

1 9 8 6

079569585

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



OBTENCION DE UN EXTRACTO ENZIMATICO A PARTIR DE
HONGOS DEL GENERO TRICHODERMA, PARA EL
AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE Catharanthus roseus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

ANA LUZ NUÑEZ CARRASCO

GUADALAJARA, JAL., ENERO DE 1988

CON CARINO:

A MIS PADRES Y HERMANOS

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO AL
BIOL. ARTURO MANZO FONTES POR SU
VALIOSA AYUDA EN LA REALIZACION
DE ESTA TESIS.

AGRADEZCO AL CENTRO DE
INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO DE
JALISCO. A.C. POR PERMITIR LA
REALIZACION DE ESTA TESIS EN SUS
INSTALACIONES.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE
TEJIDOS VEGETALES DEL DEPARTAMENTO DE PROYECTOS ESPECIALES DE LA
DIVISION DE BIOTECNOLOGIA. CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA
EN TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO. A. C.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

CIATEJ	Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. A. C.
ANA	Acido naftalenacético
KIN	Cinetina
MS	Murashige y Skoog
DNS	Acido 3,5-dinitrosalicílico
FDA	Diacetato de fluoresceína
BSA	Albúmina de suero bovino
PDA	Papa-dextrosa-agar
D.O	Densidad optica
T.v	<u>Trichoderma viride</u>
T.h	<u>Trichoderma harzianum</u>

INDICE

	PAG.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
HIPOTESIS	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
ANTECEDENTES	8
MATERIAL Y METODOS	30
MEDIOS Y SOLUCIONES	30
MATERIAL BIOLOGICO	43
METODOLOGIA	44
RESULTADOS	65
DISCUSION	84
CONCLUSIONES	96
BIBLIOGRAFIA	100

INTRODUCCION

La Biotecnología es una área de la Biología, llamada también Tecnología Biológica cuyo objetivo es el manejo y utilización de organismos vivos para producir bienes y servicios con una utilidad económica y social. Dicha área ha crecido enormemente en los últimos años, conforme se ha ido conociendo mejor las funciones vitales de los organismos.

Su importancia estriba en la potencialidad que tiene como factor de desarrollo social, ya que se puede hacer uso de metabolitos tales como enzimas, hormonas, vitaminas, antibióticos y anticuerpos. Encuentra también aplicación en la industria alimentaria con la obtención de nuevos productos nutricionales más ricos; en el combate a la contaminación, con la utilización de microorganismos que metabolicen los desechos orgánicos, y en la agricultura, en donde ha propiciado importantes avances debido

a las modernas técnicas de ingeniería genética y de cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo in vitro de células, tejidos y órganos de plantas es una de las ramas de la Biotecnología que cobra mayor importancia en la actualidad, cuando los problemas alimenticios y demográficos son particularmente agudos.

El cultivo de tejidos vegetales se basa en el principio de la totipotencialidad que marca que cada célula de la planta tiene el potencial para regenerar una planta completa igual de la que proviene, si es provista de las condiciones adecuadas para su desarrollo (Augé, 1982).

En teoría, si experimentalmente a estas células en cultivo se les modifica genéticamente podrían transmitir a las células hijas esta información y las nuevas plantas adquirirían nuevas características genéticas.

En particular, los experimentos con protoplastos (células desprovistas de pared celular) procedentes de diversos tipos de tejido de plantas, han probado ser adecuados en la obtención de variedades de plantas con capacidad mejorada para resistir plagas, tolerar medios ambientes adversos y producir alimentos a través de modificaciones genéticas, tales como fusión y transformación celular (Robert, 1981).

Desde ahora se puede vislumbrar que el aislamiento y cultivo de protoplastos vegetales, será en el futuro próximo, un campo de importancia, ya que, las plantas de utilidad económica podrán adquirir características genéticas tan importantes como la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, la resistencia a alguna plaga o tolerancia a elevadas concentraciones de salinidad.

OBJETIVO GENERAL

Implementar la metodología para la obtención de un extracto enzimático necesario para el aislamiento de protoplastos de células vegetales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Obtener un extracto enzimático a partir de hongos del género Trichoderma, capaz de degradar la pared celular de vegetales superiores.

-Utilizar el extracto enzimático obtenido con el propósito de aislar protoplastos a partir de la planta Catharanthus roseus.

HIPOTESIS

Las modificaciones a los métodos conocidos para la obtención de extractos enzimáticos a partir de hongos del género Trichoderma resultarán óptimos para el aislamiento de protoplastos de vegetales superiores como Catharanthus roseus.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las técnicas de Cultivo de tejidos vegetales el uso de protoplastos vegetales se hace cada vez mas extensivo, ya que estos ofrecen un gran potencial como herramienta prometedora en estudios de ciencia básica y/o aplicada, como el mejoramiento de plantas de interés agrícola e industrial.

El mejoramiento de especies vegetales de interés agroindustrial puede ser llevado a cabo mediante fusiones y transformación de protoplastos. En el aislamiento de estos protoplastos, es necesario el uso de algunas enzimas como celulasas, hemicelulasas, pectinasas, entre otras, las cuales son elaboradas por compañías extranjeras.

Se han reportado que ciertos hongos filamentosos, específicamente del género Trichoderma producen enzimas que degradan paredes

celulares de vegetales superiores. Es muy importante desarrollar un medio de cultivo cuyas características permitan la producción de estas enzimas, con lo cual se favorecería en gran medida el fitomejoramiento de especies comercialmente importantes.

ANTECEDENTES

El área de la biotecnología en los últimos años ha causado un impacto impresionante en los medios científicos, tecnológicos, social y financiero a nivel mundial. Este impacto se debe, esencialmente al potencial casi ilimitado de las tecnologías biológicas para producir económicamente una extensa variedad de sustancias en un futuro cercano y al desarrollo de las técnicas de Ingeniería Genética, Fusión Celular y Cultivos de Tejidos (animales y vegetales) y sus posibles aplicaciones (Sánchez, 1985).

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que se refieren al cultivo in vitro (en medios nutritivos adecuados) de todas las partes de la planta bajo condiciones asépticas, ya sean células aisladas, tejidos (raíz, tallos, hojas, etc.) u órganos (embriones, anteras, polen, etc.) (Navarro, 1987).

Estas técnicas tienen gran potencial como herramienta en estudios básicos y aplicados, como el aislamiento y fusión de protoplastos vegetales, ya que sus implicaciones son de gran alcance, por estar aislados del conjunto de células. Cada protoplasto puede ser utilizado como un sistema celular individual, lo que permite manejarlo igual que a un microorganismo, hecho que nos permite efectuar estudios de fitomejoramiento e hibridación somática (Barba, 1987); también son un medio útil para estudios básicos de Bioquímica, Genética, Patología, Morfología y Embriología vegetal (Gamborg, 1981), pues los protoplastos tienen la capacidad de captar para sí organelos (cloroplastos, mitocondrias, etc.) e información genética ajena ADN viral o bacteriano, etc. (Gamborg, 1981; Barba, 1987).

PROTOPLASTOS

En 1880 Hanstein propuso el término protoplasto para designar a la unidad del protoplasma contenido dentro de una célula; dicho

en otras palabras, el protoplasto es la unidad homeostática básica de la célula en que no está involucrada la pared celular (Barba, 1987). La operación fundamental en el aislamiento de protoplastos es la remoción de la pared celular sin causar daño al interior de la célula (Larkin, 1976).

Los protoplastos vegetales son células esféricas, con diámetro entre 25 y 60 μm cuya apariencia varía según el tejido del que son obtenidos, generalmente poseen una vacuola central y cloroplastos homogéneamente distribuidos en la periferia. El núcleo es inconspicuo y en algunos se pueden observar movimientos de ciclosis de protoplasma celular. La capacidad de un protoplasto para sobrevivir en un medio artificial varía según su especie y las condiciones fisiológicas de la planta madre (Robert, 1981).

Kuster en 1909 reportó el aislamiento y fusión de protoplastos vegetales, pero no pudo mantener vivos a los productos de esta fusión por mucho tiempo, debido a que los conocimientos sobre

fisiología y nutrición vegetal eran, en aquella época insuficientes (Barba, 1987). Sin embargo, la totipotencialidad en protoplastos no fue demostrada hasta 1971 por Takebe cuando regeneró plantas intactas con protoplastos de tabaco (Evans y Bravo, 1983; Paredes, 1985).

Durante la década de los 70's se realizó un gran número de investigaciones enfocadas a estudios de embriogénesis, organogénesis, hibridación, diferenciación, fitopatología, citología, mutagénesis y producción de metabolitos secundarios.

En los últimos años se ha incrementado el número de científicos que utilizan la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células aisladas en investigaciones para mejoramiento de plantas.

Las técnicas y avances relacionados con los protoplastos se remontan al primer reporte del aislamiento y obtención de un protoplasto por Klercker en 1892 que fue llevado a cabo por medio del método mecánico, el cual consistió en sumergir el tejido en

una solución hipertónica, provocando con ello plasmólisis; ya plasmolizadas las células, se seccionó el tejido y se liberaron los protoplastos (Constabel, 1982; Paredes, 1985; Barba, 1987).

En 1960, Edward C. Cocking los aisló por primera vez utilizando el método enzimático, el cual empleaba un extracto enzimático que degradaba la paredes celulares (Cocking, 1960; Dodds y Roberts, 1982; Constabel 1982; Evans y Bravo, 1983; Paredes, 1985; Barba, 1987). Cocking empleó celulasas obtenidas a partir de un cultivo filtrado del hongo Myrothecium verrucaria para aislar grandes cantidades de protoplastos de raíces de jitomate (Cocking, 1960; Robert, 1981; Barba, 1987).

Por el método enzimático se han aislado protoplastos a partir de múltiples especies y de casi todas las partes vegetales. Algunos ejemplares se enlistan en la Tabla No. 1.

Tabla No. 1

Tipo de Tejido	Referencias	
Raiz	Cocking	1960
Nódulos Radiculares	Davey y Short	1973
Pericarpio	Skene	1974
Tejidos Frutales	Gregory y Cocking	1965
Pétalos Florales	Potrykus	1971
Tubérculos	Lorenzini	1973
Endospermo	Motovoshi	1972
Células de Mesófilo	Shepard y Totten	1977
Tejido Tumeroso	Soweroff y col.	1973

Ejemplos de Tejidos de donde han sido aislados protoplastos por el Método Enzimático (Barba, 1987).

La mejor fuente para el aislamiento de protoplastos son las hojas en estado juvenil y con un crecimiento activo o las células cultivadas en medio líquido, que presentan gran potencial de crecimiento. Para aislar protoplastos de plantas, tejidos u órganos con mayor grado de dificultad se utilizan otras enzimas en combinación con extractos comerciales, por ejemplo: helicasa, (extraído del caracol Helix pomatia) para aislar protoplastos de papa; colonasa, (pectinasa) para aislar protoplastos de callos de arroz; glusulasa, utilizada para aislar protoplastos de cebada; zimolasa, una preparación enzimática cruda de Arthrobacter luteus para el aislamiento de protoplastos de polen (Evans y Bravo, 1983).

Para el aislamiento de protoplastos por métodos enzimáticos es necesario conocer varios factores:

- La estructura, componentes y constitución de la pared celular.
- Los microorganismos capaces de producir enzimas que degradan la pared celular a tratar.

- Los medios de cultivo específicos para obtener una máxima actividad enzimática por parte del microorganismo seleccionado.
- Las técnicas para aislamiento de protoplastos por digestión enzimática de la pared celular.
- Los medios de cultivo específicos para la estabilidad osmótica y la regeneración de la pared celular de protoplastos aislados.

PARED CELULAR

Para la obtención de protoplastos vegetales existe una barrera fisiológica natural, la pared celular. Dicha pared determina en gran parte la forma de la célula y representa una especie de exoesqueleto que protege y le da sostén mecánico a la célula. La pared sirve para mantener el balance con la presión osmótica. La estructura de la pared celular puede ser comparada con la de un plástico reforzado con fibras de vidrio, ya que está constituida

por un retículo microfibrilar incluido en una matriz de moléculas unidas entre sí. las microfibrillas están compuestas principalmente por celulosa (Robertis y Robertis, 1982).

Los componentes primarios de la pared celular son: celulosa, hemicelulosa y pectina. La celulosa es un polímero lineal de D-glucosa con enlaces beta-1,4; el peso molecular puede variar entre 50,000 y 2'500,000 d en diferentes especies. La hemicelulosa existe en menor cantidad y aparece como una mezcla de polímeros de glucosa, galactosa, manosa, arabinosa y xilosa, muchos de estos carbohidratos están ligados con ambos enlaces beta-1,4 y beta-1,3. La pectina comprende cerca del 5% de la pared celular primaria y es importante en la estructura de la pared celular y la estabilidad entre células vegetales. La pectina es un polímero de metil-D-galacturonato conectado con enlaces alfa-1,4 con peso molecular de 25,000 a 36,000 d. Además, las paredes celulares contienen extensinas, un complemento glicoproteínico unido a las fibras de celulosa, y muchos lípidos indefinidos (Evans y Bravo, 1983).

Los componentes mencionados anteriormente deben considerarse de gran importancia para la degradación de la pared celular y por consecuencia la obtención de protoplastos vegetales.

ORGANISMOS QUE DEGRADAN LA CELULOSA

La pared celular de vegetales superiores puede ser degradada por extractos enzimáticos, que están constituidos por celulasas, hemicelulasas, pectinasas, glucanasa, etc., estas son producidas por bacterias, hongos, actinomicetos y algunos animales invertebrados. La investigación sobre producción de celulasas ha sido restringida a fuentes microbianas que utilizan como fuente de carbono distintos compuestos carbonados presentes en las paredes celulares (Philips y Humpherey, 1983; Laborda, 1984).

Las especies de bacterias y hongos que degradan la celulosa han sido aislados de tierra, madera en estado de putrefacción o

materiales textiles. Philips y Humphrey en 1983 enlistan a varios géneros de actinomicetos, bacterias, y hongos que tienen la capacidad de degradar celulosa como se enlista en la Tabla No.2.

Tabla No. 2

ACTINOMICETOS	BACTERIAS	HONGOS
<u>Actinomices</u>	<u>Clostridium</u>	<u>Trichoderma</u>
<u>Streptomices</u>	<u>Cellulomonas</u>	<u>Aspergillus</u>
<u>Termomospora</u>	<u>Cellvibrio</u>	<u>Penicillium</u>
	<u>Cytophaga</u>	<u>Sporotrichum</u>
	<u>Sporocytophaga</u>	<u>Fusarium</u>
	<u>Corynebacterium</u>	<u>Stachybotrys</u>

Géneros de actinomicetos, bacterias y hongos que descomponen la celulosa (Philips y Humphrey, 1983).

Taxonómicamente los actinomicetos exhiben propiedades comunes de hongos y bacterias. varias especies de estos producen celulasas que son secretadas al medio de cultivo.

Las bacterias que descomponen la celulosa son tanto anaerobias como aerobias. La producción de celulasas por bacterias es constitutiva. los niveles de celulasas producidas por bacterias son típicamente bajas, que los niveles que producen los hongos, y en algunos casos, las celulasas son intracelulares (Philips y Humphrey, 1983).

La producción de celulasas por hongos es mas frecuentemente utilizada; el complejo enzimático es inducido o aumentado por la presencia de celulosa como sustrato. Las celulasas producidas por hongos son usualmente secretadas en el medio de cultivo (Sternberg, 1976; Philips y Humphrey, 1983; Huitrón, 1983; Crueger y Crueger, 1984).

No existen publicaciones de comparaciones cuantitativas de la actividad celulolítica entre hongos, bacterias y actinomicetos. Estas han sido reportadas en muchos laboratorios por separado y solo en algunas especies, en diferentes medios de cultivo, diferentes sustratos, condiciones de cultivo y diferentes métodos de mediciones de actividad, etc. (Philips y Humphrey, 1983).

Miles de microorganismos tienen la habilidad para crecer sobre celulosa. Aunque muchos de estos crecen verdaderamente rápido, pero solo unos pocos son capaces de producir in vitro celulasas extracelulares capaces de convertir celulosa cristalina a glucosa (Sternberg, 1976).

La Tabla No. 3 enlista a los organismos probados por Sternberg para su actividad celulolítica.

Tabla No. 3

CEPA

Trichoderma viride QM6a (cepa silvestre)

Trichoderma viride QM9123

Trichoderma viride QM9414

Trichoderma viride QM9316

Streptomyces sp QM8814

Penicillium iriensis QM9624

Cryosporium lignorum QM9145

Pestalotiopsis westerdikii QM381

Sporotrichum sp QM806

Cryosporium pruinatum QM826

Organismos probados por Stenberg para la producción de celulasas

(Stenberg, 1976).

Muchos de estos microorganismos aislados producen celulasas extracelulares que realmente hidrolizan los derivados de la celulosa tales como carboximetil-celulosa y celulosa microcristalina, pero solo pocos tienen la habilidad para hidrolizar extensivamente la celulosa nativa. De los cultivos filtrados los mas activos son a partir de *T. viride* QM6a (Sternberg, 1976). Un incremento adicional fue obtenido irradiando conidias con un acelerador lineal de partículas, resultando la mutante *T. viride* QM9123 con el doble de actividad de la cepa original. Un tratamiento posterior utilizando irradiación gama, originó la cepa de *T. viride* QM9414, con alta actividad celulolítica (Menezes y Menezes, 1983).

De manera general, las especies del género *Trichoderma* han sido las mas utilizadas para producir extractos enzimáticos para degradar paredes celulares de bacterias, hongos y vegetales superiores, ya que estos utilizan como fuente de carbono distintos compuestos carbonados como: celulosa microcristalina (Sternberg, 1976; Brown, 1976), bagazo de caña (información

obtenida en el I.M.C.P., U de G) bagazo y pulpa de remolacha (Illanes y Shaffeld, 1982; Shaffeld y Illanes, 1983; Larios, 1984). quitina (De Vries y Wessels, 1973a; Peberdy e Isaac, 1976) laminarina (Peberdy e Isaac, 1976) etc.

Entre las especies del género Trichoderma que se han reportado mas eficientes para este fin son: T. koningii (Crueger y Crueger, 1984) T. album (Larios, 1984), T. viride (Demain, 1976; Sternberg, 1976; Brown, 1976; Philips y Humpherey, 1983; Crueger y Crueger, 1984; Power y Cocking, 1970; Shaffeld e Illanes, 1983) y T. harzianum (De Vries y Wessels, 1973a; De Vries y Wessels, 1973b; Peberdy e Isaac, 1976; Peberdy, 1979).

En particular las cepas de T.harzianum han sido utilizadas en la elaboraci3n de extractos enzimáticos para la degradaci3n de paredes celulares de otros hongos. estos extractos utilizan como fuente de carbono quitina, laminarina, glucano, etc., que est3n presentes en las paredes celulares de los hongos, por ende estos compuestos inducen la producci3n de quitinasas, laminariasas,

glucanasas, etc., activas en las paredes celulares de hongos basidiomicetos (De Vries y Wessels, 1973a).

Las cepas de *T. viride* son utilizadas extensivamente para la producción industrial de extractos enzimáticos que degradan la pared celular de vegetales superiores, tal es el caso de Kinki Yakult Co. (Japón) y Calbiochem (USA). Muchas de estas preparaciones de enzimas comerciales contienen sustancias tóxicas, esto incluye ribonucleasas, proteasas, lipasas, y otras enzimas fénólicas y sales. Shenk y Hildebrand en 1969 purificaron celulasas comerciales para eliminar compuestos tóxicos en un intento para incrementar la producción y viabilidad de protoplastos vegetales (Evans y Bravo, 1983).

Para la producción de celulasas con *T. viride* QM9414 utilizan el medio de cultivo desarrollado por Mandels y Reese en 1957, el cual es suplementado con una sola fuente de carbono, como celulosa microcristalina (que por ende induce la producción de celulasas), además contiene $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y urea como fuente

nitrógeno: los minerales restantes son los típicamente establecidos en medios formulados para cultivos de hongos. La producción de celulasas es incrementada con la adición de peptona biotriptasa que sirve para acelerar el crecimiento del hongo y la producción de enzimas. El Tween 80 incrementa la permeabilidad de la membrana celular permitiendo la rápida secreción de la enzima al medio de cultivo.

En la acción del complejo celulolítico no participa una sola enzima sino un conjunto de aproximadamente 60 actividades enzimáticas (Montenecourt, 1985), que han demostrado estar sujetas a controles metabólicos de inducción, inhibición y represión por fuentes de carbono rápidamente metabolizables (Shaffeld e Illanes, 1983; Huitrón, 1983; Larios, 1983).

Adicionalmente las hemicelulasas también son necesarias para la recalcitración del tejido. Las pectinasas son utilizadas junto a las anteriores para aislar protoplastos, sin embargo cuando se utilizan solo pectinasas, estas son efectivas para la separación

de células de explantes de hoja y para aislar protoplastos de tejidos frutales (Evans y Bravo, 1983).

El rendimiento y viabilidad de los protoplastos depende de la fuente original (vegetal), la calidad de las enzimas utilizadas para degradar la pared, la estabilidad del plasmalema y las condiciones del cultivo. No existe un método estándar para el cultivo de protoplastos, cada tipo de tejido y cada línea celular posee problemas especiales que deberán ser solucionados mediante un ajuste empírico de las condiciones de aislamiento (Constabel, 1982).

Las técnicas de aislamiento de protoplastos utilizando extractos enzimáticos es de gran importancia en los laboratorios de investigación interesados en la obtención de protoplastos a partir de vegetales superiores, los cuales buscan obtener especies más eficientes en materia agrícola y farmacéutica.

Desde el punto de vista agrícola han sido las plantas

monocotiledóneas las mas estudiadas (estas presentan mayor grado de dificultad de regenerar plantas a partir de protoplastos) ya que en ellas se incluyen los cereales como el trigo, maíz, centeno, avena, etc. (Robert, 1981). Sin embargo las dicotiledóneas son ampliamente estudiadas en el aislamiento de protoplastos y regeneración de plantas completas como ejemplo: Kao y col. con Glicine max (frijol soya) en 1970; Gamburg y col. con Phaseolus vulgaris (frijol) en 1974; Gamburg y col. con Vicia hajastana (haba) en 1974. En especies forrajeras, la fusión de protoplastos en cultivo y la regeneración es reportada por Gresshoff en 1979 en Trifolium repens (trebol blanco). En lo que se refiere a Medicago sativa (alfalfa), Dos Santos y col. investigan la formación de embriones y órganos por fusión de protoplastos (Dos Santos, 1980).

El avance mas notorio en este campo es el realizado por el Dr. Melchers en 1978, que fusionó protoplastos de Lycopersicum esculentum (jitomate) con protoplastos de Solanum tuberosum (papa), la cual dió como resultado la planta llamada "jitopapa".

En esta área se pretende obtener híbridos somáticos, con un mayor índice de productividad, tolerancia a temperaturas adversas, a elevadas concentraciones de sal, resistencia a plagas, entre otras (Robert, 1981).

Para la industria farmacéutica, la importancia radica en la posibilidad de obtener plantas híbridas por fusión de protoplastos vegetales con capacidad para producir sustancias naturales de interés farmacéutico tales como: terpenoides, esteroides, alcaloides, etc., en niveles por arriba de los normalmente sintetizados (Robert, 1985).

Entre las familias que han sido más estudiadas para este fin está la familia Rubiaceae, que incluye al género Nicotiana del cual se han obtenido 11 híbridos intergenéricos en los cuales buscan obtener híbridos hiperproductores de nicotina (Robert, 1985). En la familia Solanaceae se incluyen las especies Atropa belladonna productora de atropina, Datura stramonium, Datura innoxia que producen atropina y escopolamina (Ruiz, 1979; Robert, 1985). En

la familia Apocináceae se incluye Catharanthus roseus que produce vinblastina y vincristina. los cuales son muy utilizados en tratamiento de quimioterapia (Lewis y Lewis, 1977; Loyola y Reyes, 1985).

Como síntesis el uso de protoplastos vegetales tienen las características siguientes:

-Los protoplastos naturalmente o por inducción pueden fusionarse, y por lo tanto es posible obtener híbridos somáticos .

-Presentan totipotencialidad, por lo cual es posible obtener de ellos plantas completas.

-Debido a sus características intrínsecas. los protoplastos son un excelente material de investigación en muchas áreas de biología vegetal (Barba, 1987).

MATERIALES Y METODOS

MEDIOS Y SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO

Medio Papa-Dextrosa-Agar (Medio comercial Merck)

Componentes	g/l
Infusión de papas	4.0
D(+)-Glucosa	20.0
Agar-Agar	15.0

En 200 ml. se disolvieron 7.89 g de PDA, se esterilizó en autoclave a 121 g C. por 15 min.

MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO "A" PARA T.viride GM9414 Y T. harzianum

CBS-354-33 (Sternberg, 1976).

Componentes	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4
KH ₂ PO ₄	2.0
Urea	0.3
CaCl ₂	0.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.005
MnSO ₄ .7H ₂ O	0.0016
ZnSO ₄ .H ₂ O	0.0014
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.002
Celulosa microcristalina	7.5
Peptona biotriptasa	0.75
Tween 80	400.0 ul.

El pH fue ajustado a 5.7 con NaOH 1.0M.

Este medio de cultivo fue desarrollado por Mandels y Reese para producción de celulasas con T. viride QM9414 (Sternberg, 1976) y adaptado en el laboratorio para T. harzianum CBS-354-33.

Todos los componentes del medio fueron disueltos en agua destilada y aforados a 1000 ml, excepto la celulosa microcristalina y la urea. La celulosa fue agregada por separado a cuatro matraces de 1000 ml., 1.87 g. a cada matraz, para luego agregar 250 ml. del medio y ajustar el pH en cada uno con un potenciómetro (Conductronic) a 5.7, para luego ser esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 min. La urea fue agregada por filtración estéril, con filtros de membrana Millipore de 0.45 μ m (esto se realizó en un área estéril).

MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO "B" PARA T. viride QM9414 Y T. harzianum

CBS-354-33.

Componentes	g/l
KH ₂ PO ₄	2.0
CaCl ₂	0.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.005
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0016
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0014
CoCl ₂ .7H ₂ O	0.002
Licor de maiz	4.2
Celulosa microcristalina	7.5
Peptona biotriptasa	0.75
Tween 80	400 ul.

El pH fue ajustado a 5.7 con NaOH 1.0 M.

Este medio fue modificado, del reportado por Sternberg en 1976, en el laboratorio para la producción de celulasas con I. viride QM9414 y I. harzianum CBS-354-33.

Los componentes del medio fueron disueltos en agua destilada (excepto la celulosa) y aforado a 1000 ml. La celulosa fue agregada a matraces de 1000 ml., 1.87 g en cada uno. Luego se agregaron 250 ml. del medio de cultivo líquido "A" (mencionado anteriormente). Se ajustó el pH en cada uno con un potenciómetro (Conductronic) a 5.7 y esterilizados en autoclave a 121 oC. por 15 min.

MEDIO DE CULTIVO MURASHINGE Y SKOOG OSMOTICO (BARBA, 1987)

Componentes	g/l
NH ₄ NO ₃	1.65
KNO ₃	1.90
CaCl ₂	0.44
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.37
KH ₂ PO ₄	0.17
KI	0.00083
H ₃ BO ₃	0.0062
MnSO ₄ .H ₂ O	0.022
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0086
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.00025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00002
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.00002
EDTA sal disódica	0.043
Inositol	0.100
Ac. nicotínico	0.0005

Piridoxina.HCl	0.0005
Tiamina.HCl	0.0001
ANA	0.0003
KIN	0.0001
Sacarosa	30.0
Agar	20.0(en cultivo sólido)
Sorbitol	130.0

El pH fue ajustado a 5.7 con NaOH 1.0 M.

Todos los componentes del medio fueron disueltos en 500 ml. de agua destilada (excepto el agar). 250 ml. se separaron en un matraz. a los 250 ml. restantes se les agregó agar. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

El medio líquido es utilizado para la purificación de protoplastos, pues sirve como un estabilizador osmótico, por la presencia de sorbitol.

SOLUCIONES

SOLUCION DNS (Miller, 1959)

Componentes	g/l
NaOH	10.0
DNS	10.0
Tartrato de Na y K	200.0
Fenol	2.0
Metabisulfito de Na	0.5

En un determinado volúmen de agua destilada se adicionaron cada uno de los reactivos lentamente en el orden como se encuentran anteriormente. Ya completamente disueltos se aforó a 1000 ml. Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

AMORTIGUADOR DE CITRATOS 0.05 M

Citrato de Sodio	7.35 g/350 ml.
Ac. Cítrico	2.06 g/250 ml.

Se aforó el citrato de sodio a 350 ml., y con el ácido cítrico se llevó a un pH de 5.0.

Se guardó en refrigeración a 4 °C.

SOLUCION BSA (Scopps, 1982)

Suero de albúmina de bovino	5.0 mg.
Agua destilada	5.0 ml.

Los 5 mg de BSA se disolvieron en los 5 ml. de agua. el espectrofotómetro se llevó a cero con un blanco con agua a 280 nm. la solución de BSA fue leída tomando la densidad óptica como

lectura A, después se hizo la siguiente ecuación:

$$\frac{A}{6.7} \times 10 = \text{peso real del BSA mg/ml.}$$

SOLUCION DE GLUCOSA

Glucosa anhidra	20 mg.
Agua destilada	20 ml.

La glucosa anhidra se agregó a un matraz volumétrico de 20 ml., el cual se aforó con agua destilada para dar una concentración final de 1mg/ml.

SOLUCION BRADFORD (Bradford, 1976)

Azul brillante	100 mg.
Etanol al 95%	50 ml.
Ac. Fosfórico 85%	100 ml.
Agua destilada a	1000 ml.

El Azul brillante y el etanol se mezclaron hasta disolverse bien en un matraz siendo almacenado en oscuridad total todo un día.

Al día siguiente se agregó el ac. fosfórico y se filtró en membrana Millipore de 0.45 um aforando a 1000 ml.

Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

SOLUCION DE ETANOL

Etanol industrial	70 ml.
Agua destilada	30 ml.

SOLUCION DE HIPOCLORITO DE Na

Hipoclorito de Sodio (clorox, marca comercial)	50 ml.
Agua destilada	50 ml.
Detergente (Tween 80)	2 gotas

SOLUCION ENZIMATICA

Extractos enzimáticos	100 g/l
Sorbitol	130 g/l
Amortiguador de fosfatos	2 ml.
Agua destilada	8 ml.

Se ajustó a pH 5.8 con KOH 0.2 N.

El extracto enzimático se diluyó en el amortiguador de fosfatos, después se le adicionó el sorbitol disuelto en agua destilada y se ajustó el pH. Posteriormente se filtró en membrana Millipore

0.45 μ m. Se filtró en un área estéril (campana de flujo laminar y mechero) y se pasó a una placa Petri de vidrio también estéril.

SOLUCION FDA (Larkin, 1976)

Diacetato de fluoresceína	5 mg.
Acetona	1 ml.

La solución stock se almacenó en refrigeración a 4 oC en completa obscuridad.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.1 M

Componentes	g/l
K ₂ HPO ₄	10.74
KH ₂ PO ₄	10.36

El pH se ajustó a 5.7 con Ac. Cítrico.

MATERIAL BIOLÓGICO

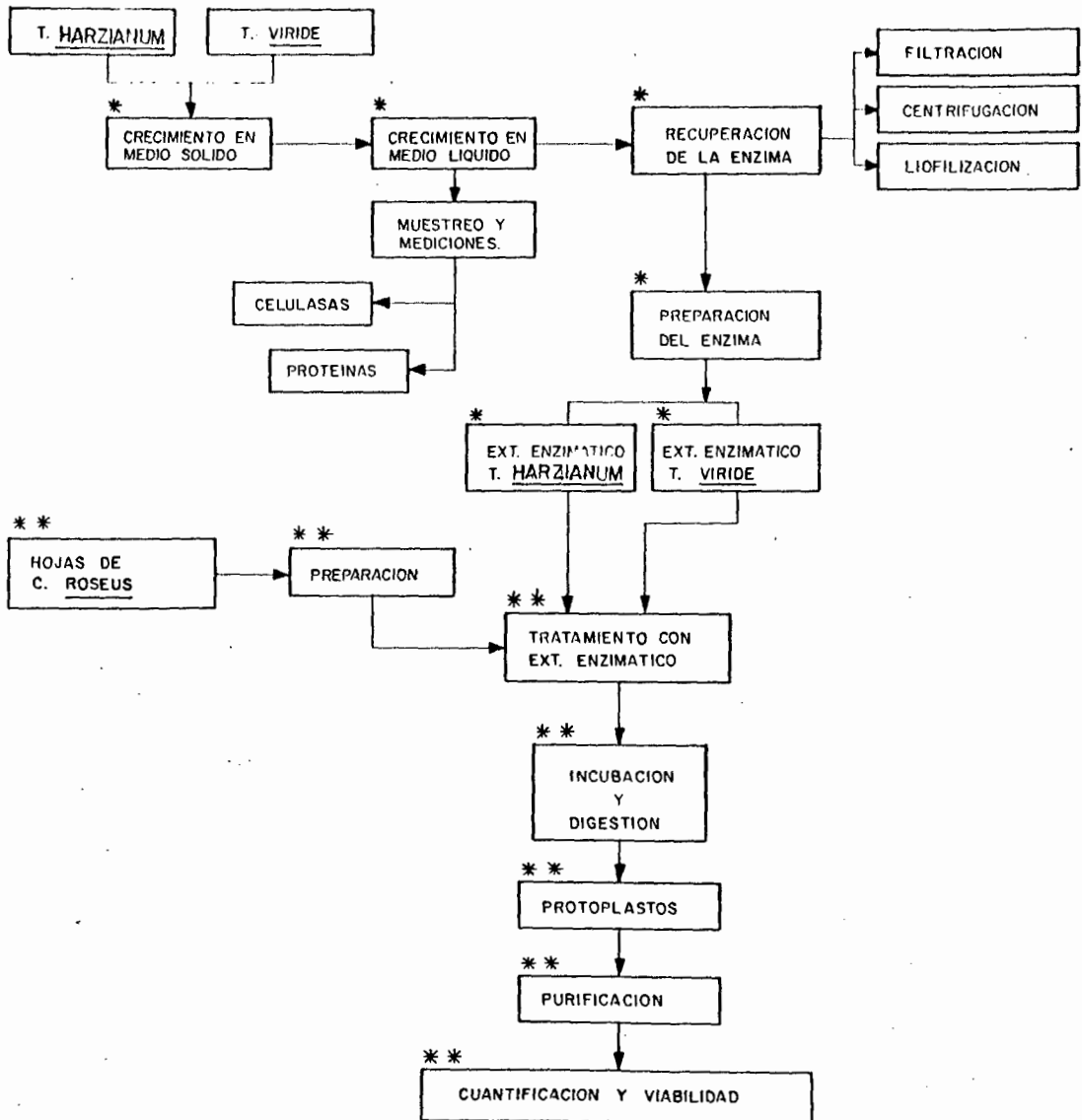
-Cepa de Trichoderma viride QM9414. obtenida del Instituto de Madera Celulosa y Papel de la Universidad de Guadalajara.

-Cepa de Trichoderma harzianum CBS-354-33. donada por el Dr. J. Peberdy de la Universidad de Nottingham, Inglaterra.

-Plantas jóvenes de Catharanthus roseus. cultivadas en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. A.C. (CIATEJ).

METODOLOGIA

A CONTINUACION SE PRESENTA UN DIAGRAMA GENERAL SOBRE LA METODOLOGIA PLANEADA PARA ESTE TRABAJO. LA DESCRIPCION SE HA DIVIDIDO EN DOS PARTES: * LA OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO Y ** LA PRODUCCION DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE CATHARANTHUS ROSEUS



UNA DESCRIPCION MAS DETALLADA POR ETAPA SE DA A CONTINUACION:

METODOLOGIA

OBTENCION DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS A PARTIR DE LAS CEPAS DE Trichoderma viride QM9414 Y Trichoderma harzianum CBS-354-33.

Crecimiento de las cepas en medio sólido

Conociendo la fisiología y esporulación de los hongos filamentosos altamente celulolíticos como T. viride QM9414 y T. harzianum CBS-354-33, fueron propagados y mantenidos en placas con medio nutritivo papa-dextrosa-agar (PDA) (ver sección de medios de cultivo) durante 8-10 días; los primeros dos días se incubaron a 27 °C en estufa de incubación (Marca Precision) y el resto a temperatura ambiente hasta su esporulación.

Obtención de los extractos enzimáticos de Trichoderma viride QM9414 y Trichoderma harzianum CBS-354-33 en medio de cultivo "A".

El medio de cultivo líquido "A" se refiere al medio desarrollado para producción de celulasas con T. viride QM9414 por Mandels y Reese en 1957 (Sternberg, 1976). Para T. harzianum CBS-354-33 es reportado un medio de cultivo para extractos enzimáticos para degradar paredes de hongos (Peberdy e Isaac, 1976), por lo anterior se decidió utilizar esta cepa en el medio desarrollado por Mandels y Reese (ver sección de medios de cultivo).

El medio de cultivo fue preparado y esterilizado en matraces de 1000ml., con 250 ml. de medio "A" en autoclave a 121 oC por 15 min.

Posteriormente las esporas fueron "raspadas" de las placas de PDA con cepas de T. viride y T. harzianum (cada cepa en diferentes matraces), y resuspendidas cada placa a 20 ml de una solución de

Tween 20 al 0.01%. Los matraces fueron inoculados con 10 ml. de suspensión de esporas a temperatura ambiente, en una área estéril. Dichos matraces fueron incubados en agitador orbital (New Brunswick, Mod. G-25) por 120 horas a 28 oC a 180 rpm, y monitoreando la cinética de incubación cada 24 horas (Fig. No. 1).

Otención de los extractos enzimáticos de Trichoderma viride QM9414 y Trichoderma harzianum CBS-354-33 en medio de cultivo "B".

El medio desarrollado por Mandels y Reese en 1957 llamado anteriormente medio "A", fue modificado en el laboratorio sustituyendo la fuente de nitrógeno ((NH₄)₂SO₄ y Urea) por un sustrato usado como fuente de nitrógeno en muchos procesos a gran escala, como el licor de maíz, que es eficientemente metabolizable. es formado durante la producción de almidón de maíz. El extracto concentrado contiene numerosos aminoácidos,

tales, como alanina, arginina, ac. glutámico, isoleucina, treonina, valina, fenilalanina, metionina y cisteína (Crueger y Crueger, 1984), además es utilizado como estabilizador del pH durante la incubación. Este medio fue llamado medio de cultivo "B" (ver medios de cultivo).

El medio de cultivo "B" fue preparado con los mismos componentes del medio "A", excepto el $(NH_4)_2SO_4$ y Urea, substituidos con licor de maíz, siendo la celulosa microcristalina la única fuente de carbono. Así mismo la esterilización, inoculación e incubación fue igual como se menciona para el medio "A". De igual forma, en este medio se utilizaron cepas de Trichoderma viride GM9414 y Trichoderma harzianum CBS-354-33. Los muestreos se llevaron a cabo cada 24 horas para monitorear la cinética de incubación (Fig. No. 1).

Muestras

Las primeras muestras fueron tomadas a las 24 h. de incubación, de cada matraz fueron tomados de 2 a 4 ml. de medio de cultivo, en tubos de 10X100 mm. en un área estéril, los tubos fueron sellados con plástico autoadherible y posteriormente congelados a -20°C.

El mismo procedimiento se realizó cada 24 h. hasta el término de la incubación (120 h.), para que posteriormente se efectuaran las determinaciones de pH, actividad celulolítica y concentración de proteínas (Fig. No. 1).

Determinación de pH.

Las muestras fueron descongeladas y llevadas a temperatura ambiente, el pH fue determinado en el mismo tubo que contenía la muestra mediante un potenciómetro (Conductronic) ajustado previamente con una solución de pH 4. Posteriormente los tubos fueron colocados sobre hielo para continuar con las determinaciones siguientes (Figs. No. 1 y 2).

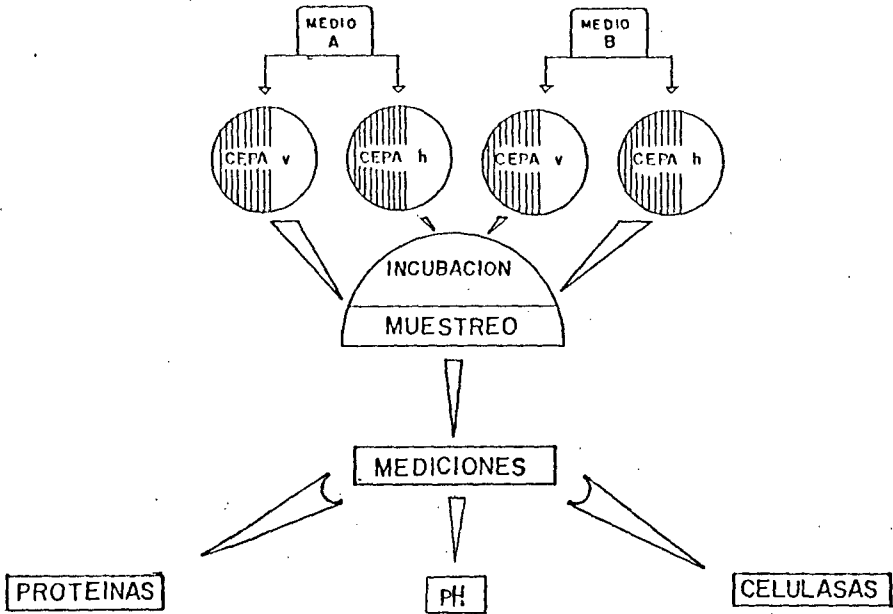


FIG. NO. 1.- DIAGRAMA GENERAL DE INCUBACIÓN, MUESTREOS Y MEDICIONES DE LAS CEPAS TRICHODERMA VIRIDE QMS414 Y TRICHODERMA HARZIA NUM. CBS-354-33 EN MEDIOS DE CULTIVO "A" Y "B".

Determinación de actividad celulolítica.

El método de actividad celulolítica del papel filtro fue desarrollado por M. Mandels (Mandels, 1976) para cuantificar la actividad que tienen las celulasas para hidrolizar el papel filtro, esta actividad es reportada por miligramos de azúcares reductores por mililitro en una hora de reacción (Fig. No. 2).

De las muestras que fueron colectadas cada 24 h. durante la incubación y siguiendo la secuencia de la Fig. No. 2 fue llevado a cabo el método de actividad celulolítica para todas las muestras.

Las muestras contenidas en los tubos de 10X100 mm. fueron filtradas a través de una tela de manta de cielo para eliminar el micelio. Del filtrado se tomaron 0.5 ml. de muestra y 1 ml. de amortiguador de citratos 0.05 M con pH 5 (ver sección de soluciones) en tubos de 25X150 mm. se agregó una tira de papel filtro (Whatman No. 1) 1X6 cm. arrollado dentro de la solución.

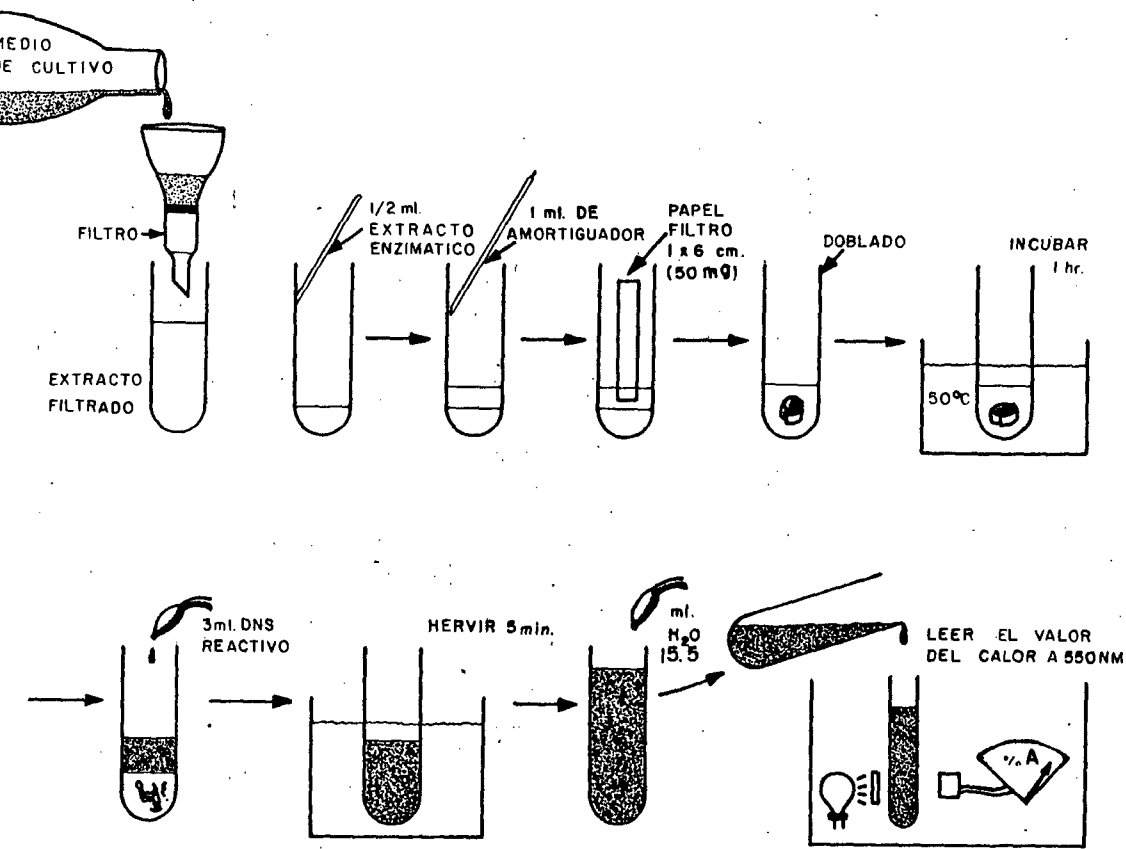


FIG. 2 METODO DE DETERMINACION DE ACTIVIDAD CELULOLITICA. (MENDELS, REESE 1976).

se incubó por una hora a 50 °C. Al término de este tiempo se le agregaron 3 ml. del reactivo DNS (ver sección de soluciones) para detener la reacción. Los tubos fueron puestos en un baño de agua a punto de ebullición durante 5 min., después se agregaron 15.5 ml. de agua destilada aforando a 20 ml., se mezcló en un vortex (FISHERBRAND). Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro (LKB modelo ULTROSPEC II) a 550 nm determinando el total de azúcares reductores como glucosa; se empleó un blanco para ajustar el equipo a D.O. 550nm igual a 0.0 (Fig. No. 2) (Mandels, 1976).

Para cuantificar los azúcares reductores producidos en una hora de reacción, se utilizó una curva estándar de glucosa anhidra a una concentración de 1 mg/ml que se preparó de la siguiente manera:

No. tubo	Sol. Glucosa ml	Agua ml	DNS ml	Aforo a 20.0 ml
0(Bco)	0.0	1.5	3.0	15.5
1	0.2	1.3	3.0	15.5
2	0.4	1.1	3.0	15.5
3	0.6	0.9	3.0	15.5
4	0.8	0.7	3.0	15.5
5	1.0	0.5	3.0	15.5

Antes de aforar a 20 ml. con agua las muestras se pasaron por un baño de agua a punto de ebullición durante 5 min.

La lectura se tomó por espectrofotometría a 550 nm y se graficó D.O. vs concentración. para obtener una curva estándar de glucosa y tomarla de patrón para determinar actividad celulolítica (como azúcares reductores producidos por la celulosa hidrolizada por la acción de las celulasas en una hora de reacción) en los extractos enzimáticos.

Determinación de concentración de proteínas

Las proteínas fueron determinadas por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando suero de albúmina bovino como estándar (ver sección de soluciones). La curva estándar fue preparada con solución BSA a 1mg/ml. en tubos de 10X100 mm se agregaron 10, 20 y 30 ul de solución BSA en cada tubo. posteriormente se adicionaron 3 ml de solución Bradford y se tomó la lectura en un espectrofotómetro (ULTROSPEC II, LKB) a 595 nm.

La curva se elaboró graficando *densidad óptica vs concentración*. Las muestras se prepararon tomando como referencia la curva. Se tomaron 100 ul de cada muestra en tubos de 10X100 mm y 3 ml de solución Bradford, se agitaron suavemente y fueron leídas en un espectrofotómetro (ULTROSPEC II, LKB) a 595 nm. La densidad óptica de las muestras fue comparada con la curva estándar, para así determinar la concentración de proteína en mg/ml de los extractos enzimáticos.

Recuperación del extracto enzimático

Filtración

Los matraces fueron descongelados hasta temperatura ambiente, inmediatamente después de ser descongelados, se filtraron en tela de algodón de cielo para descartar el micelio y el filtrado se mantuvo en hielo para evitar la desnaturalización de la enzima.

Centrifugación

Posteriormente el extracto se centrifugó (centrifuga Sorvall RC5C) a 10,000 rpm en un rotor de ángulo fijo Sorvall SS-34, durante 15 min a 0 °C. El sobrenadante se recuperó en botellas de 1000 ml, con 100 ml de extracto. estas botellas se mantuvieron sobre hielo.

Congelación y Liofilización

Las botellas con 100 ml de extracto se congelaron con una mezcla criogénica de bióxido de carbono (CO₂) y acetona en un recipiente de aluminio. Los 100 ml de extracto se congelaron en las paredes de las botellas por un continuo movimiento giratorio de las botellas en el recipiente con la mezcla criogénica. Las botellas con el extracto ya congelado en las paredes fueron destapadas para ser liofilizadas por 48-72 h a -50 oC (se utilizó un liofilizador marca LABCONCO, modelo 75040).

Almacenamiento

Los extractos ya liofilizados (cada uno por separado) se almacenaron a -20 oC hasta que se utilizó para el aislamiento de protoplastos de Catharanthus roseus.

AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE HOJAS DE Catharantus roseus POR EL METODO ENZIMATICO.

El aislamiento de protoplastos de Catharantus roseus se obtuvo mediante la acción de los extractos enzimáticos de Trichoderma viride QM9414 y Trichoderma harzianum CBS-354-33 mencionados anteriormente.

Desinfección de las hojas de Catharantus roseus

El material vegetal se desinfectó superficialmente antes de iniciar su tratamiento in vitro, y todo el manejo del tejido se hizo en condiciones asépticas en áreas específicas para este propósito (campana de flujo laminar VECO y mecheros Bunsen), así como todos los medios de cultivo, instrumentos, y recipientes de cultivo fueron esterilizados por autoclave 15 min a 121 °C. Las hojas de C. roseus completamente expandidas se desinfectaron primero en etanol al 70% (v/v) por 2 min por lo cual se eliminaron grasas de las hojas lo que permitió una mejor

penetración del agente desinfectante que fue el hipoclorito de sodio (clorox, marca comercial) al 50% (v/v) con una gota de detergente (Tween 80) en el cual las hojas se mantuvieron por 15 min. Al término de este tiempo las hojas se enjuagaron con agua destilada estéril (Barba, 1987) Fig. No. 3.

Tratamiento e incubación de las hojas de Catharanthus roseus

La epidermis inferior de las hojas fueron separadas con sumo cuidado y las hojas se cortaron en segmentos de 2 a 5 mm transversales a la hoja. A continuación las pequeñas piezas de tejido se colocaron en contacto con una placa de Petri estéril de vidrio que contenía la siguiente mezcla:

Extracto enzimático	1.0 g
Amortiguador de Fosfatos	2.0 ml
Sorbitol (130.0 g/l p/v)	8.0 ml

Se ajustó el pH con KOH 0.2 N, se adicionaron 50 ul de ampicilina (8.0 mg/ml).

El extracto enzimático disuelto en 2.0 ml de amortiguador de fosfatos con pH 5.7 y en 8.0 ml de sorbitol, fue previamente esterilizado por filtración en membrana Millipore de 0.45 um, las placas fueron selladas con plástico autoadherible y mantenidas en completa oscuridad e incubados durante 16 hrs en un incubador orbital (New Brunswick, Scientific Co.) a 50 rpm, a 25 oC (Constabel, 1982) Fig No. 3.

Purificación de protoplastos de Catharanthus roseus

Después del período de incubación, los segmentos de hoja se agitaron muy suavemente para liberar todos los protoplastos; la suspensión fue filtrada a través de una malla (Tela de manta de cielo doble) para separar los fragmentos o remanentes de hoja. El filtrado se transfirió a tubos cónicos de polipropileno y se

centrifugaron a 85 x g por 5 min en una centrifuga INTERNATIONAL. (mod HN-SII). El sobrenadante se removió cuidadosamente con pipeta Pasteur y se eliminó.

Los protoplastos se resuspendieron en el medio de cultivo osmótico MS líquido (ver sección de medios de cultivo) con sorbitol. el proceso de centrifugación se repitió por tres veces. Al cabo de la centrifugación se eliminó el sobrenadante y los protoplastos se concentraron en el fondo del tubo y se resuspendieron en un mililitro de medio de cultivo MS con sorbitol (Barba, 1987) Fig. No. 3.

Quantificación de protoplastos de Catharanthus roseus

La densidad de protoplastos se determinó con un microscopio American Optical y una cámara Neubauer de 1 mm³ de volumen.

La densidad de protoplastos requerida para la siembra es de 10 E4

protoplastos por mililitro, pudiéndose ajustar esta densidad añadiendo medio osmótico MS con sorbitol.

Viabilidad de protoplastos de Catharanthus roseus

La viabilidad se determinó tiñendo los protoplastos con diacetato de fluoresceína (FDA) esta fue preparada en una solución stock (ver sección de soluciones), una gota de esta fue añadida a 10 ml de medio osmótico, a continuación se le agregaron 0.5 ml de suspensión de protoplastos, después de 5 min a temperatura ambiente los protoplastos fueron examinados con un microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss) con luz ultravioleta.

Siembra de protoplastos de Catharanthus roseus

Todos los medios de cultivo protoplasmáticos son variaciones de los medios minerales de Murashige y Skoog (Barba, 1987) ya que

requieren altas concentraciones de iones calcio y azúcares alcohólicos como estabilizadores para evitar la lisis osmótica.

Por lo tanto se sembraron tomando alícuotas de protoplastos suspendidos en medio osmótico líquido y se colocaron en una placa Petri; se mezclaron cuidadosamente con un volumen del mismo medio osmótico, con 2.0% de agar a 40 oC sin haberse gelificado.

A continuación, se selló la placa con plástico autoadherible y se colocaron en una cámara de cultivo a 26 oC y con un fotoperíodo de 16 hrs luz (luz fluorescente) y 8 hrs oscuridad para su regeneración (Dodds and Roberts, 1982).

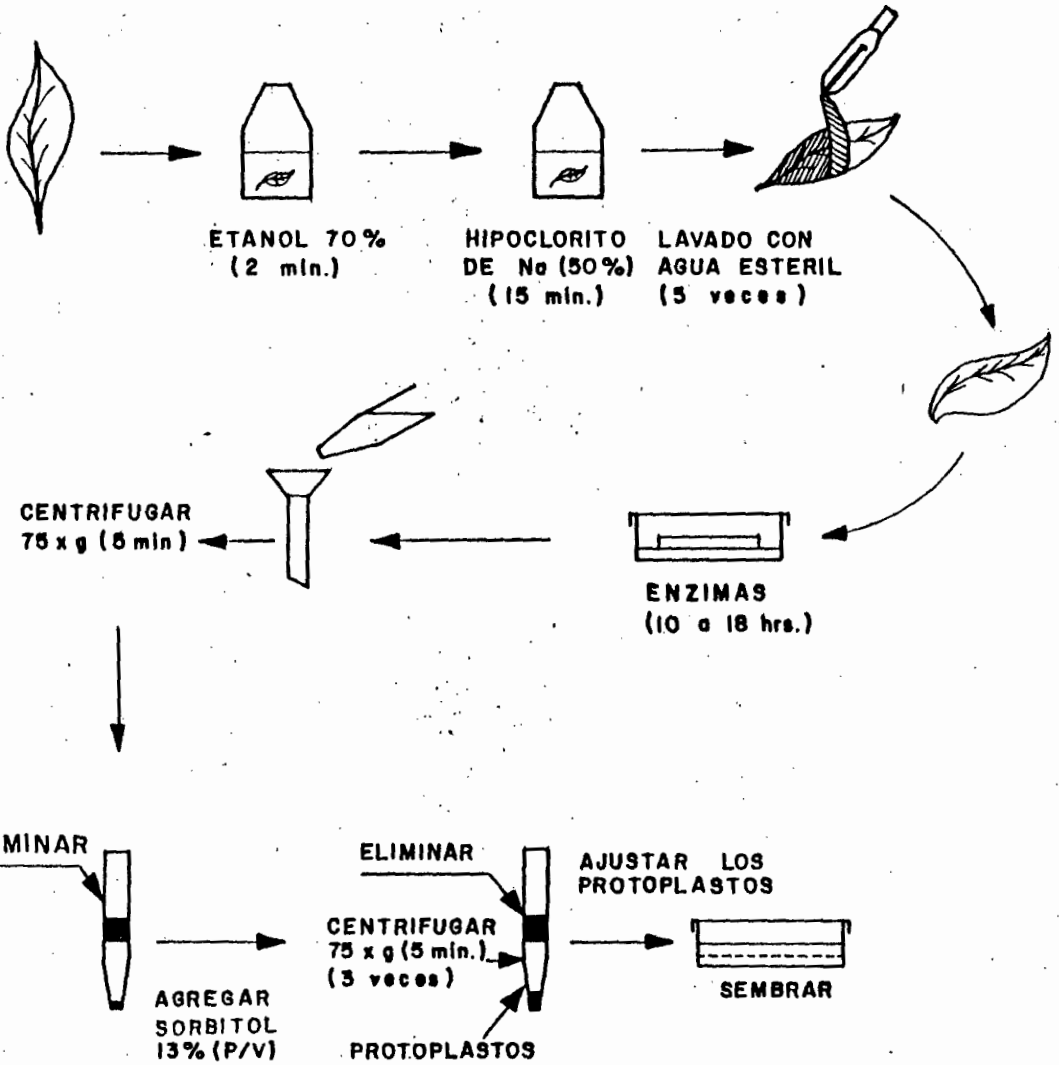


FIG. 3.- METODO ENZIMATICO DE AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS

RESULTADOS

Obtención del extracto enzimático a partir de Trichoderma viride QM9414 en medio "A".

Como se observa en la Figura No. 4, las primeras 24h se caracterizan por un incremento en la actividad celulolítica siendo esta de 0.52 mg/ml/h, mientras la concentración de proteínas es mínima, 0.07 mg/ml. El pH del cultivo subió de 5.7 a 6.4 en 24h (Fig. No. 8). De las 24h a las 48h la actividad celulolítica aumentó llegando a 0.60 mg/ml/h. y la concentración de proteínas se mantuvo en un nivel bajo, 0.88 mg/ml (Tabla No. 4).

A las 48h el pH del medio de cultivo alcanzó su nivel mas alto, 6.6. La actividad celulolítica a las 72h se incrementó a mas del doble, 1.94 mg/ml/h. A partir de las 72h el pH comenzó a

FIG. NO. 4.- DETERMINACION DE ACTIVIDAD CELULOLITICA Y CONCENTRACION DE PROTEINAS DE LA CEPA TRICHODERMA VIRIDE QMS414 EN MEDIO DE CULTIVO "A".

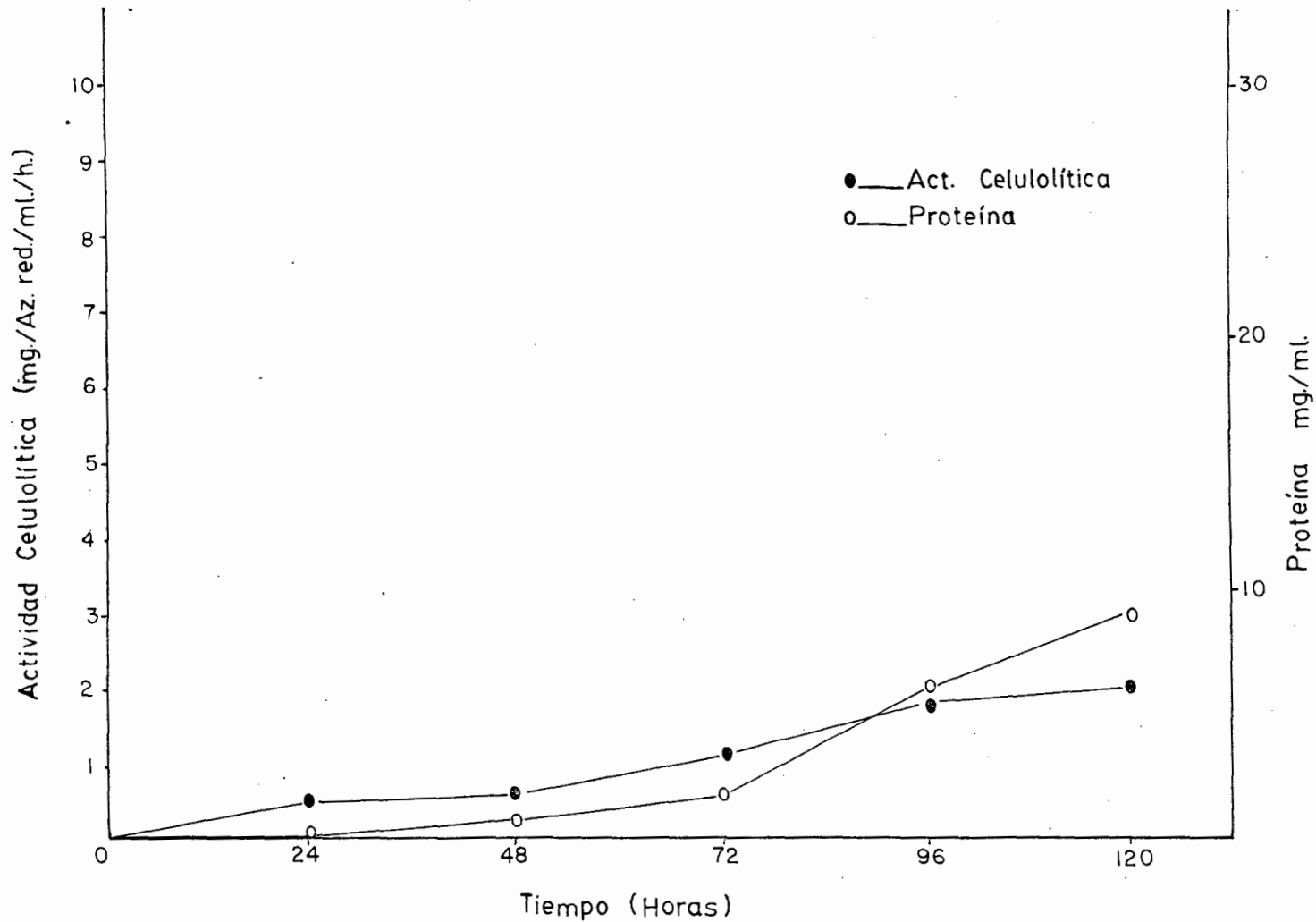


Tabla No. 4

TIEMPO (Hrs)	ACTIVIDAD CELULOLITICA (mg/ml/h)	CONC. PROTEINAS (mg/ml)
24	0.52	0.07
48	0.60	0.88
72	1.10	1.94
96	1.83	6.11
120	1.96	9.32

Determinación de Actividad Celulolítica y
 Concentración de Proteínas de Trichoderma
viride QM9414 en Medio A.

descender hasta 4.9. La actividad celulolítica llegó a un nivel de 1.83 mg/ml/h a las 96h de cultivo, la concentración de proteínas aumentó considerablemente hasta 6.11 mg/ml al mismo tiempo, mientras que el pH llegó a su nivel mas bajo 3.6 (Fig. No. 8). Al final del cultivo, 120h la actividad celulolítica llegó a 1.96 mg/ml/h y la concentración de proteínas a 9.32 mg/ml, el pH final del cultivo subió un poco llegando a 3.9 (Fig. No.8). Tal como se observa en la Figura No. 4 tanto la actividad celulolítica como la concentración de proteínas no llegó a su nivel máximo ya que ambas curvas siguen en ascenso.

Obtención del extracto enzimático a partir de Trichoderma harzianum CBS-354-33 en medio "A".

La cepa de T. harzianum CBS-354-33 fue cultivada en el medio desarrollado para T. viride QM9414 como se mencionó en Materiales y Métodos. Esta cepa presentó una actividad celulolítica de 0.36 mg/ml/h a las 24h, mientras la concentración de proteínas fue de

4.9 mg/ml en las mismas horas. El pH se incrementó de 5.7 a 6.2 (Tabla No. 8). A las 48h la actividad celulolítica se incrementó de 0.36 a 3.36 mg/ml/h, mientras la concentración de proteínas llegó a 6.1 mg/ml (Tabla No. 5). El pH aumentó un poco de 6.2 a 6.3 a las 48h (Fig. No. 8). La actividad celulolítica casi se duplicó a las 72h, llegando a 6.8 mg/ml/h, la concentración de proteínas aumentó hasta 6.7 mg/ml a las 72h de cultivo (Fig. No. 5). Mientras tanto el pH bajó drásticamente hasta 3.4 (Fig. No. 8).

La actividad celulolítica a las 96h llegó a 7.8 mg/ml y la concentración de proteínas aumentó considerablemente hasta 21.5 mg/ml. El pH continuó descendiendo hasta 2.9 (Fig. No. 8).

Al finalizar el cultivo (120h) la actividad celulolítica llegó a un nivel de 8.96 mg/ml/h, al igual que la concentración de proteínas, cuyo valor fue de 23.1 mg/ml. El pH presentó su nivel mínimo, 2.8 al finalizar el cultivo (120h), como se observa en la Figura No. 8. La actividad celulolítica y la concentración de

FIG. No. 5.- DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA CEPA TRICODERMA HARZIANUM CBS-354-33 EN MEDIO DE CULTIVO "A".

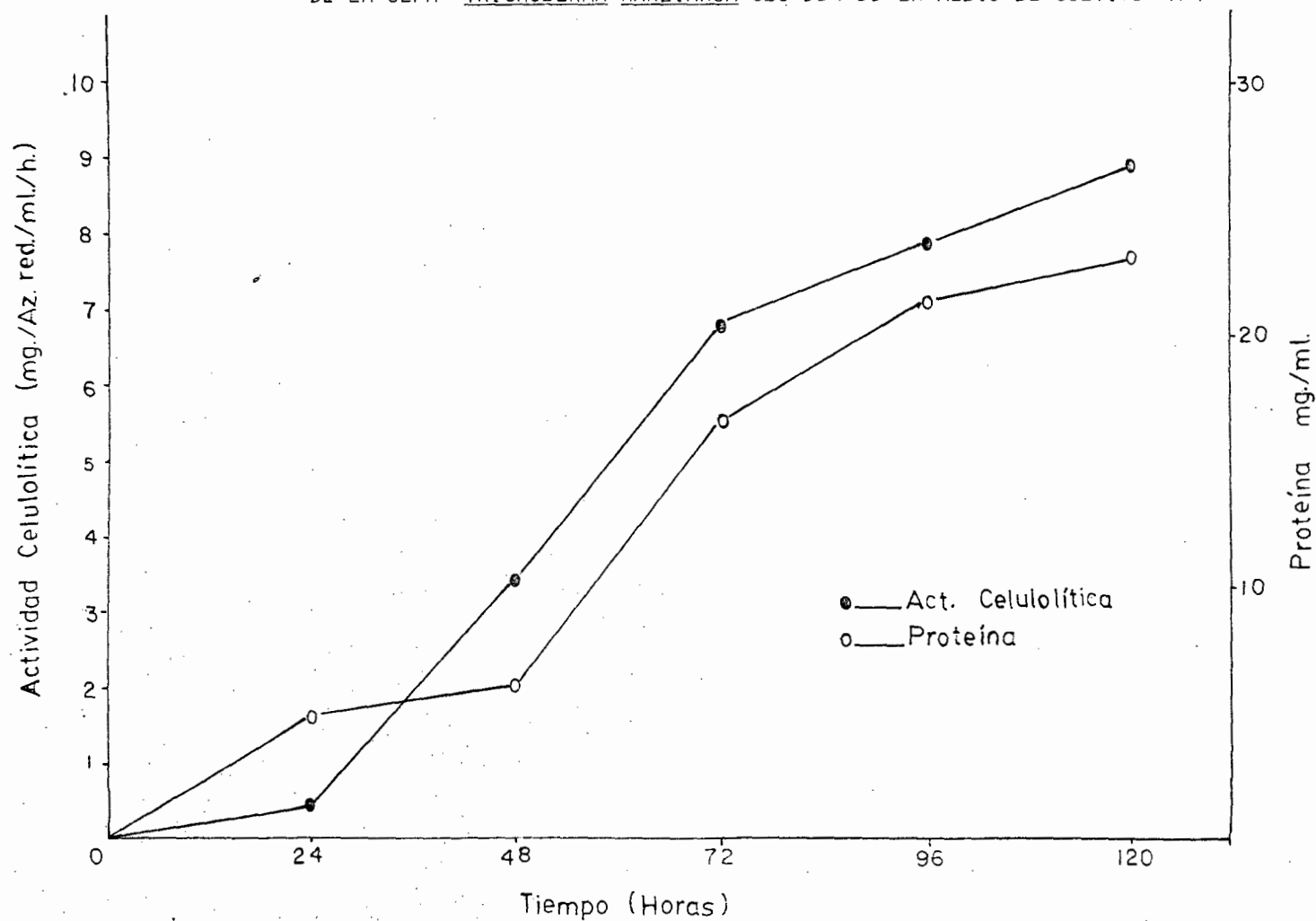


Tabla No. 5

TIEMPO (Hrs)	ACTIVIDAD CELULOLITICA (mg/ml/h)	CONC. PROTEINAS (mg/ml)
24	0.36	4.90
48	3.36	6.10
72	6.80	16.70
96	7.80	21.50
120	8.96	23.10

Determinación de Actividad Celulolítica y
 Concentración de Proteínas de Trichoderma
harzianum CBS-354-3 en Medio A.

proteínas no alcanzaron su nivel máximo a las 120h, como se observa en la Figura No. 5.

Obtención del extracto enzimático a partir de Trichoderma viride QM9414 en medio "B".

La Figura y Tabla No. 6 muestran que en las primeras 24h de cultivo la actividad celulolítica fue de 0.73 mg/ml/h, mientras que la concentración de proteínas llegó a un nivel de 3.36 mg/ml. El pH en el cultivo subió a 6.3 a las 24 h (Fig. No. 8). A las 48h de cultivo la actividad celulolítica aumentó hasta 1.82 mg/ml/h, a su vez la concentración de proteínas tuvo un incremento considerable de 13.46 mg/ml a las mismas horas (Fig. No. 6), mientras tanto el pH descendía un poco a 6.1.

La actividad celulolítica aumentó muy poco a las 72h llegando a 1.85 mg/ml/h. en este mismo período de cultivo la concentración de proteínas se mantuvo en 13.46 mg/ml como se observa en la

Tabla No. 6. Mientras que el pH volvió a subir a 6.3 a las 72h, la actividad celulolítica llegó a un nivel de 2.80 mg/ml/h a las 96h de cultivo, la concentración de proteínas llegó a 17.27 mg/ml al mismo tiempo, mientras el pH ascendía de 6.3 a 6.4. Cuando finalizó el cultivo (120h), la actividad celulolítica descendió a 2.40 mg/ml/h y la concentración de proteínas también descendió hasta 14.60 mg/ml, el pH final del cultivo subió un poco más llegando a 6.5 (Fig. No 8).

Obtención del extracto enzimático a partir de Trichoderma harzianum CBS-354-33 en el medio "B".

El cultivo de T. harzianum CBS-354-33 en el medio modificado, que se describe en Medios de cultivo, muestra un notable incremento de actividad celulolítica y concentración de proteínas a las primeras 24h, 1.68 mg/ml/h y 11.32 mg/ml respectivamente, como se observa en la Tabla y Figura No. 7. A las 48h la actividad celulolítica continuó incrementándose considerablemente hasta

DE LA CEPA TRICODERMA VIRIDE Q11S414 EN MEDIO DE CULTIVO "B".

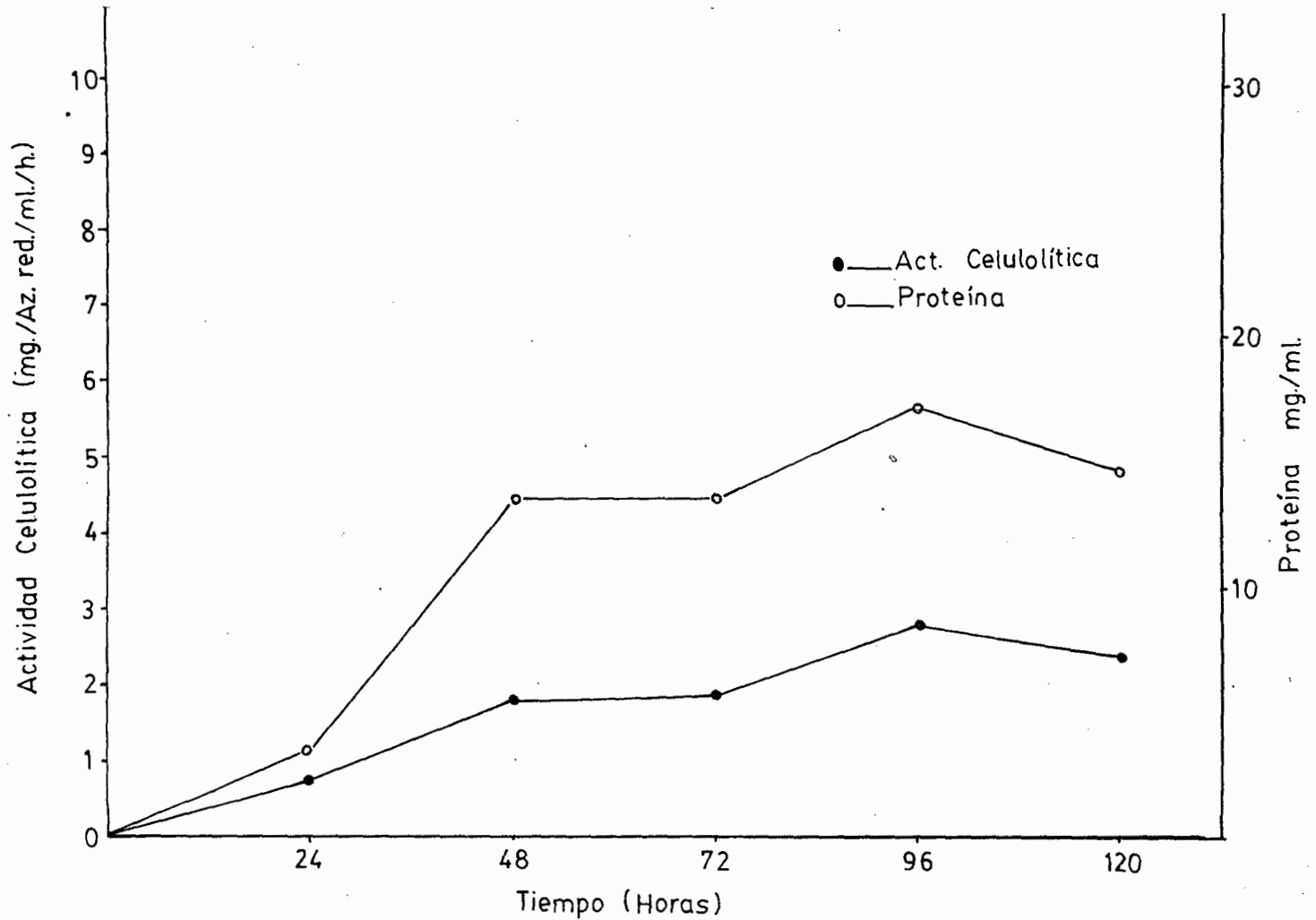


Tabla No. 6

TIEMPO (Hrs)	ACTIVIDAD CELULOLITICA (mg/ml/h)	CONC. PROTEINAS (mg/ml)
24	0.73	3.36
48	1.82	13.46
72	1.85	13.46
96	2.80	17.27
120	2.40	14.60

Determinación de Actividad Celulolítica y
 Concentración de Proteínas de Trichoderma
viride QM9414 en Medio B.

FIG. No. 7.- DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA CEPA TRICHODERMA HARZIANUM CBS-354-33 EN MEDIO DE CULTIVO "B".

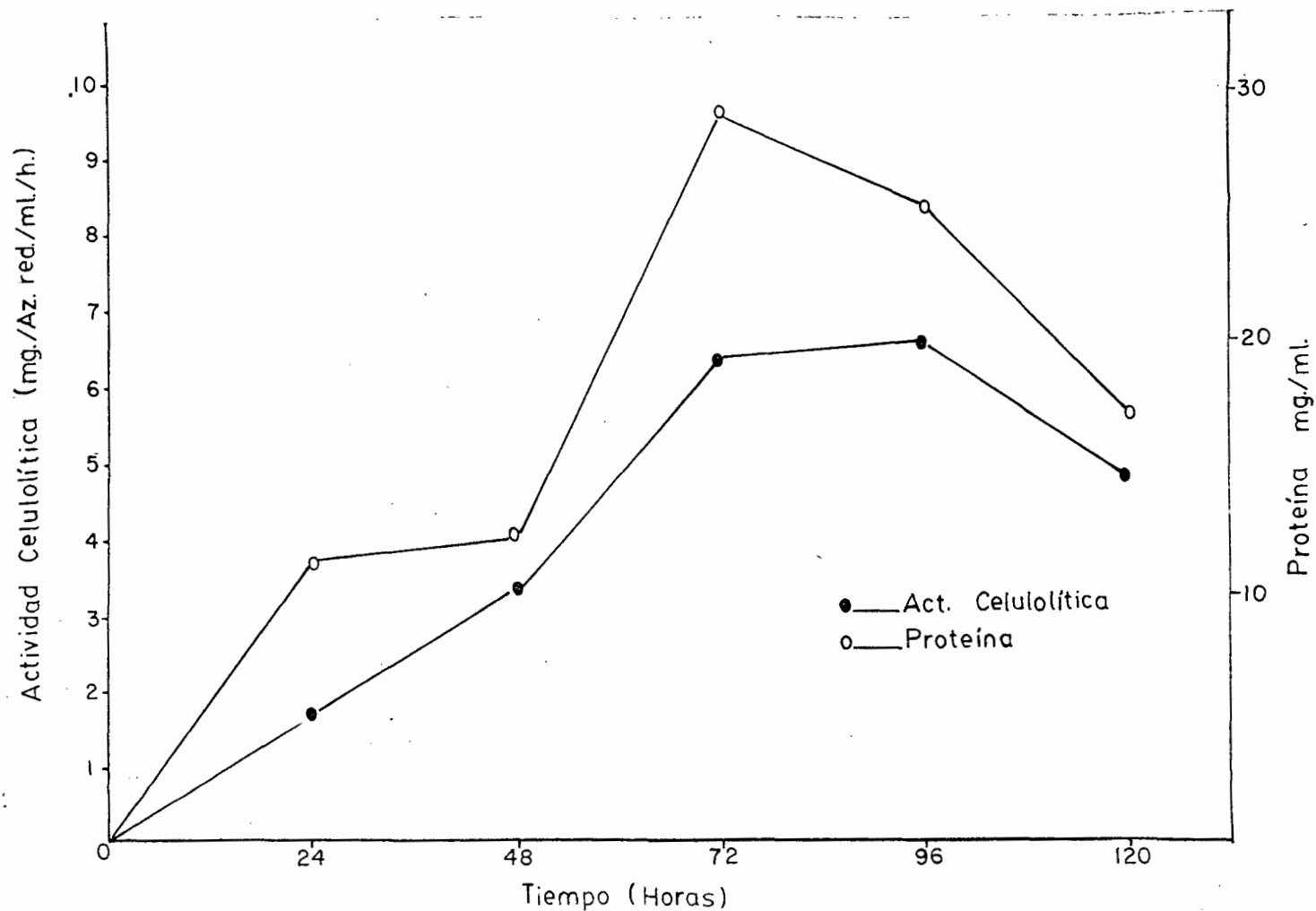


Tabla No. 7

TIEMPO (Hrs)	ACTIVIDAD CELULOLITICA (mg/ml/h)	CONC. PROTEINAS (mg/ml)
24	1.68	11.32
48	3.36	12.13
72	6.42	28.84
96	6.61	25.46
120	4.96	17.14

Determinación de Actividad Celulolítica y
 Concentración de Proteínas de Trichoderma
harzianum CBS-354-3 en Medio B.

3.36 mg/ml/h. mientras la concentración de proteínas tuvo un ligero incremento de 11.32 mg/ml a 12.13 mg/ml como se observa en la Tabla No. 7, por lo tanto el pH durante las primeras 24h subió de 5.7 hasta 6.6 y descendiendo a 6.3 a las 48h (Fig. No. 8). En la Figura No. 7 se muestra que a las 72h la actividad celulolítica se incrementó hasta 6.42 mg/ml/h, como también la concentración de proteínas a estas mismas horas tuvo su máxima concentración 28.84 mg/ml. La máxima actividad celulolítica se presentó a las 96h cuando alcanzó 6.61 mg/ml/h.

La concentración de proteínas fue descendiendo a las 96h a 25.46 mg/ml, al igual que la actividad celulolítica, que a las 120h de cultivo tuvo un descenso hasta 4.96 mg/ml/h, también la concentración de proteínas terminó el cultivo descendiendo hasta 17.14 mg/ml, como se observa en la Figura No. 7. Sin embargo el pH desde las 48h hasta el final del cultivo (120h) se mantuvo en 6.3 (Tabla No. 8.).

FIG. NO. 8.- NIVELES DE PH DURANTE LA INCUBACION DE TRICHODERMA
TRICHODERMA HARZIANUM CBS-354-33 CULTIVADOS EN LOS MEDIOS "A" Y "B".

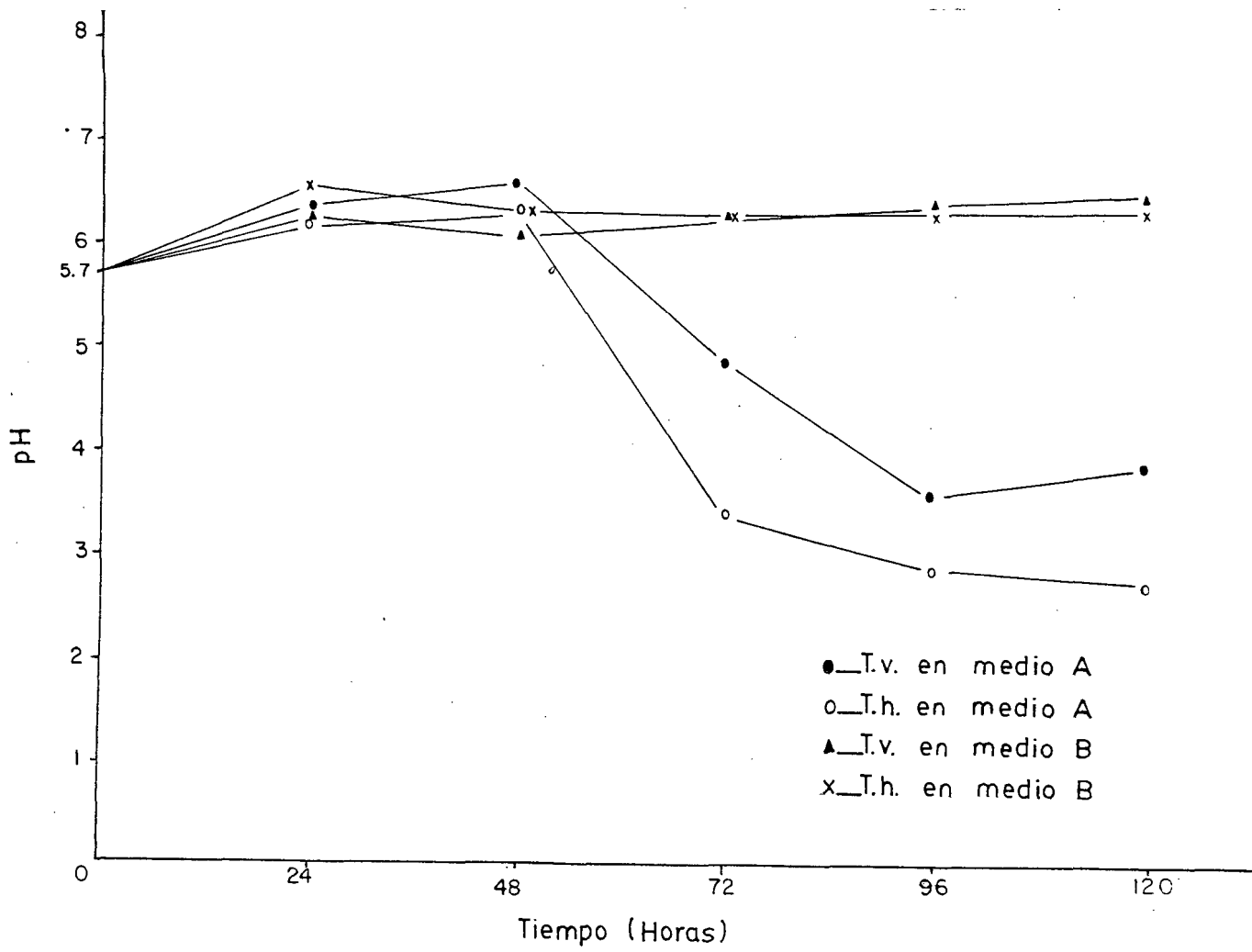


Tabla No. 8

CULTIVOS	TIEMPO (Hrs)				
	24	48	72	96	120
T. <u>viride</u> Medio A	6.4	6.6	4.9	3.6	3.9
T. <u>harzianum</u> Medio A	6.2	6.3	3.4	2.9	2.8
T. <u>viride</u> Medio B	6.3	6.1	6.3	6.4	6.5
T. <u>harzianum</u> Medio B	6.6	6.3	6.3	6.3	6.3

Niveles de pH durante el cultivo de Trichoderma viride QM9414 y Trichoderma harzianum CBS-354-33 en los Medios A y B.

Aislamiento de protoplastos de Catharanthus roseus utilizando los extractos enzimáticos.

Como se mencionó en Materiales y Métodos, los extractos enzimáticos de Trichoderma viride QM9414 y Trichoderma harzianum CBS-354-33 se utilizaron en el aislamiento de protoplastos de Catharanthus roseus, obteniendo los siguientes resultados:

Con el extracto enzimático de T. viride QM9414 en el medio "A", la concentración de protoplastos aislados fue de $1.54 \text{ E}6$ protoplastos por mililitro (Tabla No. 9).

La máxima producción de protoplastos de Catharanthus roseus se obtuvo con el extracto enzimático de T. harzianum CBS-354-33 cultivado en el medio "A", siendo esta de $1.67 \text{ E}7$ protoplastos por mililitro, como se indica en la Tabla No. 9.

El extracto enzimático de T. viride QM9414 crecido en el medio "B" produjo una densidad de protoplastos de C. roseus de

1.67 E6 protoplastos por mililitro (Tabla NO. 9).

Finalmente la densidad de protoplastos aislados de *C. roseus* utilizando el extracto enzimático de *T. harzianum* CBS-354-33 cultivado en el medio "B", fue de 2.22 E6 protoplastos por mililitro (Tabla No. 9).

Las pruebas de viabilidad de protoplastos aislados mostraron una mayor cantidad de protoplastos viables utilizando el extracto enzimático de *T.harzianum* CBS-354-33 cultivado en el medio "A". Por lo contrario los protoplastos obtenidos al utilizar el extracto enzimático de esta cepa cultivado en el medio "B" no presentaron viabilidad.

Utilizando los extractos enzimáticos de *T. viride* QM9414 cultivado en ambos medios se obtuvieron protoplastos viables, aunque en menor cantidad que los obtenidos con el extracto enzimático de *T. harzianum* CBS-354-33 en el medio "A".

Tabla No. 9

EXTRACTOS ENZIMATICOS	PROTOPLASTOS POR ml
T. <u>viride</u> QM9414 del Medio A	1.54 E6
T. <u>harzianum</u> CBS-354-33 del Medio A	1.16 E7
T. <u>viride</u> QM9414 del Medio B	1.67 E6
T. <u>harzianum</u> CBS-354-33 del Medio B	2.22 E6

Densidad de Protoplastos aislados utilizando los Extractos Enzimáticos de Trichoderma viride QM9414 y Trichoderma harzianum CBS-354-33 en los Medios de Cultivo A y B.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el medio "A" con la cepa de Trichoderma viride QM9414 muestran una *mínima* concentración de proteínas durante las primeras 48h. a partir de entonces mostró un incremento considerable hasta el final del cultivo (120h), como se observa en la Tabla No. 4 y Figura No. 4.

La actividad celulolítica, siempre mostró un incremento como como lo reportado por Sternberg en 1976. hasta las 120h, sin embargo Sternberg prolongó los cultivos hasta 20 días donde se mostraba un decremento en la actividad celulolítica al final del cultivo.

La Figura No. 4 muestra que hasta las 120h la actividad celulolítica continúa incrementándose al igual que la concentración de proteínas. lo que sugiere realizar cultivos mas prolongados con el objeto de observar la máxima actividad celulolítica y concentración de proteínas.

Sternberg en 1976 reportó que a medida que el pH desciende de 5.7 (pH inicial) hasta pH menor de 3.0 la actividad enzimática tiende a incrementarse al igual que la concentración de proteínas. La Figura No. 8 muestra este mismo patrón, descendiendo el pH a un nivel 6.6, a las 48h. hasta 3.6, a las 96h. finalizando en 3.9 a las 120h. Paralelamente tanto la actividad celulolítica como la concentración de proteínas a partir de las 48h mostraron un incremento (Fig. No. 4). Esto indica que a medida que el pH desciende la actividad celulolítica se incrementa de acuerdo a lo mencionado en la literatura.

Los resultados que se muestran en la Tabla y Figura No. 5 del cultivo de la cepa de *T. harzianum* CBS-354-33 en el medio de cultivo "A" muestran, una mínima actividad celulolítica de 0.36 mg/ml/h durante las primeras 24h. similar a la de *T. viride* QM94114 en el medio "A". Mientras que la concentración de proteínas fue mayor que para *T. viride* QM94114, 4.9 mg/ml en las primeras 24h. la concentración de proteínas no es similar a lo

reportado por Sternberg en 1976 para T. viride QM9414 en el mismo medio.

La actividad celulolítica tuvo un incremento bastante considerable a partir de las 24h hasta las 72h, llegando hasta 6.8 mg/ml/h, esto sobrepasa a lo reportado por Sternberg en 1976, en cantidad y tiempo de cultivo en la cepa T. viride QM9414 en el mismo medio. La actividad celulolítica siguió incrementándose durante las 96 y 120 horas con 7.80 mg/ml/h y 8.96 mg/ml/h respectivamente. Al final del cultivo la curva aun no declinaba lo que supone que al seguir el cultivo pudo haber un incremento en la actividad celulolítica y concentración de proteínas (Fig. No. 5).

La concentración de proteínas se comportó de una forma similar a la actividad celulolítica a partir de las 48h de cultivo, siempre mostró un incremento muy considerable, llegando al final del cultivo hasta 23.1 mg/ml, como se observa en la Tabla y Figura No. 5, mostrando esta cepa mayor actividad celulolítica y

concentración de proteínas que T. viride QM9414 en el mismo medio de cultivo.

El pH se comportó como lo reportado por Sternberg en 1976 para T. viride QM9414, a medida que el pH desciende, la actividad enzimática tiende a incrementarse como también la concentración de proteínas. La Tabla No. 8 indica los pH que se presentaron durante todo el cultivo, como a las 120h el pH alcanzó su nivel más bajo, 2.8. En la Figura No. 5 se observa que la actividad celulolítica y concentración de proteínas tienen un máximo nivel, como lo indica la literatura.

Según observaciones realizadas durante los muestreos, el crecimiento micelar de T. harzianum CBS-354-33 era muy aparente a partir de las 24h de cultivo, manteniéndose hasta las 72h.

Observándose en la Figura No. 5 tanto la actividad celulolítica como la concentración de proteínas se incrementan notablemente a las 24h la primera y a las 48h la segunda, y continúan

incrementándose a lo largo de todo el cultivo. Illanes y Schaffeld en 1982 reportaron para una cepa de *T. reesei* QM9414 (*T. viride* QM9414 para otros autores), crecido en un medio conteniendo bagazo de remolacha como fuente de carbono, que la concentración de proteínas se incrementa hasta 30h después de que la masa microbiana llegara a su fase estacionaria. Muy posiblemente ocurra el mismo patrón para *T. harzianum* en este medio. Es importante hacer notar que la actividad celulolítica para *T. harzianum* CBS-354-33 fue muy superior a lo reportado por Sternberg en 1976 para *T. viride* QM9414 en el mismo medio, llegando aquel hasta 8.96 mg/ml/h contra 4.75 mg/ml/h reportado.

De los resultados obtenidos del medio de cultivo de la cepa de *T. viride* QM9414 cultivado en el medio "B", como se indica en la Tabla y Figura No. 6, se observa un incremento mayor de actividad celulolítica a las 24h en el medio "B" que en el medio "A" con esta misma cepa 0.73 mg/ml/h y 0.52 mg/ml/h, respectivamente. De la misma manera sucedió con la concentración de proteínas en el

medio "B" fue de 3.36 mg/ml y en el medio "A" fue de 0.07 mg/ml (Figs. No. 4 y 6).

La actividad celulolítica y la concentración de proteínas se comportaron de forma similar durante el cultivo como se puede observar en la Figura No. 6. De las 24h a las 48h tuvieron el incremento mas considerable durante el cultivo, la actividad celulolítica aumentó hasta 1.82 mg/ml/h, la concentración de proteínas se incrementó hasta 13.46 mg/ml, superando las cantidades anteriores al cultivo de esta misma cepa en el medio de cultivo "A" reportado por Sternberg en 1976. En el período de 48h a 72h tanto la actividad celulolítica como la concentración de proteínas se mantuvieron estables. A partir de las 72h se siguió incrementando la actividad celulolítica y la concentración de proteínas, teniendo su máxima actividad celulolítica a las 92h con 2.80 mg/ml/h, superando con esto a la actividad celulolítica de *T. viride* QM9414 en el mismo medio de cultivo "A" (Figs No. 4 y 6) aun en menor tiempo de cultivo. La máxima concentración de proteínas fue a las 92h con 27.27 mg/ml, por lo tanto la

concentración de proteínas de la cepa de *T. viride* QM9414 en el medio "B" es mayor en este tiempo que el mostrado por esta misma cepa en el medio "A" en las mismas condiciones de cultivo. A partir de las 96h hasta el final del cultivo (120h) la actividad celulolítica y la concentración de proteínas declinó hasta 2.40 mg/ml/h y 14.60 mg/ml respectivamente como se observa en la Figura No. 6.

El pH durante todo el cultivo se mantuvo en un rango de 6.6 a 6.5, esto debido aparentemente, a que el medio "B" contiene licor de maíz el cual pudiera ejercer la función de amortiguador de pH (Fig. No. 8).

Los resultados mostrados en la Tabla y Figura No 7 que pertenecen a la cepa de *T. harzianum* CBS-354-33 cultivada en el medio "B", se observa un incremento superior al mostrado por la cepa de *T. viride* QM9414 cultivado en las mismas condiciones. Llegando la actividad celulolítica hasta 1.68 mg/ml/h. a diferencia de *T. viride* QM9414 cuya actividad celulolítica a las 24h fue de 0.73 mg/ml/h .

En cuanto a la concentración de proteínas la cepa de *T. harzianum* CBS-354-33 presentó una concentración mucho mayor que la mostrada por *T. viride* QM9414 bajo las mismas condiciones de cultivo, de 11.32 mg/ml, el primero y 3.36 mg/ml el segundo, a las 24h.

La Figura No. 6 muestra un incremento en la concentración de proteínas de 12.13 mg/ml a las 48h hasta 28.84 mg/ml a las 72h, la cual fue la máxima concentración mostrada. A partir de entonces la concentración de proteínas declinó llegando hasta 17.14 mg/ml a las 120h.

Como se puede observar en la Figura No. 7, la concentración de proteínas para *T. viride* QM9414 es mucho menor que la mostrada por *T. harzianum* CBS-354-33 llegando solo a 17.27 mg/ml como máxima concentración a las 96h.

La máxima actividad celulolítica se presentó a las 96h con 6.61 mg/ml/h para *T. harzianum* CBS-354-33 en el medio "B" (Fig. No.

7). a diferencia de *T. viride* QM9414 cuya actividad celulolítica máxima fue de 2.80 mg/ml/h a la misma hora de cultivo (Fig. No. 6). A las 96h de cultivo la actividad celulolítica comenzó a declinar hasta 4.60 mg/ml/h para *T. harzianum* CBS-354-33 en el medio "B".

Al igual que para *T. viride* QM9414 el pH se mantuvo en un rango de 6.6 a 6.3 durante todo el cultivo como se observa en la Figura No. 8.

Es importante notar que a diferencia del crecimiento observado para *T. harzianum* CBS-354-33 en el medio "A", tanto la concentración de proteínas como la actividad celulolítica declinan al final del período del cultivo y según observaciones realizadas durante los muestreos la población de *T. harzianum* CBS-354-33 en el medio "B" crecía más rápidamente y en mayor abundancia que en el medio "A". En este caso la celulosa del medio, probablemente fue totalmente digerida en menor tiempo (alrededor de 96h), de ahí que la actividad celulolítica y la

concentración de proteínas descendieran. Estas observaciones se presentaron de igual forma para *T. viride* QM9414 en este mismo medio (Figs. No. 6 y 7).

Aparentemente el licor de maíz estimula más el crecimiento del hongo en menor tiempo y consecuentemente una mayor digestión de la celulosa. En el medio de cultivo "A" el crecimiento de ambas cepas fue más lento y la celulosa presente quizás no fue digerida en su totalidad durante las 120h de cultivo. de ahí que ambas curvas (actividad celulolítica y concentración de proteínas) no declinaran (Figs. No. 4 y 5).

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla No. 9 el extracto enzimático más eficiente en el aislamiento de protoplastos fue el de *T. harzianum* CBS-354-33 cultivado en el medio "A" con una densidad de 1.67×10^7 protoplastos por mililitro.

La densidad menor de protoplastos se presentó al utilizar el extracto enzimático de *T. viride* QM9414 en el medio "A" con 1.54×10^6 protoplastos por mililitro.

Cabe mencionar que la literatura no indica la cantidad de protoplastos aislados para una determinada especie de planta (Cocking, 1960; Constabel, 1982; Evans y Bravo, 1983; Barba, 1987). Sin embargo, los autores mencionan que la densidad mínima para el cultivo de protoplastos aislados debe ser de $10E4$ protoplastos por mililitro. Las cantidades de protoplastos aisladas en el presente estudio están por encima de los niveles requeridos para su siembra, por lo cual el método empleado fue eficiente para este fin.

Aunado a lo anterior, es necesario señalar que los extractos enzimáticos obtenidos en este trabajo no pasaron por un proceso de semipurificación como marca la literatura (Constabel, 1982; Evans y Bravo, 1983) sin embargo los niveles de protoplastos obtenidos fueron aceptables.

El ensayo de viabilidad confirmó que el método empleado en el aislamiento de protoplastos de Catharanthus roseus fue efectivo ya que gran cantidad de los protoplastos aislados presentaron

viabilidad, específicamente los aislados con el extracto enzimático de T. harzianum CBS-354-33 en el medio "A".

Finalmente los extractos enzimáticos para el aislamiento de protoelastos de Catharanthus roseus pueden ser utilizados para el aislamiento de protoplastos de diversas especies de plantas superiores.

CONCLUSIONES

- 1.- Los valores máximos de actividad celulolítica de los extractos enzimáticos de *T. viride* QM9414 y *T. harzianum* CBS-354-33 cultivados en el medio "A", se presentaron cuando el pH estuvo en sus niveles mas bajos.
- 2.- La concentración de proteínas de los extractos enzimáticos de *T. viride* QM9414 y *T. harzianum* CBS-354-33 cultivados en el medio "A", se incrementaron a partir de las 72h y 24h, respectivamente, hasta el final del cultivo.
- 3.- La actividad celulolítica del extracto enzimático de *T. viride* QM9414 cultivado en el medio "A", tiende a incrementarse a partir de las 48h hasta el final del cultivo (120h).

- 4.- La cepa de *T. harzianum* CBS-354-33 mostró mas altos niveles de actividad celulolítica como de concentración de proteínas, que *T. viride* QM9414 en el medio desarrollado para este.

- 5.- Aparentemente el periodo de cultivo para ambas cepas utilizando el medio "A" deberá ser mas prolongado ya que la actividad celulolítica y la concentración de proteínas no alcanzan su punto máximo.

- 6.- La actividad celulolítica y la concentración de proteínas es mayor en el extracto enzimático de *T. viride* QM9414 cultivado en el medio "B" que las mostradas en el extracto enzimático de la misma cepa en el medio "A".

- 7.- La celulosa presente en el medio de cultivo "B" probablemente sea consumida en su totalidad alrededor de las 96 h de cultivo, ya que tanto la actividad celulolítica como la concentración de proteínas decrecen notablemente.

8.-El pH en el medio de cultivo "B" se mantiene entre 6.1 y 6.6 durante todo el cultivo y es debido aparentemente a la presencia del licor de maíz. el cual pudiera estar funcionando como amortiguador.

9.- El extracto enzimático de *T. harzianum* CBS-354-33 cultivado en el medio "B" mostró tener mayor actividad celuloítica que el extracto enzimático de *T. viride* GM9414 cultivado en el mismo medio.

10.-Probablemente el licor de maíz incrementa el crecimiento de ambas cepas en menor tiempo, acelerando la producción de enzimas (celulasas entre otras).

11.- Los diferentes extractos enzimáticos fueron eficientes en el aislamiento de protoplastos de *Catharanthus roseus* .

12.- A pesar de no haber sido semipurificados los extractos enzimáticos, estos fueron capaces de aislar cantidades considerables de protoplastos de Catharanthus roseus.

13.- El ensayo de viabilidad confirmó que el método de aislamiento de protoplastos y los extractos enzimáticos de Trichoderma viride QM9414 y Trichoderma harzianum CBS-354-33 son útiles para la obtención de protoplastos viables.

BIBLIOGRAFIA

- Augé, R. G.; Beauchesne. J.; Boccon-Gibod. L.; Decourtye, B.;
Digat. R.; Minier. J.; Morand. C.; Oudin. Y. et Vidalie,
H. (1982) La culture in vitro et ses aplicaciones
horticoles. Technique et Documentation (Lavoisier). J. B.
Bailliere. 11-15.
- Barba. A.A. (1987) Obtención y Cultivo de Protoplastos. En:
Cultivo de Tejidos Vegetales. Hurtado, M.V. y Merino.
M.M. (1987) Ed. Trillas. 111-121.
- Bradford, M. (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.

Brown, B.E. (1976) Cellulase Production by Trichoderma viride.

In: Technology and Applications. Gaden, E; Mandels, M;

Reese, E. and Spano, L. (1976) Interscience Publication.

75-77.

Cocking, E.C. (1960) A Method for the Isolation of Plant

Protoplast and Vacuoles. Nature, 187: 962-963.

Constabel, F. (1982) Isolation and culture of plant protoplast.

In: Plant Tissue Culture Methods. Wettar L.R and

Constabel F. (1982) 2nd. Ed., National Research Council

of Canada. 38-46.

Crueger, W. and Crueger a. (1984) Biotechnology A Textbook of

Industrial Microbiology. Science Tech. Inc. 48-51; 274-276.

Demain, A. L. (1976) Comments on Cellulase Production. In:

Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials; Technology

and Applications. Gaden, E; Mandels, M; Reese, E. and

Spano, L. (1976) Eds. Interscience Publication. 79-81.

De Robertis, D.R. (1982) *Biología Celular y Molecular*. 10a ed. El Ateneo S.A. 284-288.

De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H. (1973) Effectiveness of a Lytic enzyme preparation from Trichoderma viride in releasing spheroplasts from fungi particularly basidiomycetes. Antonie Van Leeuwenhoek 39: 397-400.

De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H. (1973) Release of Protoplasts from Schizophyllum commune by Combined Action of Purified α -1,3- Glucanase and Chitinase Derived from Trichoderma viride. J. Gen. Microbiol. 76: 319-330.

Dodds, J.H. and Roberts, L.W. (1982) *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. 107-119.

Dos Santos, A.V.P.; Outka, D.E.; Cocking, E.C. and Davey, M.R.

(1980) Organogenesis and Somatic Embryogenesis in Tissues
Derived from Leaf Protoplasts and Leaf Explants of
Medicago sativa. Z. Pflanzenphysiol. Ed.99.5.261-270.

Evans, D.A. and Bravo, J.E. (1983) Protoplast Isolation and
Culture. In: Handbook of Plant Cell Culture. Evans, D.A.,
Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (1983) Vol. I
Macmillan Publishing Co. 124-176.

Gamborg, O.L., Shyluk, J.P. and Shahin, E.A. (1981) Isolation,
Fusion and Culture of Plant Protoplasts. In: Plant Tissue
Culture Methods and Applications in Agriculture. Thorpe,
T. A. (1981) Academic Press, Inc. 115-153.

Huitrón, C.; Gibón, A. y Larios G. (1983) Producción de celulasas
por un hongo levaduriforme que degrada celulosa
microcristalina. En: Biotecnología de Enzimas (Symposium).
Huitrón C. (1983) UNAM. 39-52.

Illanes, A. y Schaffeld (1982) Enriquecimiento proteico de bagazo de remolacha por fermentación. Revista Argentina de Microbiología, 14 (2).

Laborda, F.; Garcia, I.A. and Villanueva J.R. (1974) Studies on a Streptzyme Capable of Obtaining Protoplasts from Fusarium culmorum conidia. Trans. Br. mycol. soc. 62 (3): 509-518.

Larios, A.G. (1984) Enrichissement Proteique des Pulpes de Betterave par Fermentation a L'état solide: Etude de Deux Souches Cellulolytiques. These De Doctorat de 3e cycle. University De Dijon U.E.R. DES SCIENCES DE LA VIE.

Larios, G.; Gibón, A. y Huitrón C. (1983) Sistema Celulolítico Extracelular de AUREOBASIDIUM sp. En: Biotecnología de Enzimas (Symposium). Huitrón C. (1983) UNAM, 281-296.

Larkin, P.J. (1976) Purification and Viability Determinations of Plant Protoplasts. Planta 128: 213-216.

Lewis, W.H. and Lewis-Elvin, M.P.F. (1977) Medical Botany, Plants Affecting Man's Health. John Wiley & Sons, Inc. 105-149; 199-225.

Loyola, V.M. y Reyes, J.L. (1985) El Cultivo de Tejidos Vegetales Para la Producción de Sustancias Naturales. En: El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. Robert, M. y Loyola V.M. (1985) CONACYT. 125-132.

Mandels, M.; Andredotti, R. and Roche, C. (1976) Measurement of Saccharifying Cellulase. In: Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials: Technology and Applications. Gaden, E.; Mandels, M.; Reese, E. and Spano, L. (1976) Interscience Publication. 26-27.

Menezes, J.B. y Menezes, H.C. (1983) Utilización de Celulasas para sacarificación de productos agrícolas En: Biotecnología de Enzimas (Symposium). Huitrón, C. (1983) UNAM, 187-195.

Miller, G.L.(1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for
Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31, (3):
426-428.

Montenecourt, B.S. (1985) Zymomonas, a Unique Genus of Bacteria.
In: Biology of Industrial Microorganisms. Demain, A.L.
and Solomon, N.A. (1985) The Benjamin Cummings
Publishing Co. Inc. 261-289.

Navarro, S. U. y Vera, R. E. (1987) Historia del cultivo de
tejidos vegetales. En: Cultivo de Tejidos Vegetales.
Hurtado, M. V. y Merino, M. M. (1987) Ed. Trillas. 15-30.

Paredes, O. y Gwyneth, I.H. (1985) La Ingeniería Genética de
Plantas: Una alternativa para la producción de alimentos
en México. En: Prospectivas de la Biotecnología en
México. Quintero, R. (1985). CONACYT, 305-330.

Peberdy, J.F. (1979) Isolation, reversion and fusion. Annual
Reviews Microbiology, (33): 21-39.

Peberdy, J.F. and Isaac, S. (1976) An improved procedure for
protoplast isolation from Aspergillus nidulans. Microbius
Letters, 3: 7-9.

Phillips, J.A. and Humphrey, A. E. (1983) An Overview of Process
Technology for the Production of Liquid Fuels and
Chemical Feedstocks via Fermentation. In: Organic
Chemicals from Biomass. Wise, D.L. (1983) The
Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 249-304.

Power, J.B. and Cocking, E.C. (1970) Isolation of Leaf
Protoplast: Macromolecule Uptake and Growth Substance
Response. Journal of Experimental Botany, 21, (66): 64-
70.

Robert, M. (1981) La Modificación Genética de Células Vegetales en Cultivo. En: Transplante y Movilización de Genes. Ondarza. N.R.; Robert, M. y Bolivar, F. (1981) CONACYT 2a. Ed. 29-42.

Robert, M. (1985) El potencial del Cultivo in vitro de células vegetales en el mejoramiento genético de las plantas. En: El cultivo de tejidos vegetales en México. Robert, C. Lovola, V. (1985) CONACYT 89-110.

Ruiz, O.M.; Nieto, R.D.; y Rodriguez, L.I. (1979) Tratado elemental de Botánica. 15a. ed. Ed. E.C.L.A.L.S.A. 380-384.

Sánchez, R.S. (1985) El desarrollo biotecnológico en México. En: Prospectiva de la biotecnología en México. Quintero, R. (1985) CONACYT. 131-148.

Scoppes. R.K. (1982) Protein Purification Principles and Practice. 1a. ed. Springer-Verlag, New York Inc. 237-240.

Shaffeld, G. e Illanes. A. (1983) Producción de Celulasas de Trichoderma viride QM9414 a partir de pulpa de remolacha agotada. En: Biotecnología de Enzimas (Symposium). Huitrón, C. (1983) UNAM. 247-254.

Sternberg. D. (1976) Production of Cellulase by Trichoderma. In: Enzimatic Conversion of Cellulosic Materials: Technology and Applications. Gaden. E.; Mandels. M.; Reese, E. and Spano. L. (1976) Interscience Publication. 35-53.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....
Número 816/87

Srita. Ana Luz Núñez Carrasco
Presente. -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "OBTENCION DE UN EXTRACTO ENZIMATICO A PARTIR DE HONGOS DEL GENERO TRICHODERMA, PARA EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE Catharanthus roseus", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado - como Director de dicha tesis el M. en C. Rogelio Camacho García.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Julio 10 de 1987
El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel



FACULTAD DE CIENCIAS

c.c.p. El M. en C. Rogelio Camacho García.- Pte.
c.c.p. El Expediente del alumno.-

Si contestar este oficio citese fecha y número

Guadalajara, Jal. Enero 6 de 1988.

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.


Estimado Dr. Astengo:

Por este medio comunico a usted que la Srita. Ana Luz NIÑEZ Carrasco pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de tesis titulado: OBTENCION DE UN EXTRACTO ENZIMATICO A PARTIR DE HONGOS DEL GENERO Trichoderma, PARA EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE Catharanthus roseus, realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C.

Asi mismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad y lo presentamos a consideración.

Sin mas por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E



M. en C. Rogelio Camacho García.

Director de Tesis.