



**ESTUDIOS MOLECULARES DE  
LA BIOSÍNTESIS DE  
ALCALOIDES INDÓLICOS EN  
*Catharanthus roseus***

CENTRO DE INVESTIGACION  
CIENTIFICA DE YUCATAN, A.C.  
DIRECCION ACADEMICA  
7 FEB 2009

**INFORME FINAL**

**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN**

DIRECCION ACADEMICA

Mérida, Yuc., 16 de julio de 1999

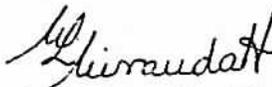
Dr. Marcial Bonilla Marín  
Director de Apoyo a la Investigación Científica,  
DAIC-CONACyT,  
México, D.F.

Estimado Dr. Bonilla:

Anexo a la presente me permito someter para su evaluación el reporte técnico final del proyecto "Estudios moleculares de la biosíntesis de alcaloides indólicos en *Catharanthus roseus*", clave 2205P-N.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión de enviarle un cordial saludo y ponerme a sus órdenes para cualquier aclaración necesaria con respecto a este reporte.

Atentamente,



Dra. María de Lourdes Miranda Ham  
Investigador responsable del proyecto

Recibí  
20-VII-99  
Rodolfo Aranda

c.c.p. Dr. Alfonso Larqué Saavedra, Director General, CICY.  
c.c.p. Dra. Teresa Hernández Sotomayor, Directora de la Unidad de Biología Experimental, CICY.

Mérida, Yuc., 16 de julio de 1999

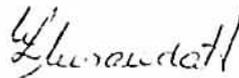
Dr. Marcial Bonilla Marín  
Director de Apoyo a la Investigación Científica,  
DAIC-CONACyT,  
México, D.F.

Estimado Dr. Bonilla:

Anexo a la presente me permito someter para su evaluación el reporte técnico final del proyecto "Estudios moleculares de la biosíntesis de alcaloides indólicos en *Catharanthus roseus*", clave 2205P-N.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión de enviarle un cordial saludo y ponerme a sus órdenes para cualquier aclaración necesaria con respecto a este reporte.

Atentamente,



Dra. María de Lourdes Miranda Ham  
Investigador responsable del proyecto

c.c.p. Dr. Alfonso Larqué Saavedra, Director General, CICY.  
c.c.p. Dra. Teresa Hernández Sotomayor, Directora de la Unidad de Biología Experimental, CICY.



16 JUL 1999

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA  
DE YUCATAN, A. C.  
DIRECCION GENERAL

**CONACYT, DIRECCIÓN ADJUNTA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
CONCENTRADO DE INFORME TÉCNICO FINAL DE PROYECTOS DE  
INVESTIGACIÓN**

---

**DATOS GENERALES**

**CLAVE:** 2205P-N

**TÍTULO DEL PROYECTO**

Estudios moleculares de la biosíntesis de alcaloides indólicos en *Catharanthus roseus*

**RESPONSABLE**

María de Lourdes Miranda Ham

**INSTITUCIÓN**

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

**DIRECCIÓN COMPLETA**

Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México

**TELÉFONO**

01 (99) 813966

**FAX**

01 (99) 813900

**e-mail**

[mirham@cicy.cicy.mx](mailto:mirham@cicy.cicy.mx)

**INFORME FINAL**

**PERIODO QUE CUBRE ESTE INFORME:** abril de 1996 a julio de 1998

**FECHA DE INICIO:** abril de 1996

**DURACIÓN:** 2 años

**FINANCIAMIENTO OTORGADO PARA TODO EL PERIODO CUBIERTO:**

**GASTO CORRIENTE:** \$104,000.00

**GASTO RECIBIDO:** \$100,000.00

**EJERCIDO:** \$98,599.42

**GASTO DE INVERSIÓN:** \$45,000.00

**EJERCIDO:** \$44,146.95

**EVALUACIONES DE INFORMES PARCIALES ANTERIORES:**

**NÚMERO DE INFORMES ENTREGADOS: 1**

**PERSONAL QUE PARTICIPÓ EN EL PROYECTO:**

M.C. Lizbeth A. Castro Concha

**ESTUDIANTES QUE PARTICIPARON EN EL PROYECTO:**

Q.I. Angela Francisca Kú González  
I.B. Ramón Guillermo Rodríguez Martínez

---

**CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS DURANTE EL PERIODO DE VIGENCIA**

**OBJETIVOS Y METAS INICIALES**

**OBJETIVOS**

1. Obtener los bancos genómicos y de cDNA de raíces transformadas de *C. roseus* en condiciones de máxima producción de alcaloides.
2. Obtener y caracterizar clonas genómicas y de cDNA de la iridodial ciclasa y la estrictosidina sintasa de raíces transformadas de *C. roseus*.
3. Determinar si son genes que existen en una sólo copia o forman parte de familias multigénicas.

**METAS**

1. Obtener clonas, tanto genómicas como de cDNA, de SSS durante el primer año y las de IC en el segundo.
2. Formación de recursos humanos a nivel Licenciatura, una tesis por año de proyecto.
3. Publicar un artículo en una revista internacional con arbitraje con los resultados del proyecto.

**PRODUCTOS OBTENIDOS DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO**

**ARTICULOS EN EL EXTRANJERO**

Sometido: 1

**TESIS DE LICENCIATURA**

Terminadas: 2

**ANEXO AL INFORME TÉCNICO SOBRE EL PROYECTO: "ESTUDIOS MOLECULARES SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES INDÓLICOS EN *Catharanthus roseus*"**

**PRODUCTIVIDAD**

**Equipo adquirido**

1 computadora Hewlett Packard Vectra 520MCX 5/133

1 Fuente de poder Life Technologies Modelo 4001

**Tesis desarrolladas bajo este proyecto y grado de avance**

1. Angela Francisca Kú González, OBTENCIÓN DE CLONAS DE ADNc DE LA ENZIMA ESTRICTOSIDINA SINTASA PROVENIENTE DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Catharanthus roseus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingeniería Química , UADY. Grado de avance: 100%
2. Ramón Guillermo Rodríguez Martínez, SELECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE *Lycopersicon esculentum* Mill. RESISTENTES A *Phytophthora infestans*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida. Grado de avance: 100%

**Artículo sometido**

1. Islas-Flores I., O. Moreno-Valenzuela, Y. Minero, V.M. Loyola-Vargas and M.L. Miranda-Ham, TRYPTOPHAN DECARBOXYLASE FROM TRANSFORMED ROOTS OF *Catharanthus roseus* CULTIVATED *in vitro*. Plant Physiol. Biochem.

## INTRODUCCIÓN

*Catharanthus roseus* L.G. Don, uno de los miembros de la familia de las Apocynaceas, produce una gran variedad de alcaloides indólicos terpénicos como parte de su metabolismo secundario. Muchos de estos alcaloides tienen importantes aplicaciones en medicina como antihipertensivos, antitumorales, etc.

Los alcaloides de *C. roseus*, tanto los monoméricos como los diméricos, consisten de una parte indólica que proviene de la triptamina y una porción terpénica, el glucósido iridoide secologanina. La triptamina se deriva del metabolismo primario por una simple conversión enzimática del triptofano, reacción catalizada por la triptofano descarboxilasa (TDC). La biosíntesis de la secologanina requiere de un número de reacciones, de las cuales el primer paso limitante es la hidroxilación del geraniol a 10-hidroxigeraniol por la geraniol-10-hidroxilasa (G10H). La triptamina y la secologanina se condensan estereoespecíficamente por medio de la strictosidina sintasa (SSS) para formar la strictosidina, la cual es el precursor general de todos los alcaloides indólicoterpénicos.

Durante las últimas décadas se ha hecho un enorme esfuerzo para elucidar la vía de síntesis que conduce hacia estos alcaloides y para caracterizar las enzimas involucradas en ella. Solamente se ha aislado las clonas de cDNA de 3 de las enzimas claves y los mecanismos moleculares que controlan su expresión apenas comienzan a estudiarse. El conocimiento detallado de la regulación de esta vía podría al final darnos la posibilidad de manipular la productividad al modificar genéticamente plantas o cultivos *in vitro*.

El objetivo principal de este trabajo fue el iniciar el estudio sistemático a nivel de gene de la regulación de enzimas involucradas en la síntesis de alcaloides indólicos en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.

## OBJETIVOS LOGRADOS

1. Se obtuvieron los bancos genómicos y de cDNA de raíces transformadas de *C. roseus* en condiciones de máxima producción de alcaloides. Ambos bancos poseen títulos tales que pueden utilizarse para la búsqueda de otros genes relacionados con el metabolismo secundario en *C. roseus*. En particular, el banco de cDNA resultó representativo del estadio de máxima producción, dado que el aislamiento de las clonas primarias de SSS fue un proceso relativamente sencillo.
2. Se aislaron 6 clonas genómicas y 7 de cDNA de la SSS. De las clonas de cDNA, la más completa (aproximadamente 1100 pb) dá lugar a una proteína de 39 kDa y muestra en su secuencia una similaridad arriba del 90% con la clona aislada por McKnight y colaboradores a partir de un banco de cDNA de plántulas muy jóvenes de *C. roseus*. Ninguna de las clonas genómicas estaba completa.
3. Se determinó que el gene de la SSS cuando menos en las raíces transformadas de *C. roseus* se encuentra en una sola copia.
4. Por lo que respecta al trabajo correspondiente a la búsqueda de clonas para la iridodial ciclasa, éste no fue exitoso. Aún cuando en la opinión de gente experimentada, como el Dr. V. De Luca (Universidad de Montreal), se tenían posibilidades de poder aislarla por medio de PCR con oligonucleótidos representativos de las regiones conservadas de otras monoterpeno ciclasas (sitio activo), no se obtuvieron bandas de DNA que pudieran utilizarse como sondas. El trabajo bioquímico realizado en el grupo del Dr. Víctor Manuel Loyola (CICY) ha demostrado que la iridodial ciclasa (ó 10-oxogeranial ciclasa, como ellos la han denominado) muestra diferencias significativas en sus requerimientos de sustrato con respecto a las otras monoterpeno ciclasas. Esto

parecería redundar en diferencias importantes en el sitio activo de la enzima. Al momento, este grupo aún se encuentra en el proceso de purificación de esta enzima y por lo tanto, los anticuerpos contra dicha proteína aún son una promesa futura (que podría constituir una manera mucho más segura de poder aislar el gene). Cabe mencionarse que aún cuando se tenía cierta información que el grupo holandés del Dr. Verpoorte estaba tras esta misma enzima (proteína y gene), aún no han publicado ni siquiera su determinación.

5. Dado lo anterior, se tomó la decisión de completar el trabajo que había quedado pendiente con otra importante enzima de metabolismo secundario, en la que ya habíamos trabajado en años anteriores, la triptofano descarboxilasa (TDC). Habían quedado pendientes ciertos experimentos que podrían dar una pauta sobre su regulación en las raíces transformadas de *C. roseus*, que fueron terminados y se tiene sometida una publicación a la revista *Plant Physiology and Biochemistry*. La contribución de este trabajo con la TDC es que provee de evidencia sobre la importancia de la regulación postranscripcional durante la inducción del metabolismo secundario en raíces transformadas en *C. roseus*.

## COMENTARIOS GENERALES SOBRE EL INFORME

Aún cuando no fue posible obtener las clonas de la iridodial ciclasa que se había planteado como parte de los objetivos de este proyecto, se puede decir que se han dado pasos importantes en cuanto a la implementación de metodologías para el estudio sistemático a nivel molecular de la regulación de diferentes enzimas, no sólo aquellas involucradas en el metabolismo secundario en raíces transformadas de *C. roseus*, sino también con proteínas involucradas en la transducción de señales en sistemas vegetales o durante el proceso embriogénico en café y agaves.

Se consiguieron las metas en lo que se refiere a la formación de recursos humanos y el manuscrito de un artículo se encuentra sometido a una revista de buen nivel de impacto.