoline and catharanthine production in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. J, Ferm Bioeng, **70**:193-195.

**Hirata K, Yamanaka A, Kurano N, Miyamoto K and Miura Y** (1987) Production of indole alkaloid in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. Agric Biol Chem, **51**:1311-1317.

**Irmiler S, Schröder G, St-Pierre B, Crouch N P, Hotze M, Schmidt J, Strack D, Matern U and Schröder J** (2000) Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of phytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. Plant J, **24**:797-804.

**Krueger RJ, Carew DP, Lui JHC and Staba EJ** (1982) Initiation, maintenance and alkaloid content of *Catharanthus roseus* leaf organ cultures. Planta Medica, **45**: 56-57.

**Krueger RJ and Carew DP** (1978) *Catharanthus roseus* tissue culture the effect the precursors on growt and alkaloid production. J Nat Prod, **41**: 327-331.

**Lange B, Wildung M, McCaskill D and Croteau R** (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. Proc Natl Acad Sci USA, **95**: 2100-2104.

**Luijendijk Teus J C, Stevens L H and Verpoorte R** (1998) Purification and characterization of strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. Plant Physiol Biochem, **36**: 419-425.

**Madyastha K and Coscia C** (1979) Enzymology of indole alkaloid biosynthesis. Rec Adv Phytochem, **13**: 85-129.

**Madyastha K, Ridgway J, Wyer J and Coscia C** (1977) Subcellular localization of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in vesicles of the higher plant *Catharanthus roseus*. *J Cell Biol*, **72**: 302-313.

**McCaskill D and Croteau R** (1998) Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants, *Trends Biotechnol*, **16**: 349-355.

**McCaskill DG, Martin D L and Scott A L** (1998) Characterization of alkaloid uptake by *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Protoplasts. *Plant Physiol*, **87**: 402-408.

**McKnight TD, Bergey DR, Burnett R and Nessler CL** (1991) Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants. *Planta*, **185**: 148-152.

**McKnight TD, Roessner CA, Devagupta R, Scott A and Nessler CL** (1990) Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*. *Nucl Acids Res*, **18**: 4939.

**Memelink J, Verpoorte R and Kijne JW** (2001) ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci*, **6**: 212-219.

**Menke FLH, Champion A, Kijne JW and Memelink J** (1999a) A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA<sup>™</sup>. *EMBO J*, **16**: 4455-4463.

**Menke FLH, Parchmann S, Muller MJ, Kijne JW and Memelink J** (1999b). Involvement of octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, **199**: 1289-1296.

**Mersey BG and Cutler AJ** (1986) Differential distribution of specific indole alkaloids in leaves of *Catharanthus roseus*. *Can.J. Bot.* **64**: 1039-1045.

**Moreno PRH, van der Heijden R and Verpoorte R** (1995) Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey II. Updating from 1988 to 1993. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **42**: 1-25.

**Moreno Valenzuela O** (1993) Efectos de los inductores bióticos y abióticos sobre la producción de alcaloides indólicos en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, Tesis Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, ITECM-CICY, Mérida, Yucatán.

**O'Keefe BR, Mahady GB, Gills JJ and Beecher CWW** (1997) Stable vindoline production in transformed cell cultures of *Catharanthus roseus*. *J Nat Prod*, **60**: 261-264.

**Ouwerkerk PBF and Memelink J** (1999a) A G-box element from the *Catharanthus roseus* strictosidine synthase (*Str*) gene promotor confers seed-specific expression in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet*, **261**: 635-643.

**Ouwerkerk PBF and Memelink J** (1999b) Elicitor-responsive promotor regions in the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol*, **39**:129-136.

**Pasquali G, Goddijn O, de Waal A, Verpoorte R, Schilperoort R, Hoge H and Memelink J** (1992) Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxins and elicitors. *Plant Mo Biol*, **18**: 1121-1131.

**Pasquali G, Erven SW, Ouwerkerk PB, Menke FL, and Memelink J** (1999) The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factor GT-1 and GBF. *Plant Mol Biol*, **39**: 1299-1310.

**Pelletier SW** (1970) *Chemistry of the Alkaloids*. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

**Pfzner U and Zenk M** (1989) Homogeneous strictosidine synthase isoenzymes from cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica*, **55**: 525-530.

**Rhomer M, Knani M, Simonin P, Sutter B and Sahm H** (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J*, **295**: 517-524.

**Roberts M and Wink M** (1998) *Alkaloid biochemistry, ecology and medical applications*. Plenum Press, New York. pp: 238-262.

**Roewer IA, Cloutier N, Nessler CL and De Luca V** (1992) Transient induction of tryptophan decarboxylase (TDC) and estrictosidine synthase (SS) genes in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep*, **11**: 86-89.

**Sottomayor M** (1998) Purification and characterization of  $\alpha$ -3', 4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *FEBS Lett*, **428**: 299-303.

**Stevens LH, Blom TJ and Verpoorte R** (1993) Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and strictosidine glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*. *Plant Cell Rep*, **12**: 573-526.

**St-Pierre B, LaFlamme P, Alarco AM and De Luca V** (1998) The terminal O-acetyl involved in vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. belong to a new superfamily of acetyltransferases related the CAT class of genes. *Plant. J.* **14**: 703-713.

**St-Pierre B, Vázquez-Flota F and De Luca V** (1999) Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of pathway intermediates. *Plant Cell*, **11**: 887-900.

**Van der Fits L and Memelink J** (2001) The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant J.* **25**: 43-53.



**Van der Fits L, Zhang H, Menke F, Deneka M and Memelink J (2000)** A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via JA-independent signal transduction pathway. *Plant Mol Biol.*, **4**: 675-685.

**Van der Heijden R, de Boer-Hlupa V, Verpoorte R and Dunes J (1994)** Enzymes involved in the metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **38**: 345-349.

**Van der Heijden R, Verpoorte R and Ten Hoopen JG (1989)** Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **18**: 231-280.

**Vázquez-Flota F and De Luca V (1998a)** Developmental and light regulation of deacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) *Plant Physiol*, **117**: 1351-1361.

**Vázquez-Flota F and De Luca V (1998b)** Jasmonate modulates development- and light – regulated alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, **49**: 395-402.

**Vázquez-Flota F, De Carolis E, Alarco A-M and De Luca V (1997)** Molecular cloning and characterization of deacetoxyvindoline-4-hydroxylase. 2-oxoglutarate dependent dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G Don. *Plant Mol Biol* **34**: 935-1361.

**Vázquez-Flota F, St-Pierre B and De Luca V (2000)** Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry*, **55**: 531-536.

**Verpoorte R, van der Heijden R and Schripsema J (1993)** Plant cell biotechnology for production of alkaloids: present status and prospects. *Nat Prod*, **56**: 186-207.

**Whitmer S, Canel C, Hallard D, Goncalvez C and Verpoort R (1998)** Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, **116**: 853-857.

**Wink M and Roberts MF (1998)** Compartmentation of alkaloids synthesis, transport and storage. In: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. Roberts M.F. and Wink M. (eds) Plenum Press. New York, pp. 238-262.

**Wood SD, Balick MJ and Laird SA (1997)** Botanical garden Bronx, New York, pp. 12-16.

**Yamamoto H, Katana N, Ooi A and Inoue K (2000)** Secologanin synthase which catalyze the cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450. *Phytochemistry*, **53**: 7-12

**Zenk MH, El-Shagi H, Arens H, Stöckigt J, Weiler EW, and Dens B (1977)** Formation of indole alkaloid serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of

*Catharanthus roseus*. In Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applications. Barz W., Reinhard E., and Zenk H. (Eds) Springer-Verlag. New York, pp. 27-43.

## CAPITULO II

### **Efecto del régimen de luz sobre la formación de brotes en *Catharanthus roseus***

La primera etapa de este trabajo consistió en la generación del cultivo de brotes y su adaptación de una condición de luz continua a un fotoperíodo. En este capítulo se describen estos procesos.

#### **Introducción**

*Catharanthus roseus* produce varios alcaloides indólicos, entre ellos los diméricos, la vinblastina y la vincristina, que se utilizan como anticancerígenos y serpentina y ajmalicina como agentes hipotensores. Sin embargo, los alcaloides diméricos son indetectables en cultivos celulares, por lo que la atención se ha centrado en la síntesis de vindolina y catarantina, que son los precursores para su síntesis, en cultivos *in vitro*. Desafortunadamente la vindolina, que es el alcaloide mayoritario en la planta, no se produce en cultivos celulares (Kutney *et al.*, 1980; Stocking y Soll, 1980). Para superar este obstáculo, se ha propuesto el establecimiento de cultivos *in vitro* con potencial morfogénico, como el cultivo de brotes (Krueger *et al.*, 1982). No obstante, aunque este tipo de cultivo mantiene la capacidad de sintetizar vindolina, puede presentar un perfil cualitativo de alcaloides diferente al observado en las plantas formadas de semillas (Constabel *et al.*, 1982; Krueger *et al.*, 1982).

El patrón de desarrollo de las plantas está regulado por factores ambientales, siendo la luz uno de los más importantes. Dada la importancia de la fotosíntesis para la supervivencia de la planta, no sorprende que las plantas respondan a las señales de luz para asumir un patrón de crecimiento que aumente la exposición y su captación. Esta forma de control de la planta por el factor de luz se denomina fotomorfogénesis (Kendrick y Kronenberg, 1994), y si bien se hace más evidente en plántulas, también ocurre en las etapas adultas. Por ejemplo, la respuesta de las plántulas de *Arabidopsis* son varias, dependiendo de la condición de luz. Las plántulas que se encuentran en luz directa tienen un patrón característico de fotomorfogénesis: presentan cotiledones expandidos y abiertos, y un hipocotilo corto, mientras que las que se encuentran en sombra presentan una reducción en la expansión de los cotiledones y un notable aumento en la longitud del hipocotilo. Finalmente, en aquellas que se encuentran en oscuridad total, los cotiledones se mantienen cerrados con hipocotilos extremadamente elongados (McNellis y Deng, 1995).

La luz también tiene efectos importantes en el desarrollo de cultivos *in vitro*, particularmente sobre la capacidad de formación de nuevas estructuras aéreas. En plántulas de *Catharanthus roseus*, la luz no sólo produce cambios morfológicos, sino que además tiene un efecto notable en el metabolismo de los alcaloides, particularmente sobre el de la vindolina. Dado que en esta planta se ha encontrado una relación entre el proceso de desarrollo y el metabolismo de los alcaloides, en este trabajo se analiza el efecto del régimen de iluminación en un cultivo de brotes.

## **Materiales y Métodos**

### **Material biológico**

Para este trabajo se decidió iniciar los cultivos de brotes a partir de plántulas germinadas de embriones inmaduros. Para ello, se colectaron frutos verdes de plantas cultivadas en el vivero del CICY. Las semillas inmaduras se colectaron de la siguiente manera: las vainas fueron lavadas con agua corriente, agua destilada y agua destilada estéril. Después fueron desinfectadas remojándolas en una solución de blanqueador comercial (Cloralex<sup>MR</sup>) al 30% (concentración final de hipoclorito de calcio 1.8%) durante 5 min, seguido por un lavado con etanol al 70% por otros 5 min. Los excesos fueron eliminados al enjuagar después de cada lavado con agua estéril. Este procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar.

### **Obtención de plántulas**

Las semillas desinfectadas fueron depositadas sobre medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 3% sacarosa, 0.7% de agar, y sin reguladores de crecimiento, a un pH de 5.7. Las semillas fueron mantenidas en oscuridad para su germinación durante siete días. A continuación las plántulas fueron expuestas a luz continua por cinco días adicionales.

### **Inducción de brotes**

Los brotes se indujeron a partir de las plántulas sin radículas, en el medio MS, suplementado con 1.0 mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BAP), como único regulador (Endo *et al.*, 1987; Hernández-Domínguez, 2004). La concentración de 1.0 mg/l de BAP equivale a 4.34  $\mu\text{M}$ . Los explantes se cultivaron en frascos con 25 ml de medio y se mantuvieron en un cuarto de cultivo a una temperatura de 25°C, en luz continua ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los brotes formados fueron escindidos del explante inicial y se continuaron cultivando en el mismo medio, bajo las condiciones de iluminación y

temperatura. Los brotes se multiplicaron en ciclos de cultivo de 3-4 semanas y cuando se obtuvo un número suficiente para iniciar el experimento (aproximadamente seis meses), se tomó un lote para mantener en condiciones de un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. A partir de este momento, las resiembras de los brotes en ambas condiciones de iluminación se realizaron cada 28 días.

### **Evaluación del crecimiento**

Después de varios ciclos de cultivo, los brotes fueron caracterizados en cuanto a sus patrones de crecimiento en las dos diferentes condiciones de iluminación; luz continua y en fotoperíodo (16 h de luz /8 h oscuridad). Se colocaron 4 brotes en cada frasco que contenía 25 ml de medio. Se colectaron muestras por triplicado cada 4 días durante un ciclo de crecimiento de 35 días, determinando la ganancia en peso fresco y el número de brotes formados por explante. El número de brotes formado por explante fue contado a simple vista en los días de la colecta. Cabe mencionar que la aparición de brotes en los explantes se dio en el meristemo apical y en las yemas axilares. La distribución de frecuencias observada permitió el establecimiento de rangos de entre 1 y 3; 4 y 6; 7 y 9, y 10 y 12 brotes/racimo. Estos datos se utilizaron para la elaboración de la figura 2.1. Una vez cosechados, los brotes fueron congelados en nitrógeno líquido inmediatamente, y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador. El peso seco se determinó después de liofilizar los tejidos colectados durante 24 h.

## **Resultados y discusión**

### **Inducción de un cultivo de brotes**

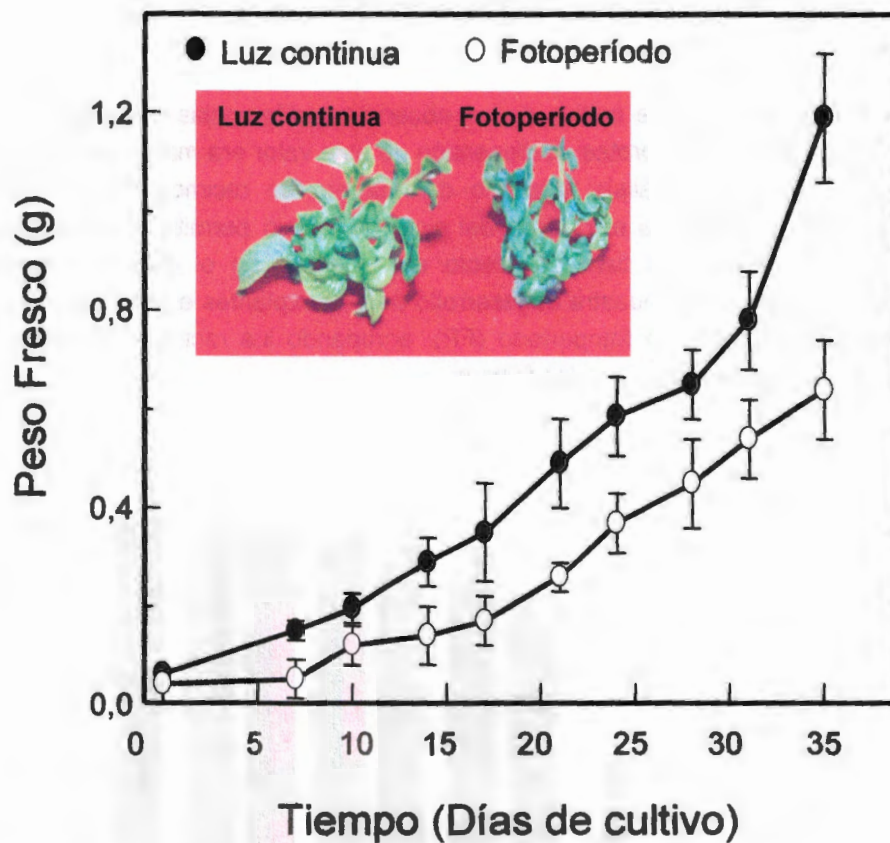
Los cultivos se generaron a partir de plántulas obtenidas de la germinación de semillas inmaduras. Transcurrida una semana se observó el desarrollo de brotes primarios sobre la base del hipocotilo y después de tres semanas, se observa la formación de numerosos brotes secundarios. De este modo, cada explante dió origen a un conglomerado de brotes, denominado como racimo de aquí en adelante. Los brotes así formados fueron escindidos del explante MS con 1.0 mg/l de BAP) en condiciones de luz continua. Las resiembras se realizaron cada 28 días, escindiendo los brotes de aproximadamente un cm de largo con al menos un par de hojas bien definidas.

## Evaluación del crecimiento

Con el cultivo establecido, se realizaron las curvas de crecimiento en ambas condiciones de iluminación (Fig. 2.1). En ambos casos, se observó una clara etapa de retardamiento con una duración aproximada de 10 días para los brotes bajo luz continua, y de 14 días para aquellos en fotoperíodo. A partir de entonces y hasta el día 28 del ciclo, se presentó la etapa de crecimiento exponencial (Fig. 2.1). Si bien los cultivos de más de 28 días de edad continuaron aumentando su peso fresco, la variación en peso seco no fue significativa, sugiriendo que los brotes solamente estaban captando agua del medio, pero no acumulaban biomasa en esas etapas. Por ello, se decidió dar por terminado el experimento después de 35 días de cultivo. Con excepción de las etapas finales del ciclo, la ganancia de peso seco tuvo un comportamiento similar al observado para el peso fresco. Los brotes mantenidos en luz continua tuvieron un mayor crecimiento, medido como peso fresco, que los brotes bajo fotoperíodo. Al término de un ciclo de cultivo de 35 días, el peso promedio de un racimo mantenido en luz continua era de cerca de 1.20 g, mientras que en los brotes mantenidos bajo fotoperíodo, éste era de 0.70 g aproximadamente (Fig. 2.1). En promedio, el contenido de peso seco de los cultivos de brotes mantenidos en luz continua varió entre 5.0 y 6.2% (datos no mostrados) a lo largo del ciclo de cultivo. En contraste, en los brotes en fotoperíodo, este valor fue ligeramente superior (entre el 7.0 y 9.0%, datos no mostrados).

Las velocidades de crecimiento, calculadas en base a las pendientes de las fases lineales de crecimiento, fueron de 0.03 y de 0.02 g de PF/día, para los brotes bajo iluminación continua y fotoperíodo, respectivamente. Estas diferencias se reflejaron también en los tiempos de duplicación que fueron de 23 y 35 d, respectivamente. Los valores del índice de crecimiento, que estima la máxima cantidad de biomasa generada durante el ciclo de cultivo fueron de 240 y 163 para los brotes mantenidos en luz continua y en fotoperíodo.

De este modo, los brotes bajo fotoperíodo presentaron un crecimiento más lento que los mantenidos en luz continua. Esto se hace más notorio al comparar las velocidades de crecimiento. Los parámetros de crecimiento mostraron un mejor desarrollo de los brotes mantenidos en luz y se hicieron evidentes al comparar ambos brotes, mostrando que en apariencia son similares, difiriendo en el tamaño y color. Los brotes en luz presentan un mayor tamaño en comparación de los mantenidos en fotoperíodo, como se puede apreciar en el recuadro de la figura 2.1.



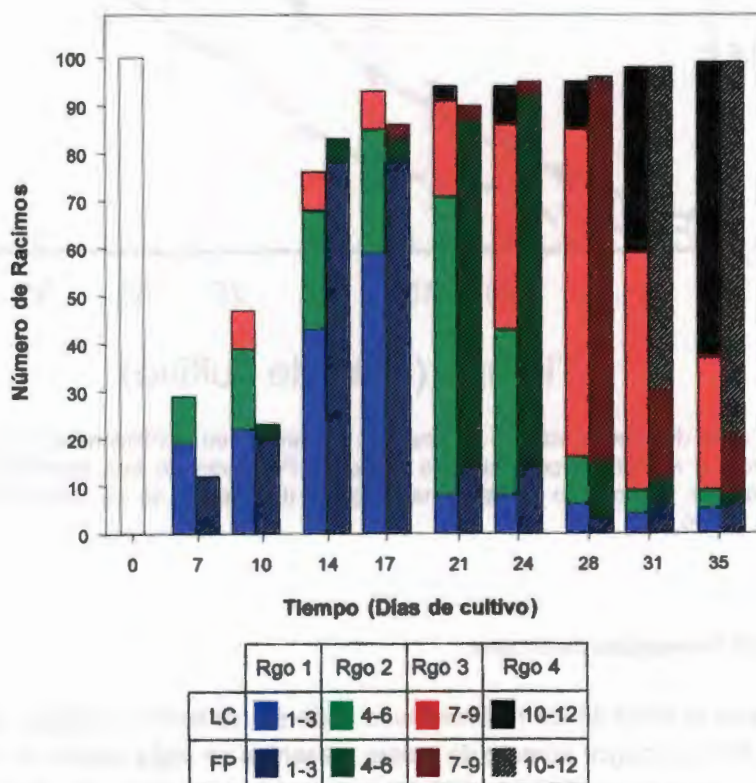
**Figura 2.1.** Curva de crecimiento de los cultivos de brotes en condiciones de luz continua (círculos negros) y de fotoperíodo (círculos blancos). Promedio de tres repeticiones con la desviación estándar. El recuadro muestra una fotografía del aspecto de los racimos de brotes a los 17 días de cultivo.

#### Capacidad de formación de brotes

La diferencia en el peso de los racimos pudo deberse, ya sea a un mayor tamaño de los brotes, o bien, al mayor número de brotes presentes en cada racimo. Con el fin de determinar la razón, se contabilizó el número de brotes contenidos en un total de 100 racimos, tanto en condiciones de luz continua, como de fotoperíodo. Este análisis demostró que aunque los cultivos bajo iluminación continua presentaron un mayor crecimiento en comparación con aquellos bajo fotoperíodo, esta condición no fue una limitante en cuanto a la capacidad de formación de brotes, ya que al final de un ciclo

de cultivo de 35 días, cada explante había formado un racimo conteniendo entre 10 y 12 brotes.

Si bien al final del ciclo de cultivo no se observaron diferencias importantes en el promedio de formación de brotes, la dispersión de este valor era mayor en los cultivos bajo luz continua. Un análisis detallado del número de racimos conteniendo un número diferente de brotes a lo largo del ciclo de cultivo permitió observar que el régimen de iluminación sí tuvo un efecto en el orden en el que dichos brotes emergieron. La figura 2.2 muestra el desarrollo de 100 explantes en racimos, tanto en luz continua (LC) como en fotoperiodo (FP), agrupando los racimos en rangos, de acuerdo al número de brotes que los forman.



**Figura 2.2.** Formación de brotes en racimos, representado en rangos (número de brotes por racimo; Rgo). El valor 0 corresponde al explante original, antes de formar algún brote nuevo.



A los siete días la moda del racimo fue Rango 1, tanto en LC como en FP. No obstante, el número de explantes que no formaron nuevos brotes fue menor en LC (71) que bajo FP (88) (Fig. 2.2). Este dato indica que la LC favoreció que una mayor cantidad de explantes iniciara la formación de brotes antes que el FP. Más aún, en esta etapa ya se podían observar racimos Rango 2, en adición a los de Rango 1, en los cultivos bajo LC. El número de explantes que no habían formado nuevos brotes se mantuvo con pocos cambios en los cultivos FP (77) después de 10 días, mientras que en los cultivos LC, solamente 53 no lo habían hecho. De los 47 explantes que habían producido brotes en LC, 25 (17 + 8) habían dado lugar a racimos Rangos 2 y 3. Por el contrario, de los 23 racimos FP formados (100 – 77), 20 eran Rango 1 y solamente 3 eran Rango 2 (Fig. 2.2). A los 14 días, se observó un desarrollo interesante, ya que la moda cambió de Rango 0 a Rango 1 para ambas condiciones (Fig. 2.2). No obstante, el número de racimos en este rango fue sustancialmente mayor en FP (78) que en LC (43). De los 22 racimos FP restantes, solamente 5 eran Rango 2 y ninguno de los rangos superiores (Fig. 2.2). Por el contrario, en los cultivos LC 25 racimos eran Rango 2 y ocho de ellos se encontraban en Rango 3 (Fig. 2.2). A los 21 días, ocurrió otro cambio en la moda, cuando ésta pasó del Rango 1 al 2. De nueva cuenta, el número de racimos en este rango fue mayor en FP (73) que en LC (63). La frecuencia de racimos de rangos superiores (3 y 4) fue mayor en LC (23) que en FP (3 y ninguno de ellos Rango 4). Si bien a los 24 días, el mayor número de racimos LC eran Rango 3 (43), un buen número de ellos (49 en total) eran de rangos inferiores (6, 8 y 35 de los Rangos 0, 1 y 2, respectivamente). En los cultivos FP de esta edad, la mayoría de los racimos (78) aún eran Rango 2 y sólo cambiaron al rango superior hasta el día 28 (Fig. 2.2). Este tipo de desarrollo se continuó observando hasta el final del ciclo de cultivo.

De este modo, el tránsito de los 100 explantes iniciales en racimos de rangos superiores se dió de una forma más ordenada en los brotes FP que en los LC. Es decir, en los cultivos FP, la mayoría (cerca del 70% de los explantes/racimos) progresaron al siguiente rango de manera simultánea. Esto dio lugar a que en cualquier momento del ciclo de cultivo, la gran mayoría (cerca del 70%) de los racimos se encontrara en el mismo rango, con un número muy bajo de racimos en los rangos superiores. Por el contrario, si bien los racimos de un mismo rango predominaban en los cultivos LC en una etapa definida, también podía distinguirse un número considerable de racimos de rangos diferentes, tanto superiores como inferiores.

En resumen, el conjunto de estas observaciones sugieren que la transición entre los periodos de luz y oscuridad permite coordinar el desarrollo de las yemas en nuevos brotes.

## Conclusiones

Se logró establecer un sistema de cultivo de brotes que fue caracterizado bajo dos condiciones de iluminación: luz continua (LC) y fotoperíodo de 16 h luz/8 h fotoperíodo (FP). Si bien el crecimiento de los brotes fue mayor en condiciones de LC (Fig. 2.1), la capacidad de formación de brotes, medida como número de brotes contenidos en el racimo derivado de un explante, no fue diferente, al menos durante los 35 días que duró el experimento. Es importante mencionar que después de este periodo, en ambas condiciones, la proliferación de nuevos brotes por racimo fue exponencial, lo que impidió su conteo. Aún cuando los cultivos en FP no tuvieron una mayor capacidad de formación de brotes, éstos se formaron de manera más ordenada que en los cultivos bajo LC (Fig. 2.2). De este modo, la transición entre oscuridad y luz parece coordinar el desarrollo de las yemas contenidas en cada uno de los brotes que integran un racimo de manera más precisa que la iluminación continua.

En plántulas en desarrollo, la transición entre la oscuridad y la luz también tiene un papel crítico en la activación coordinada de las enzimas que participan en la síntesis de vindolina (Vázquez-Flota y De Luca, 1998). Dicha activación coordinada parece estar asociada con procesos de diferenciación y desarrollo (Vázquez-Flota *et al.*, 2000). De este modo, un sistema *in vitro* en el que la formación de estructuras diferenciadas, pueda coordinarse como es el presente caso resultaría útil para el estudio de la relación entre la diferenciación y la síntesis de alcaloides, en particular de la vindolina.

## Referencias

**Constabel F, Gaudet-laPrairie P, Kurz WGW and Kutney JP** (1982) Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. XII. Biosynthetic capacity of callus from original explants and regenerated shoots. *Plant Cell Rep*, **1**: 139-142.

**Endo T, Goodbody A and Misawa M** (1987) Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med*, **53**: 479-482.

**Hernández-Domínguez E** (2004) Regulación de la síntesis de vindolina durante procesos morfogénicos en cultivos *in vitro* de *Catharanthus roseus*. Tesis de doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, CICY, Mérida, Yucatán.

**Kendrich RE and Kronenberg GH:** (1994) *Photomorphogenesis in plants* (Dordrech, the Netherlands: Kluwer Academic Publisher).

**Krueger RJ, Carew DP, Lui JHC and Staba EJ (1982)** Initiation, maintenance and alkaloid content of *Catharanthus roseus* leaf organ cultures. *Planta Med*, **45**: 56-57.

**Kutney JP, Choi LS, Kolodziejczyk P, Sleigh SK, Stuart KL, Worth B, Jurz WG, Chatson KB and Constabel F (1980)** Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures. III. Catharanthine and other alkaloid from the 200GW cell line. *Heterocycles*, **14**: 766-768.

**McNellis TW and Deng X (1995)** Light control of seedling morphogenetic pattern. *Plant Cell*, **7**: 1749-1761.

**Murashige T and Skoog F (1962)** A revised for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, **15**: 435-497.

**Stocking J and Soll JJ (1980)** Indole alkaloid from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* and *C. ovalis*. *Plant Med*, **40**: 22-30.

**Vázquez-Flota F and De Luca V (1998)** Developmental and light regulation of deacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) *Plant Physiol*, **117**: 1351-1361.

**Vázquez-Flota F, St-Pierre B and De Luca V (2000)** Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry*, **55**: 531-536.



## CAPITULO III

### Efecto de las condiciones de luz sobre la síntesis de alcaloides en brotes de *Catharanthus roseus*

#### Introducción

Aunque *Catharanthus roseus* produce más de 200 alcaloides monoterpénicos indólicos, solamente para la síntesis de vindolina se ha registrado un estricto control regulatorio, que incluye elementos ambientales, por etapa de desarrollo y tejido específico (De Luca y St-Pierre, 2000). La vindolina y la catarantina son las dos subunidades necesarias para la formación de los alcaloides citotóxicos vinblastina y vincristina. El valor económico en estos alcaloides ha despertado el interés para su producción por medio de la tecnología *in vitro*, sin embargo, esto no ha sido posible debido a que la desorganización celular propia de los callos y los cultivos en suspensión impide la formación de la vindolina, sin embargo no afecta la síntesis de catarantina (Van der Heijden *et al.*, 1989). Estas observaciones sugieren que la síntesis de vindolina requiere cierto grado de diferenciación celular que no parece ser necesaria para la síntesis de los demás alcaloides (De Luca *et al.*, 1988). Para superar esta dificultad, se ha propuesto el uso del cultivo de brotes. Este sistema presenta la ventaja de que, al conservar la estructura propia de las hojas, mantiene la capacidad de síntesis de la vindolina. No obstante, con frecuencia se observan variaciones importantes en las cantidades producidas entre diferentes lotes de cultivo (Hirata *et al.*, 1990). Este tipo de variaciones también pueden observarse en plántulas germinadas de semillas cuando son sometidas a ciertas condiciones ambientales. Por ejemplo, se ha determinado que la exposición a la luz de plántulas de menos de cinco días de edad, aunque no impide la formación de vindolina, sí la disminuye en comparación con plántulas de cinco a siete días de edad (Vázquez-Flota, 1998). De hecho, la germinación de semillas bajo luz continua también reduce de manera notable la acumulación de este alcaloide.

En plántulas derivadas de semillas, la transición de la oscuridad a la luz juega un papel fundamental en la expresión coordinada de las enzimas que participan en las primeras (TDC y EST) y en las últimas (D4H y DAT) etapas de la síntesis de la vindolina. Dicha coordinación representa un elemento regulatorio de gran importancia en la síntesis del alcaloide. Para que esta coordinación pueda manifestarse, es necesario que la exposición a la luz ocurra una vez que las plántulas hayan alcanzado cierto estado de desarrollo específico (Vázquez-Flota y De Luca, 1998). En plántulas se ha encontrado que también existen elementos de regulación por desarrollo, ya que si bien la expresión de las enzimas involucradas en las reacciones tempranas puede

ocurrir en etapas menos avanzadas del desarrollo, aquellas que participan en las etapas tardías sólo ocurren después de que se ha alcanzado cierto grado de madurez (Vázquez-Flota y De Luca, 1998).

Con base en estas observaciones, es posible que las amplias variaciones en las cantidades de vindolina detectadas en los cultivos de brotes se relacionen con la falta de coordinación entre las enzimas involucradas en las etapas tempranas y tardías. Para tratar de elucidar si existe esta falta de coordinación o no, en este capítulo se realizó un estudio sobre algunas de las enzimas que participan en la síntesis de vindolina en cultivos de brotes de *Catharanthus roseus*. Debido al papel de la luz en la regulación de tales enzimas y en su expresión coordinada, se ensayaron condiciones de iluminación continua y de fotoperíodo de 16 h.

## **Materiales y métodos**

### **Material biológico**

Los brotes fueron inducidos a partir de plántulas, obtenidas por germinación de semillas inmaduras. Las semillas se germinaron en oscuridad por cinco días y después, las plántulas resultantes fueron expuestas por dos días a luz continua como se indicó previamente. A las plántulas se les eliminó la radícula y fueron sembradas en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 1.0 mg/l de 6-bencilaminopurina (6-BAP, equivalente a 4.34  $\mu\text{M}$ ), como único regulador (Endo *et al.*, 1987; Hernández-Domínguez, Comunicación personal). Las plántulas utilizadas como explantes se cultivaron en frascos con 25 ml de medio y se mantuvieron en un cuarto de cultivo a una temperatura de 25°C, en luz continua ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Una vez formados, los brotes fueron escindidos del explante inicial y se continuaron cultivando en el mismo medio, bajo las condiciones mencionadas de iluminación y temperatura. Los brotes fueron multiplicados en ciclos de cultivo de 3-4 semanas, y cuando se obtuvo un número suficiente para los experimentos, se tomó un lote para mantener en condiciones de un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad (FP), mientras que otro se mantuvo bajo iluminación continua (LC). A partir de este momento, las resiembras de los brotes en ambas condiciones se realizaron cada 28 días. Las muestras se recolectaron durante un ciclo de cultivo de 35 días, se congelaron con nitrógeno líquido y fueron conservadas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **Extracción de alcaloides**

La extracción de alcaloides se realizó de acuerdo a Monforte-González *et al.* (1992). En breve, un gramo de tejido liofilizado, se homogenizó con 3 ml de metanol y se

incubó en un baño María a 55°C durante 2 h. La mezcla se dejó enfriar antes de filtrarla a vacío. El extracto recuperado se concentró por evaporación a presión reducida y el residuo se resuspendió en 3 ml de ácido sulfúrico al 2.5 %. Se realizaron tres extracciones con acetato de etilo, recuperando la fase acuosa cada vez, a la que se le elevó el pH a 9.4 con hidróxido de amonio concentrado. Los alcaloides fueron extraídos tres veces de la fase acuosa con acetato de etilo. Finalmente, los alcaloides se concentraron por evaporación a presión reducida en un rotavapor y se resuspendieron en 500 µl de metanol.

### **Análisis cuantitativo y cualitativo de alcaloides**

La cuantificación de los alcaloides totales se realizó por espectrofotometría a 280 nm (Monforte-González *et al.*, 1992), con la ayuda de un equipo DU-6 (Beckman). Se tomaron 20 µl del extracto de alcaloides totales y se diluyeron con 1980 µl de metanol.

El contenido de alcaloides se determinó mediante la siguiente relación:

$$\text{Alcaloides totales (mg/ml)} = (\text{Abs}_{280\text{nm}}/0.02289) \times 100$$

Donde  $\text{Abs}_{280\text{nm}}$  corresponde a la absorbancia a 280 nm, 0.02289 es la pendiente de la curva de calibración y 100 es el factor de dilución de la muestra.

La cuantificación de ajmalicina, catarantina y vindolina se realizó por cromatografía de capa fina (CCF), seguida por densitometría *in situ* en un Shimadzu CS-930. Los extractos crudos se separaron por CCF, utilizando placas de sílica gel (sílica gel 60F<sub>254</sub>, Merck) con los sistemas de disolventes discutidos en los resultados (Balsevich *et al.*, 1986; Monforte-González *et al.*, 1992; Hernández-Domínguez, 2004). Los alcaloides fueron identificados por comparación de los valores de R<sub>f</sub>'s de las muestras con los de estándares auténticos, y por su reacción colorida al reactivo de sulfato cérico amónico (CAS, De Luca *et al.*, 1988).

### **Determinaciones enzimáticas**

#### **Obtención del extracto enzimático**

El material se cosechó en los días correspondientes, se congeló con nitrógeno líquido, y se conservó a -80°C hasta su utilización. El tejido (1.0 g) se trituró hasta polvo fino en un mortero de porcelana, y se mezcló con 2.5 ml del amortiguador de extracción (200 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM EDTA y 5 mM DTT). La mezcla se homogenizó y centrifugó a 13 000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se desaló en una columna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), previamente equilibrada con el

amortiguador de corrida (50 mM Tris-HCl, pH 7.5). Este extracto se utilizó para determinar las actividades enzimáticas de TDC, D4H y DAT.

#### **Determinación de la actividad de la TDC**

El extracto proteico se mezcló con 0.2323 nmol de L-[<sup>14</sup>C] triptofano, equivalente a 50 nCi de [<sup>14</sup>C], 50 mM fosfato de piridoxal y 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, en un volumen final de 100  $\mu$ l. La mezcla de reacción fue incubada durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción con 100  $\mu$ l de 1M NaOH y el producto de la reacción (triptamina marcada) se extrajo con 250  $\mu$ l de acetato de etilo. Las fases orgánica y acuosa fueron separadas por centrifugación durante 5 min a 14 000 rpm, y 100  $\mu$ l de la fase orgánica se mezclaron con 5 ml de líquido de centelleo para cuantificar la triptamina marcada (De Luca *et al.*, 1988).

#### **Determinación de la actividad de la D4H**

La actividad se determinó en una mezcla de reacción que contenía 0.56 nmol del sustrato marcado (desacetoxivindolina), equivalente a 44,600 dpm, 10 mM 2-oxoglutarato, 7.5 mM ascorbato, 7.5  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 y el extracto proteico en un volumen final de 150  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 30°C durante 30 min y transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo con 100  $\mu$ l de 1M NaOH. El producto y el sustrato que no reaccionó, fueron extraídos con 250  $\mu$ l de acetato de etilo. El producto ( $R_f = 0.22$ ) se separó del sustrato no utilizado ( $R_f = 0.52$ ) por cromatografía de capa fina con 10% metanol en acetato de etilo. Las placas fueron visualizadas con luz UV (366 nm). Las manchas correspondientes al producto fueron raspadas de la placa, y transferidas a 5 ml de líquido de centelleo para su cuantificación (De Carolis *et al.*, 1990).

#### **Determinación de la actividad de la DAT**

La mezcla de reacción se preparó con el extracto proteico, 5  $\mu$ M desacetilvindolina, 4.4  $\mu$ M de [1-<sup>14</sup>C] acetilCoA (0.040  $\mu$ Ci), ajustándola a un volumen de 100  $\mu$ l con 100 mM Tris-HCl, pH 8. La mezcla fue incubada durante 30 min a 30°C y se detuvo con 100  $\mu$ l de 1M NaOH. El producto acetilado se extrajo con 250  $\mu$ l de acetato de etilo, y 100  $\mu$ l de la fase orgánica se mezclaron con 5 ml de líquido de centelleo para su cuantificación (De Luca *et al.*, 1988).

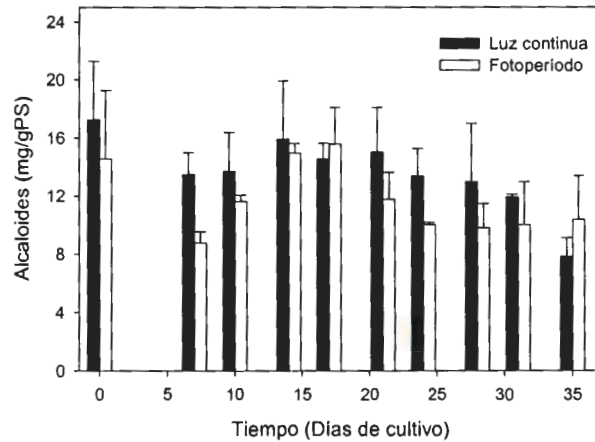


## Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976), utilizando un sistema comercial (BIORAD), y como estándar albúmina sérica bovina (Sigma, fracción V).

## Resultados y discusión

El contenido de alcaloides totales en los brotes a lo largo de un ciclo de cultivo varió entre 8 y 17 mg/g PS, independientemente del régimen de iluminación empleado (Fig. 3.1). Es importante resaltar que no se encontró ningún tipo de correlación entre la acumulación de alcaloides y la fase de crecimiento del cultivo en ninguno de los dos casos. Dado que la luz no sólo puede afectar el contenido total de alcaloides, sino también su patrón cualitativo, se realizaron cuantificaciones de ajmalicina (tipo Corinante), catarantina (tipo Iboga) y vindolina (tipo Aspidosperma). Estos alcaloides se seleccionaron por ser de los más representativos de cada uno de esos grupos. Los análisis se realizaron por cromatografía de capa fina, seguidos de cuantificación por densitometría *in situ*. Los alcaloides se identificaron comparando los valores de Rf con los de estándares auténticos y mediante su reacción colorida al tratamiento con una solución de sulfato cérico de amonio (CAS). Con fines comparativos, se incluyeron muestras provenientes de hojas y callos de *C. roseus*. La separación se realizó con un sistema de disolventes: metanol: acetato de etilo (1:9). En esas condiciones los estándares de ajmalicina, catarantina y vindolina presentaron valores de Rf de 0.75, 0.62 y 0.68, respectivamente. En los extractos provenientes de los brotes en ambas condiciones de iluminación, aparecieron compuestos con los mismos valores Rf. Más aún, al teñir las placas con el reactivo de CAS, se observó que estos compuestos adquirían la coloración característica. Así, la ajmalicina se tornó a un color verde-amarillento, mientras que la catarantina y la vindolina tomaron colores azul y fucsia, respectivamente. Compuestos con el mismo comportamiento cromatográfico se visualizaron en los extractos obtenidos de los brotes en ambas condiciones de iluminación, sugiriendo su presencia. No obstante lo anterior, debido a la similitud en los valores de Rf de la catarantina y la vindolina en este sistema de disolventes, se ensayaron otros que permitieran una mejor separación. La fase móvil elegida fue acetato de etilo, en el cual los valores de Rf para ajmalicina, catarantina y vindolina fueron de 0.562, 0.375 y 0.25, respectivamente.



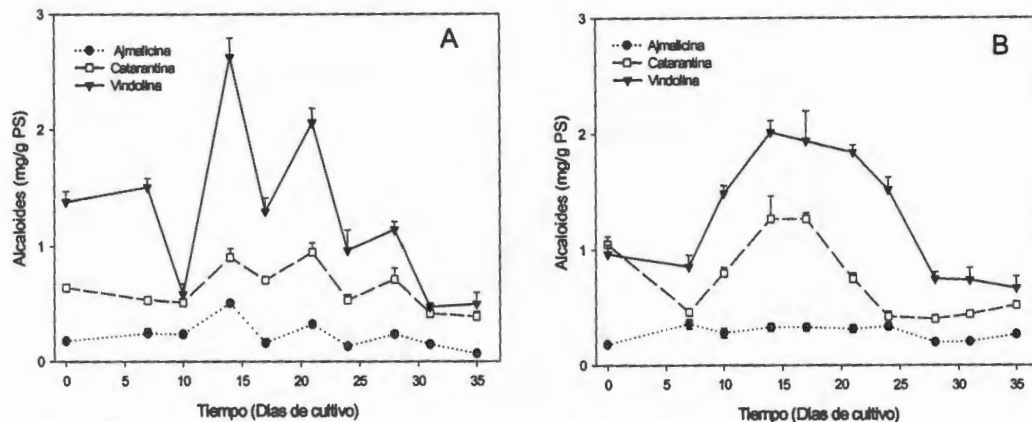
**Figura 3.1.** Contenido de alcaloides totales durante un ciclo de cultivo de brotes en condiciones de luz continua y fotoperiodo. Los datos representan el promedio de tres repeticiones con sus desviaciones estándar.

De manera general, el régimen de luz no influyó de manera notable en el patrón de alcaloides acumulados. La vindolina fue el alcaloide mayoritario en ambos casos, representando aproximadamente dos tercios de la sumatoria de los tres alcaloides cuantificados (Fig. 3.2 A y B). No obstante, es interesante hacer notar que, en ciertos puntos a lo largo del ciclo de cultivo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de algunos alcaloides, en los brotes mantenidos en diferentes condiciones (Apéndice 1).

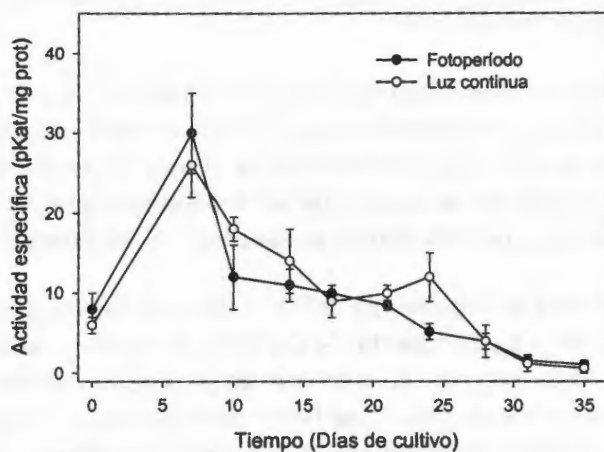
El máximo contenido de vindolina detectado en los brotes fue del mismo orden de magnitud que en las partes aéreas de plantas (Endo *et al.*, 1987), independientemente del régimen de iluminación. De manera aparente, la acumulación de vindolina fue ligeramente mayor en los brotes mantenidos en luz continua (Apéndice 1), y en ambas condiciones, el máximo se alcanzó a los 14 días de cultivo (Fig. 3.2 A y B).

### **Análisis enzimáticos**

La actividad de la TDC tuvo un comportamiento muy similar en ambas condiciones de iluminación. El pico de máxima actividad ocurrió al día 7 (Fig. 3.3), y no coincidió con la acumulación de alcaloides. Después de este pico, la actividad declinó; de modo similar a lo que sucede en plántulas en desarrollo, confirmando que esta enzima no está regulada por luz, sino por el estado de desarrollo (De Luca *et al.*, 1988).

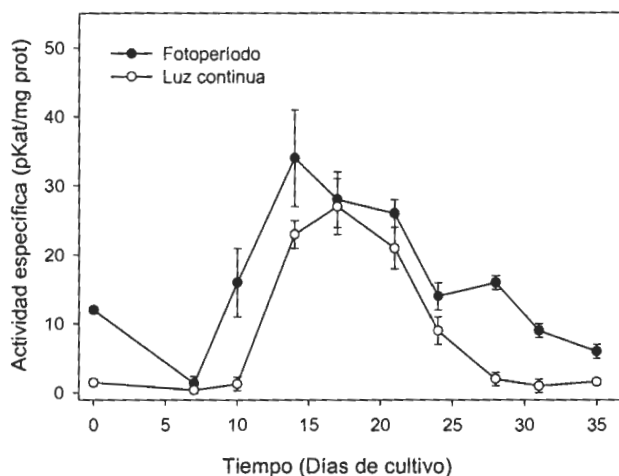


**Figura 3.2.** Contenido de ajmalicina (círculos negros), catarantina (cuadros blancos) y vindolina (triángulos negros), en un cultivo de brotes en condiciones de luz continua (A) y fotoperíodo (B). Los datos representan el promedio de tres repeticiones con sus desviaciones estándar.



**Figura 3.3.** Actividad específica de TDC durante un ciclo de cultivo de brotes en luz continua y fotoperíodo. Los datos representan el promedio de tres repeticiones con sus desviaciones estándar.

La actividad de la D4H (Fig. 3.4) también presentó un comportamiento similar en ambas condiciones de luz. El pico de máxima actividad para esta enzima ocurrió al día 14 del ciclo, coincidiendo con la acumulación de vindolina (Fig. 3.2). De este modo, la máxima actividad de la D4H ocurre después de que la máxima actividad de la TDC se ha presentado como fue observado en plántulas en desarrollo (Balsevich *et al.*, 1986; De Luca *et al.*, 1988).

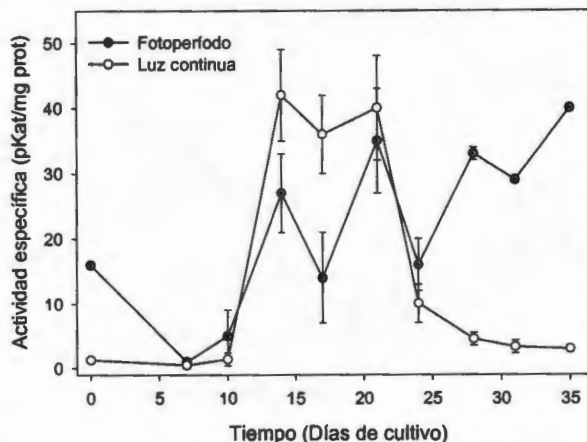


**Figura 3.4.** Actividad específica de la D4H durante un ciclo de cultivo de brotes en luz continua (círculos blancos) y fotoperiodo (círculos negros). Los datos representan los promedios de tres repeticiones y sus desviaciones estándar.

La DAT cataliza la última reacción en la síntesis de vindolina (Figura 1.3). La actividad de esta enzima en brotes mantenidos en luz continua alcanzó su valor máximo entre los días 14 y 21 (Fig. 3.5), coincidiendo con la mayor acumulación de vindolina. Después de dicho periodo, estos valores no se mantuvieron y disminuyeron hacia el final del ciclo de cultivo, de manera similar al contenido del alcaloide (Fig. 3.2 A).

En los brotes mantenidos en fotoperiodo, la DAT mostró variaciones en sus valores de actividad, particularmente a partir del día 14 del ciclo de cultivo y hasta el final de éste (Fig. 3.5). Durante este periodo, la actividad de la enzima presentó cambios de aproximadamente 10 unidades entre una fecha de muestreo y la subsiguiente (Fig. 3.5). Hacia el final del ciclo de cultivo, la DAT mostró altos niveles de actividad, aún cuando las cantidades de vindolina fueron muy bajas (Fig. 3.2 B), sugiriendo que la vindolina podría ser metabolizada o transformada antes de que llegue a acumularse. De este modo, el patrón de actividad de la DAT difirió de manera importante en los cultivos LC y FP. En los primeros, una vez que la actividad de la enzima alcanzó sus máximos valores se mantuvo sin mayores variaciones entre los días 14 y 24, decayendo después. Por otro lado, en los cultivos FP, la actividad de esta enzima tuvo oscilaciones a partir de los 14 días (Fig. 3.5). De manera notoria, al final del ciclo de cultivo, la actividad de la DAT se mantuvo en niveles altos.

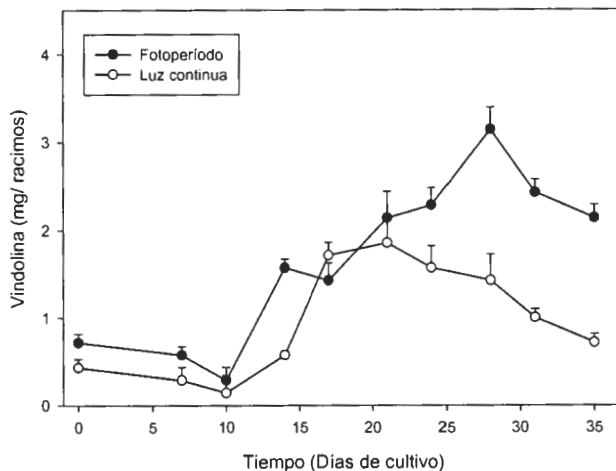
oscilaciones a partir de los 14 días (Fig. 3.5). De manera notoria, al final del ciclo de cultivo, la actividad de la DAT se mantuvo en niveles altos.



**Figura 3.5.** Actividad específica de la DAT durante un ciclo de cultivo de brotes en luz continua (círculos blancos) y fotoperíodo (círculos negros). Los datos representan los promedios de tres repeticiones y sus desviaciones estándar.

Puesto que el régimen de iluminación afectó la capacidad de crecimiento, medido como acumulación de biomasa, pero no la de formación de brotes, con el fin de realizar un estudio más detallado, la acumulación de la vindolina fue analizada con referencia al número de brotes formado por cada explante. Para ello, la cantidad de vindolina de los tejidos fue referida por racimo de brotes (Fig. 3.6). Este tipo de análisis proporciona información acerca del contenido total de vindolina por brote formado, ya que cada racimo se formó a partir de un sólo explante. También permite cotejar, de manera más directa, los efectos del régimen de iluminación sobre este alcaloide, ya que la condición de iluminación sí tuvo efectos sobre el crecimiento, pero no sobre la cantidad de brotes formados, a lo largo del ciclo de cultivo (Fig. 2.1 y 2.2).

Este tipo de análisis mostró que, en ambos casos, la vindolina comenzó a acumularse alrededor del día 14. No obstante, en los brotes mantenidos bajo iluminación continua, el alcaloide mostró una acumulación gradual discontinua, es decir, que después de un aumento en la cantidad acumulada, ésta se mantuvo sin cambio por un periodo de tiempo, tras el cual ocurrió otro aumento. Tres eventos de este tipo fueron observados durante el ciclo de cultivo, localizados entre los días 12 y 16, 20 y 24 y al día 28 del ciclo de cultivo. En cada uno de estos periodos, la cantidad total de vindolina aumentó respecto al periodo anterior (Fig. 3.6). Es de notar que los picos de actividad de la DAT (Fig. 3.5) coincidieron con los periodos de acumulación de vindolina en los brotes



**Figura 3.6.** Contenido de vindolina por racimos de brotes en condiciones de luz continua (círculos blancos) y de fotoperíodo (círculos negros). Promedio de tres repeticiones con la desviación estándar.

Más aún, un análisis detallado de las etapas de formación de brotes (Fig. 2.2), reveló que éstos aparentemente se formaron en los mismos periodos en que también se presentaron los aumentos de actividad de DAT y la acumulación de vindolina (en los días 12, 20 y 28). De este modo, la síntesis de vindolina parece ocurrir en los periodos de desarrollo de los brotes. El control más prominente para la formación de vindolina parece funcionar específicamente sobre la DAT, que es la enzima encargada de llevar a cabo la última reacción.

Este tipo de relación no se observó en los brotes mantenidos bajo luz continua, en donde la formación de brotes no ocurrió con el mismo grado de orden que en los brotes bajo fotoperíodo. Bajo estas condiciones, los brotes parecen formarse de manera continua a lo largo del ciclo de cultivo. Dado el papel de la luz en los procesos de desarrollo, particularmente de la transición entre las etapas de oscuridad y luz, estos datos sugieren, en conjunto, que el fotoperíodo facilita la formación sincronizada de brotes a partir de los explantes (Fig. 2.2). El desarrollo ordenado de los brotes permite, a su vez, que los programas bioquímicos asociados a éste, como la síntesis de alcaloides, puedan proceder de manera igualmente ordenada.

Es interesante notar que sólo el patrón de actividad de la DAT mostró esta coincidencia con la formación de brotes. En plántulas en desarrollo y en plantas

Es interesante notar que soló el patrón de actividad de la DAT mostró esta coincidencia con la formación de brotes. En plántulas en desarrollo y en plantas maduras, la activación de la DAT obedece a las mismas señales que para la D4H. De hecho, los mecanismos regulatorios de ambas enzimas son muy similares, involucrando tanto controles transcripcionales y postrcripcionales (De Luca y St-Pierre, 2000). La similitud en dichos patrones de activación, en respuesta a los mismos estímulos, sugiere la existencia de mecanismos de transducción de estos, similares para ambas enzimas. Sin embargo, las diferencias ocasionadas por el régimen de iluminación en los cultivos de brotes establecen una oportunidad para distinguir un control que opera sobre la DAT, pero no sobre la D4H.

Recientemente, un grupo de factores transcripcionales involucrados en la activación de la síntesis de alcaloides en respuesta a la inducción con jasmonato fueron aislados a partir de cultivos en suspensión de *Catharanthus roseus* (Var der Fits y Memelink, 2000, 2001). Dichos factores transcripcionales fueron denominados ORCA1, 2 y 3 (por Octadecanoic Responsive Catharanthus AP proteins), y pertenecen a la familia de proteínas AP. Los tres tienen la capacidad de *trans* activar a los genes de *tdc* y *str*. Cuando se transformaron callos de *Catharanthus roseus* con ORCA3, muchos de los genes involucrados en la síntesis de alcaloides, y algunos de los genes del metabolismo primario que suministran precursores para la formación de estos alcaloides, se expresaron de forma constitutiva. El gene de DAT fue uno de los pocos cuya expresión no pudo ser detectada en estos tejidos transformados (Van der Fits y Memelink, 2000). Estas observaciones indican que este gene presenta requerimientos de organización que no son necesarios para los demás genes. El cultivo de brotes permite por tanto, su expresión.

De este modo, la utilización del fotoperíodo para el cultivo de brotes de *Catharanthus roseus* parece representar una buena alternativa para sincronizar la formación de brotes.

## Referencias

**Bradford NM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-254.

**De Carolis E, Chan F, Balsevich J and De Luca V** (1990) Isolation and characterization of a 2-oxoglutarate dependent dioxygenase involved in the second-to-last step in vindoline biosynthesis. *Plant Physiol*, **94**: 447-450.

**De Luca V, Alvarez J, Campbell D and Kurz WGW** (1988) Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, **86**: 447-450.

**De Luca V and St-Pierre B** (2000) The cell and developmental biology of alkaloids biosynthesis. *Trends Plant Sci*, **5**: 168-173.

**Endo T, Goodbody A and Misawa M** (1987) Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med*, **53**: 479-482.

**Monforte-González M, Ayora-Talavera T, Maldonado-Mendoza I and Loyola-Vargas VM** (1992) Quantitative analysis of serpentine and ajmalicine in plant tissues of *Catharanthus roseus* and hyoscyamine and scopolamine in root tissue of *Datura stramonium* by densitometry in thin layer chromatography. *Phytochem. Anal*, **3**: 117-121.

**Murashige T and Skoog F** (1962). A revised for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, **15**: 435-497.

**Van der Fits L and Memelink J** (2001) The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant J*, **25**: 43-53.

**Van der Fits L and Memelink J** (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**: 295-297.

**Van der Heijden R, Verpoorte R and Ten Hoopen JG** (1989) Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **18**: 231-280.

**Vázquez-Flota F** (1998) Molecular regulation of deacetoxyvindoline 4-hydroxylase. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus*. Tesis de doctorado, Universidad de Montreal, Canada.

**Vázquez-Flota F and De Luca V** (1998) Developmental and light regulation of deacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.). *Plant Physiol*, **117**: 1351-1361.



## CAPITULO IV

### Conclusiones generales y perspectivas

#### Conclusiones

Con el establecimiento de cultivos de brotes de *Catharanthus roseus* en medio semisólido, a partir de semillas inmaduras, en un principio cultivados en condiciones de iluminación continua y después expuestos a un fotoperíodo (16 h luz/ 8 h oscuridad), se obtuvo un sistema *in vitro* en el que la formación de estructuras diferenciadas, pueda coordinarse como es el presente caso resultaría útil para el estudio de la relación entre la diferenciación y la síntesis de alcaloides, en particular de la vindolina.

La condición de iluminación parece afectar la ganancia de peso y vigor de los brotes, debido a que los brotes mantenidos en iluminación constante presentan mayor velocidad de crecimiento, en comparación con los mantenidos en fotoperíodo. Aun cuando la condición de iluminación no afectó la capacidad de formación de brotes, ya que al final del ciclo de cultivo en ambos casos termina siendo el mismo, sí afectó los tiempos de aparición de los brotes. Mientras que en los brotes mantenidos en iluminación constante la aparición se dio de manera irregular, en aquellos bajo fotoperíodo presentó una tendencia hacia la sincronización en su formación.

El contenido de alcaloides totales no fue afectado por la condición de luz; sin embargo, a nivel cualitativo, en particular el caso de la ajmalicina y la vindolina, se acumularon en mayor cantidad en los brotes en luz continua, en contraste con el caso de la catarantina donde ésta fue mayor en los brotes bajo fotoperíodo. Las actividades de las enzimas tuvieron un comportamiento muy similar a los que se presentaron en plántulas en desarrollo (Vazquéz-Flota y De Luca, 1998). El comportamiento de la actividad de TDC durante el ciclo de cultivo mostró estar regulada por la etapa de desarrollo, como sucede en las plántulas de *Catharanthus roseus*, en donde esta enzima está altamente regulada (De Luca *et al.*, 1988). Por otra parte, la D4H también presentó un tipo de regulación debida a la etapa de desarrollo de los brotes en ambas condiciones de iluminación. La DAT en los brotes en luz continua, después de alcanzar su máxima actividad, declina al final del ciclo, teniendo el mismo comportamiento de la D4H. En el caso de la DAT en brotes bajo fotoperíodo no se detectó relación alguna con la actividad de la D4H, pero es interesante hacer notar que su actividad estuvo relacionada con la formación de brotes.

En condiciones de fotoperíodo, el aumento en el contenido de vindolina del día 14 al 28 coincidió con la aparición de nuevos brotes y también con la actividad de DAT, enzima encargada del último paso para la síntesis de vindolina, lo que no sucede en los brotes mantenidos en luz continua. Esto sugeriría que los periodos de oscuridad y luz son necesarios para que se de una sincronización para la formación de nuevos brotes.

De manera general, las condiciones de cultivo de los brotes en luz continua o fotoperíodo no tuvieron ningún efecto sobre la acumulación de alcaloides totales, empero el régimen de luz tuvo un efecto favorable en acumulación de vindolina, que no se reflejó en las actividades enzimáticas de las enzimas involucradas en los últimos pasos de su síntesis.

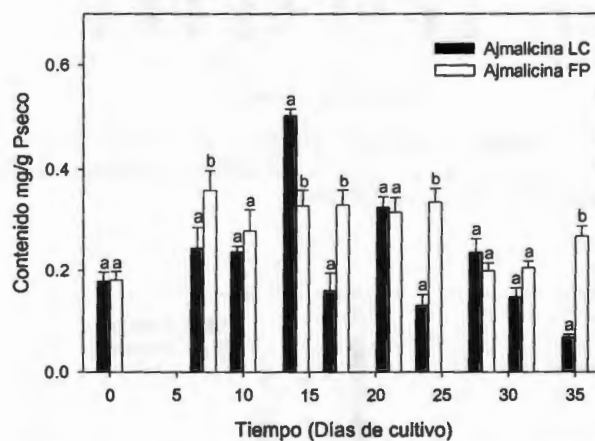
## **Perspectivas**

La síntesis de vindolina tiene varios niveles de regulación, como pudo observarse en este trabajo. Algunos puntos importantes que ayudarían a complementar la investigación son:

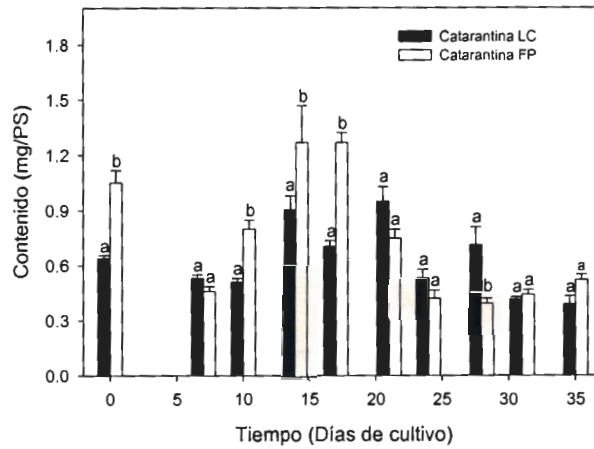
1. Cuantificar a los intermediarios post-tabersonina y antes de la síntesis de vindolina, con el fin de conocer cómo es su comportamiento después de la actividad máxima de TDC, y hasta que se presentan las actividades máximas de D4H y DAT. En el caso del fotoperíodo también sería importante saber cómo es el comportamiento de estos intermediarios durante las fases de oscuridad y de luz.
2. Detectar las enzimas TDC, D4H y DAT con ensayos inmunológicos con el fin de averiguar cómo se encuentra durante el ciclo de cultivo, y si su incremento en la actividad se debe a un aumento en la cantidad de la enzima o a la activación de la existente.
3. Realizar estudios para conocer cómo la transición de oscuridad a luz afecta la síntesis, particularmente de vindolina, así como de las enzimas involucradas en dichos pasos.

## Apéndice 1

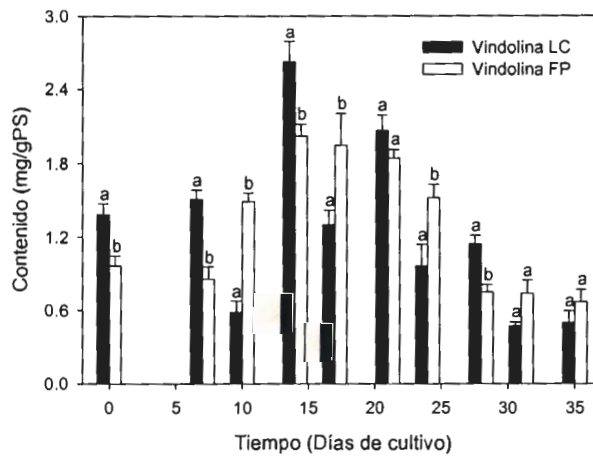
Con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre las muestras, se realizó un análisis estadístico, en el cual se analizaron las medias de tres repeticiones de las determinaciones de ajmalicina, catarantina y vindolina obtenidas en muestras sometidas a condiciones de luz continua y fotoperíodo con la ayuda del software *Sigma Stat*. Los resultados se presentan a continuación, las letras iguales en un mismo punto indican que no había diferencia significativa y las letras diferentes denotan la diferencia que existe entre las dos muestras analizadas.



**Figura A1.** Contenido de ajmalicina durante un ciclo de cultivo. LC, luz continua; FP, fotoperíodo. Promedio de 3 repeticiones con la desviación estándar. Literales diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.



**Figura A2.** Contenido de catarantina durante un ciclo de cultivo. LC, luz continua; FP, fotoperíodo. Promedio de 3 repeticiones con la desviación estándar. Literales diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.



**Figura A3.** Contenido de vindolina durante un ciclo de cultivo. LC, luz continua; FP, fotoperíodo. Promedio de 3 repeticiones con la desviación estándar. Literales diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.

## Apéndice 2

### Análisis moleculares

#### Extracción de ARN

El ARN total se extrajo de los tejidos de *Catharanthus roseus* mediante la técnica de fenol/cloroformo, seguida de precipitación con cloruro de litio (Jones *et al.*, 1985). El tejido se pulverizó en un mortero con un pistilo y con nitrógeno líquido, el polvo así obtenido se transfirió a un tubo de plástico, al que se le agregaron 2.25 ml del amortiguador de extracción (100 mM NaCl, 40 mM Trizma base, 1 mM EDTA, 1% SDS, pH 7.5) y 1.5 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v). La suspensión se agitó durante 10 min, se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 rpm a 4°C, y la fase acuosa se transfirió a otro tubo, al que se le adicionó un décimo del volumen recuperado de 3 M acetato de sodio pH 5.1 y dos volúmenes de etanol absoluto frío. Después de precipitar durante 20 min en hielo, la mezcla fue centrifugada durante 10 minutos a 10 000 rpm a 4°C. La pastilla así obtenida se lavó con 1 ml de etanol al 70%, y se centrifugó otra vez durante 10 minutos a 10 000 rpm y 4°C. La pastilla se dejó secar, se resuspendió en agua estéril y se precipitó durante 3 horas con una solución de cloruro de litio a una concentración final de 2 M. Después de este tiempo, se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 rpm a 4°C, y la pastilla se resuspendió con 300 µl de agua. Los ácidos nucleicos se precipitaron con acetato de sodio y etanol absoluto, y fueron resuspendidos en 50 µl de agua estéril. La integridad del ARN obtenido se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% con 14% de formaldehído.

#### Detección de los transcritos de *tdc* y *d4h* por RT-PCR

La transcripción reversa del ARN se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, mezclando 5 µg de ARN y 50 pmoles del cebador oligo dT (Invitrogen) en un volumen final de 5 µl. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C para permitir el alineamiento del cebador y el ARN. Después de este tiempo, se adicionó MgCl<sub>2</sub>, hasta una concentración final de 3 mM y los dNTPs (Invitrogen) hasta una concentración de 0.2 mM cada uno. La reacción se inició con 50 unidades de la transcriptasa reversa (Invitrogen) y se incubó durante 60 min a 37°C. Después de este tiempo, la reacción se detuvo inactivando la enzima calentando a 70°C por 5 min. El ADNc así obtenido se amplificó por PCR. Para ello, al volumen total de la reacción se le adicionaron: 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP y 0.5 µM de los oligo nucleótidos cebadores (Tabla 2). La reacción se inició añadiendo 1.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) en un volumen final de 30 µl. Las condiciones para la PCR se muestran en

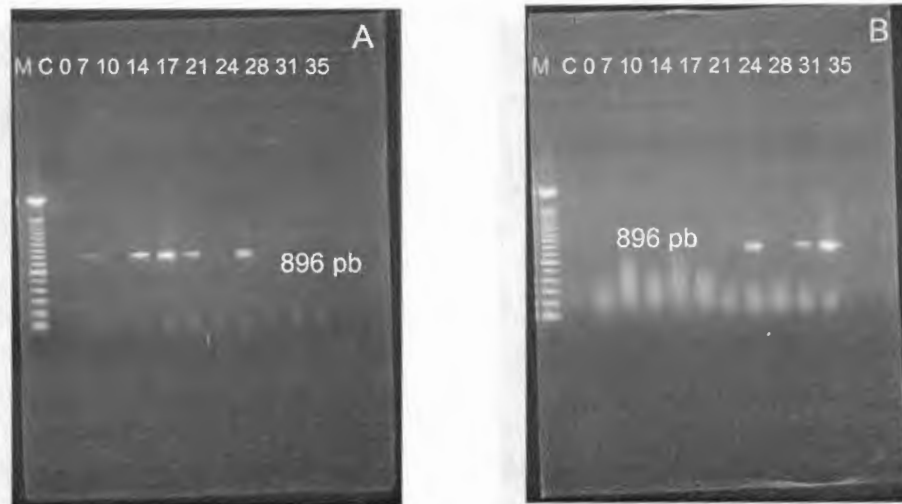
los resultados. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis de gel de agarosa al 1% en TAE (40 mM Tris-Acetato, pH 8.0, 1mM EDTA; Sambrook *et al.*, 1989).

**Tabla II.** Secuencia de los oligonucleótidos cebadores utilizados para las amplificaciones por RCP.

Oligonucleótido	Transcritos que amplifica	Dirección	Secuencia
TDC-SN	<i>tdc</i>	Sentido 5'-3'	5-ccg gtg gcg gcg tca tcc-3
TDC-AS		Antisentido 3'-5'	5-ata aac tcg tcc cgt cga-3
D4H-SN	<i>d4h</i>	Sentido 5'-3'	5-gga ttt cag tgt gta gag-3
D4H-AS		Antisentido 3'-5'	5-gat aag gaa gag cta tcg-3

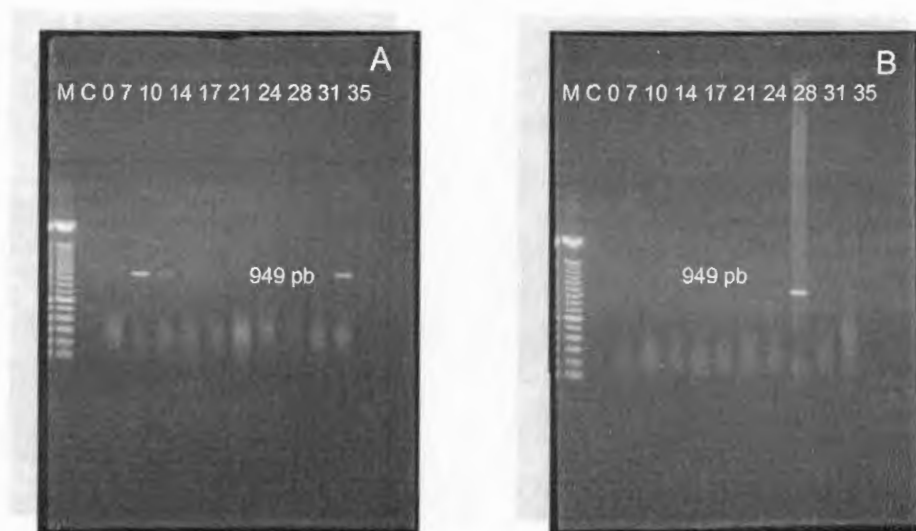
## Resultados

Se detectaron los transcritos de *tdc* que por RT-PCR. Después de extraer el ARN de los brotes, se sintetizó el ADNc, el cual fue utilizado para llevar a cabo una amplificación por PCR, en la cual se utilizaron oligonucleótidos específicos para este gen con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización a 94°C (1min.), alineación 62°C (1 min), y extensión por 35 ciclos 72°C (1 min). El tamaño del producto de amplificación esperado para este gen era de 896 pb. El producto de PCR fue separado por electroforesis de agarosa al 1%. En los brotes bajo luz continua, se detectó el transcrito sólo en los días 0,10,14,17 y 24 (Fig. 1 A), mientras que en el caso de los brotes en fotoperíodo sólo se detectaron en los días 24, 28 y 31 (Fig. 1 B). La aparición de éstos no coincidieron con la máxima actividad de la enzima, ya que no está regulada por luz, pero está sujeta a un control a varios niveles , transcripcional, postranscripcional y postraducional (Alvarez-Fernández *et al.*, 1989, Alvarez-Fernández *et al.*, 1994 De Luca *et al.*, 1988)



**Figura A4.** Productos de la amplificación de *tdc* por RT-RCP separados en geles de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. A: amplificaciones de los brotes bajo luz continua, y B: amplificaciones de los brotes en fotoperíodo.

Para la amplificación del transcrito de *d4h*, se empleó una temperatura de 94°C (1 min) para la desnaturalización, 60°C (1 min) para la alineación y 72°C (1 min) para la extensión durante 35 ciclos. Se procedió de igual forma que para *tdc*. El tamaño esperado del producto de amplificación era de 949 pb. Los transcritos de la *d4h* sólo se detectaron en algunos días del cultivo de brotes en luz continua (Fig. 2 A) y en un sólo día de los brotes en fotoperíodo (Fig. 2 B). No se observó correlación con la actividad enzimática, como lo observado en plantas etioladas que son transferidas a luz (Vazqu ez-Flota y De Luca 1998), debido a que en este trabajo están sometidas a una fuente de luz constante que no permitió observar este comportamiento. Por otro lado las plántulas etioladas al ser transferidas a luz muestran un aumento en el transcrito a las 24 horas (Vazqu ez-Flota y De Luca, 1998), este comportamiento podr a esperarse en los brotes de fotoperíodo pero la exposición a luz es de tan sólo 16 horas.



**Figura A5.** Productos de amplificación de *dh4* por RT-RCP separados en geles de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. A: amplificaciones de los brotes de luz continua, B: amplificaciones de los brotes en fotoperíodo



## Referencias

**Alvarez-Fernández J and De Luca V** (1994) Ubiquitin-mediated degradation of tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, **36**: 1123-1128.

**Alvarez-Fernandez J, Owens TG, Kurz WGW and De Luca V** (1989) Immunological detection and quantitation of tryptophan decarboxylase in developing *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol*, **91**:79-84.

**De Luca V, Alvarez J, Campbell D and Kurz WGW** (1988) Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, **86**: 447-450.

**Jones JDG, Dunsmuir P and Bedbrook J** (1985) High level expression of introduce chimeric genes. *EMBO J*, **4**:2411-2418.

**Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T** (1988) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

**Vázquez-Flota F and De Luca V** (1998) Developmental and light regulation of deacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.). *Plant Physiol*, **117**: 1351-1361.

