



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: “El cultivo de protoplastos como  
herramienta biotecnológica aplicable a las plantas  
medicinales”.**

**Autor: Félix Márquez González**

**Fecha: Junio de 2019**

**Tutor: María Soledad Martín Gómez**

## **Resumen.**

Los protoplastos son células vegetales desprovistas de pared celular que juegan un papel fundamental en la biotecnología vegetal. Por sus características, entre otras aplicaciones, se podrían considerar como una alternativa a los cultivos vegetales tradicionales y también sería posible su manipulación genética con la utilización de vectores. Además, mediante los protoplastos se pueden superar la incompatibilidad entre cruces de especies, induciendo a la formación de híbridos somáticos. En función de la finalidad y de la especie objeto de estudio, se seleccionaría el método más adecuado. Una vez se hayan obtenido las células con las características deseadas, se puede regenerar la planta completa, llevar a cabo un cultivo selectivo de sus órganos o realizar un cultivo *in vitro*. Los protoplastos también se podrían utilizar como biofactorías, mejorando la producción de los metabolitos secundarios de la especie seleccionada (con la adición de precursores, elicitación, etc.). Por todo ello, los protoplastos se pueden considerar una herramienta de gran utilidad, tanto para el desarrollo de las plantas medicinales, como para mejorar la producción de los compuestos de interés.

**Palabras clave:** protoplastos, híbrido somático, biotecnología vegetal, metabolitos secundarios, plantas medicinales.

## **Abstract**

Protoplasts are plant cells devoid of cell walls that play a fundamental role in plant biotechnology. Due to their characteristics, among other applications, they could be considered as an alternative to traditional vegetable crops and their genetic manipulation with the use of vectors would also be possible. In addition, protoplasts can overcome the incompatibility between species crossings, inducing the formation of somatic hybrids. Depending on the purpose and the species under study, the most appropriate method would be selected. Once the cells have been obtained with the desired characteristics, the whole plant can be regenerated, selectively culture their organs or carry out an *in vitro* culture. Protoplasts could also be used as biofactories, improving the production of the secondary metabolites of the selected species (with the addition of precursors, elicitation, etc.). Therefore, protoplasts can be considered a very useful tool both for the development of medicinal plants and to improve the production of compounds of interest.

**Key words:** protoplasts, somatic hybrid, vegetal biotechnology, secondary metabolites, medicinal plants.

## **Introducción**

Los protoplastos son células que excluyen a la pared celular, por lo que poseen los orgánulos típicos de una célula, membrana plasmática, núcleo y vacuolas así como un citoplasma con una gran cantidad de enzimas donde se desarrollan las reacciones metabólicas. Los protoplastos vegetales pueden dividirse, formar colonias, volver a sintetizar la pared celular y bajo ciertas condiciones regenerar completamente una planta (1) (9).

En este trabajo se van a tratar las aplicaciones de los protoplastos para el cultivo de plantas medicinales. Los protoplastos pueden proceder de distintas partes de la planta (tallo, hojas, frutos, etc.) y siempre deben de aislarse siguiendo un protocolo de asepsia para prevenir la contaminación microbiológica de la muestra (5).

Una vez aisladas las células vegetales se les eliminará la pared celular por medios mecánicos o enzimáticos. El método mecánico es menos utilizado que el enzimático ya que está restringido a tejidos con gran cantidad de células, con grandes vacuolas y poco tejido meristemático. Este es un proceso complejo y se ha visto que da lugar a protoplastos con una viabilidad bastante baja y en la actualidad solo está recomendado cuando no es posible el método enzimático (2)

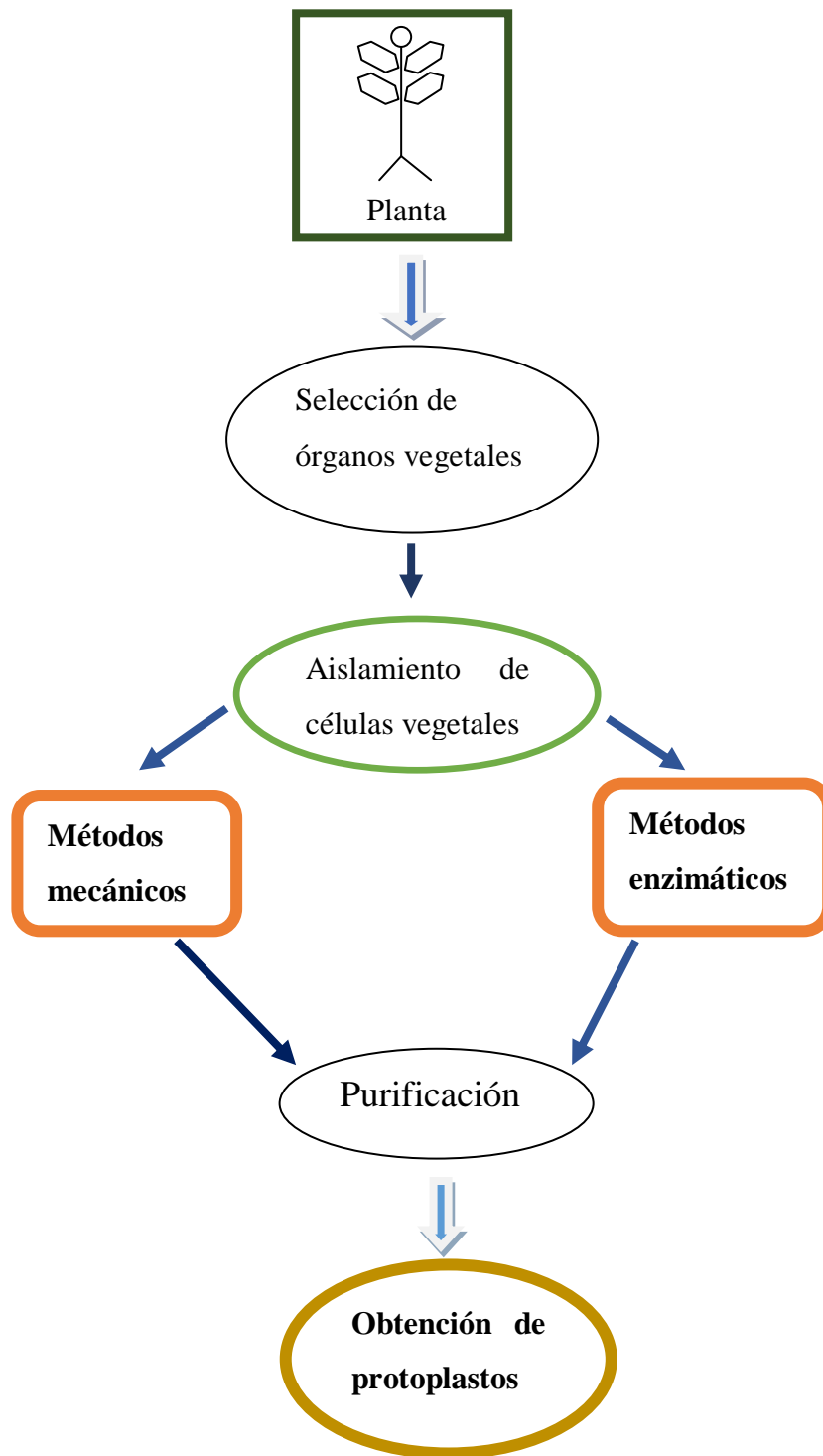
El método enzimático consiste en la incubación de las células vegetales del explanto (muestra de tejido vegetal del que se extraen las células que se van a cultivar) en una mezcla enzimática comercial, principalmente compuesta por celulasas, hemicelulasas y pectinasas de diverso tipo. Estas enzimas se encargan de degradar los componentes de la pared celular así como el tejido conector que une a las células entre sí, de forma que los protoplastos puedan quedar aislados en la suspensión. Estas preparaciones comerciales suelen contener reguladores, tanto del pH como de la osmolaridad, para asegurar una actividad óptima de las enzimas y una buena viabilidad de los protoplastos (2) (9).

Después de la digestión enzimática, se lleva a cabo un proceso de purificación para separar los protoplastos sanos, restos celulares, protoplastos rotos y células no digeridas entre otros componentes. Se les somete a una serie de procesos de centrifugación, filtración y lavado que resulta, finalmente en una suspensión pura de protoplastos (2) (Figura 1).

Hay que tener en cuenta que las condiciones a las que se someten los protoplastos durante el cultivo *in vitro*, no van a ser las mismas que se dan cuando se está cultivando una planta completa. Estas características diferentes pueden llevar a la expresión de nuevos genes que ya estaban presentes pero que no presentaban actividad. Esto requiere un amplio conocimiento previo de las rutas biosintéticas, de forma que se pueda predecir la respuesta de un determinado cultivo celular ante unas condiciones determinadas y buscar una finalidad específica (5).

Al igual que en la propia planta, las líneas celulares no son siempre estables y pueden mutar. Esto puede modificar tanto la cantidad de principio activo que se produce, como la naturaleza de este producto, lo que puede llevar al descubrimiento de nuevos metabolitos o simplemente hacer que una línea celular deje de ser útil. Por esta razón, cuando se está buscando únicamente la producción de metabolitos en grandes cantidades se seleccionaran líneas celulares estables (10).

Para encontrar líneas celulares estables de alto rendimiento, se cultivan primero las células en medio sólido, dando lugar a la formación de varias colonias diferentes y luego llevan a cabo varios subcultivos de cada una de esas colonias, realizándose exámenes macroscópicos (por ejemplo de producción de biomasa y producción de pigmento) y microscópicos acompañados de técnicas analíticas, lo que se conoce como *selección directa*. En el caso de que la característica que se está analizando no sea posible de comprobar macroscópicamente, se lleva a cabo una selección indirecta mediante ensayos analíticos. Como todas las técnicas no tienen un carácter universal, y en algunos casos pueden ser muy útiles para mejorar la producción de metabolitos de algunas especies (pigmentos *Lithospermum erythrorhizon*), pero pueden no dar resultados en otros (producción intensiva de codeína a partir de *Papaver somniferum*) (10) (7).

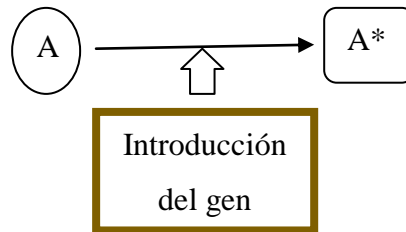


**Figura 1.** *Esquema del proceso para la obtención de protoplastos*

Posteriormente, los protoplastos se cultivarán en un medio con unos requerimientos nutricionales similares a los de las células vegetales completas, pero con la concentración de sales adaptadas a la falta de pared celular (por ejemplo los protoplastos tienen necesidades aumentadas de calcio). También requerirá una fuente de hidratos de carbono (normalmente glucosa), reguladores osmóticos (frecuentemente manitol y sorbitol), nutrientes esenciales (vitaminas, proteínas...) y fitohormonas para estimular el crecimiento celular (2).

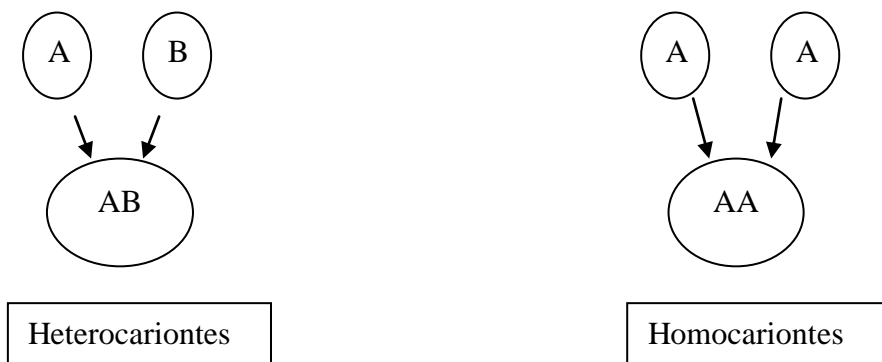
Una vez se han obtenido unos protoplastos viables, se puede empezar a pensar en las áreas para los que pueden ser útiles. Las aplicaciones de los protoplastos son muy diversas, entre ellas están la manipulación genética y la obtención de híbridos somáticos, sin olvidar otras aplicaciones como el estudio de las biomembranas (5).

Las técnicas de manipulación genética van a consistir en transformar una célula mediante la introducción de un gen exógeno que le aporte características de interés. Así la célula A se convertirá en una célula diferente llamada A\*(5) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de manipulación genética

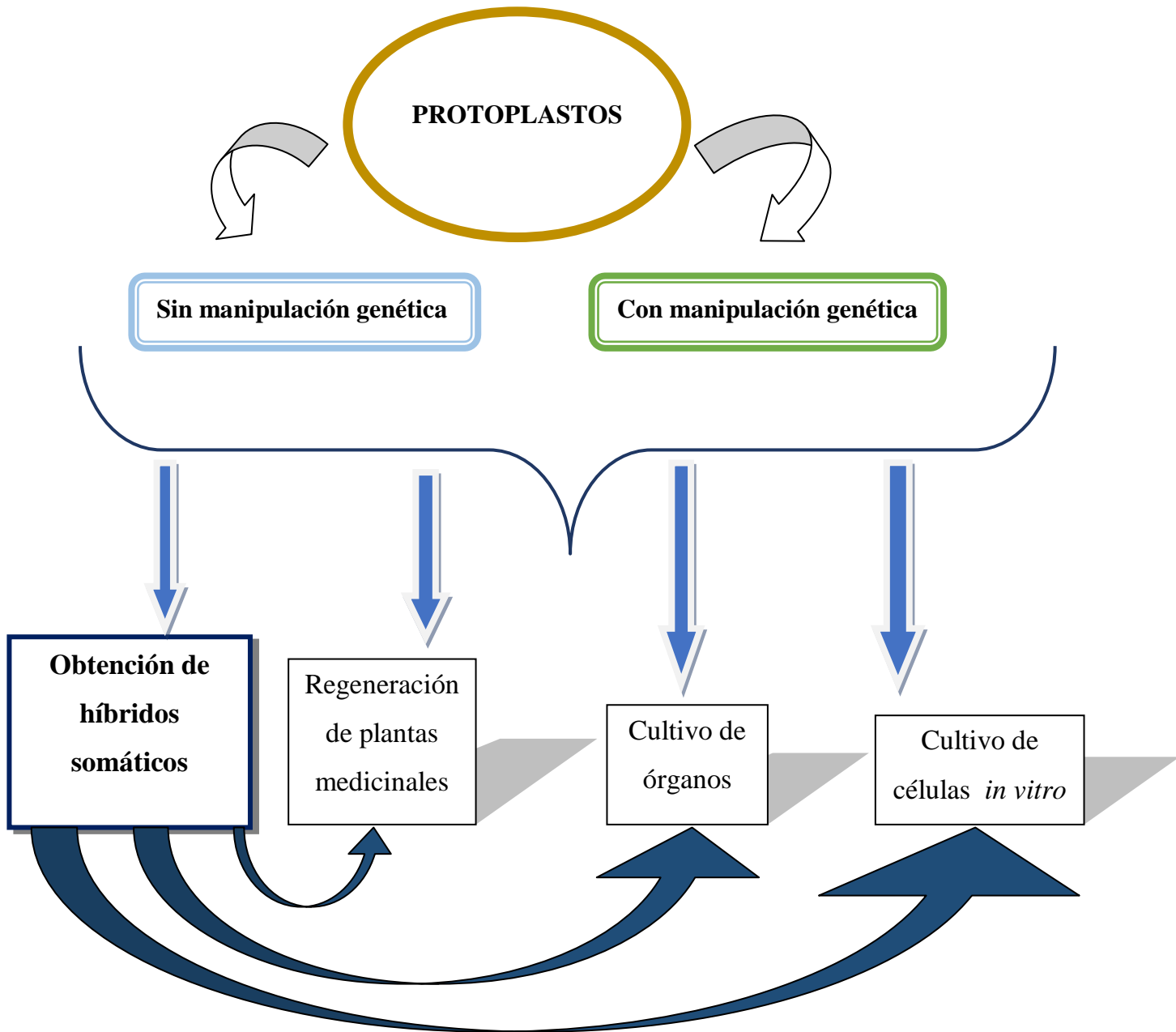
Los protoplastos también se pueden fusionar dando lugar a la formación de híbridos somáticos, para ello, se fusionan tanto sus citoplasmas como sus núcleos. Cuando solo se produce la fusión de citoplasmas entre dos protoplastos, estando solo presente el núcleo de uno de ellos, se forma un cíbrido o híbrido citoplasmático. Los híbridos somáticos que se forman pueden ser homocariones (fusión entre dos plantas de la misma especie) y heterocariones (entre plantas de distintas especies). Es decir que la célula de una especie A, se fusiona con la de una especie B para dar lugar a una especie totalmente nueva, o bien dos células de la misma especie se fusionan entre ellas (5) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de hibridación somática

Una vez obtenidas las características que se están buscando podrán llevarse a cabo tres tipos de cultivo: cultivo de células *in vitro* (suele estar acompañado de varios procesos para optimizar la producción), cultivo de órganos vegetales u organogénesis (en ocasiones solo interesa cultivar de forma selectiva determinadas partes de la planta, por ejemplo el cultivo de raíces en cabellera) y regeneración de la planta completa (en el caso de haberse modificado o hibridado se estará dando lugar a una planta completamente nueva) (5).

Obviamente, también puede haber una interrelación entre las técnicas anteriormente citadas (Figura 4).



**Figura 4.** Algunas de las aplicaciones de los protoplastos

### **Objetivo**

El objetivo de este trabajo es manifestar la importancia de los protoplastos para el cultivo de plantas medicinales y para la obtención de metabolitos de interés en diversos ámbitos (farmacéuticos, agroalimentarios, etc.).

## **Materiales y métodos**

Como material se ha utilizado bibliografía tanto en formato físico como consultada de internet.

El trabajo que se presenta a continuación recoge algunos de los métodos para llevar a cabo los procesos que se describen en la introducción (hibridación somática y manipulación genética), varias de las características de los tipos de cultivo que existen (cultivo de órganos, regeneración de la planta completa y cultivo celular *in vitro*) y una explicación sobre la optimización de metabolitos secundarios. Por último, se exponen unas conclusiones sobre las aplicaciones del cultivo *in vitro* de protoplastos.

## **Resultados y Discusión**

El proceso de hibridación de protoplastos se obtiene por fusión, ya sea de forma espontánea o inducida.

La fusión de protoplastos espontánea, si bien se puede dar entre protoplastos aislados, presenta un problema fundamental, y es que no permite la regeneración de la planta completa. Por esta razón, se emplea más la hibridación inducida, cuyos híbridos resultantes tienen una mayor viabilidad a la hora de regenerar plantas completas (2).

La fusión inducida puede darse por métodos químicos o bien estimulando la membrana plasmática por medio de pequeños impulsos eléctricos (5) (2) (6).

-El método de fusión química más utilizado actualmente va a consistir en la utilización de polietilenglicol (PEG), cationes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y pH elevado (entre 9 y 11). Durante este proceso las membranas plasmáticas de los protoplastos se ponen en contacto, formándose puentes citoplasmáticos entre ellas que son promovidos por el uso del PEG; por otro lado, el alto pH y la elevada concentración  $\text{Ca}^{2+}$  reduce la carga negativa neta que hay en la superficie de las membranas, disminuyendo la repulsión y facilitando este contacto inicial. Finalmente, las interconexiones citoplasmáticas entre las células se expanden dando lugar a una fusión de los protoplastos. Se trata de un proceso complejo en el que hay que cuidar mucho tanto la concentración de PEG (15%-45%) como la concentración de protoplastos en la suspensión (un 4% - 5% aproximadamente). Cuando se retiren los híbridos somáticos de la solución, tendrá que hacerse poco a poco lavando con solución alcalina y reduciendo la concentración de PEG progresivamente.

-La electrofusión se basa en el hecho de que si se expone a los protoplastos a un voltaje eléctrico preciso durante un tiempo determinado, se producirán pequeñas rupturas y reparaciones en su membrana plasmática. Se divide el proceso en dos pasos:

1. Se lleva a cabo la dielectroforesis que redistribuye las cargas eléctricas de las células, lo que provoca que se vean atraídas hacia uno de los electrodos quedando todas juntas.
2. Se aplican una serie de breves pero intensos impulsos eléctricos, que dan lugar a poros en la membrana. Al estar las células en estrecho contacto, estos poros permiten que se establezcan puentes citoplasmáticos entre las células que, al igual que en el caso de los métodos químicos, terminan conduciendo a la fusión celular completa (6).

En el caso de querer obtener únicamente híbridos heterocariontes, se presenta un problema, ya que los métodos de fusión mencionados no son selectivos y se producirán tanto híbridos homocariontes como heterocariontes, por lo que se han identificado maneras de favorecer la formación de heterocariontes sobre homocariontes. Primero es necesario saber cuál de las dos especies de protoplastos que se quieren fusionar tiene mayor tendencia a

fusionarse, esto va a depender de muchos factores, como pueden ser la procedencia, el genotipo y el tamaño (los más grandes se fusionan más fácilmente). Los protoplastos con mayor tendencia a fusionarse deberán encontrarse en menor proporción con respecto a los que tienen menor tendencia a fusionarse. Así, es más probable que se rodeen de los protoplastos con menor tendencia y se fusionen con ellos, de otra forma sería más probable que los protoplastos con mayor tendencia se fusionaran entre ellos.

Al margen de este método, se pueden usar técnicas selectivas para la formación de heterocariontes pero que no pueden llevarse a cabo a gran escala. La electrofusión de pares de protoplastos se basa en controlar de forma individualizada la fusión de las células. Tiene un rendimiento mucho mayor pero es un proceso más lento (treinta pares de protoplastos fusionados por hora aproximadamente).

En el caso de que no se lleve a cabo un método de fusión selectivo, se pueden llevar a cabo procesos de selección posterior, especialmente en el caso de que se haya dado la fusión por métodos químicos que no dan lugar a frecuencias de fusión tan elevadas como la electrofusión, por lo que pueden quedar en la mezcla protoplastos sin fusionar. Para seleccionar los protoplastos se pueden analizar los caracteres morfológicos del callo (en caso de que sean diferentes los de los híbridos heterocariontes de los de los progenitores), utilizar medios restrictivos para el crecimiento de protoplastos que no sean híbridos heterocariontes o bien aislar las células híbridas y marcarlas por medio de colorantes o fluorocromos que serán diferentes en los parentales (6).

Los híbridos somáticos pueden clasificarse en simétricos y asimétricos:

- En el caso de los **híbridos simétricos** se produce la fusión de los núcleos de los dos protoplastos, combinándose sus genomas completos.
- Un **híbrido asimétrico** se da cuando uno de los protoplastos solo se fusiona con parte del material genético del otro protoplasto, es decir que el ADN nuclear no se encuentra intacto. Para favorecer su formación se pueden usar rayos X o rayos gamma que fragmentan los cromosomas. Tras producirse la fusión, parte de estos fragmentos no se integran y se pierden en las sucesivas mitosis, mientras que otros se integran en el ADN nuclear dando lugar a un híbrido asimétrico (6).

Se han obtenido híbridos somáticos a partir de diversas especies (Tabla 1).

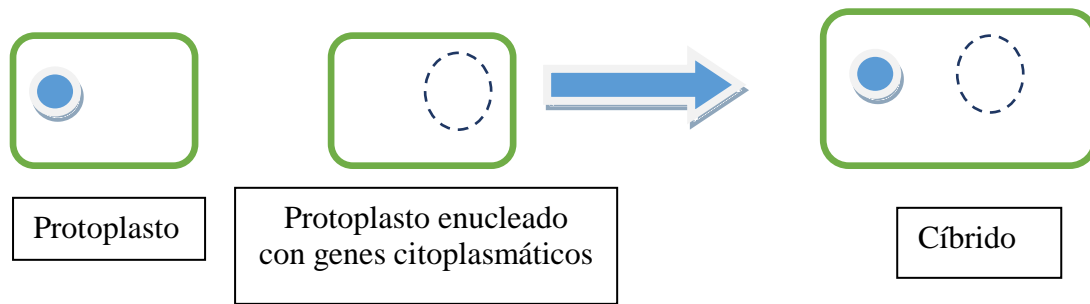
<b>HÍBRIDOS SOMÁTICOS</b>
<i>Brassica oleracea x Brassica campestris</i>
<i>Datura innoxia x Datura stramonium</i>
<i>Nicotiana tabacum x Nicotiana sylvestris</i>
<i>Solanum nigrum x Solanum tuberosum</i>

**Tabla 1.** Ejemplos de hibridación somática.

Además de la hibridación somática (fusionando dos núcleos) se puede llevar a cabo un hibridación citoplasmática entre dos protoplastos (uno de ellos enucleado), formando un híbrido. Esto no significa que este híbrido no cuente con nuevo material genético pero solo



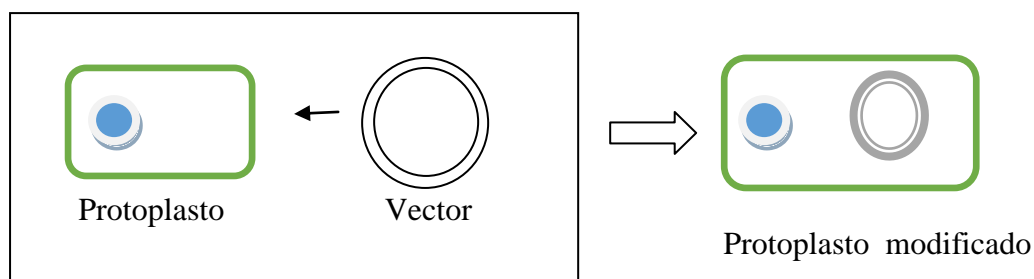
aquel que estuviera presente en el citoplasma de la célula cuyo núcleo se pierde (genes citoplasmáticos), por ejemplo el material genético de los cloroplastos. En estos casos antes de producirse la fusión entre los protoplastos se tiene que inactivar el núcleo de una de las células con radiación, con productos químicos, suprimiendo su división o simplemente eliminado el núcleo del protoplasto mediante una centrifugación. Los cíbridos presentan gran utilidad para incorporar a las plantas genes de resistencia a los pesticidas sin modificar otras características de las mismas. Por ejemplo *Brassica campestris* x *Brassica napus* dan lugar a un cíbrido con resistencia a la atrazina (un herbicida) (2) (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema de hibridación citoplasmática

Como ya se ha comentado, utilizar la técnica de fusión no es la única forma de aportar a los protoplastos nuevas características, al carecer de pared celular los protoplastos son susceptibles de ser manipulados genéticamente. El método más empleado en la edición genética es sistema CRISPR/Cas, que se vale de un mecanismo de inmunidad de origen bacteriano adaptado para poder seleccionar de forma precisa el gen a partir de su ARN complementario. La versión que de CRISPR/Cas que se usa en plantas no es exactamente la misma que la “original” bacteriana, pues ha sido optimizada para su buen funcionamiento en células vegetales (3).

Una vez se ha seleccionado el gen, es necesario el uso de un vector para introducirlo en el interior del protoplasto. El vector más utilizado proviene de *Agrobacterium tumefaciens* (también conocido como *Rhizobium radiobacter*), una bacteria gram negativa que tiene un plásmido con la capacidad de inducir tumores en las plantas (enfermedad de agallas de corona) y es utilizado en el cultivo de raíces. Una vez aislado ese plásmido, se puede usar como vector introduciéndole el gen (o mejor dicho transgen) de interés y transfiriéndoselo a los protoplastos que se quieran modificar. El hecho de que sea el más utilizado no quiere decir que sea el que se usa siempre, en función de los requerimientos del proyecto se pueden necesitar diferentes plásmidos (3) (7) (10) (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de vectorización de genes

En el caso de que no se pueda recurrir a la vectorización, bien por las características de los protoplastos o inconvenientes de otra clase se pueden usar métodos directos para introducir el ADN en el protoplasto (3) (10). Por ejemplo:

- Electroporación, una técnica que se basa en el mismo principio de ruptura y reparación de la membrana plasmática que la electrofusión. Se aprovechan potenciales eléctricos para estimular la membrana plasmática y se forman pequeños poros por los que se va a poder introducir el ADN exógeno.
- Mediada por liposomas, es decir vesículas que contienen el ADN exógeno y están recubiertas por fosfolípidos que imitan la composición de la membrana plasmática. Por ello, pueden fusionarse con los protoplastos y entrar en su interior por medio de endocitosis.

También hay alternativas que permiten la modificación genética de las células con pared celular pero no se usan en el cultivo de protoplastos (10).

Los híbridos somáticos que han sido modificados genéticamente son plantas transgénicas y pueden tener utilidades muy diversas, entre ellas está la fitorremediación, el mejor aprovechamiento de agua y energía en condiciones en las que no abundan, la eliminación de alérgenos de los alimentos y otras mejoras de sus características, mejora frente al estrés biótico y abiótico y un aumento de la producción de metabolitos de interés. Estas dos últimas funciones son de especial interés para la industria farmacéutica (10) (3).

El estrés biótico va a estar marcado por infecciones y plagas, en general el causado por los seres vivos. Así, modificando algunos genes de determinadas plantas, se ha comprobado que mejora la resistencia sin que las características agronómicas resulten afectadas. Por otro lado, los factores abióticos van a ser todos aquellos que no están relacionados con los seres vivos como el agua, la temperatura, el pH, la salinidad y la cantidad de nutrientes. Mediante una modificación por CRISPR en un gen de respuesta al estrés abiótico, se ha logrado una menor pérdida de agua en plantas, algo que podría ser de gran utilidad para el cultivo en condiciones secas (3) (Tabla 2).

ESPECIE	RESULTADO
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mejoras frente al estrés abiótico para disminuir la pérdida de agua
<i>Oryza sativa</i>	Resistencia a varios microorganismos ( <i>Xanthomonas oryzae</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> ...)
<i>Papaver somniferum</i>	Cambios en el perfil de alcaloides
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Disminución de la acumulación de tashinona

**Tabla 2.** Ejemplos de transformaciones genéticas

En un cultivo *in vitro*, una de las finalidades más importantes es la mejora en la obtención de los metabolitos secundarios de interés industrial.

El aumento de la producción de metabolitos se puede conseguir mediante la *ingeniería metabólica*, un conjunto de modificaciones y medidas que tienen como objetivo aumentar la producción *in vitro*. Se centra principalmente en tres rutas: la sobreexpresión de enzimas del metabolismo secundario, la canalización del flujo metabólico hacia nuevos productos de interés y la creación de nuevas rutas en las redes metabólicas existentes (7) (10).

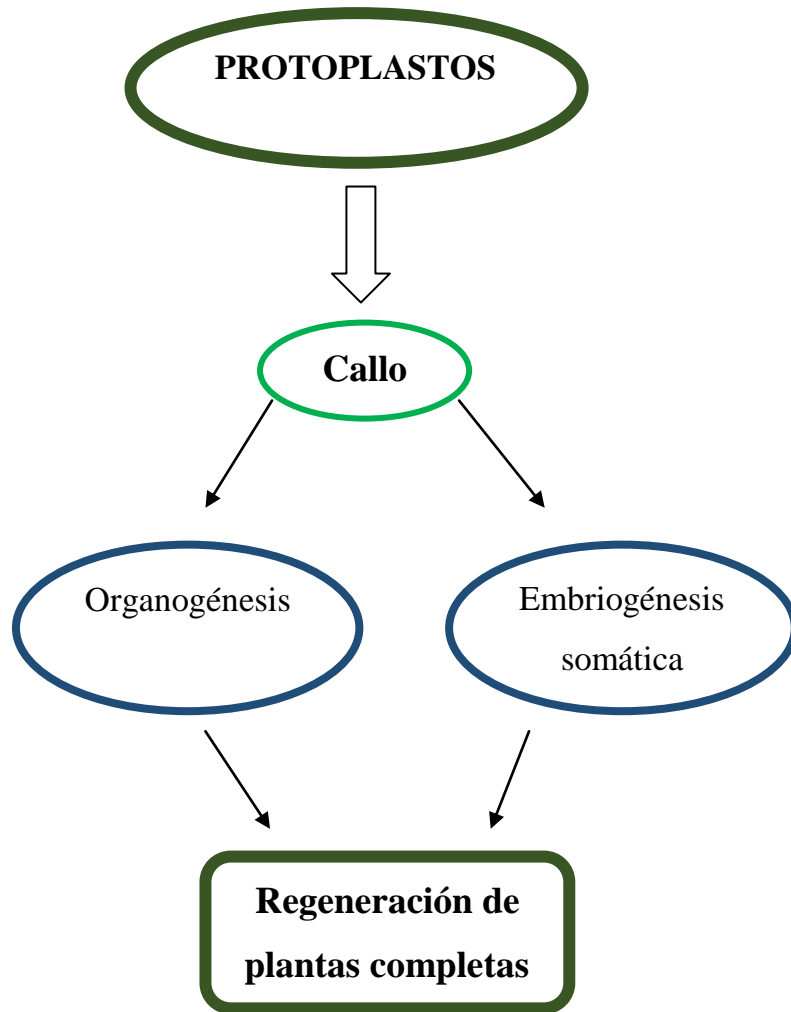
Todo esto requiere un extenso conocimiento de las rutas biosintéticas y para su estudio se utilizan precursores marcados, para poder identificar que metabolitos se forman a partir de ellos. No obstante, el objetivo final no es solo éste, sino también llegar a averiguar que enzimas son las que están catalizando este proceso y sobre todo que genes las codifican y así poder modificarlos si es necesario (7).

Aunque la ingeniería metabólica suele llevarse a cabo por medio de modificaciones en los propios protoplastos, hay que mencionar que el estudio de las rutas biosintéticas sería de gran importancia. Por ejemplo, el conocimiento de la ruta biosintética de la artemisina en *Artemisa sp.* ha permitido generar una variante transgénica de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de sintetizar un precursor de su metabolito, la artemisina. (10).

La utilización de procedimientos de hibridación (somática o citoplasmática) o procesos de transformación genética va a depender de las necesidades experimentales. Cuando se trabaja con hibridación se van a transmitir cromosomas completos o incluso la totalidad del ADN de la célula, por el contrario la transformación genética es un método más sencillo pues permite transmitir únicamente un gen o un conjunto de genes definidos. Su principal desventaja frente a la hibridación será que es necesario un conocimiento mucho más exhaustivo de las rutas biosintéticas de la planta y de los genes involucrados que se quieren transmitir, por ejemplo algunos caracteres son poligénicos por lo que para que sean transmitidos a una célula transgénica será necesario seleccionar varios genes (6).

Además de las aplicaciones anteriores, a partir del cultivo de protoplastos puede inducirse a la organogénesis o desarrollar una planta completa (Figura 7). Para alcanzar estas etapas, organogénicas o morfogénicas, el cultivo de protoplastos debe pasar por la formación de callo (masa de células no desarrolladas ni diferenciadas).

El callo no solo es el material inicial para el establecimiento de un cultivo *in vitro*, sino también se utiliza para la obtención de suspensiones celulares y de embriones somáticos. Sin embargo, no hay que olvidar que el crecimiento del tallo es lento y heterogéneo. La composición del medio de cultivo del callo es básica para su desarrollo y puede influir en la formación de los metabolitos de interés de la especie.



**Figura 7.** Esquema de morfogénesis

Independientemente de su procedencia, en un proceso morfogénico hay varios factores que determinan el resultado final:

1. Genéticos, la información genética va a determinar el crecimiento de una planta. Incluso dentro de un mismo género, la técnica idónea para la obtención de metabolitos puede variar según la especie, por ejemplo dentro del género *Digitalis* se ha llevado a cabo anteriormente organogénesis indirecta en *Digitalis obscura* y organogénesis directa en *Digitalis nervosa*. En otras especies como *Digitalis purpurea* y *Digitalis lamarkii*, se han llevado a cabo ambos tipos de organogénesis de forma eficaz. Esta diferencia entre las diferentes especies vegetales es lo que impide que exista un método universal para llevar a cabo la morfogénesis (8) (4).
2. Las condiciones químicas que se han seleccionado para realizar el cultivo: la concentración salina, diferentes antibióticos y la adición de reguladores del crecimiento son muy importantes para determinar qué tipo de morfogénesis se va a llevar a cabo y si se va a inducir o no formación del

callo. El carbón activado será también necesario para poder retirar los productos de desecho y el exceso de reguladores del crecimiento. La composición del agar que se está utilizando es importante para asegurarse de que ninguno de sus componentes actúa como inhibidor del crecimiento. La consistencia del agar condiciona mucho los efectos morfogénicos y puede variar en función de la especie la consistencia óptima para el cultivo. Por último, hay que tener en cuenta que también se controla la atmósfera gaseosa del cultivo, en concreto el oxígeno, ya que una buena aireación es fundamental para lograr un buen proceso de morfogénesis (8).

3. De las condiciones físicas del cultivo, las tres más importantes son la temperatura, la humedad relativa y la luz. La temperatura, cuanto se asemeje a las condiciones óptimas de crecimiento de la planta en la naturaleza, mejor respuesta se conseguirá en la regeneración y el cultivo. La humedad relativa debe ser controlada porque si disminuye en exceso puede favorecerse la concentración de sustancias en el medio que resultan tóxicas, ralentizando el crecimiento. La luz es un importante elemento diferenciador, se utiliza para favorecer la organogénesis y se priva de ella al cultivo para favorecer la formación del callo (8).
4. Condiciones del explanto (tejido iniciador del callo). Puede ser determinante la porción de la planta de la que se ha extraído la muestra. No solo entre dos partes muy diferentes de la planta como la hoja y la raíz, sino que en función de la zona de la hoja de la que se extraiga el explanto se pueden dar lugar a respuestas morfológicas muy diferentes. En el caso de la *Camelia japonica*, la sección de la lámina de la que se extraiga el explanto condiciona que a iguales condiciones de cultivo se favorezca la organogénesis o la embriogénesis (8).

En resumen, el tipo de cultivo que se va a llevar a cabo debe ser tenido en cuenta según las características de la especie y la selección de la muestra. El medio de cultivo y las condiciones del mismo se deben controlar durante todo el proceso (4).

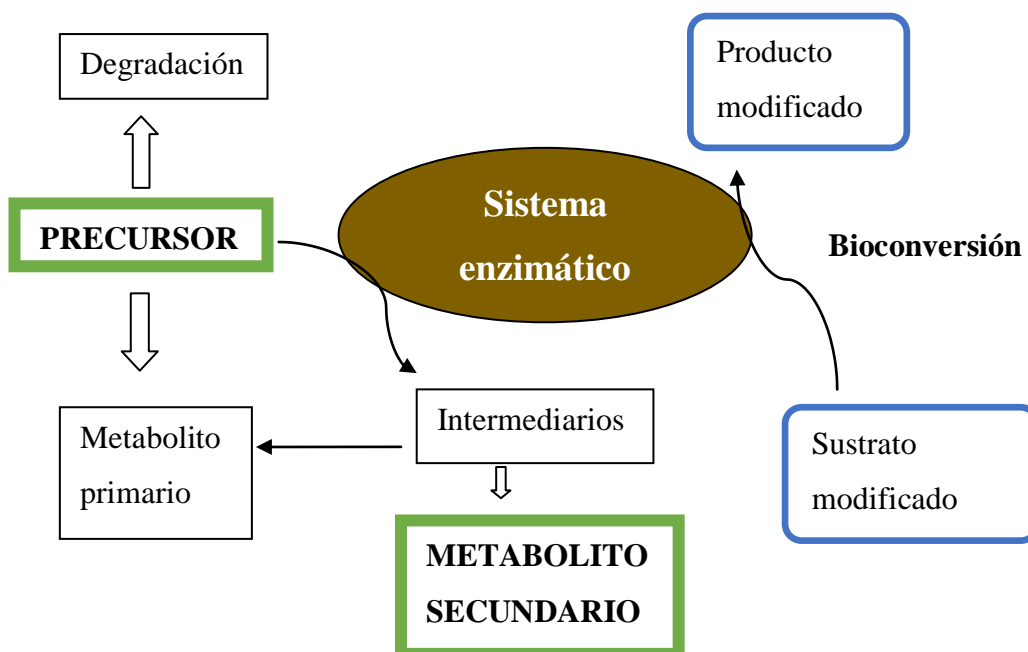
Los medios de crecimiento adecuados tienen que tener fuentes de carbono y nitrógeno, una adecuada proporción de macro y micronutrientes y reguladores del crecimiento entre otros componentes. Estos son los componentes esenciales que tienen que estar presentes, otros factores como el pH, la luz, la aireación y la temperatura también pueden influir en el crecimiento. No obstante, la optimización también puede variar en función de la especie y del órgano de procedencia del explanto (10).

¿Qué se puede cambiar en un medio de producción? Se han descrito estudios en los que se ha optado por eliminar alguno de los nutrientes del medio de cultivo dando lugar a una mayor producción de metabolitos secundarios (caso de los niveles de cardenólidos en *Digitalis thapsi* que aumentan con la eliminación del calcio). Otra opción puede ser modificar la concentración de carbono o cambiar totalmente la fuente de carbono en el medio, esto puede dar lugar a que aumente la concentración de metabolitos secundarios, por ejemplo la adición de sacarosa produce un aumento en la producción de taxoides en los cultivos de *Taxus chinensis*, pero también es conocido que una alta concentración de sacarosa puede ralentizar el crecimiento celular. El aumento de la concentración de nitrógeno también puede beneficiar producción de metabolitos secundarios (aunque tienen que ser fuentes de nitrógeno concretas), por el contrario algunas fitohormonas (como auxinas) que estimulan el crecimiento celular pueden inhibir la producción de metabolitos secundarios en algunas especies (10) (7).

El pH, la luz y la temperatura que ya se habían comentado antes, también pueden influir en la producción de metabolitos, siendo el caso de *Linun flavum* que tiene una respuesta positiva a la luz mientras que las suspensiones de *Podophyllum hexandrum* mejoran su producción en la oscuridad (7).

Para maximizar la producción de metabolitos secundarios también se pueden adicionar precursores. Los precursores ideales tienen que tener un bajo coste económico, ser lo menos tóxicos posible y tener un gran parecido con el producto final. No siempre son aprovechados directamente por los protoplastos para producción de metabolitos secundarios, en ocasiones pueden ser degradados por enzimas extracelulares o ser utilizados para formar metabolitos primarios.

Antes de adicionar los precursores es necesario un detallado conocimiento de las rutas metabólicas, este conocimiento puede aprovecharse para no limitarse a adicionar sustancias que formen parte de sus rutas biosintéticas, sino utilizar otros compuestos que presenten alguna modificación en su estructura. Este es el principio de la bioconversión o biotransformación, aprovechar el sistema enzimático de los protoplastos, sabiendo sobre que grupos funcionales actuará, para obtener productos a partir de sustratos modificados. En la práctica no tienen porque llevarse a cabo solo con protoplastos, pueden extraerse sus enzimas y purificarse para aprovecharlas o bien recurrir a un cultivo de órganos para llevar a cabo las biotransformaciones. Para que la bioconversión sea rentable el sustrato tiene que tener algunas características en común con los precursores (por ejemplo no ser tóxicos) pero también hay que tener en cuenta otros factores, por ejemplo asegurarse de que el producto no es metabolizado e incorporado a sus rutas por el protoplasto más rápido de lo que se sintetiza, ya que entonces podría servir de precursor pero no se podrá aprovechar (10) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema de biosíntesis y bioconversiones

Una técnica que se emplea para la optimización de los metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro* es la elicitación. La elicitación es una técnica que se basa en exponer el cultivo a determinados factores que inducen a la expresión de los genes asociados a enzimas del metabolismo secundario. Estos factores reciben el nombre de elicitores y se clasifican en

función de su naturaleza (físicos o químicos) y de su origen (biótico o abiótico). Imitan las condiciones adversas a las que están sometidas las plantas en la naturaleza, eso es lo que provoca la activación del metabolismo secundario como un mecanismo de defensa. Diversos estudios abalan la utilización de elicitores en función de la especie, siendo útil usualmente la combinación entre elicitores bióticos y abióticos. Hay muchos factores de los que depende la elicitación como la especificidad el elicitor, el tiempo de contacto, la concentración del mismo y la fase de crecimiento celular en el momento de la aplicación entre otros (10) (7).

Algunos elicitores se repiten mucho en las diferentes especies, como por ejemplo el metil jasmonato que no solo tiene efecto en *Taxus chinensis* sino también en otras especies como *Cayriatia trifolia* y *Pueraria condollei* (7) (Tabla 3).

ESPECIE	ELICITOR	EFEECTO
<i>Ammi majus</i>	Extractos de bacterias y sustancias como dióxido de silicio y ácido jasmónico (Una combinación de bióticos y abióticos)	Aumento de la acumulación de umbelíferna.
<i>Capsicum annum</i>	Extracto fúngico (biótico)	Incremento de capsaicina
<i>Linum album</i>	Plata (abiótico)	Incremento de podofilotoxinas
<i>Taxus chinensis</i>	Metil jasmonato (abiótico)	Incremento de taxol

**Tabla 3.** Ejemplos de elicitores.

Para la extracción de los metabolitos secundarios originados se puede recurrir a los procesos de recuperación *in situ* como por ejemplo la permeabilización de membranas o la adición de adsorbentes. Estas estrategias tienen como ventaja que al disminuir la concentración de metabolitos secundarios favorecen un aumento de la biosíntesis (7).

### Conclusiones

- El cultivo de protoplastos, al poder controlar las condiciones, en un futuro podría ser una alternativa a los cultivos vegetales tradicionales.
- Mediante el cultivo de protoplastos se podría optimizar el rendimiento de los metabolitos de interés, tanto en su producción como en su extracción.
- La aplicación de la ingeniería genética a los protoplastos podría mejorar el desarrollo de determinadas especies de interés farmacéutico.
- Los protoplastos podrían utilizarse como biofactorías, introduciendo por manipulación genética genes que codifican proteínas de interés biomédico o industrial, por ejemplo vacunas o biofármacos.
- La fusión de protoplastos sirve como herramienta para superar la incompatibilidad entre cruces interespecíficos e intergenéricos, formando híbridos somáticos. Existe también la posibilidad de transmitir información de una especie a otra de forma limitada (cíbridos o híbridos asimétricos).
- El cultivo de protoplastos es una estrategia que permite incrementar las posibilidades de la biotecnología vegetal en el desarrollo de plantas medicinales.

## **Bibliografía**

1. Carrillo EAL. (2009). “Célula vegetal: introducción a la biotecnología vegetal. Córdoba”: El Cid Editor.
2. Chawla HS. (2009). “Introduction to Plant Biotechnology”. Science Publishers. 3<sup>o</sup> edición.
3. Concepción-Hernández M. (2018). “CRISPR / Cas : aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas”. Biotecnol Veg, vol.18(3), págs 135-49.
4. Martín R, Chong B, Pérez N. (2015). “Organogénesis *in vitro* en el género *Digitalis* *In vitro* organogenesis in *Digitalis genus*”. Biotecnol Veg, vol. 15(4), págs 195-206.
5. Martín S, Torres M, Saco D. Biotecnología vegetal. (2018). “Cultivos vegetales *in vitro*. Obtención de productos de interés farmacéutico”. En: Martín Brieva H (ed.). Fundamentos de Biotecnología Farmacéutica. Madrid: Dextra. págs. 353-75.
6. Polci P, Friedrich P. (2010). “Hibridación somática”. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. INTA. págs. 197-210.
7. Pérez-Alonso N, Jiménez E. (2011). “Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*”. Biotecnol Veg, vol.11(4), págs 195-211.
8. Radice S. (2010). “Morfogénesis”. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L (eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. INTA. págs. 26-33.
9. Szabados L. (1991). “Protoplastos : aislamiento, cultivo y regeneración de plantas”. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. págs. 239-70.
10. Torres M, Martín S, Saco D. (2018). “Biotecnología vegetal. Optimización de la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico en cultivos *in vitro*”. En: Martín Brieva H. (ed.). Fundamentos de Biotecnología Farmacéutica. Madrid: Dextra. págs. 377-406.