



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**Fusión Celular de Protoplastos Vegetales  
(Zea mays) con Protoplastos Bacterianos  
(Azospirillum Lipoferum).**

**T E S I S**

Que para obtener el título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**LUIS EDMUNDO IGLESIAS SAAVEDRA**

**1 9 8 2**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## I N D I C E

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCION	2
	1.- Fusión Celular	2
	1, 1    Métodos Físicos	
	1,1, 1    Microcirugía	
	1, 1, 2    Campo Eléctrico	
	1, 2    Métodos Biológicos	
	1, 2, 1    Virus	
	1, 3    Métodos Químicos	
	1, 3, 1    Soluciones Hipotónicas	
	1, 3, 2    Compuestos de Cadena Larga	
	1, 3, 3    Mezclas	
	2.- Obtención de Protoplastos	4
	2, 1    Protoplastos Vegetales	
	2, 2    Protoplastos Bacterianos	
	3.- Usos y Características del PEG y DMSO	6
	4.- Descripción de <u>Zea mays</u>	7
	5.- Descripción de <u>Azospirillum lipoferum</u>	8
	6.- Autorradiografía	9
	7.- Objetivo	10
III	MATERIALES Y METODOS	11

1.-	Material Biológico	11
1, 1	Zea mays	
1, 2	<u>Azospirillum lipoferum</u>	
2.-	Metodología Experimental	11
<b>I V</b>	<b>RESULTADOS</b>	14
1.-	Viabilidad de Protoplastos	14
1, 1	Protoplastos Vegetales	
1, 2	Protoplastos Bacterianos	
2.-	Análisis Microscópico a Contraste de Fases de la Autorradiografía del Producto de Fusión	14
3.-	Viabilidad del Producto Híbrido	16
<b>V</b>	<b>DISCUSION</b>	23
<b>V I</b>	<b>APENDICE 1 (Medios de Cultivo y Soluciones)</b>	27
<b>V I I</b>	<b>REFERENCIAS</b>	31

## I RESUMEN

En este trabajo se fusionaron protoplastos de maíz con protoplastos de una bacteria (Azospirillum lipoferum) capaz de fijar nitrógeno, marcados en su ADN con timidina tritiada, utilizando la mezcla fusio- nante polietilenglicol-dimetilsulfoxido (PEG-DMSO), en un intento de obte- ner un híbrido celular que sea capaz de fijar nitrógeno.

El experimento consistió en la formación de protoplastos de - Zea mays (maíz) por acción de las enzimas Onozuca R-10, Hemicelulasa y - Pectinasa, el marcaje de las bacterias con timidina tritiada, la forma- - ción de protoplastos bacterianos por acción de la Lisozima, y la fusión - celular.

La fusión se realizó con la mezcla fusioante PEG-DMSO. Se -- montaron los protoplastos híbridos en porta objetos y se cubrieron con --- emulsión fotográfica Kodak NTB 2 . Se revelaron después de 30 días, se - analizó al microscopio de contraste de fases observando marcas en el cito- plasma y núcleo.

Aparentemente los resultados son muy halagadores ya que, es--- tos dos tipos celulares pueden fusionarse y desde el punto de vista bio- lógico esto es muy importante, pues este híbrido podría desarrollar la ca- pacidad biológica de fijar nitrógeno del medio ambiente. Sin embargo para demostrar que este híbrido es capaz de fijar nitrógeno y que la informa-- ción genética es heredable es necesario realizar un trabajo más exhausti- vo y concluyente.

## 1 1 INTRODUCCION

### 1.- FUSIÓN CELULAR

Existen dos formas de Fusión Celular, la natural y la Inducida. La Fusión Celular natural es un fenómeno que se presenta frecuentemente, tal es el caso de la fusión Espermatozoide-Ovulo en la fecundación, la fusión de las células musculares, los micelios de hongos no septados, etc. La Fusión Celular Inducida produce dos tipos de híbridos; Homocariocíticos, células con dos ó más núcleos y citoplasma del mismo género y especie, y Heterocariocíticos, células con dos ó más núcleos y citoplasmas de diferente género, especie o hasta reino. Existen tres procesos fundamentales para inducir la Fusión Celular y son:

#### 1, 1 FISICOS;

1, 1, 1 LA MICROCIURUGIA; Es la forma de realizar trasplantes de núcleos o inyección de uno o varios núcleos a una célula receptora, formando así los híbridos. Los primeros trabajos publicados son de Dicumackos y Col. en 1972 quienes formaron híbridos de una misma población.

1, 1, 2 CAMPO ELECTRICO; Consiste en aplicar a las células campos eléctricos de alta intensidad en corto tiempo - (seg. ó  $\mu$ seg.) Esta descarga eléctrica produce un gran cambio en la permeabilidad de la membrana celular permitiendo el paso de sustancias y partículas grandes. Cuando es el caso de que hay contacto entre membranas y éstas reciben el pulso eléctrico, hay adherencia entre las células y en muchos casos fusión (Zimmerman y Col., 1981).

## 1, 2 BIOLÓGICOS;

1, 2, 1 En este caso los virus son los protagonistas de este tipo de métodos, que han sido utilizados desde 1970 por OKADA y HARRIS (Steplewski, 1970). Los virus más empleados para estas técnicas son: Herpesvirus, Poxvirus, Myxovirus y Paramyxovirus. Lo importante para el desarrollo de esta técnica es que el virus se encuentre inactivado, es decir, que pierda su capacidad replicativa, pero no su capacidad fusional, lo cual se logra exponiendo a los virus a radiación ultravioleta (Watkins 1971).

## 1, 3 QUÍMICOS:

1, 3, 1 SOLUCIONES HIPOTÓNICAS; Como es el caso del  $\text{NaNO}_3$  que produce plasmólisis en células vegetales y así la formación de protoplastos, al estar éstos en contacto, sus membranas se adhieren y en algunos casos se fusionan. El primer trabajo publicado es de KUSTER en 1909 (Gamborg, 1981).

1,3, 2 COMPUESTOS DE CADENA LARGA (Lípidos): Existen algunos agentes como la Lisolecitina y el Polietilenglicol (PEG) que son capaces de inducir la fusión celular. El mecanismo de acción a estos agentes (Lucy, 1971) consiste en una des-polarización de la membrana celular dando como resultado agregación y fusión celular. El uso de estos agentes proporciona gran agilidad en el trabajo de laboratorio ya que no es tan difícil como la microcirugía, no es tan costoso como el campo eléctrico ni tan peligroso como el de los virus. Existen algunos defectos como son la posible actividad cancerígena de la lisolecitina, o el bajo porcentaje de fusión cuando se usan concentraciones de más del 50 % (P/v) del PEG. Se han probado



otros agentes que producen fusión celular en diferentes grados, como son: Renitol, Acido Oléico, Acido Linolénico, Acido Láurico, Acido Glicerol Monoláurico, entre otros.

1, 3, 3 MEZCLAS: La única mezcla conocida es la de PEG DIMETIL SULFOXIDO (DMSO) utilizada por primera vez en microorganismos por Hopwood y Col. en 1977, donde el incremento en la fusión es de casi el 100 % de las células.

La fusión celular entre vegetales se conoce desde 1909, siendo Kuster el pionero de estas técnicas, obteniendo protoplastos plasmolizados usando soluciones hipotónicas de  $\text{NaNO}_3$ . Estos protoplastos muestran un bajo porcentaje de fusión (Constabel, 1976). Actualmente ya se conocen otros métodos para la obtención de protoplastos. Definimos por protoplasto a una célula vegetal, bacteriana o de hongo que ha perdido su pared celular. Kao y Michayluk en 1976 utilizan el PEG de diferentes pesos moleculares en la fusión de células vegetales. La fusión de vegetales ha sido utilizada para generar gran variedad de mutantes útiles para la agricultura, fruticultura, y la investigación (Gamborg, 1981).

Por otra parte la fusión de microorganismos ha sido demostrada por varios investigadores como: Fodor y Col., 1974; Schaffner, 1976; Gabor 1976; Tsenin y Col., 1978; Goerzee y Col., 1979; Sánchez - Rivas y Col., - 1979; Frehgl y Col., 1979; Hotchkiss y Col., 1980 (Hopwood, 1981); Todos ellos utilizaron PEG como agente fusinante, y obtuvieron resultados que son muy importantes para la microbiología.

## 2.- OBTENCION DE PROTOPLASTOS

Se define como protoplasto a una célula que haya perdido su pared celular, y puede haber protoplastos de vegetales, hongos y bacterias.

## 2, 1 PROTOPLASTOS VEGETALES;

A la par del desarrollo de cultivos vegetales, se han ido desarrollando las técnicas de obtención de protoplastos, en 1960 Cocking describe el uso de la celulasa para la obtención de protoplastos a partir de raíz de jitomate obteniendo más de un 50 % de viabilidad, dando así suficiente material para propósitos científicos (Power, 1970).

Actualmente los protoplastos son obtenidos por medio de mezclas de enzimas degradantes de la pared celular en soluciones con estabilizadores osmóticos que preservan la estructura y viabilidad de los protoplastos (Gamborg, 1981). Las enzimas utilizadas para formar protoplastos son de tres clases; Celulasas que degradan a la celulosa, Hemicelulasas que degradan a la hemicelulosa y Pectinasa que degrada a la amilopectina. Los sustratos de estas enzimas corresponden directamente a la composición de la pared celular del maíz. En este trabajo usamos:

Onozuca R 10	(Nat. Japan)
Hemicelulasa	(Sigma)
Pectinasa	(Nat. Japan)

Cuando se usan estas enzimas la viabilidad reportada es de un 70 - 90 % y generalmente es determinada por las pruebas de exclusión de colorante, usando nigrosina o azul de tripan.

## 2, 2 PROTOPLASTOS BACTERIANOS;

La pared celular de las bacterias está formada por Mucopolisacáridos (Mureína), ésta, para ser degradada necesita de una Mucopolisacaridasa, que da como productos n-acetilglucosamina y Ac. n-acetil murámico. Las bacterias

gram negativas aparte de los mucopolisacáridos de la pared, - tiene recubriéndola una capa lipoproteica que necesita del ión calcio para su estabilidad.

La Lisozima es una mucopolisacaridasa que - despolimeriza los azúcares en presencia del ión cloruro. Fleming en 1922 descubre la enzima y la llama Lisozima. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, por ejemplo; lágrimas, mucosa nasal, saliva, suero de sangre, plasma humano y en un gran número de tejidos y secreciones de animales, vertebrados e invertebrados y en plantas (Jolles, 1960). La presencia de estas enzimas fué detectada por su acción lítica sobre cocos gram positivos. Para el caso de bacterias gram negativas los estudios realizados por Peterson y Hartseil en - 1955 informan la necesidad de utilizar agentes quelantes como el EDTA (Jolles, 1960).

### 3.- USOS Y CARACTERISTICAS DEL PEG Y DMSO:

El PEG (Fig. 3.1) por vía oral posee una toxicidad muy baja y ésta disminuye al aumentar el peso molecular del polímero, aún después de uso prolongado, a dosis usuales, se considera no tóxico (Davidson, 1976).

Es usado en la industria farmacéutica como base para ungüentos, para supositorios, y como lubricante en la manufactura de tabletas. Es eliminado totalmente del organismo en 48 horas (Hawley, 1975).

Para su uso en fusión celular los pesos moleculares (del PEG) que se utilizan van del 1000 al 6000 obteniéndose diferentes grados de fusión (Pontecorvó, 1975).

El DMSO es por su parte un disolvente dipolar aprótico potente. tanto de compuestos polares como no polares, Está particularmente in-

clinado a participar como aceptor de átomos en uniones de o con el hidrógeno, Se usa como disolvente químico, como preservador biológico durante la congelación, como protector del daño por radiaciones y en medicina se usa como antiinflamatorio. Su capacidad para disminuir las hinchazones en áreas edematosas, sugiere que puede alterar la permeabilidad de la membrana celular de alguna manera (Hawley, 1975).

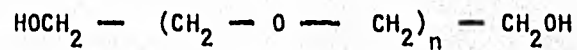


Fig. 3.1. Polietilen glicol

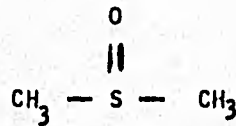


Fig. 3.2. Dimetil sulfoxido

#### 4.- DESCRIPCION DE ZEA MAYS:

Se decidió escoger como vegetal a Zea mays (maíz) debido a su gran importancia mundial dentro de la alimentación y por su dificultad de desarrollo sin fertilizantes nitrogenados.

El maíz de nombre científico Zea mays es una gramínea monocot

tiledonea, que es capaz de desarrollarse en casi todo tipo de climas y -- aunque sus requerimientos nutritivos son bajos, necesita de sustancias nitrogenadas y de compuestos fosforados. Es originario de América, es un grano comestible, el tallo es de estación, erecto y fuerte, de hojas grandes y lanceoladas. El maíz es usado como alimento en humanos, como forraje para animales y como materia prima en la industria. Su valor nutritivo es bajo, debido a su poco contenido en proteínas, su deficiencia en niacina y en algunos aminoácidos esenciales como el triptófano (Enciclopedia Británica).

El maíz, un alimento de gran importancia mundial fué utilizado desde la antigüedad en América por casi todas las culturas precolombianas y aún en nuestro tiempo el maíz representa un alimento básico en la dieta, como por ejemplo, la masa y todos sus derivados.

#### 5.- DESCRIPCION DE AZOSPIRILLUM LIPOFERUM;

La bacteria seleccionada fué Azospirillum lipoferum, ya que -- posee como característica fundamental que fija nitrógeno y realiza una simbiosis facultativa con maíz en climas tropicales (Smith y Col. 1976).

Beijerinck describe en 1923, a un organismo llamado Azotobacter spirillum al que más tarde (1925) le llama Spirillum lipoferum, que -- aparece descrito en el manual de Bergey en 1957, clasificado como fijador parcial de nitrógeno en vida libre. Es hasta 1963 donde Becking describe -- la capacidad de incorporar N<sup>15</sup> por Spirillum o Vibrio que era el mismo descrito por Beijerinck (Tarrand y Col., 1978).

Spirillum lipoferum es una bacteria gram negativa, móvil con -- forma de vibrión y con gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, crece en medio libre de nitrógeno. Como fuentes de energía puede utilizar; malato, lactato, succinato y piruvato. Algunos estudios mostraron que ciertas cepas requieren de bajas cantidades de extracto de levadura para crecer en medios

minerales usando como fuente de carbono a la glucosa. Basándose en estas - y otras observaciones se creyó en la existencia de dos o tres grupos dentro de la especie Spirillum lipoferum (Dobereiner, 1977).

Tarrand, Kreig y Dobereiner en 1978 realizan experimentos de - ADN homólogo en Spirillum lipoferum y sugieren la creación de un nuevo género, Azospirillum con dos especies Azospirillum brasilense y Azospirillum lipoferum:

Azospirillum brasilense; Incluye a las cepas de los grupos I y III, encontradas frecuentemente en climas tropicales. Las cepas del grupo III se diferencian del grupo I porque, en bajas concentraciones de oxígeno no desnitrifica, acumulan nitrito a partir de nitrato (Neyra, 1977).

Azospirillum lipoferum; Contiene a todas las cepas del grupo II y se diferencian por su capacidad de utilizar la glucosa como fuente -- única de carbón, crece en medio libre de nitrógeno y dan reacción ácida sobre un medio a base de glucosa y peptona, requieren de biotina y además reducen el nitrato a nitrito con producción de gas (Tarrand, 1978) (Neyra, 1977).

#### 6.- AUTORRADIOGRAFIA:

En 1867 Niepce de St. Víctor publicó que una emulsión de sales de cloruro y yoduro de plata era ennegrecida por nitrato y tartrato de -- uranio; era curioso que el material radioactivo velara la emulsión fotográfica, pero en su tiempo, no se había descrito la radioactividad, y él interpretó el fenómeno en términos de luminiscencia.

Henri Becquerel en 1896 utilizó agentes fluorescentes como el sulfato de uranio sobre placas fotográficas cubiertas con dos capas de -- papel negro, logrando velarlas. Estos experimentos y los descubrimientos - de los Curie en 1898, demostraron la existencia de la radioactividad.

Es hasta 1924 cuando Lacassagne y sus colaboradores estudian la distribución del Polonio en especímenes biológicos (Rogers, 1967).

En la actualidad se ha ido desarrollando la técnica de la autorradiografía aprovechando el principio de la reducción de sales de plata por energía ionizante, es decir, un compuesto radioactivo emite energía -- ionizante (en el caso del tritio radiación  $\beta$ ) que es capaz de velar -- (ennegrecer) a la emulsión fotográfica. En este trabajo empleamos timidina metil tritiada de New England Nuclear y emulsión fotográfica Kodak NTB 2 que se seleccionó por el tamaño de grano ( $0.26\mu$ ) y la sensibilidad a la radiación emitida por el tritio (emisión  $\beta$ , menos de 0.2 MeV.).

7.- OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo es el de comprobar la fusión celular entre Azospirillum lipoferum y Zea mays, observando el destino del ADN bacteriano marcado con timidina tritiada, por medio de autorradiografía y su análisis en microscopía de luz (contraste de fases).

### III MATERIALES Y METODOS:

#### 1.- MATERIAL BIOLÓGICO:

##### 1, 1 Zea mays

Se seleccionó una variedad mutante clasificada en PRONASE - - (Productora Nacional de Semillas) como H-507 variedad que se desarrolla en valles altos y climas templados. Nosotros cultivamos la semilla en frascos de vidrio con papel filtro y algodón en condiciones estériles, el algodón húmedo y a 28 °C durante tres días.

##### 1, 2 Azospirillum lipoferum

La cepa fué proporcionada por la M. en C. Rosa María Ramírez Gama del laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM. La cepa se cultivó en medio de propagación para Azospirillum, se resembró en medio de papa para aislamiento y medio semisólido, donde se observaron las características coloniales y de fijación de nitrógeno de Azospirillum lipoferum, se realizó tinción de gram y observación con contraste de fases, con lo cual se reconfirmó que la cepa es Azospirillum lipoferum.

#### 2.- METODOLOGIA EXPERIMENTAL:

A un cultivo de bacterias de 24 hrs., desarrolladas en medio de propagación (A1,3)\*, se les centrifugó a 3000 RPM. Durante 10 min. y se resuspendieron en la solución de pulso radiactivo (A1,8)\* incubando durante 90 min.. Se centrifugó a 2000 RPM. Durante 10 min. eliminando el sobrenadante y resuspendiendo con medio de propagación (A1,3)\*, realizando esta operación tres veces para eliminar la timidina tritiada no asimilada. - Se centrifugó en las condiciones anteriores y el botón de bacterias marca-

\* Este paréntesis corresponde a la solución mencionada en el apéndice 1.



das se resuspendió en solución de lisozima (A1, 6) \* durante 30 min. para obtener los protoplastos. Por otra parte a semillas de maíz germinadas durante tres días, se les cortó la radícula, se fragmentaron en cajas de petri con unas gotas de solución para protoplastos (A1, 4) \*, se pasaron los fragmentos a un tubo de ensayo con solución de enzimas para vegetales (A1,7)\* durante 30 min.. Se centrifugó a 500 RPM. durante 10 min. a 0°C, y se lavaron tres veces con solución para protoplastos (A1,4)\*.

Ya obtenidos los protoplastos vegetales y bacterianos, se realizaron las pruebas de viabilidad; para los protoplastos vegetales se usó la prueba de exclusión de colorante con la solución para prueba de viabilidad de protoplastos (A1,5)\*, contando 100 células por preparación, donde las células que permanecen claras, sin teñir, son las viables. Para los protoplastos bacterianos la viabilidad se les determina por la prueba de regeneración del protoplasto, los protoplastos son incubados durante 1 hrs. en solución, se realiza una cuenta en hemocitómetro y se sembró 0.1 ml. en forma masiva en una caja de petri con medio de papa para aislamiento (A1,1)\* y se incubó a 28°C durante 48 hrs., al término de la incubación se realizó la cuenta colonial. Estas pruebas se realizaron en cada experimento.

Otra parte de los protoplastos vegetales y bacterianos, se mezclaron 10:1 (V/V) vegetales-bacterias, y se centrifugaron a 500 RPM. a 0°C durante 10 min. se retiró el sobrenadante dejando sólo un ML., en el cual se resuspendió el botón de protoplastos y se mezcló con el agente fusiónante (A1,9)\* 1:1 (V/V) durante 30 seg., después se agregaron 10 ML. de solución para protoplastos (A1,4)\* para detener la acción del agente fusiónante.

Para fijar los protoplastos híbridos se utilizó la solución fijadora de formaldehído (A1,10)\*, goteando 30 ML. con una frecuencia de una gota cada 15 seg. Se centrifugó a 1500 RPM durante 15 min. y el botón

obtenido se resuspendió en 1 ml. de agua destilada. Se montaron en portaobjetos limpios y desengrasados, cubiertos con la solución de gelatina (A1,11)\*, se cubrieron con emulsión fotográfica Kodak (A1,12)\* en cuarto oscuro, y se guardaron durante 30 días en oscuridad a 4°C, se revelaron, se cubrieron con aceite para contraste de fases, y se montó con cubreobjetos, sellando con barniz para uñas.

Se realizaron 5 experimentos para comprobar la representatividad de los resultados obtenidos.

#### IV RESULTADOS:

##### 1.- VIABILIDAD DE PROTOPLASTOS VEGETALES Y BACTERIANOS:

1, 1 A los protoplastos vegetales obtenidos por acción de las enzimas; Onozuca, Hemicelulosa y Pectinasa (Foto # 1) se les determinó la viabilidad, por la prueba de exclusión de colorante, con la solución de nigrosina (A1,5). Un protoplasto se encuentra viable, si mantiene la selectividad del transporte a través de su membrana, es decir, mantiene al colorante fuera de la célula. Cuando la célula ha muerto, el colorante pasa libremente y tiñe a toda la célula de un color gris a negro. Nosotros encontramos un 80 % de viabilidad, determinada como se indica en métodos.

1, 2 Los protoplastos bacterianos obtenidos por acción de la lisozima (Foto # 2), se les determinó la viabilidad por la prueba de regeneración del protoplasto, en un medio sólido (A1,1). Cuando un protoplasto bacteriano viable se incubaba en un medio isoosmótico sin enzimas degradantes de su pared celular, regenera su pared celular, y es capaz de desarrollarse en medio sólido con todas sus características coloniales. Nosotros encontramos un 70 % de viabilidad, determinada como se indica en métodos.

##### 2.- ANÁLISIS MICROSCÓPICO A CONTRASTE DE FASES DE LA AUTORADIOGRAFÍA DEL PRODUCTO DE FUSIÓN:

Para determinar si se había formado un híbrido en el experimento, se utilizó la emulsión fotográfica, que detectaría la marca radioactiva del ADN bacteriano.

La laminilla utilizada para la fotografía # 1, es una preparación de medio líquido, que sólo contiene células vegetales. En esta fotografía podemos observar el tejido vegetal y los protoplastos obtenidos de este tejido. Se observa claramente que el protoplasto vegetal carece de la pared celular y tiene una forma esférica.

La laminilla utilizada para la fotografía # 2, es una laminilla testigo; que contiene protoplastos bacterianos sin pulso radioactivo y, protoplastos vegetales en ausencia de agente fusinante. En esta fotografía podemos observar la diferencia de tamaño entre los protoplastos vegetales y bacterianos, en el protoplasto vegetal podemos observar estructuras como; los dos núcleos, cloroplastos y quizá algunas vacuolas.

La laminilla utilizada para la fotografía # 2A, es una preparación de medio líquido, que sólo contiene bacterias. En esta fotografía podemos observar que las bacterias han perdido su forma bacilar, y que tres protoplastos bacterianos se encuentran fusionándose.

Para las fotografías 3 y 3A se utilizó una laminilla experimental que contiene; protoplastos bacterianos con pulso radioactivo, protoplastos vegetales y agente fusinante. En el caso de la Foto # 3 observamos un protoplasto vegetal con núcleo bien definido, cloroplastos, vacuolas, y algunas bacterias en el medio. En la foto # 3A observamos la marca autorradiográfica muy intensa sobre el protoplasto vegetal, algunos granos autorradiográficos se encuentran concentrados sobre el núcleo.

Las fotografías 4 y 4A fueron tomadas de una laminilla experimental. En la foto # 4 observamos dos protoplastos vegetales fusionándose, sus membranas están unidas pero sus citoplasmas aún no se han mezclado, los núcleos se observan bien definidos y se encuentran algunas bacterias en el medio. En la foto # 4A observamos la marca autorradiográfica -- que se encuentra más intensa en el protoplasto de mayor tamaño.

Las fotografías 5 y 5A fueron tomadas de una laminilla experimental. En la foto # 5 observamos un sincicio de nueve núcleos bien definidos, se observan bacterias en el medio y algunas unidas al sincicio. En la foto # 5A observamos la marca autorradiográfica muy intensa en el sincicio y algunos gránulos autorradiográficos en el medio, que corresponden a bacterias no fusionadas.

Las fotografías 6 y 6A fueron tomadas de una laminilla experimental. En la foto # 6 observamos dos protoplastos vegetales fusionados, en donde se distingue un núcleo bien definido y otro desenfocado, decimos fusionados porque las membranas se fusionaron y los citoplasmas ya se mezclaron y parece ser que han comenzado a formar estructuras de protección como es la pared celular. El porcentaje de este tipo de células es de aproximadamente un 3 %. En la foto # 6A observamos la marca autorradiográfica - polarizada hacia los núcleos de esta célula y casi no se observa marca -- autorradiográfica en el medio.

Las fotografías presentadas son una selección de lo más representativo del experimento.

El porcentaje de protoplastos vegetales fusionados entre sí -- es de un 90 % y el porcentaje de protoplastos vegetales que se les encontró marca radioactiva es de un 80 %.

Dados los resultados concluimos que el producto de fusión es un híbrido del vegetal y la bacteria.

### 3.- VIABILIDAD DEL HIBRIDO.

Para demostrar que este híbrido mantiene sus características funcionales y dado que todavía es un protoplasto, decidimos utilizar la -- funcionalidad de su membrana para la prueba de viabilidad por exclusión de colorante, donde obtuvimos un 70 % de viabilidad.

#### V DISCUSION:

El estudio de la fusión de protoplastos vegetales comenzó en 1909 por Kuster, usando sales de nitrato de sodio y es hasta 1974 cuando Kao y Michayluk utilizan el PEG, dando aplicaciones muy fuertes a la agricultura, ya que promueve la transferencia de genes entre vegetales que no pueden cruzarse sexualmente, estos métodos se han usado, en la mayoría de las veces, para dar a los vegetales una mayor resistencia a enfermedades (Gamborg, 1981). Sin embargo no se ha trabajado sobre los requerimientos nutritivos de los vegetales.

Por otra parte la fusión de bacterias comienza en 1976 con Katalin Fodor y Col. En Bacillus megaterium y Pierre Schaeffer en Bacillus subtilis. Ellos obtienen cepas recombinantes a partir de microorganismos auxotróficos, estos datos son muy importantes para la Microbiología, pero ellos en sus artículos, no mencionan la posibilidad de una fusión vegetal-bacteria.

Un antecedente importante es que en el congreso nacional de bioquímica (1976) el Dr. Yamada Yasakuki mencionó que ahora trabajan en la fusión de algas azul - verdes y plantas superiores. En los artículos revisados no han aparecido resultados sobre estos experimentos.

La mezcla PEG-DMSO fué usada por primera vez en microorganismos por el Dr. Hopwood en 1977, donde reportó un incremento en la recombinación entre cepas de Streptomyces coelicolor. Nosotros decidimos utilizar esta mezcla porque en los primeros experimentos al utilizar solamente PEG, los resultados de la autorradiografía reportaban sólo dos o tres granos -- autorradiográficos en el citoplasma.

Desde el punto de vista celular podemos decir que a nivel de-

microscopía de luz y con contraste de fases los protoplastos vegetales y los híbridos mantienen en forma normal sus estructuras fundamentales y aparentemente en algunos casos como es el caso de la Fotografía # 5 se generan estructuras de protección como es la pared celular; aunque es conveniente realizar un examen con microscopía electrónica para observar con más detalle posibles alteraciones a nivel de ultraestructura celular. En el caso de la fotografía # 3 podemos observar que los citoplasmas aún no se han mezclado y esto corresponde a los pasos de la fusión celular, además la marca se encuentra polarizada a uno de los núcleos lo que sugiere que la fusión con la bacteria ocurrió un momento antes. En el caso de la fotografía número 5 algunos autores Motoyoshi, 1971; Power y Col. 1970; Withers y Col., 1972 describen que después de la regeneración de la pared celular y la primera división, los núcleos hijos abandonan el sincicio, es decir, que el sincicio se fragmenta en algunas células híbridas normales. La viabilidad del producto híbrido es un dato que no debe despreciarse ya que representa la recuperación de estas células para convertirlas en callo y después en plántula.

Es también importante recordar que las pruebas de viabilidad sólo se refieren a la funcionalidad de la membrana, ya que ésta es la que realiza la función de exclusión del colorante. Existen algunos casos donde la membrana se puede encontrar dañada, pero los organitos celulares en buen estado, o el caso contrario, donde algunos organitos celulares se encuentran dañados, y la membrana se encuentre en buen estado.

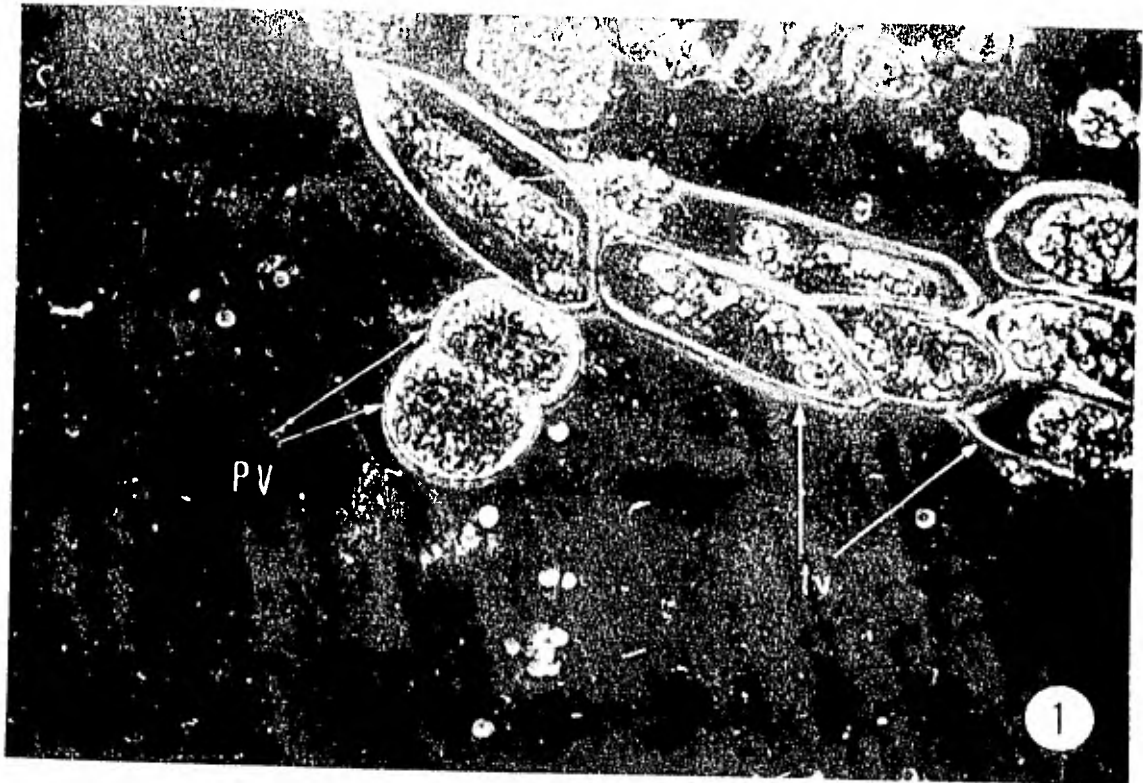
El protoplasto vegetal es muy sensible a los fijadores, en nuestros experimentos al poner el fijador en contacto con los protoplastos, éstos estallaban. Después de que probamos gran variedad de fijadores, se decidió utilizar el formaldehído en goteo, donde la concentración del fijador aumenta gradualmente y el protoplasto se fija lentamente.

Cuando se observan los protoplastos vegetales o híbridos, en tinción, ésta enmascara la marca autorradiográfica. Al observar con contraste de fases en agua o aceite de inmersión las estructuras no se observan bien definidas, pero al usar aceite de medio de inclusión para análisis de cristales (Aceite Carl-Zeiss  $N_D-1.515$ ) las estructuras resaltan como se muestra en las fotografías.

Los resultados de los experimentos son muy halagadores ya que sí pueden fusionarse estas 2 especies, existe la posibilidad de una recombinación genética entre la bacteria y el vegetal, y con esto quizá la manifestación biológica de que el híbrido fijará nitrógeno. Ahora bien si el maíz como planta fijara nitrógeno, esto sería un gran avance para la agricultura ya que se eliminaría el uso de fertilizantes nitrogenados.

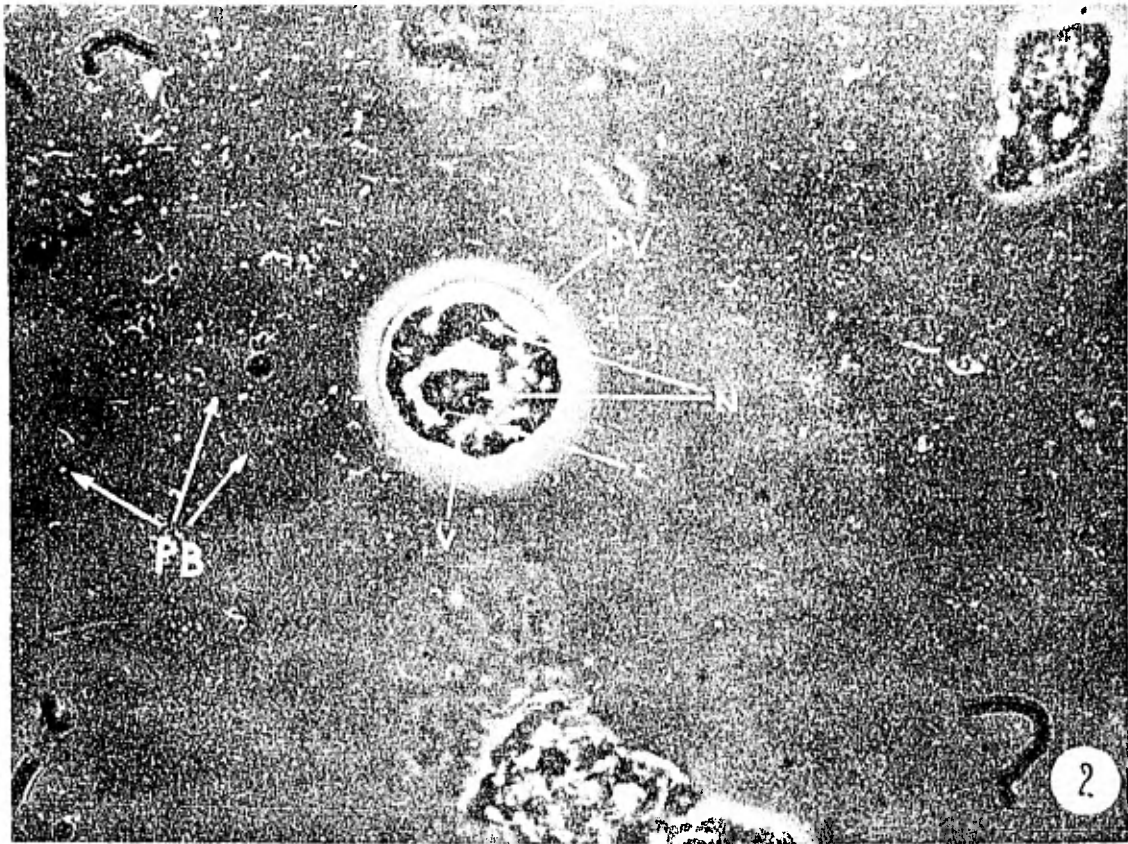
Es importante recordar que éste no es un trabajo terminado, que apenas comienza esta línea de investigación, que aún faltan muchos experimentos antes de decir que el híbrido obtenido por nosotros, es útil para la agricultura, alimentación, y la investigación en general.





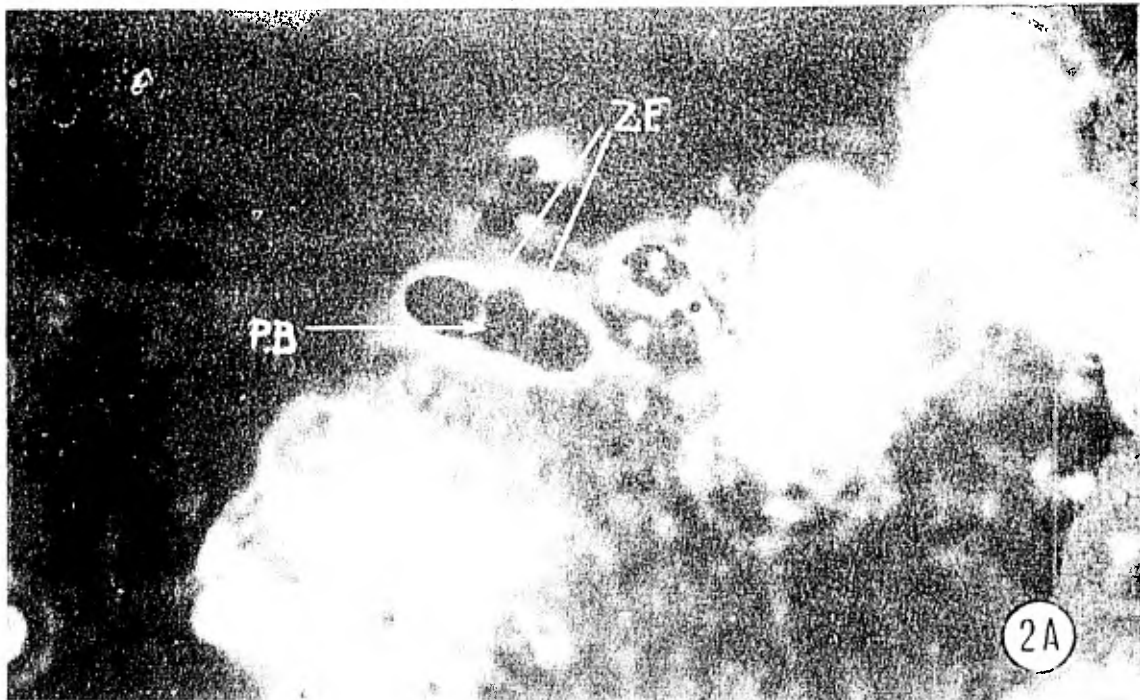
Fotografía No. 1.—

Laminilla de medio líquido. Obtención de protoplastos vegetales. (PV) protoplasto vegetal, (tv) tejido vegetal. 1000 X



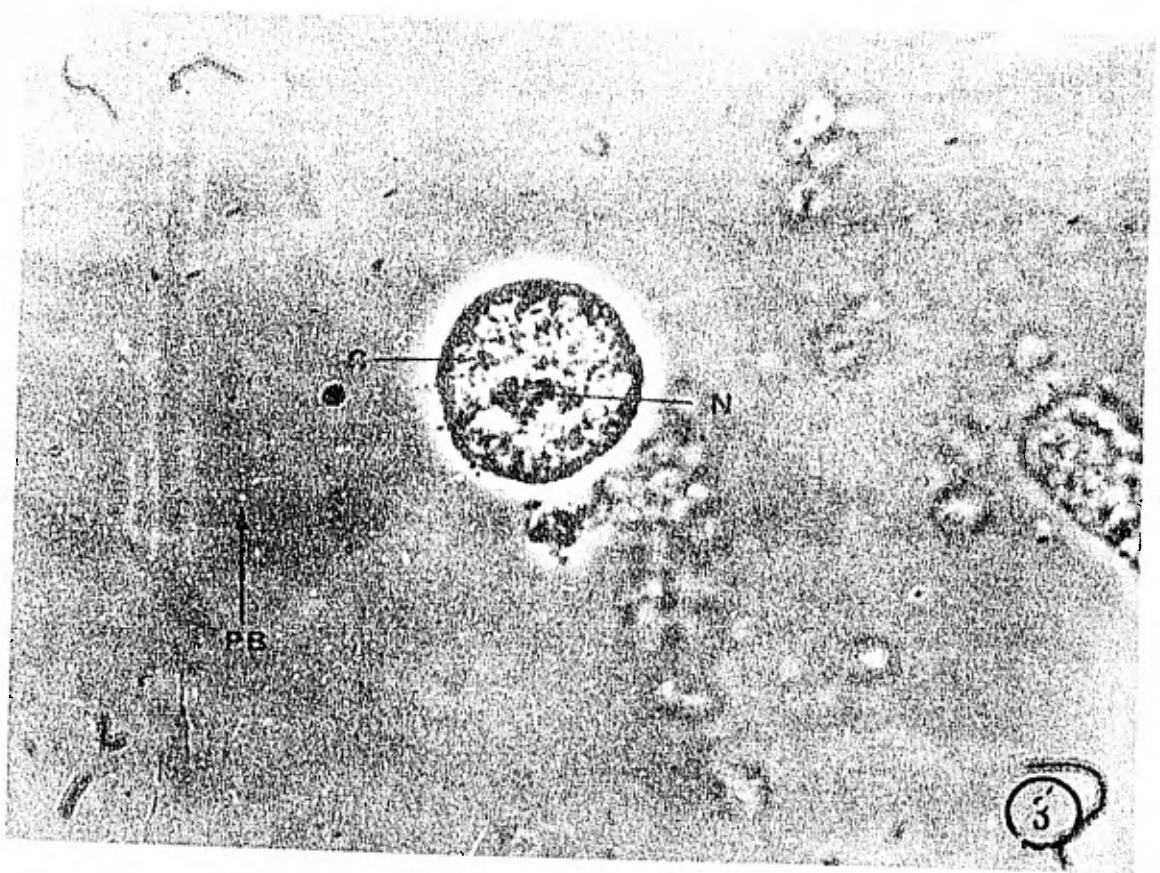
Fotografía No. 2.—

Laminilla testigo. Protoplasto vegetal binucleado, sin marca radioactiva, (PV) protoplasto vegetal, (PB) protoplasto bacteriano, (N) Núcleo, (v) vacuola, (c) citoplasma. 1000 X.



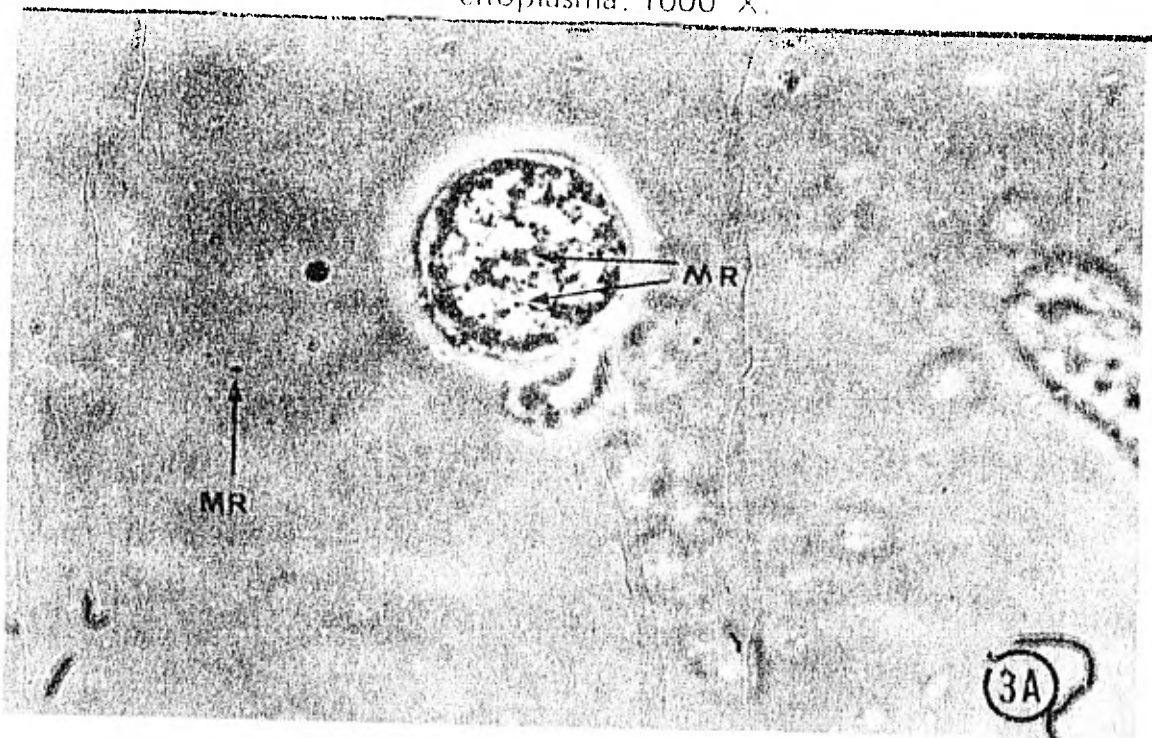
Fotografía No. 2A.

Laminilla de medio líquido. Tres bacterias fusionándose. (PB) protoplasto bacteriano, (ZF) zona de fusión. 2500 X.



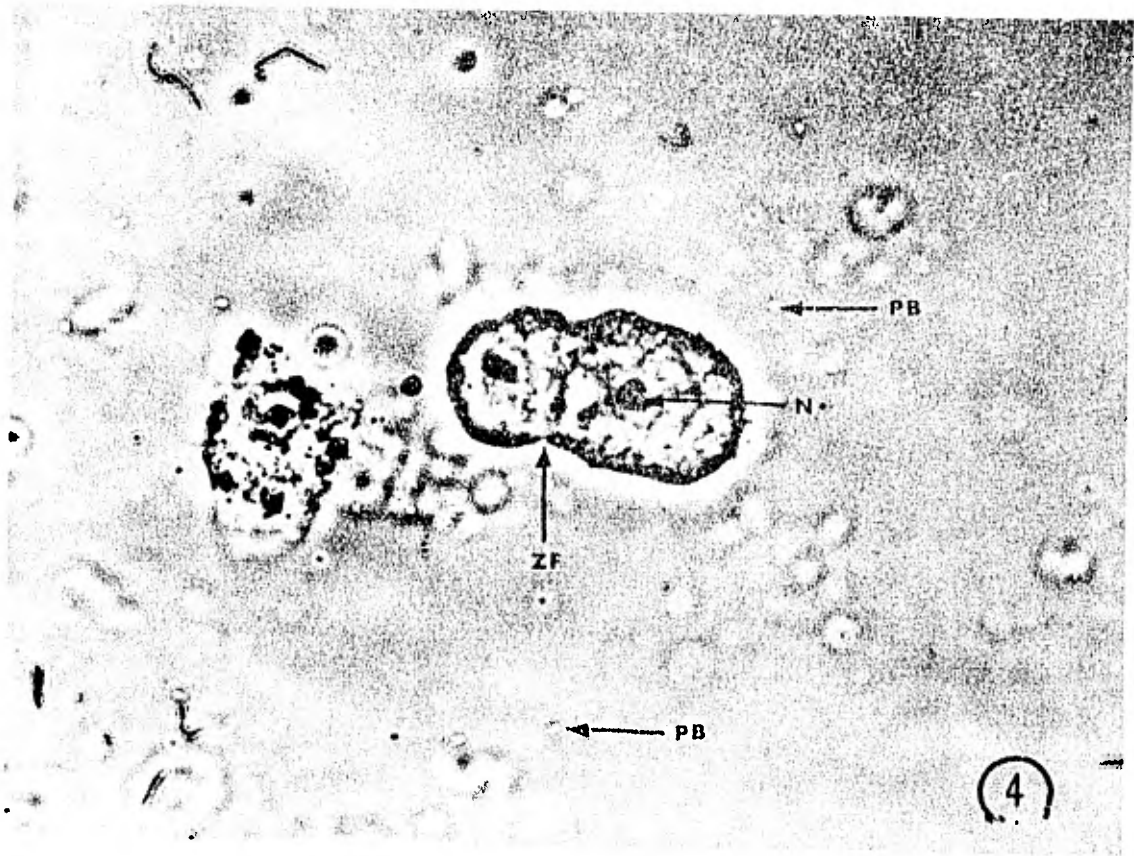
Fotografía No. 3.—

Laminilla experimental. Protoplasto vegetal con marca, se observa el núcleo. (N) núcleo, (PB) protoplasto bacteriano, (c) citoplasma. 1000 X.



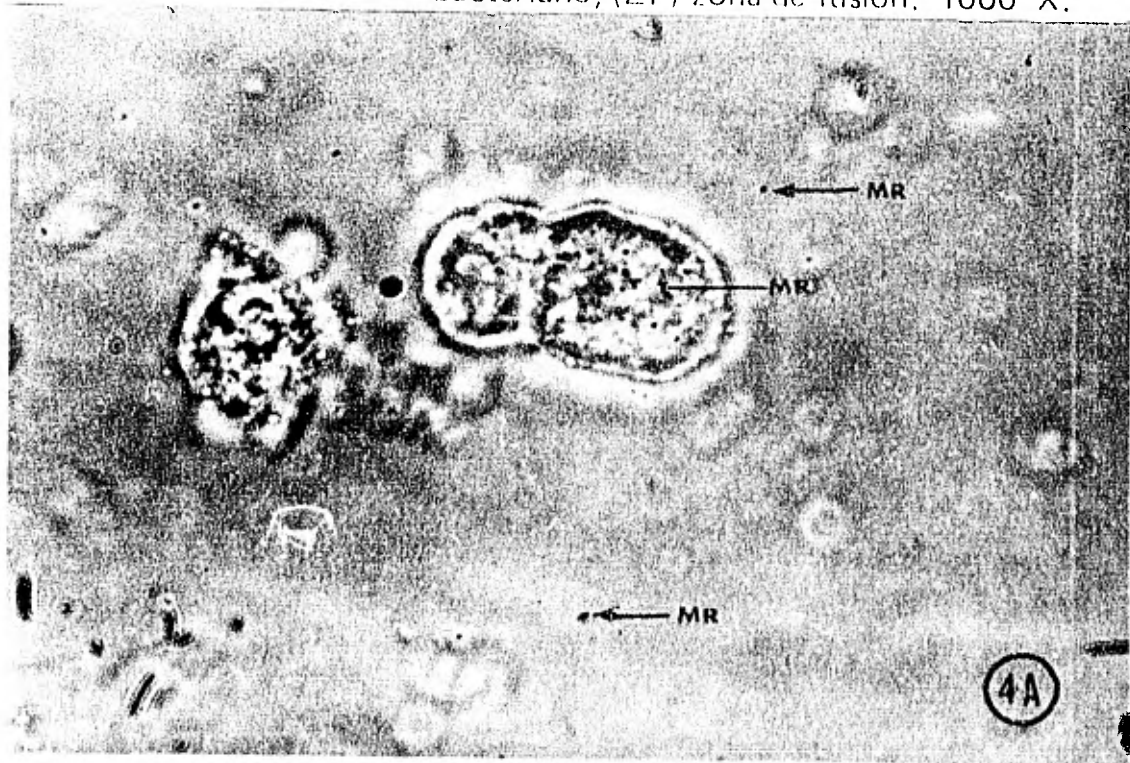
Fotografía No. 3A.—

Laminilla experimental. Protoplasto vegetal con marca, se observa la marca. (MR) marca radioactiva. 1000 X.



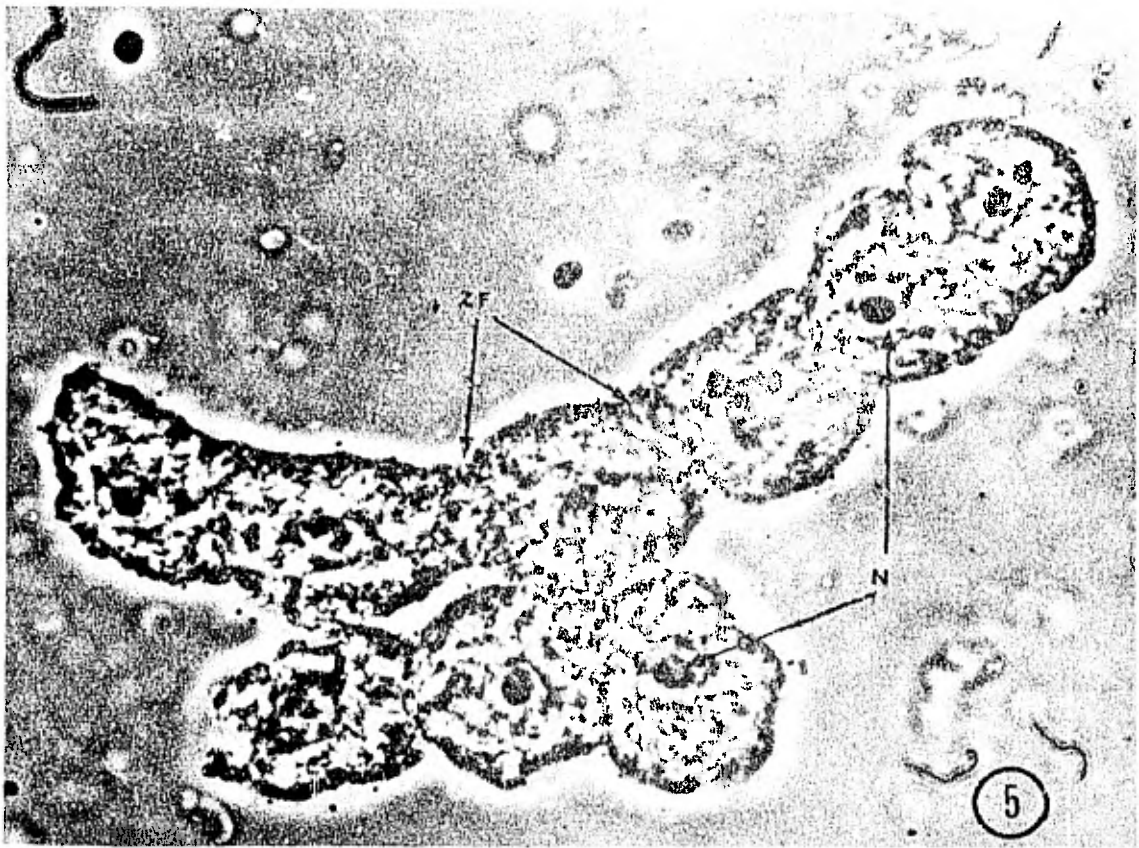
Fotografía No. 4.—

Laminilla experimental. Protoplastos fusionándose. (N) núcleo, (PB) protoplasto bacteriano, (ZF) zona de fusión. 1000 X.

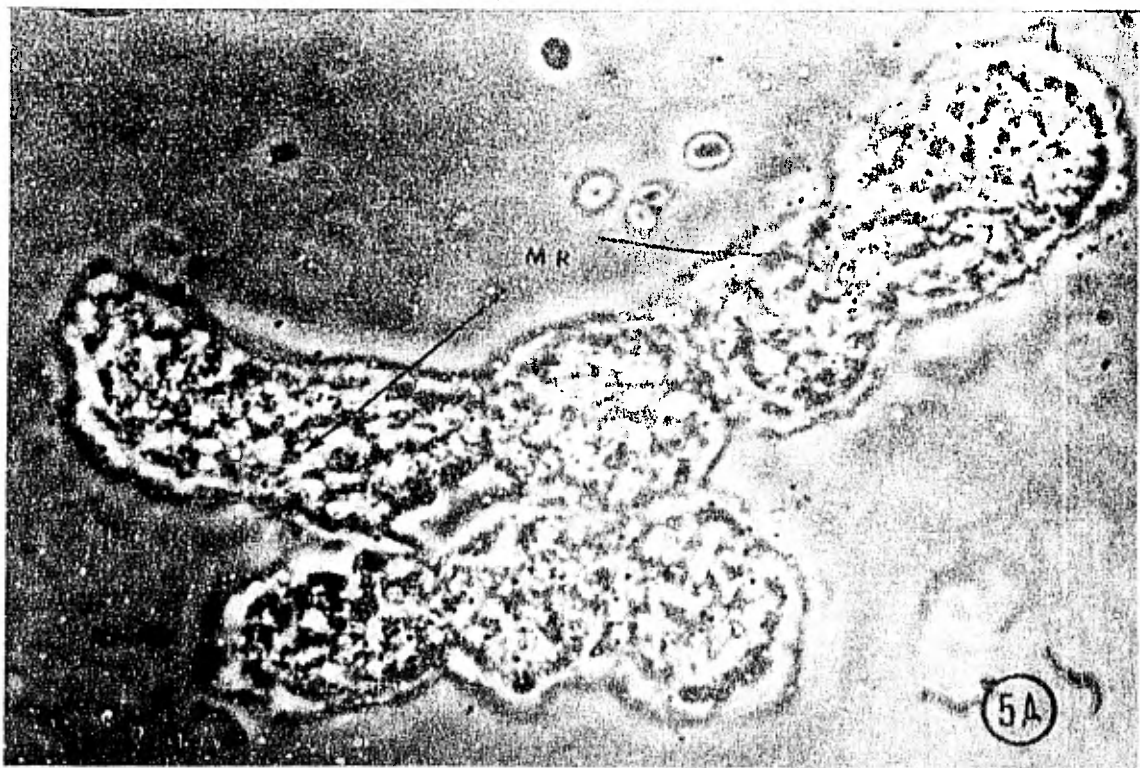


Fotografía No. 4A.—

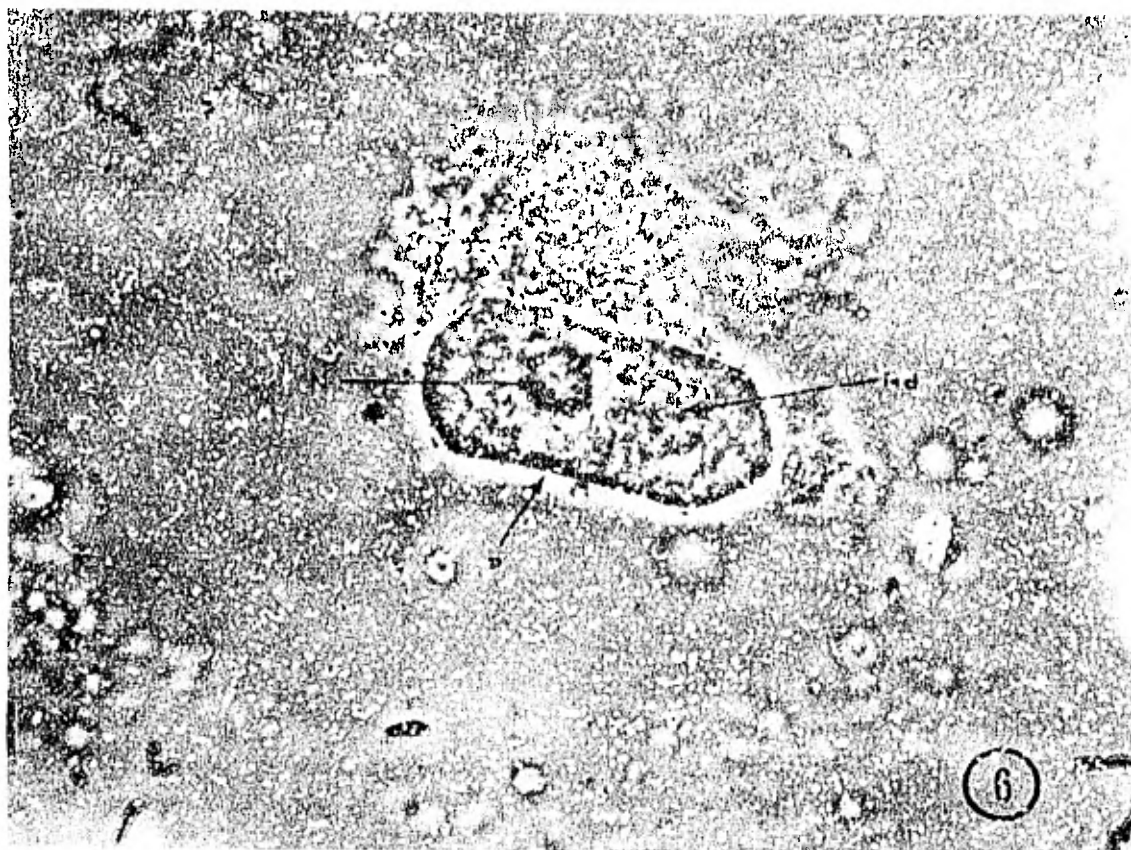
Laminilla experimental. Protoplastos fusionándose. (MR) marca radioactiva. 1000 X.



Fotografía No. 5.— Laminilla experimental. Sincicio de nueve núcleos. (N) núcleo, (ZF) zona de fusión. 1000 X.

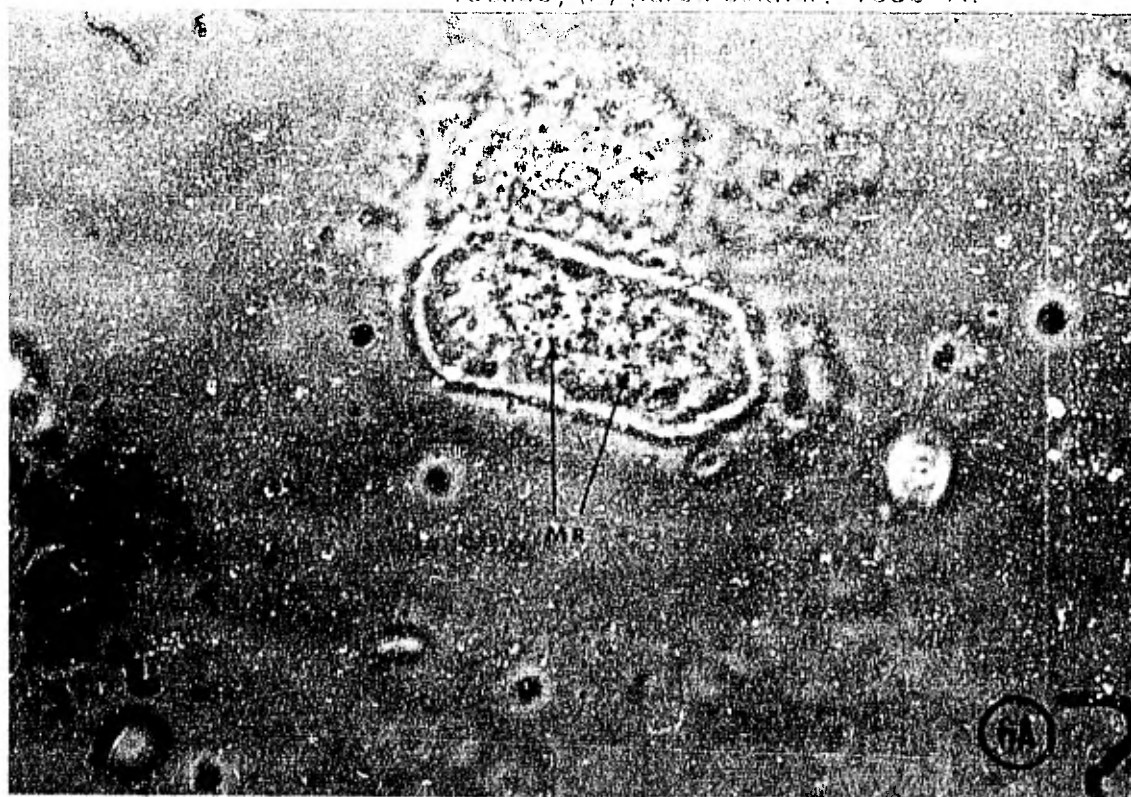


Fotografía No. 5A.— Laminilla experimental. Sincicio de nueve núcleos. (MR) marca radioactiva. 1000 X.



Fotografía No. 6.—

Laminilla experimental. Protoplastos fusionados. (N) núcleo, (Nd) núcleo desenfojado, (P) pared celular. 1000 X.



Fotografía No. 6A.—

Laminilla experimental. Protoplastos fusionados. (MR) marca radioactiva. 1000 X.

VII REFERENCIAS

- 1.- CONSTABEL, F. (1976). Somatic Hybridization in Higher Plants. In -  
Vitro. 12:11 pp 743 - 748.
- 2.- COCKING, E. C. (1960). A method for the Isolation of plant proto-  
plasts and vacuoles. Nature Sep 157:962 - 963
- 3.- DAVIDSON, R. L. (1976). Improved techniques for mammalian cell hi-  
bridization by PEG. Somatic Cell Genet. 2: 165 - 176.
- 4.- DICUMACKOS, E. G. and Tatum E. L. (1972) Fusion of mammalian soma-  
tic cells by Microsurgery. Proc. Nat. Acad. Scr. --  
69 : 2959 - 2962 .
- 5.- DOBEREINER, J., MARRIEL, I. E. and NERY, M. (1976). Ecological --  
Distribution of Spirillum Lipoferum Beijerinck. - -  
Can. J. Microbiol. 22: 1464 - 1473.
- 6.- DOBEREINER, J. (1979). Fijación de Nitrógeno en Gramíneas Tropica-  
les. INTERCIENCIA 4:4 Jul - Ago.
- 7.- ENCRICLOPAEDIA BRITANNICA. (1974). Mikropedia London Vol. VI - --  
p. 514 - 515.
- 8.- FREEDEN, F. J. H. (1960). A. Method for the Isolation of Plant --  
Protoplasts and Vacuoles. Nature 187: September.
- 9.- FODOR, K. DEMIRI, E. and ALFOLDI, F. (1978). Polyethylene Glycol-  
Induced Fusion of Heat-Inactivated and Living Proto--  
plasts of Bacillus Megaterium. J. Bac. 135:1, 68-70.

- 10.- FODOR, K. and ALFOLDI, L. (1976). Fusion of Protoplasts of Bacillus megaterium. Proc. Nat. Acad. Sci. 73:6, - - -  
2147 - 2150.
- 11.- GAMBORG, O. L. and BOTTINO, P. J. (1981). Protoplast in Genetic Modifications of Plants Advances in Biochem. Engin. 19: 239 - 260.
- 12.- HAWLEY, G. G. (1975). Diccionario de química y de productos químicos. Ediciones Omega Barcelona (ESPAÑA).
- 13.- HOPWOOD, D. A., WRIGHT, H. M., BIBB, M. J., and COHEN, S. N. - - (1977). Genetic Recombination Through protoplast Fusion in Streptomyces Nature 268: 171 - 174, July.
- 14.- JOLLES, P. (1960). Lysozime. The Enzymes. Vol. 4 Academic Press N. Y. 2a. Ed. pp 431 - 444.
- 15.- KAO, K. N. and MICHAYLUK, M. R. (1974). A method for High frequency Intergenetic fusion of plant protoplast. Planta - 115 : 355 - 367.
- 16.- LUCY, J. A., Ahkong, Q. F., Cramp, D., Fisher and Howell, I. (1971). Cell (fusion with out viruses. Biochem. J. 124: 46 - 47
- 17.- MARTINES, M. S. (1979). Algunos Aspectos Ecológicos de la Simbiosis Azospirillum - Gramíneas. Tesis Profesional. Facultad de Química, UNAM.
- 18.- MOTOYOSHI, F. (1971). Protoplasts Isolated From Callus cells of - Maize Endosperm. Formation of Multinucleate Protoplasts and Nuclear Division. Expt. Cell. Res. Vol. 68 : - 452 - 456.



- 19.- NEYRA, C. A. and DOBEREINER, J. (1977). Denitrification by  $N_2$  fixing Spirillum Lipoferum. Can. J. Microbiol. 23: 300-305.
- 20.- OKON, Y. ALBRECHT, S. L. and BURRIS, R. H. (1976). Factors - - affecting growth and nitrogen fixation of Spirillum Lipoferum. J. Bacteriol. 127; 3F. 1248-1254.
- 21.- PONTECORVO, G. (1975). Production of indefinitely Multipliyng -- mammalian somatic all hibrids by Polyethylene Glicol (PEG) treat ment. Somatic. Cell Genet. 1: 397 - 400.
- 22.- POWER, J. B. and COCKING. E. C. (1970). A siple method for the - isolation a very large numbers of leaf protoplasts -- by using mixtures of cellulasa and pectinase. Proc. - Biochem Soc. 3: P. 33
- 23.- POWER, J. B. CUMINS, S. E. and COCKING, E. C. (1970). Fusion of - isolated plant protoplast. Nature 225; 1016 - 1018.
- 24.- SMITH, R. L. BOUTON, J. H. TYLER, M. E. GASKINS, M. H. LITTELL, - R. C. (1976). Nitrogen fixation in grasses inoculated with Spirillum Lipoferum. Science 193: 1003-1005.
- 25.- SCHAEFFER, P. CAMI, B. and HOTCHKISS, R. D. (1976). Fusion of bac terial protoplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 6, p. - 2151 - 2155.
- 26.- STEPLEWSKI, Z. and Koprowski. (1970). Somatic cell fusion and -- hybridization. Methods in Cancer Research. Acad. Pross 5: 155 - 191 (1970).
- 27.- ROGERS, A. W. (1967). Techniques of Autoradio graphy. ELSEVIER -- publishing company. New York.

- 28.- TARRAND, J. J. KREIG, N. R. and DOBEREINER, J. (1978). A taxonomic study of the Spirillum Lipoferum group, with descriptions of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species, Azospirillum Lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and - Azospirillum Brasilense sp. nov., Can. J. Microbiol.- 24: 967-980.
- 29.- WATKINS, J. F. (1971). Fusion of cells for virus studies production of cell hybrids Methods in Virology. 5: 1-32.
- 30.- WEBER, G. (1979). PLANT TISSUE CULTURE COURSE. Curso de cultivo - de tejidos vegetales, Fac. de Química, Div. de Est. de Posgrado UNAM.
- 31.- YAMADA, Y. y KAMEYAMA, K. L. (1976). Estudios sobre el aislamiento y fusión de protoplastos de diferentes plantas. XI Reunión Nacional, Sociedad Mexicana de Bioquímica, -- A. C. p. 157.
- 32.- ZIMMERMAN, U. SCHEURICH, P. PILWAT, G. and BENZ, R. (1981). Cell with manipulated functions: New perspectives for cell biology, medicine, and technology, Angewandete Chemie. 20:4 p. 325-344.

APENDICE 1

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES:

1.- MEDIO DE PAPA PARA AISLAMIENTO DE AZOSPIRILLUM:

Cocer 200 g. de papa cortada con cáscara, filtrar por algodón, añadir 5 g de Ac. málico, 4 g. de KOH, 5 g. de azúcar comercial, ajustar el pH a 6.8; adicionar un ml. de Biotina (10 mg./100ml.), 15 g de agar, todo esto para un litro de medio. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. (Martínez, 1979)

2.- MEDIO SEMISOLIDO PARA AISLAMIENTO DE AZOSPIRILLUM:

Ac. MÁLICO	_____	5.0	g.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	_____	0.5	g.
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	_____	0.2	g.
NaCl	_____	0.1	g.
CaCl <sub>2</sub>	_____	0.02	g.
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	_____	0.002	g.
MnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	_____	0.1	g.
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	_____	0.5	g.
KOH	_____	4.5	g.
BIOTINA (10 mg./100 ml)	_____	1.0	ml.
AZUL DE BROMO TIMOL (0.5 % en ETOH)	_____	2.0	ml.
AGAR	_____	1.75	g.

Ajustar el pH a 6.8 completar a 1 lt. con agua destilada y esterilizar a 121 °C por 15 min. a 15 lib. de presión. --

(Okon, 1976)

3.- MEDIO DE PROPAGACION PARA AZOSPIRILLUM:

Ac. MÁLICO _____	5.0 g.
$K_2HPO_4$ _____	0.5 g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ _____	0.2 g.
NaCl _____	0.1 g.
$CaCl_2$ _____	0.02 g.
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ _____	0.002 g.
$MnSO_4 \cdot H_2O$ _____	0.01 g.
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ _____	0.5 g.
KOH _____	4.5 g.
EXTRACTO DE LEVADURA _____	0.02 g.

Ajustar el pH a 6.8, completar a un litro con agua destilada y esterilizar a 121 °C por 15 min. a 15 lb. de presión - -  
(Martínez, 1979)

4.- SOLUCION PARA PROTOPLASTOS VEGETALES Y BACTERIANOS:

$CaCl_2$ _____	0.155 g.
$K_2HPO_4$ _____	0.100 g.
SORBITOL _____	4.550 g.
MANITOL _____	4.550 g.

Ajustar el pH a 6.4, completar a 100 ml. con agua destilada y esterilizar por filtración con poro de 0.22  $\mu$  (Weber, 1979)

5.- SOLUCION PARA PRUEBA DE VIABILIDAD DE PROTOPLASTOS VEGETALES:

Preparar una solución de nigrosina al 0.05 % en solución para protoplastos.

6.- SOLUCION DE LISOZIMA:

LISOZIMA _____	0.02 g.
EDTA _____	0.155 g.
NaCl _____	0.05 g.
$K_2HPO_4$ _____	0.10 g.
SORBITOL _____	4.55 g.
MANITOL _____	4.55 g.

Ajustar el pH a 6.4, completar con agua bidestilada a 100 ml. y esterilizar por filtración con poro de  $0.45 \mu$  (Millipore, - etc.)

7.- SOLUCION DE ENZIMAS PARA VEGETALES:

ONOUCA r-10	2.0 g.
HEMICELULASA SIGMA	2.0 g.
PECTINASA	1.0 g.

Completar con solución para protoplastos hasta 100 ml. Ajustar el pH a 5.5 y esterilizar por filtración con poro de 0.45 (Weber, 1979)

8.- SOLUCION DE PULSO RADIOACTIVO:

Tomar 25 m Curies y aforar a 10 ml. con medio de propagación. Esta solución se prepara en el momento de usar-- se.

$2.5 \mu$  Curies/ml.

9.- MEZCLA PEG-DMSO:

Preparar una solución de DMSO al 5 % en solución - para protoplastos. Pesar 5 g. de PEG (PM 6000) y licuarlos a

60 °C en baño de maría. Agregar 5 ml. de la solución de DMSO y seguir calentando con agitación hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. a 15 lib. - de presión. Este mezcla debe conservarse a 40 °C.

10.- SOLUCION FIJADORA DE FORMALDEHIDO:

Preparar una solución de formaldehído al 15 % en solución para protoplastos. Esterilizar por filtración con poro - de 0.22 $\mu$ .

11.- SOLUCION DE GELATINA:

GELATINA	_____	0.5	g.
SULFATO DOBLE DE CROMO	_____	10	mg.
AGUA DESTILADA (60 °C)	_____	100	ml.

Se disuelve la gelatina y el alumbre de cromo en el agua caliente y se filtra antes de usarla.

12.- EMULSION FOTOGRAFICA KODAK:

Diluir la emulsión Kodak NTB 2, 1:2 en agua destilada a 40 °C. Esto debe hacerse en cuarto oscuro y con luz de seguridad. Preparar en el momento de usarse.