

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *Uncaria tomentosa* PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES MONOTERPÉNICOS.**

Margarita I. Garrido-Gutiérrez\* (1); Carlos M. Cerda-García-Rojas (2); Martha L. Orozco-Cárdenas (3); Ana C. Ramos-Valdivia\*\* (1), Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Depto. de Biotecnología y Bioingeniería, México D.F., México; maguigarrido@yahoo.com.

Palabras clave: *Uncaria tomentosa*, *Agrobacterium*, alcaloides monoterpénicos.

**Introducción.** *Uncaria tomentosa* (uña de gato) es una planta del Amazonas que produce alcaloides oxindólicos monoterpénicos (MOA). Éstos tienen propiedades citotóxicas, inmunomoduladoras, antileucémicas y anti-VIH<sup>1</sup>. Debido a su importancia, dentro de las estrategias que actualmente se siguen para la obtención de los MOA, es la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Las raíces transformadas con *A. rhizogenes* producen altos niveles de alcaloides<sup>2</sup> y es posible insertar genes de interés metabólico por medio de *A. tumefaciens*.

El objetivo del presente trabajo fue obtener raíces y plantas transformadas de *Uncaria tomentosa* infectadas por *Agrobacterium rhizogenes* (AR12, LBA9402 y A4) y *A. tumefaciens* (AGLO con el gene para la dexoxilulosa sintasa, DXS), respectivamente, para producir MOA y estudiar su metabolismo.

**Metodología.** Los explantes que se usaron para la transformación fueron hojas, raíces e internodos obtenidos de plantas crecidas bajo condiciones *in vitro*. Después de la infección con las diferentes cepas de *Agrobacterium*, éste fue eliminado de los cultivos con 300 mg/L de cloranfenicol<sup>®</sup> o 400 mg/L de Vancomicina. Los tejidos transformados se seleccionaron *in vitro* con 50 mg/L de kanamicina. La confirmación de la transformación se hizo por PCR buscando los genes del rol B y C, además del gen para la DXS, con el DNA obtenido de las raíces por el método del DNazol<sup>®</sup>. La producción de alcaloides liberados al medio se llevó a cabo por HPLC Masas.

**Resultados y discusión.** Se obtuvieron raíces en los explantes de hojas de *U. tomentosa*, en promedio, a los 6 días después de la infección con cada una de las cepas de *Agrobacterium rhizogenes*. En los controles, las raíces fueron evidentes después de 15 días de cultivo. Con la

cepa AR12, la mitad de ellos formaron raíces en la zona de infección y únicamente la tercera parte, o menos, con las cepas A4 y LBA9402 (tabla 1). Con AGLO DXS, la transformación con los explantes de raíces e internodos resultó ser eficiente. La confirmación de la transformación con *A. rhizogenes* se muestra en la figura 1.

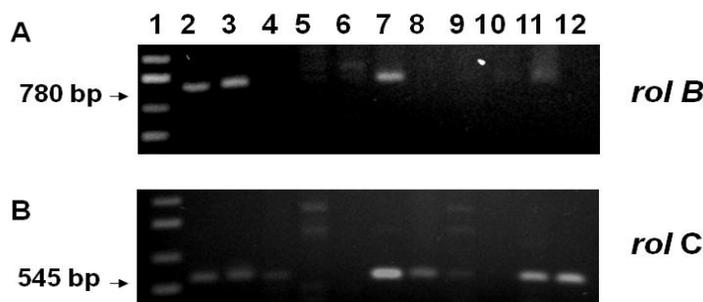


Fig. 1. Rol B y C amplificados por PCR de varios explantes (carriles del 2-11) transformados.

Está por confirmarse la transformación de las plantas con AGLO DXS. Los resultados obtenidos hasta el momento de esta transformación, nos son alentadores para poder estudiar la vía metabólica de los MOA en un futuro muy cercano. Con las cepas AR12 y A4 fue posible obtener raíces transformadas de *U. tomentosa* y no con LBA9402. La cepa A4 tiene menos infectividad pero mayor capacidad para transferir completo su T-DNA, con respecto a la AR12. El análisis de HPLC Masas reveló una producción mayor de alcaloides en las raíces transformadas (infectadas con AR12 y A4) y una gran gama de compuestos que merecen su identificación.

**Conclusiones.** Gracias a la transferencia de los oncogenes rol B y C (pero principalmente el B<sup>1</sup>) fue posible, al parecer, incrementar la producción de alcaloides monoterpénicos en *U. tomentosa*.

**Agradecimientos.** Agradecemos a IB Y. Santos-Mendoza y la M.C G. Luna-Palencia por el análisis de los alcaloides. Esta investigación fue financiada por UC MEXUS-CONACYT y CONACYT, proyecto 43228.

**Bibliografía.**

1. Laus G. (2004) Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. *Phytother. Res.* 18: 259-274.
2. Bulgakov VP. (2008). Functions of rol genes in plant-secondary metabolism. *Biotechnol. Adv.*, 26:318-324.

Tabla 1. Eficiencia de infección con *Agrobacterium rhizogenes* strains.

	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> strains		
	A4	A12	LB9402
Total infected explants	13	27	13
Hairy roots formed	4	11	3
Callus induction from explants	4	2	5