

# OBTENCION Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS DE *Solanum mammosum*

E. Canales, J. Rodríguez Sorla y K. Agüero

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

**RESUMEN.** Protoplastos del mesófilo de la hoja de *Solanum mammosum* fueron aislados mediante digestión enzimática y purificados por filtración y centrifugación. Finalmente, se colectaron por flotación. Se probaron tres métodos de cultivo y dieciséis medios, lo que permitió la regeneración de la pared y división celular.

**ABSTRACT.** Mesophyll protoplast of *Solanum mammosum* were isolated by means of enzymatic digestion and purified by filtration and centrifugation. Protoplast were collected by flotation. Three methods and sixteen culture media were assayed. Wall cell regeneration and cell division were obtained.

## INTRODUCCION

El cultivo de protoplastos es una de las formas de cultivo de tejidos más novedosas. Es a partir de la década del 70 que esta técnica toma un gran auge, especialmente después del éxito en la obtención del primer híbrido somático interespecífico producido por fusión de protoplastos.<sup>1</sup>

El cultivo de protoplastos tiene una gran importancia teórica y práctica, entre otras, para estudiar el proceso de regeneración de la pared, las propiedades de la membrana plasmática y el proceso de transporte a través de la membrana así como en la producción de híbridos somáticos, el estudio de la herencia citoplasmática, etcétera. Además, se ha demostrado que constituyen una herramienta adecuada para la ingeniería genética de las plantas, siendo los receptores más apropiados para la asimilación de genes foráneos en forma de ADN aislado.<sup>2</sup>

El uso práctico de estos procedimientos en el mejoramiento de las plantas depende en gran medida de la eficacia del cultivo y regeneración de los protoplastos. El objetivo de este trabajo fue establecer la metodología para el aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos de *Solanum mammosum*.

## MATERIALES Y METODOS

Se emplearon plantas germinadas en condiciones estériles y propagadas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog<sup>3</sup> (MS) sin hormonas y modificado con la adición de agua de coco al 10 %, las cuales fueron mantenidas a una temperatura de 27°C y a un régimen de 9 h luz (6 000 lx) y 15 h de oscuridad. Para la obtención de protoplastos se seleccionaron las hojas en buen estado, siendo las de mayor tamaño cortadas con un escalpelo en 2 ó 3 partes. Se tomó 1 g de tejido de hoja por 25 mL de solución enzimática.

Se probaron tres variantes de solución enzimática que se diferenciaban en la concentración del estabilizador osmótico. Esta solución estaba formada por la Cellulasa Onozuka R-10 al 1,5 % y la Macerozima Onozuka R-10 al 0,3 %. Como estabilizador osmótico se utilizó sacarosa en tres concentraciones: 0,4; 0,5 y 0,6 mol/L. Estos compuestos se disolvieron en las sales del medio MS, lo cual es recomendado para mejorar la viabilidad de los protoplastos.<sup>4</sup> El pH fue ajustado a 5,5. Posteriormente, fueron esterilizados por filtración.

Después de dieciséis horas de incubación a 28°C, la mezcla de enzimas y protoplastos fue filtrada por mallas de nylon de 100 y 32  $\mu$ . El filtrado fue centrifugado a 30 xg (500 r/min) durante 10 min. Los protoplastos flotando en el menisco se colectaron con una pipeta Pasteur, se añadió solución de lavado y se repitió la centrifugación, este lavado se realizó al menos dos veces.

El número de protoplastos se determinó en una cámara de Fusch-Rosenthal. Para ello se tomaron 10 gotas por muestra de protoplastos después del último lavado. La vitalidad de los protoplastos obtenidos se determinó por el método de tinción con azul de Evans.<sup>5</sup> Se emplearon tres métodos de cultivo: el cultivo en capa delgada,<sup>6</sup> el cultivo en gota asentada<sup>7</sup> y en gota colgante.<sup>8</sup> En todos los casos, se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión de protoplastos y del medio de cultivo a evaluar.

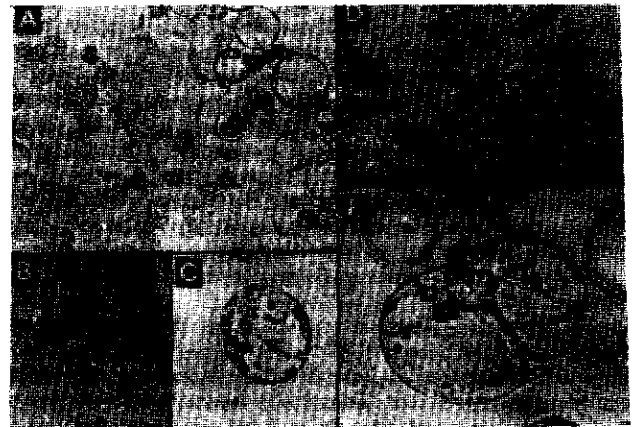
Los protoplastos se mantuvieron a una temperatura de 26 a 28°C y a una intensidad luminosa baja (500 lx) desde el comienzo del cultivo.

El cultivo fue realizado en medio líquido. Se probaron dieciséis medios de cultivo (Tabla I). Estos medios se formularon en base al medio MS. Todos se esterilizaron por filtración, excepto el XV que tenía carbón activado, el cual se esterilizó por autoclave.

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza y test de rangos múltiples de Duncan.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La utilización de plantas cultivadas in vitro de *S. mammosum* para la obtención de protoplastos resultó satisfactoria. Esta fuente tiene la ventaja de garantizar suficiente material genéticamente homogéneo y crecido bajo condiciones controladas y además, estéril. De gran importancia resultó la edad de la planta, obteniéndose una mejor digestión enzimática y una mayor producción de protoplastos con las plantas más jóvenes, con no más de 4 semanas de cultivo (Fig.1A).



**Fig. 1: (A) Protoplastos de mesófilo de hojas de *S. mammosum*, (B) protoplastos con expansiones, (C) protoplastos con gemaciones, (D) regeneración de la pared celular y (E) primera división celular.**

Con relación a la mezcla enzimática, los mejores resultados se obtuvieron con la solución que contenía sacarosa 0,4 mol/L. Se comprobó que las concentraciones de 0,5 y 0,6 mol/L de sacarosa en la solución enzimática no permiten la purificación de los protoplastos por flotación, siendo prácticamente nula su recuperación en este medio. La vitalidad de los protoplastos obtenidos fue adecuada, estando siempre por encima del 85 %.

La densidad de cultivo de los protoplastos fue de  $4.10^4$  mL<sup>-1</sup> aproximadamente, siendo este un valor adecuado.<sup>9</sup>

El método de cultivo fue seleccionado, empleando el medio de cultivo I (Tabla I). El método de cultivo en capa delgada resultó el más adecuado, lo cual coincide con lo planteado por Schumann y col.<sup>10</sup> y por Opatný y col.<sup>11</sup> Los métodos de cultivo en gotas, ade-

**TABLA I**  
**Composición de los medios de cultivo empleados**

Componentes (mg/mol)	Medios de cultivo															
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	+	825	825	-	-	825	825	+	+	+	+	+	-	-	+
KNO <sub>3</sub>	1900	+	950	950	+	+	950	950	+	+	+	+	+	950	950	+
MgSO <sub>4</sub>	370	+	185	188	+	+	1233	1233	+	+	+	+	+	1233	1233	+
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	+	85	85	+	+	680	680	+	+	+	+	+	680	680	+
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440	+	220	220	+	+	220	220	+	+	+	+	+	880	880	+
Na <sub>2</sub> EDTA	37,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FeSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	27,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KI	0,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	22,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	8,6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Na <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CoCl <sub>2</sub> .6 5H <sub>2</sub> O	0,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1000	1000	+
A.Nicco tini- co	0,5	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Tia- mina	0,1	+	+	+	+	+	1,0	1,0	+	+	+	+	+	2,0	2,0	+
Pirido- xina	0,5	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	2,0	2,0	+
Glutami- na	-	-	-	-	250	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Serina	-	-	-	-	0,1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Manitol mol/L	-	-	-	-	-	-	0,4	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Sacaca- rozamo VL	0,4	+	+	+	+	+	0,03	0,03	0,2	0,2	-	-	-	0,03	0,03	+
Glucosa mol/L	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	0,4	0,4	-	-	-	-
ANA	-	1,0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	3,0	+	+	+
6-Bap	-	1,0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
2,4-D	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Kine- tina	2,0	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Carbón A	0,1	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
%(pv)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-

más de reducir la regeneración de la pared, dificultaron la observación al microscopio, debido a la gran acumulación de protoplastos y restos celulares en el centro de la gota.

El primer medio que se empleó para el cultivo de los protoplastos fue el MS con sacarosa 0,4 mol/L, 2,0 mg/L de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0,1 mg/L de kinetina (medio de cultivo I), por ser este el medio donde se cultivaron las plantas. En este medio se logró la regeneración de la pared, pero en un bajo porcentaje y en muchos casos con deficiencias, lo que se manifestó en la formación de expansiones y gemaciones en los protoplastos (Fig. 1B y 1C). Esto ocurre cuando la síntesis de la nueva pared es incompleta.

De las dieciséis variantes de medios de cultivo probadas se evidenció la superioridad de los medios XIV y XV y en menor grado VII y XI (Tabla II).

**TABLA II**

Regeneración de la pared celular en protoplastos cultivados en diferentes medios de cultivo

Medio de cultivo	Regeneración de la pared celular *
XV	22,25 a
XIV	18,5 b
VII	13,75 c
XI	12,5 c
I	5,25 d
XVI	4,75 d
VIII	2,0 e
V	1,75 e
IX	1,5 e
II	1,0 e
VI	1,0 e
X	1,0 e
XIII	1,0 e
III	0,75 e
XII	0,5 e
IV	0,25 e

Nivel de significación 0,01

\* Coteo después de 5 días de cultivo, promedio de 4 réplicas.

Se contaron 5 campos a un aumento de 100 X.

Letras diferentes difieren en el nivel de significación.

De acuerdo con la composición de estos medios resultó evidente que los protoplastos se desarrollan mejor en ausencia o con una cantidad reducida de nitrógeno en forma de compuesto inorgánico como el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (medios VII, XIV y XV), lo cual coincide con lo reportado por von Arnold y Eriksson<sup>12</sup>. También es beneficioso el uso de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  de 2 a 4 veces mayores que las del medio MS (medios VII, XIV y XV).

El aumento de la concentración de estos iones juega un papel importante en la estabilidad de la membrana.<sup>9</sup> La adición de nitrógeno orgánico en forma de aminoácidos, en este caso glutamina y serina (medios XIV y XV), resultó adecuada, pues parece compensar las deficiencias de nitrógeno inorgánico. También fue ventajoso elevar el nivel de inositol y de tiamina (medios XIV y XV).

Con relación al estabilizador de la osmolaridad, el manitol 0,4 mol/L en combinación con 10 g/L de sacarosa como fuente de carbono (medios VII, XIV y XV) resultó el más conveniente. También dió resultados positivos el uso de glucosa 0,4 mol/L (medio XI), que a su vez, constituye una fuente de carbono.

La adición de carbón activado al medio (medio XV), contribuyó al desarrollo de los protoplastos, aumentando la regeneración de la pared celular.

Las fitohormonas más adecuadas para el cultivo de los protoplastos fueron el 2,4-D y la kinetina. El resultado negativo del ácido naftalenacético (ANA) y la 6-benzil amino purina (6-BAP) pudo ser debido a la concentración en que se usaron. Se empleó la misma cantidad de ANA que de 6-BAP, lo que comparado con la combinación de 2,4-D y kinetina, donde la concentración de 2,4-D es veinte veces mayor que la de kinetina, indica que una proporción de auxina (2,4-D y ANA) mucho mayor que la de citoquinina (kinetina y 6-BAP) resultó más ventajoso en la primera fase del cultivo. También es posible que estas concentraciones de 2,4-D y kinetina no hallan sido las mejores, considerando los resultados del cultivo, donde la cantidad de protoplastos que se dividieron fue pequeña.

En los dos primeros días del cultivo se observaron los protoplastos completamente esféricos. A partir del tercer día aparecieron los primeros indicios de la formación de la pared celular, indicado por la variación en la forma de los protoplastos, los que adoptan formas ovaladas, periformes, alargadas, etc. (Fig. 1D). La primera división celular se observó entre el quinto y el séptimo día de cultivo; la banda más oscura que divide al protoplasto en dos partes se corresponde con la pared celular y la lámina media recién formada (Fig. 1E). Debe señalarse que no se logró obtener división sostenida.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron protoplastos de *S. mammosum* en una cantidad suficiente y con una vitalidad adecuada para el cultivo, lo cual confirma que el mesófilo de hojas de plantas cultivadas in vitro es una fuente satisfactoria para su obtención. Se determinó el efecto decisivo de la sacarosa 0,4 mol/L como regulador de la osmolaridad para el aislamiento y purificación de los protoplastos. El método empleado para la obtención y la purificación de los protoplastos permitió no sólo su producción elevada sino también en un estado adecuado para su posterior cultivo. Se comprobó que el método de cultivo en capa delgada y la composición del medio XV son los más favorables para el cultivo de los protoplastos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Carlson P.S., Smith H.H. and Dearing R.D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2292, 1972.
2. Lorz H. In: *Cereals in a European context*, 48-55 (D. Morton, ed.), Ellis Horwood Limited, Chichester, 1987.
3. Murashige T. and Skoog F. *Physiol. Plant.* 15, 473, 1962.
4. Davey M.R. In: *Proc. 6th Int. Prot. Symp.*, Basel, 19-29 (I. Potrykus and col., ed.), 1983.
5. Kanai R. and Edwards G.E. *Plant Physiol.* 52, 484, 1973.
6. Butenko R.G. *Intern. Rev. Cytology* 59, 323, 1979. pa
7. Kao K.N., Gamborg O.L., Miller R.A. and Keller W.A. *Nature (London), New Biol.*, 232, 124, 1971.
8. Hams C.T. *Cell Cult. Somatic Cell Genet. Plants* 1, 213, 1984.
9. Evans D.A. and Bravo J.E. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 1, 124-176 (D.A. Evans and col., ed.), MacMillan Publishing Co., New York, 1983.
10. Schumann U., Koblitz H. and Opatmý Z. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 175, 670, 1980.
11. Opatmý Z., Schumann U.S., Rakousky S. and Koblitz H. *Blot. Plantarum (Praha)*, 22, 107, 1980.
12. von Arnold S. and Eriksson T. *Physiol. Plant.* 39, 257, 1977.