

Obtención y aislamiento de protoplastos de tejido radicular de *Allium cepa*, L.

Mariángela Bracho, Mónica García-P., Letty Marcano, Suhail Rodríguez,
Jorge Guíñez y Antonio del Campo*

Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, apartado postal 526, Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 11-01-07 Aceptado: 10-04-08

Resumen

La ausencia de una pared externa rígida y la exposición completa de la membrana celular convierten a los protoplastos en un sistema ideal para la investigación en procesos de transporte y división celular. En este trabajo se propone un protocolo para la obtención y aislamiento de protoplastos a partir de tejido radicular de *Allium cepa*, L. Se evaluó la efectividad de dos métodos de desinfección para las raíces como paso previo al proceso. Se probaron las enzimas celulasa y pectinasa a concentraciones que fluctuaron entre 0,01% y 2%. La purificación se efectuó en solución de sacarosa y en solución de Histopaque® 1077. Para la adaptación y recuperación se utilizó el medio osmótico para protoplastos y el medio mínimo esencial de Eagle. Para cada uno de los ensayos, la visualización y cuantificación de los protoplastos se llevó a cabo mediante tinción con orceína aceto-clorhídrica y por microscopía de fluorescencia utilizando el fluorocromo naranja de acridina. Se comprobó que el protocolo propuesto es eficiente para el aislamiento de protoplastos viables a partir de tejido radicular de *Allium cepa*, L., con un promedio de recuperación de 31,465 protoplastos/g de tejido. Los aportes de esta investigación permitirán el estudio de la expresión de proteínas nucleares reguladoras del ciclo celular en células vegetales, cuyas gruesas paredes constituyen una barrera infranqueable.

Palabras claves: protoplastos, *Allium cepa*, L., meristemos radiculares, aislamiento.

Isolation of protoplasts from radicular *Allium cepa*, L.

Abstract

The absence of a rigid externa wall and the complete exhibition of the cellular membrane turn to the protoplasts an ideal system for the investigation transport processes and cellular division. In this work a protocol for obtain and isolation sets out protoplasts from radicular *Allium cepa*, L. is sugest. The effectiveness of two methods of disinfection by the roots like previous step was evaluated. They were proven the enzymes cellulose and pectinases at concentrations that fluctuated between 0.01% and 2%, the purification was carried out in solution of sucrose and solution of Histopaque® 1077. For adaptation and recovery were used osmotic medium for protoplasts and the minimum essential medium of Eagle. For each one of the tests, the visualization and cuantification of the protoplasts was carried out by means of tincion with Aceto-hydrochlorate Orcein and by fluorescence microscopy using fluorocromo Acridine Orange. It was verified that proposed protocol is efficient for the isolation of viable protoplas-

* Autor para la correspondencia. E-mail: delcampoa@terra.com.

tos from weave to radicular of *Allium cepa*, L., with a recovery of 31.465 protoplasts of cel/g of weave. The contributions of this investigation will allow the study of the regulating nuclear protein expression of the cellular cycle in vegetal cells, whose heavy walls constitute an barrier.

Key words: protoplasts, *Allium cepa*, L., meristems, isolation.

Introducción

El cultivo de protoplastos es una técnica muy utilizada para estudios fisiológicos, bioquímicos y morfogénicos (1). Consiste en la obtención de células en las que la pared celular ha sido eliminada por medios mecánicos o enzimáticos (2), resultando una célula desnuda, rodeada por su membrana plasmática y potencialmente capaz de regenerar la pared celular, crecer y dividirse (3). La ausencia de una pared celular rígida y la completa exposición de la membrana convierten a los protoplastos en un sistema ideal para la investigación de procesos de transporte, división celular, morfogénesis y mutagénesis (4, 5, 6). La aplicación más utilizada actualmente es la transformación genética por hibridación o fusión somática, a través de la introducción-absorción de proteínas, ADN y otras macromoléculas (7, 8). En fitopatología se utiliza para estudiar la etiología de los virus, su absorción, procesos infectivos, replicación, especificidad, y el modo de actuación de hongos y bacterias patógenas, así como también para la evaluación de toxinas y para la obtención-selección de clones resistentes a diversos patógenos y productos fitosanitarios para la mejora genética (9, 10, 11, 12). En la última década, la obtención de protoplastos se ha logrado en un número variable de especies vegetales: *Eleusine indica* (13), *Astragalus melilotoides* (14), *Cinnamomum camphora* L (6), *Echinacea purpurea* (8); sin embargo, específicamente en *Allium cepa*, son pocos los trabajos que han logrado la obtención significativa de protoplastos (15, 16, 17), y se reporta como una especie con dificultad para el aislamiento y cultivo debido a particularidades biológicas del género (18). Un prerrequisito para su amplia aplicación biotecnológica es el de contar con un método eficien-

te para su aislamiento, el cual depende de muchos factores, todos relacionados con el tejido de la planta que se seleccione como punto de partida y las condiciones de aplicación del método (7).

Por lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue estandarizar un protocolo para el aislamiento y purificación de protoplastos a partir de tejido radicular de *Allium cepa*, L., valorando parámetros como: digestión enzimática, condiciones de purificación y mantenimiento.

Materiales y métodos

Material de estudio

Como material de estudio se utilizaron meristemos radiculares de *Allium cepa*, L., crecidos a $25 \pm 0,5$ °C, en oscuridad y con aireación constante de 10-20 mL x min⁻¹ (19). Se llevó a cabo el protocolo partiendo de raíces que alcanzaron el equilibrio dinámico (2 ó 3 cm) (19). El tejido se cortó y se incubó durante 5 minutos en 2 mL de una solución de sorbitol al 13%.

Estandarización del protocolo

En la tabla 1 se presentan las variables y condiciones que fueron evaluadas para la estandarización del protocolo propuesto para la obtención y aislamiento de protoplastos.

Método de desinfección

Con el propósito de eliminar las bacterias asociadas a la raíz, se probaron dos métodos de desinfección del tejido: uno químico, incubando las raíces por 30 minutos en una mezcla de antibióticos, y otro mecánico, sometiendo las raíces al proceso de disrupción celular ultrasónica.

Tabla 1
Estandarización de protocolo para la obtención de protoplastos.

Parámetro	Variables
Método de desinfección	Tratamiento con antibióticos Disrupción celular ultrasónica
Mezcla enzimática	Celulasa 1% + pectinasa 0,5% Celulasa 1% + pectinasa 0,2% Celulasa 2% + pectinasa 0,01%
Purificación	Centrifugación en sacarosa Centrifugación en Histopaque® 1077
Medio de recuperación	Buffer osmótico de protoplastos Medio mínimo esencial de Eagle (MEM)

Tratamiento con antibióticos. Se determinó el patrón de susceptibilidad y resistencia a antibióticos de la flora bacteriana asociada a las raíces mediante cultivo bacteriano. Para ello, raíces de *Allium cepa*, L., de 2 ó 3 cm de longitud, se colocaron en caldo nutriente y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

La susceptibilidad a antibióticos de la flora microbiana removida se determinó por el método de difusión en placa de Kirby-Baüer utilizando el agar Müeller-Hinton (20) de acuerdo con las directrices del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) y The Federal Drug Administration (US-FDA) (21, 22). Se emplearon los siguientes antibióticos y concentraciones estándar (μg): ampicilina (Am 10), amikacina (Ak 30), carbenicilina (Cb 100), kanamicina (K 30), trimetropin (Tr 5), gentamicina (G 10), cloranfenicol (C 30), tetraciclina (Te 30), ácido nalidíxico (An 30), trobamicina (Tb 10).

Disrupción celular ultrasónica. La remoción mecánica de la flora bacteriana adherida a la raíz se llevó a cabo por disrupción celular ultrasónica colocando las raíces en buffer fosfato salino (PBS), en un sonicador marca Branson, modelo SONIFIER 250, bajo condiciones de 40-45% de amplitud, 12 pulsos por minuto, 20000 MgHz de impulso *out*. Una vez aplicada la técnica, se realiza-

ron dos lavados en el mismo buffer con la finalidad de remover la flora desprendida.

Para evaluar la efectividad de las técnicas de desinfección, se colocaron raíces en caldo nutriente antes y después de la aplicación de aquellas y se incubaron a 37 °C por 24 horas. La efectividad se determinó por variaciones de la DO a 660 nm en un espectrofotómetro marca Genesys 5 Spectronic, como medida del crecimiento celular.

Digestión enzimática de la pared celular. Para llevar a cabo la digestión enzimática de la pared celular se probaron tres concentraciones diferentes de una mezcla de celulasa y pectinasa (23) en buffer manitol pH 7,4 (24). Las combinaciones ensayadas fueron: celulasa 1% + pectinasa 0,5%, celulasa 1% + pectinasa 0,2%, celulasa 2% + pectinasa 0,01%. En cada caso, el tejido fue incubado con la mezcla enzimática por 16 horas a 22 °C, en oscuridad y en baño de agua con agitación constante a 40 rpm.

Con el fin de eliminar los restos de tejido radicular no digerido por la acción del tratamiento enzimático, la suspensión obtenida se sometió a decantación para separar por gravedad los restos sólidos del tejido radicular de la suspensión con protoplastos.

Purificación de los protoplastos. La purificación de los protoplastos presentes en el filtrado se llevó a cabo por centrifugación

diferencial en gradiente a 4000 rpm y 4 °C por 10 minutos. Para esto se evaluó una solución de sacarosa al 2% y una de Histopaque® 1077 (Sigma). El sobrenadante se descartó y el pellet (protoplastos) se resuspendió en dos medios (adaptación y/o recuperación), con el fin de determinar el más apropiado. Para esto se probó el medio de mantenimiento de protoplastos propuesto por Wenck y Marton (buffer osmótico de protoplastos) (25) y medio mínimo esencial de Ta-ge (MEM) (Sigma).

Medio de recuperación. Los protoplastos resuspendidos se colocaron en los medios antes señalados, determinándose la efectividad por respuesta recuperativa a través de la visualización y conteo de estos. El MEM permite, a su vez, estimar cambios en el pH del medio, que pudiera inferir viabilidad.

Visualización de los protoplastos y determinación de la viabilidad. La visualización de los protoplastos se llevó a cabo mediante tinción con orceína aceto-clorhídrica, determinando la viabilidad celular al incubarlos en los medios de recuperación por 18 horas. Durante este período, muestras de 2 mL del cultivo a las 10, 12, 14, 16 y 18 horas se tomaron para la cuantificación. El conteo de protoplastos viables se realizó por microscopía de fluorescencia (Zeiss), utilizando el fluorocromo naranja de acridina a una concentración de 10 mg/100mL.

Resultados y discusión

Uno de los principales problemas del cultivo de plantas *in vitro* es la contaminación por microorganismos. Fellner (16), en estudios realizados en *Allium longicuspis*, reporta la presencia de microorganismos contaminantes que inhiben la viabilidad de los protoplastos aislados de esta especie, la cual se hace más severa en presencia del antibiótico ciprofloxacina. Los resultados señalan que la flora microbiana asociada a las raíces de *Allium cepa*, L., es resistente a los antibióticos ampicilina y carbenicilina, pero susceptible al resto de los antimicrobianos utilizados. Para los bioensayos posteriores se utilizó una mezcla de cloranfenicol (30 mg/mL), kanamicina (50 mg/mL) y tetraciclina (50 mg/mL), con el fin de garantizar la asepsia del medio, dadas las características del modelo biológico seleccionado.

Al comparar los valores de densidad óptica obtenidos, se observa que ambos métodos fueron eficientes en términos de remoción de la flora bacteriana, no reportándose diferencias significativas en la disminución del crecimiento bacteriano (tabla 2). Sin embargo, tomando en consideración que en el material de estudio la flora asociada no siempre es constante (16), se sugiere el método de disrupción celular ultrasónica para el proceso de desinfección, ya que no presenta restricciones en relación con la variabilidad de la flora asociada ni la posibilidad de la generación de resistencia antimicrobiana.

Tabla 2
Efecto de los tratamientos de desinfección sobre la densidad de la flora bacteriana asociada a las raíces de *Allium cepa*, L.

Protocolo de desinfección	Control	Medio de recuperación
	Caldo nutriente	MEM
Tratamiento con antibióticos	0,411	0,030
Disrupción celular ultrasónica	0,684	0,045

*Los valores corresponden a la media de las densidades ópticas de los cultivos, determinadas a 660nm luego de 24 horas de incubación de la raíz tratada.

Tabla 3
Efecto de los tratamientos de purificación y medios de recuperación sobre la obtención de protoplastos

Tratamientos de purificación	Medio de recuperación	
	MEM	Buffer
Histopaque® 1077	31,465	28,550
Sacarosa	17,100	11,400

*Los valores corresponden a la media geométrica del número de protoplastos por gramo de tejido procesado.

Por otra parte, se observó que el tipo de enzimas utilizadas y sus concentraciones afectaron el número de protoplastos obtenidos en el protocolo. Son varias las combinaciones de enzimas utilizadas para la digestión de la pared celular (26- 28). Por lo que su selección dependerá del tipo de tejido y de su diferenciación. De las tres concentraciones de mezcla enzimática ensayadas en este estudio, la combinación de celulasa 1% + pectinasa 0,5% fue la que proporcionó una adecuada digestión de la pared celular. Con las otras dos combinaciones, la digestión fue insuficiente y no se obtuvo un número significativo de protoplastos. Se ha comprobado que esta combinación enzimática es aplicable a varios géneros de plantas (8). En comparación con lo reportado por otros autores (27, 28), esta mezcla resulta más accesible y menos costosa que los kits disponibles comercialmente. Aunque el porcentaje de protoplastos viables es un tanto menor, es aceptable para determinaciones inmunohistoquímicas, por lo que se recomienda su uso para estos fines. Prasad y Naik (24), en bioensayos para la obtención de protoplastos vegetales, reportan un eficiente método utilizando extractos crudos de pectinasas y celulasas por un período de incubación de 4 a 8 horas, pH 6 y temperatura de 28 ± 2 °C, en contraste con los protocolos usados regularmente, y sugieren su uso en casos de limitación, bien sea por disponibilidad y/o costo comercial.

Con respecto a la purificación de los protoplastos, se observó que al centrifugar en solución de Histopaque® 1077 se logra

recuperar mayor número de protoplastos en comparación con la centrifugación en sacarosa (tabla 3). Así mismo, el Histopaque® 1077 resultó ser más efectivo para la remoción de detritus, obteniéndose poblaciones de protoplastos más limpios. Aunque la mayoría de los procesos de purificación se realiza con mezclas de sacarosa-manitol (17, 29), con los dos medios de centrifugación utilizados se recuperó una cantidad considerable de protoplastos, siendo el gradiente de Histopaque® 1077 más efectivo, por lo que, dependiendo de la disponibilidad, se puede usar este medio como soporte de purificación, proporcionando un rendimiento similar a los utilizados convencionalmente.

La fase de recuperación y división celular de los protoplastos, por diversas razones, suele ser muy problemática (23), por lo que se hace necesario la puesta a punto de un medio de cultivo específico y complejo, con sales minerales, vitaminas, carbohidratos, reguladores de crecimiento y una dosis de un agente osmótico, para mantener el equilibrio de los protoplastos y garantizar su viabilidad. En este trabajo se valoró la efectividad de dos medios de cultivo en la recuperación de los protoplastos obtenidos. Al respecto, como se observa en la tabla 3, el tratamiento con el que se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación de protoplastos fue con la centrifugación en Histopaque® 1077 y posterior recuperación en MEM, obteniéndose un valor de 31,465 protoplastos/g de tejido (figura 1). Debido a que todos los preparos enzimáticos incluyen impurezas,

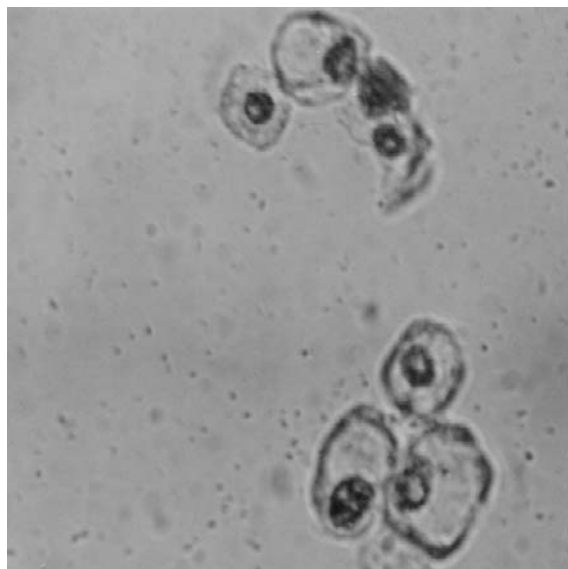


Figura 1. Protoplastos obtenidos a partir del tejido radicular de *Allium cepa*, L.

como nucleasas y proteasas que pueden tener un efecto negativo sobre la viabilidad celular, se hace necesario evaluar esta, una vez aislados los protoplastos. En la tabla 4 se presentan los resultados de los valores de concentración de protoplastos obtenidos en el medio de recuperación MEM luego de 10, 12, 14, 16 y 18 horas de su aislamiento; en esta se observa un ligero incremento, que deja en evidencia la viabilidad de los protoplastos obtenidos.

Los aportes de esta investigación permitirán el estudio de la expresión de proteínas nucleares reguladoras del ciclo celular en células vegetales, cuyas gruesas paredes constituyen una barrera infranqueable.

Conclusiones

Esta investigación permitió el desarrollo de un protocolo eficaz para la obtención de protoplastos a partir de meristemos radiculares de *Allium cepa*, L. La implementación de la disrupción celular ultrasónica representa una técnica efectiva para disminuir la infestación bacteriana de las poblaciones obtenidas. La reducción de la flora

Tabla 4
Determinación de la viabilidad de los protoplastos en MEM

Hora	Concentración de protoplastos (protoplastos/g de tejido)
10	23,165
12	27,330
14	26,000
16	28,665
18	31,265

*Los valores corresponden a la media geométrica del número de protoplastos por gramo de tejido procesado.

bacteriana asociada favorece el mantenimiento de la integridad celular y ulterior utilización en procedimientos experimentales.

Referencias bibliográficas

1. COLMENARES M., GIMÉNEZ C. *Ciencia*. 10: 5-12, 2002.
2. SMITH, R. *Plant tissue culture*. Academic Press, C.A., USA, 1992.
3. VASIL, I.K. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 39: 105-108, 1994.
4. LÓPEZ ENCINA, C. *Encuentros en la Biología* ISSN 1134-8496, núm. 34, 1996.
5. VARAVALLO M., VIEIRA DE QUEIROZ M., PEREIRA J., FERNANDES DE ARAÚJO E. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 26: 475-479, 2004.
6. DU L., BAO M. *Plant Cell. Rep.* 24: 462-467, 2005.
7. TALLMAN G. *Methods Mol. Biol.* 318: 233-252, 2006.
8. PAN Z.G., LIU C.Z., MURCH S.I., SAXENA P.K. *Methods Mol. Biol.* 318: 211-217, 2006.
9. HIROCHIKA H. *EMBO J.* 12 (6): 2521-2528, 1993.
10. BROWN P.T., LANGE F.D., KRANZ E., LORZ H. *Mol. Gen. Genet.* 237 (3): 311-317, 1993.
11. OLIVARES-FUSTER O., FLEMING G.H., ALBIACH-MARTI M.R., GOWDA S., DAWSON

- W.O., GROSSER J.W. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39: 567-572, 2003.
12. ISHIZAKI, KATO. *Plant Cell. Rep.* 24: 52-58, 2005.
 13. YEMETS A.I., KLIMKINA L.A., TARASSENKO L.V., BLUME Y.B. *Plant Cell. Rep.* 21: 503-510, 2003.
 14. HOU S.W., JIA J.F. *Plant Cell. Rep.* 22: 741-746, 2004.
 15. HANSEN E., HUBSTENBERGER J., PHILLIPS G. *Plant Cell. Rep.* 15: 8-11, 1995.
 16. FELLNER M. *Annals of Botany.* 76: 219-223, 1995.
 17. ZHU L., WANG B., ZHOU J., CHEN L., DAI C., DUAN C. *Biointerfaces.* 44: 1-5, 2005.
 18. KARIM M.A., ADACHI T. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 51: 43-47, 1997.
 19. DEL CAMPO A., BRACHO M., MARCANO L., GUIÑEZ J., DE LA TORRE C. *Biology of the Cell.* 95: 521- 526, 2003.
 20. BAUER A.W., KIRBY W.M., SHERRIS J.C., TURCK M. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496, 1966.
 21. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, NCCLSI. *NCCLS document M7-A4.* 1998.
 22. Federal Drug administration (USA). *Regulatory research perspectives: impact on public health.* 1: 1-10, 2001.
 23. SZABADOS, L. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones.* CIAT, Colombia, p. 240-254, 1993.
 24. PRASAD V.V., NAIK G.R. *Biochem. Educ.* 28: 39-40, 2000.
 25. WENCK A.R., MARTON L. *Biotechniques.* 8: 640-643, 1995.
 26. MUSSIO I., RUSIG A.M. *J. Appl. Phycol.* 18: 733-740, 2006.
 27. LIU S., LIU C., HUANG X., CHAI Y., CONG B. *J. Appl. Phycol.* 18: 783-786, 2006.
 28. CONDE P., SANTOS C. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 86: 359-366, 2006.
 29. QINGHUA Z., JIHONG L., XIUXIN D. *J. Plant. Physiol.* 163: 1185-1192, 2006.