

Fusión de Protoplastos: Biotecnología Farmacéutica

Carlos Ignacio Rangel González (1), Eduardo Duran Castro (2)

1 [Licenciatura en Biología Experimental, División de Ciencias Naturales y Exactas] | Dirección de correo electrónico: Ignacio_3107tlc@hotmail.com

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: laloduca@ugto.mx

Resumen

El objetivo de la investigación es aislar protoplastos provenientes de cladiolas o pencas de dos variantes de nopal no taxadas de la Ciudad de Guanajuato, una con espinas y otra sin espinas. Un protoplasto vegetal es una célula que contiene pared celular y es potencialmente capaz de diferenciarse en célula meristemática. Para utilizarlo como modelo de experimentación en investigación es necesario quitarle la pared celular, que contiene celulosa y pectina, de forma enzimática por medio de celulasa y pectinasa. Ya una vez sin pared celular puede fusionarse con otros protoplastos de especies diferentes y de esta forma existe intercambio de material genético. El nopal es rico en β - xantinas que son empleados para el tratamiento del asma. En este trabajo se aislaron protoplastos de dos especies diferentes de nopal, uno con espinas y uno sin espinas, se usó para su aislamiento la hemicelulasa a parte de las enzimas pectinasa y celulasa, observándose que se tenía mejor rendimiento en el nopal con espinas que sin ellas.

Abstract

The objective of the research is to isolate protoplasts from leaves of cladiolas or two variants of nopal not taxadas City of Guanajuato, one with and one without thorns. A plant protoplast is a cell that contains cell wall and is potentially able to differentiate into meristematic cell. For use as experimental models in research it is necessary to remove the cell wall containing cellulose and pectin, enzymatically by means of cellulase and pectinase. And once without cell walls can be fused with other protoplasts of different species and thus genetic material are exchanged. Nopal is rich in xanthines β - which are used to treat asthma. In this paper protoplasts from two different species of cactus, one with and one without thorns thorns, it was used for isolation hemicellulase part of pectinase and cellulase enzymes, noting that better performance was in cactus spines were isolated without them.

Palabras Clave

Protoplasto; Pared Celular; Nopal; CPW; Enzimas

INTRODUCCIÓN

El interés del ser humano por las plantas conocidas en nuestro país como nopales data de miles de años. Los nopales fueron una fuente indispensable de alimento y líquido potable [1]. Al considerarse un producto de mayor consumo en el pueblo mexicano resulta de gran interés obtener beta-xantinas a partir del cladiolo o penca del nopal. El asma bronquial es la enfermedad crónica más frecuente en niños y adolescentes, para su tratamiento se han utilizado sustancias como lo son las xantinas sintéticas. Las xantinas son un grupo de drogas provenientes de vegetales orgánicos [2], aunque en la actualidad se opta por la obtención sintética de las xantinas produciendo efectos secundarios en el uso del tratamiento [3].

El término protoplasto se refiere a componentes vivos de la célula vegetal que están rodeados solo por la membrana plasmática y pared celular, muchos protoplastos tienen la capacidad de resintetizar la pared celular, dividirse, formar colonias e incluso regenerar plantas [4].

El primer aislamiento de protoplastos vivos fue descrito por Klercker en 1892 con cebollas usando métodos físicos. Pero el primero en usar la 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. En 1960 Cocking utilizó por primera vez degradantes de pared celular para aislar protoplastos de plantas superiores, usando celulasa extraída del hongo *Myrothecium varrucaria* con los que logró aislar protoplastos de raíces de tomate [5].

En este proyecto se realiza el aislamiento adecuado y de mayor productividad de protoplastos de dos variantes de nopal no taxada de la Ciudad de Guanajuato, utilizando el mesófilo de dicha planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de Reactivos y medios

Se prepararon diferentes reactivos para el aislamiento de protoplastos, los cuales se realizaron con sumo cuidado para tener un

resultado favorable al momento de aislar los protoplastos:

CPW (9% manitol, 13% manitol, 21% sacarosa)

Para la preparación de los medios CPW se siguió la composición de la **tabla 1**, al mezclar los reactivos se hizo en agua destilada en el orden en el que aparecen en la tabla, esperando a que se disolviera el reactivo que se colocaba.

Tabla 1: Composición del medio CPW para el aislamiento de protoplastos

Nombre del Reactivo	Cantidad (mg/L)	
1. KH_2PO_4	27.2	CPW9M: CPW + 9% Manitol
2. KNO_3	101.0	
3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1480.0	CPW13M: CPW + 13% Manitol
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.0	
5. KI	0.16	CPW21S: CPW + 21% Sacarosa
6. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	

Enzimas

Se realizó la preparación de enzimas que se utilizaron en la digestión de la pared celular, en este proyecto utilizamos celulasas al 1%, hemicelulasa al 1% y pectinasa al 0.5%, disolviendo el soluto en agua destilada estéril.

Aislamiento de protoplastos

Para el aislamiento de los protoplastos, se consiguieron dos tipos de penca de nopal, una con espinas y otra sin espinas, de tamaño mediano.

Se procedió a cortar las espinas de los nopales con un bisturí para una mejor manipulación (Imagen 1). A partir de este paso se realizó el trabajo en una campana de flujo laminar para mantener un ambiente estéril. Posteriormente se retira la epidermis inferior y superior de la penca, para

obtener el mesófilo. Se cortó en pedazos muy pequeños, para que fuera más eficiente la degradación de la pared celular del tejido, estos pedazos se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% durante 15 min para esterilizarlos (Imagen 2). Por último se realizaron enjuagues con agua destilada estéril para eliminar los restos de hipoclorito de sodio.

Los pedazos de nopal estériles se vertieron en frascos para cultivo celular (NUNC-40mL), se añadieron 10 mL de una suspensión osmoactiva de CPW13M durante media hora, transcurrido el tiempo se le agregaron las enzimas celulasa, pectinasa y hemicelulasa 5 mL de cada una. Las muestras se incubaron durante 36 hrs a 26°C en oscuridad y con agitación continua de 50rpm.

La solución se pasó por un tamiz, para remover el tejido no digerido y se recolectó en tubos para centrifuga de 50mL. Se continuó con centrifugación a 100g durante 3 min, se remueve el sobrenadante y se resuspendió en 9 mL de solución CPW9M y 1 mL de CPW21S, se mezcla ligeramente y se centrifuga a 100rpm por 5 min, se remueve el sobrenadante y se resuspende en 10mL de CPW21S y se centrifuga a 100rpm por 3 min. Los protoplastos deben encontrarse en la superficie flotando en el medio.



IMAGEN 1: Pencas de nopal sin espinas. Arriba penca con espinas, abajo penca sin espinas



IMAGEN 2: Esterilización de trozos del mesófilo del nopal con Hipoclorito de sodio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de la incubación y la extracción de protoplastos de las muestras con las enzimas se lograron observar los protoplastos en una cantidad considerable (Imagen 3 y 4). En el cultivo de nopal con espinas se obtiene mayor cantidad de protoplastos que en el nopal sin espinas.

Probablemente se pueda mejorar la cantidad de protoplastos obtenidos añadiendo un poco más de enzimas o prolongar el tiempo de agitación para un mejor rendimiento de la actividad enzimática, así mismo como realizar cortes más pequeños de las pencas de nopal. Esto debido a que en la continuación del proyecto es indispensable un adecuado aislamiento de protoplastos para la fusión de estos.

Para proyectos futuros sería adecuada la mejora de la obtención de los protoplastos utilizando otra variedad de enzimas o en otras concentraciones o cantidades para así tener un aislamiento mayor porcentaje de protoplastos.



IMAGEN 3: Protoplasto aislado del nopal con espinas.

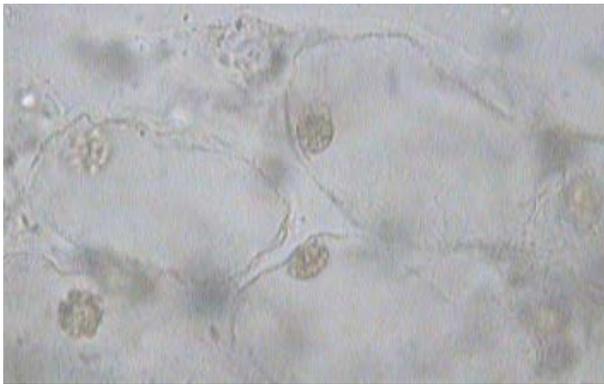


IMAGEN 4: Protoplasto aislado del nopal sin espinas.

CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de protoplastos de las dos variantes de nopal, sin espinas y con espinas, se realizaron varios ensayos para poder obtener mejores resultados y esto ayudo a un mejor entendimiento de la técnica, así como la comprensión del fundamento de procedimiento que se lleva a cabo. A pesar de que no se realizó la fusión de los protoplastos, debido al tiempo de trabajo, se han obtenido resultados satisfactorios al realizar los ensayos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a cada una de las personas que me apoyaron en la realización de este proyecto, a la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP), al Ph.D. in Pharmacy Eduardo Durán Castro de la DCNE por el apoyo económico e infraestructura, a mi compañera Cindy Bravo por la motivación y apoyo en la realización del Verano de Investigación, a mis compañeros de laboratorio Fernanda y Erick, y a mi pareja pero la motivación emocional y apoyo para continuar con mis metas.

REFERENCIAS

- [1] Zuñiga, C.A. (2012). Micropropagación de varios cultivares de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller. (Cactaceae). Zapopan, Jalisco.
 - [2] Sanchez, L.R (2004). Bases de la Neumonología Clínica. Caracas: U.C.V., Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
 - [3] Seddon, P. (2009). Oral xanthines as maintenance treatment for asthma in children. (Consultado 10 de Julio de 2015)
 - [4] Szabados, L. Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. Unidad de Investigación en Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
 - [5] Alonso, J.R. (2011). Manual de Histología Vegetal. Ediciones Mundi-Prensa pag. 252.
- 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.
- Szabados, L., Narváez, J., Roca, W.M. (1987). Tecnicas para el Aislamiento y Cultivo de Protoplastos de Yuca. (*Manihot esculenta Crantz*)