

Biotecnología Farmacéutica: Fusión de Protoplastos de dos Especies de Nopal de la Ciudad de Guanajuato

Rosiles-Ortega Ana Fernanda (1), Durán-Castro Eduardo (2), Rodríguez-Robelo Carmen (3)

1 [Bachiller en Ciencias Naturales y Exactas, ENMS Guanajuato, Universidad de Guanajuato.] [fer.rosiles@gmail.com]

2 [División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.] [laloduca@ugto.mx]

3 [ENMS Guanajuato, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] [robolocarmen@gmail.com]

Resumen

Los *protoplastos* son estructuras celulares de plantas, bacterias y hongos que han perdido totalmente la pared celular. Este proceso se realiza al degradar enzimáticamente los sustratos presentes en esta estructura; los protoplastos se describen como células desnudas. La ausencia de una pared celular rígida (obstáculo físico-químico) y la completa exposición de la membrana celular convierte a los protoplastos en un sistema ideal para la investigación en procesos de transporte y división celular, morfogénesis, mutagénesis, selección, etc. La aplicación más utilizada actualmente es la transformación genética por hibridación o fusión somática, por introducción-absorción de proteínas, ADN (vegetal, vírico o bacteriano) y macromoléculas. En esta investigación se utilizaron dos especies de nopales presentes en la ciudad de Guanajuato, de las casi cien especies y variedades que existen en México, para la formación in vitro de protoplastos. La parte utilizada es el mesófilo en los *cladidos* o pencas de los nopales siguiendo un protocolo establecido por el grupo de investigación, para la adecuada obtención de los mismos, con buenas características de viabilidad. La variedad de nopales utilizados es importante, ya que de ellos se obtiene por medio de biotecnología farmacéutica un sustrato de importancia médica con posibles aplicaciones en tratamiento de algunas enfermedades respiratorias.

Abstract

Protoplasts are cell structures of plants, bacteria and fungus that have totally lost their cell wall. This process is done by enzymatic degrading of substrates present in this structure; protoplasts are described as naked cells. The absence of a rigid cell wall (physical- chemical obstacle) and the complete exposition of the cellular membrane become the protoplasts in an ideal system to the research of transport and cellular division processes, morphogenesis, mutagenesis, selection, etc. The most updated application nowadays is the genetic transformation through hybridization or somatic fusion, by protein introduction - absorption, DNA (vegetal, viral or bacterial), macromolecules. In this investigation were used two Guanajuato City native nopales species, from among one hundred species and varieties in existence in Mexico for in vitro protoplasts formation. The utilized part is the mesophyll in the cladidos or nopales leaves following the protocol established by the investigation group for the proper obtaining of them, with good characteristics of viability. Mexican cactus (nopales) varieties used are important, due to through them it is obtained via pharmaceutical biotechnology a substratum of medical relevance with possible applications in the treatment of some respiratory diseases.

Palabras Clave

Protoplastos, Biotecnología, In vitro, Micro-propagación, Enzimas.

INTRODUCCIÓN

Un protoplasto vegetal puede definirse como: «La parte de la célula vegetal que está delimitada e incluida dentro de la pared celular y que puede ser plasmolisada y aislada por eliminación mecánica o enzimática de la pared celular. El protoplasto es por lo tanto una célula desnuda, rodeada por su membrana plasmática, potencialmente capaz de regenerar la pared celular, crecer y dividirse» (Vasil, 1976).

El pionero en el aislamiento de protoplastos fue Kiercker, que consiguió en 1892 obtener los primeros protoplastos por métodos quirúrgicos, complejos y poco eficaces. Hubo que esperar 68 años hasta que Cocking (1960) demostró la posibilidad de aislar por métodos enzimáticos grandes cantidades de protoplastos viables. Una vez establecida la eficacia del método enzimático y su enorme superioridad sobre el método quirúrgico, la técnica ha sido objeto de múltiples refinamientos y ajustes, siendo aplicada a multitud de especies vegetales con diverso éxito.

La principal característica de ellos es la capacidad para producir un organismo diferenciado, a partir de una sola célula.

Breve reseña histórica:

El primer aislamiento de protoplastos vivos fue descrito por Klercker en 1892 con cebollas usando métodos físicos. Pero el primero en usar técnica enzimática fue en 1919 por Gaija en células de levadura y usando como enzima jugo gástrico del caracol *Helix pomatia*, en ese momento no se conocían los mecanismos de degradación enzimática aunque fue un gran avance. Aunque el que se lleva el crédito aquí es Cocking que en 1960 utilizó por primera vez degradantes de pared celular para aislar protoplastos de plantas superiores, usando celulosa extraída del hongo *Myrothecium varrucaria* con los que logró aislar protoplastos de raíces de tomate. [1]

Sus usos más comunes:

Son adecuados para distintas manipulaciones genéticas que no se podrían hacer con plantas o células intactas.

Además sirven como herramientas experimentales para investigaciones fisiológicas, biofísicas y bioquímicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La primera fase es la obtención, preparación y desinfección del material vegetal. La segunda fase es la eliminación de la pared celular mediante enzimas líticas, en una solución con un alto potencial osmótico. La tercera fase es la recuperación de los protoplastos, incluye la eliminación de los enzimas por lavado y el paso a un medio de cultivo para la recuperación de la pared y la promoción de las primeras divisiones celulares de las células individuales obtenidas de los protoplastos. Así como la regeneración de la pared no representa ninguna dificultad, ya que ocurre inmediatamente al eliminar los enzimas, la fase de división celular, suele ser muy problemática y por diversas causas necesita la cuidadosa purificación y manipulación previa de los protoplastos así como la puesta a punto de un medio de cultivo específico y complejo, con sales minerales, vitaminas, carbohidratos, reguladores de crecimiento y una dosis reducida paulatinamente del agente osmótico; esto se realiza incubando el material a unos 25°C en condiciones de oscuridad de 5 a 7 días. En esta fase se realizan los tratamientos y la selección del material frente a diversos agentes. La cuarta fase es el cultivo de los microcallos obtenidos tras la división celular, se cambia en ella la densidad poblacional, la composición del medio de cultivo, que se hace menos exigente y la incubación se hace con luz. La quinta fase es la regeneración de plántulas a partir del tejido de callo, mediante modificaciones de la composición hormonal-mineral del medio de cultivo. La sexta fase es el

trasplante y aclimatación de las plantas obtenidas en invernadero.

El aislamiento de protoplastos depende en gran medida del tipo y concentración de las enzimas utilizadas. Las dos enzimas esenciales son la *celulasa* y la *pectinasa*, que degradan específicamente los componentes celulósicos y pectínicos de la pared celular. Algunos tejidos también requieren *hemicelulasas* adicionales para una correcta digestión de la pared. Otros preparados enzimáticos como la *driselasa* desarrollan un conjunto de actividades líticas: *celulasas*, *laminarinasas*, *xilanasas*, *pectinasas*. Todos los preparados enzimáticos incluyen impurezas, como *nucleasas* y *proteasas*, que pueden tener un efecto negativo sobre la viabilidad celular. Los enzimas son pH dependientes (4-6) y su temperatura óptima de actuación es de 40 a 60°C. Debido a la fragilidad osmótica de los protoplastos, es necesario controlar perfectamente el potencial osmótico tanto de la solución enzimática, como de la solución de lavado y de la solución de recuperación y cultivo de los protoplastos. Para ello se usan osmóticos iónicos o no iónicos como sorbitol, manitol, sacarosa, glucosa, cloruro cálcico, a distintas dosis. Fig. 1

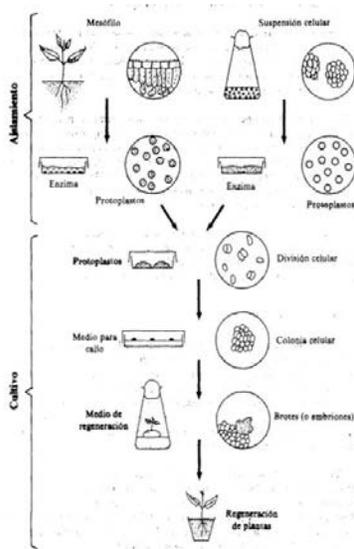


Figura 1. Protocolo para la obtención de Protoplastos.

Se recolectan muestras de al menos dos especies distintas de nopales, uno que tenga espinas visibles y grandes y otro que no tenga espinas a simple vista; de preferencia, ejemplares de tamaño mediano, tomar nota del lugar en que se recolectan las muestras.

En el laboratorio se prepara el área de trabajo, se desinfecta la campana de flujo laminar, se esteriliza todo el material a utilizar: pipetas pasteur, bisturí, pinzas, parafilm, lámparas de alcohol, frascos de cultivo celular y se preparan todos los reactivos: medio de cultivo CPW (ver tabla 1), CPW13M, CPW9M y CPW21S, las enzimas *celulasa*, *pectinasa* y *hemicelulasa*, alcohol 70%, hipoclorito 2% y agua destilada estéril.

TABLA 1: Composición del medio CPW para el aislamiento y cultivo de protoplastos.

Reactivos	Porción
KH ₂ PO ₄	27.2 mg/L
KNO ₃	101.0 mg/L
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1480.0 mg/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246.0 mg/L
KI	0.16 mg/L
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.025 mg/L

pH 5.8

Se retiran las espinas a ambas pencas, después se realiza un corte axial a ambas pencas separando ambas y etiquetando su procedencia con la leyenda "con espinas" o "sin espinas", después se introducen a la campana para continuar trabajando dentro, se retira la epidermis superior e inferior del nopal para obtener el mesófilo, posteriormente se introducen por quince minutos a una solución de hipoclorito de sodio 2%, después se realizan dos enjuagues con agua destilada estéril, se colocan las muestras en una superficie dura para cortarlas en pedazos pequeños de al menos 1 a 2 mm de largo y ancho, una vez cortados se sumergen en 10 ml de una suspensión osmoactiva de CPW13M (CPW + 13% Manitol) contenida ya en frascos de cultivo celular (NUNC DE 40 ml) durante una hora.

Pasada ya la hora se agregan 5ml de *celulasa*, 5ml de *hemicelulasa* y 5ml de *pectinasa* y se incuban 26°C durante aproximadamente 36 horas en oscuridad y una agitación de 50 rpm, al término del tiempo de incubación las muestras se pasan por un tamiz para separar todo el tejido que no fue digerido y se colecta la parte sobrante (líquida) en tubos para centrifuga de 50 ml. La muestra se centrifuga a 789 rpm durante 3 minutos, se remueve el sobrenadante y se re-suspende en 9 ml de una solución CPW9M (CPW + 9% Manitol) y 1 ml de CPW21S (CPW +21% Sacarosa), luego se vuelve a centrifugar a 100 rpm durante 5 minutos. Se remueve la capa formada en el fondo y se re-suspende en 10 ml de CPW21S y se centrifuga por 3 min a 100 rpm. Fig.2



Fig.2 Preparación de muestras.

Los protoplastos en el fondo son removidos y se re-suspenden por agitación en medio de cultivo. Fig.3



Fig.3 Agitación de muestras.

Por último se observan en microscopio de contraste de fases, de preferencia con el filtro de luz verde.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez terminado el protocolo de extracción de protoplastos se coloca la muestra en un

microscopio de contraste de fases con un filtro de luz verde, arrojando así, claramente, que entre ambas especies la ideal para extraer protoplastos es la penca que tiene espinas contra la penca que no tiene espinas.

También se observó que la cosecha de protoplastos se mejora con el uso de *hemicelulasa* en el proceso de digestión de la pared celular; junto con un tiempo de al menos 3 días de agitación continua. El seguimiento de la transformación a protoplasto observada al microscopio de contraste de fases en 40x, se muestra en la Fig.4. En la Fig.5 se observa la presencia de protoplastos íntegros y algunos con restos de pared celular, extraídos de la muestra de nopal con espinas, en microscopio óptico en 40x y en la Fig.6 se muestran los protoplastos obtenidos de nopales sin espinas en las mismas condiciones.

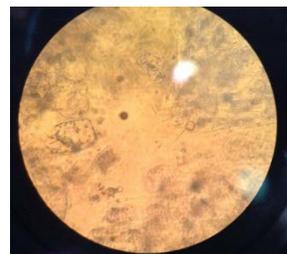


Fig.4 Células con pared celular a dos días de cultivo.



Fig.5 Protoplastos obtenidos de pencas de nopal con espinas.

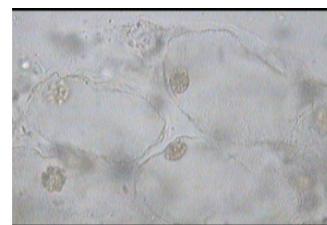


Fig.6 Protoplastos obtenidos de pencas de nopal sin espinas.

CONCLUSIONES

A pesar de que los avances en los últimos años en la obtención de protoplastos, se pueden calificar de prometedores se pone a punto la técnica para nuevas especies, la aplicación de estas técnicas se ha estabilizado, ya que a la dificultad propia de la técnica, que solo permite su utilización rutinaria en un número limitado de especies modelo, se une el cambio de moda u orientación de la ingeniería genética, que de pasar necesariamente por los protoplastos y su fusión, ha cambiado a otros métodos de transformación genética, algo más sencillos y dirigibles, aunque sin invalidar en absoluto los métodos basados en la obtención de protoplastos en los que se sigue trabajando especialmente en especies nativas de nuestro país y de nuestro estado.

El trabajo con especies endémicas de México ofrece a futuro muchas aplicaciones dentro de la biotecnología farmacéutica. El mejoramiento de protocolos permite implementar metodologías de nueva generación para el estudio de especies tan características de nuestro país como lo son los Nopales.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos aquellos que hicieron posible la realización de este proyecto, a la Universidad de Guanajuato, al Colegio de Nivel Medio Superior, a la Q.F.B. Martha Oliva Gallaga, a la Escuela de Nivel Medio Superior De Guanajuato, a la Psic. Juana Silvina Galván Rocha. A mi papá Gustavo Rosiles, a mi mamá Alexandra Ortega, a mi hermano Gael Rosiles, a mi novio Pablo Gutiérrez, a mi mejor amiga Eugenia Videgaray y a toda mi familia; gracias por ser mi soporte y motivación.

REFERENCIAS

[1] ALONSO J. R. 2011. Manual de Histología Vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Pág. 252.

Fuente:http://books.google.com.co/books?id=URwHpBfK_68C&pg=PA252&dq=protoplasto+vegetales&hl=es&ei=Qz1ZT7raD46-gAfnz4WjCw&sa=X&oi=book_result&ct=book-humbnail&resnum=7&ved=0CFEQ6wEwBg#v=onepage&q=protoplasto%20vegetales&f=false

[2] L. Szabados. Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. Fuente:

http://webapp.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo10_parte1.pdf

Leermás: <http://www.monografias.com/trabajos91/protoplastos-vegetales-aislamiento-y-cultivo/protoplastos-vegetales-aislamiento-y-cultivo.shtml#ixzz3g0yYKkXk>.

[3] Salim N; C Abdelwaheb, C. Rabah y B. Ahcene. (2009). Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. American Journal of Biotechnology 8: 1623-1624.

[4] Bravo-Hollis H. (1978) . Las cactáceas de México. Universidad Autónoma de México. México, PP-1.

[5] Flores- Valdez C. (2003). Importancia del nopal. En: (ed.) Nopalitos y tunas, producción, comercialización, post cosecha e industrialización. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp.21.

[6] Hurtado D. y M. Merino. (1994). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México. Pp 15, 133-136.

[7] Cañal M., R. Rodríguez. B. Fernández. R. Sánchez-Tames. J. Majada. 2001. Fisiología del cultivo *in-vitro*. Biotecnología vegetal 1: 3-9.

[8] Abdelnour-Esquivel A., J. Vincent-Escalant. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Turrialba, Costa Rica, pp. 2-3.

[9] Pérez E, R. Ramírez, H. Núñez y N. Ochoa. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes. México. Pp. 27, 51-63, 65.

[10] Anthony, P; W.Otoni.; B. Power; C. Kenneth & Davey, M. (1999) "Plant cell culture methods in molecular biology" "Protoplast Isolation, culture and plant regeneration from Passiflora", TotowaNew jersey USA. vol III, editorial Robert D.Hall, Pág 167- 181.

[11] Blackhall. N; M. Davey & J. Power. (1994) "Plant cell culture a practical approach". "Isolation,culture, and regeneration of protoplast" Dixon, Universidad de Oxford, , Oklahoma USA. segunda edición, editorial R:A. Pág 27- 49.

[12] Jadán. M. (2000) Tesis: "Obtención de protoplastos a partir de callos y suspensiones celulares de Citrus sinensis cv. 'Acosta 6' y cv. 'Washington', y su fusión con protoplastos de hoja de patrones comerciales". Universidad de Costa Rica.