

Capítulo 10

Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas

L. Szabados*

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, Szeged, Hungría.

Introducción

El término protoplastos se refiere a componentes vivos de las células vegetales que están rodeados sólo por la membrana plasmática; en realidad, constituyen células desnudas de una planta. Muchos protoplastos pueden resintetizar la pared celular, dividirse, formar colonias e incluso regenerar plantas. La capacidad para producir un organismo altamente diferenciado, a partir de una sola célula somática, es una característica única de los protoplastos de las plantas superiores.

Debido a la ausencia de la pared celular, los protoplastos son adecuados para diversas y diferentes manipulaciones genéticas que no serían posibles con plantas o células intactas (véase Capítulo 34). Los protoplastos sirven además como herramientas experimentales únicas para muchas investigaciones fisiológicas, biofísicas y bioquímicas.

El primer aislamiento de protoplastos vivos fue el descrito por Klercker (1892), quien tuvo éxito al aislar protoplastos de cebolla usando métodos mecánicos. El primer aislamiento por métodos enzimáticos se hizo en células de levadura, utilizando jugo gástrico del caracol *Helix pomatia* (Gajja, 1919); aunque en ese momento no se conocía el mecanismo de degradación enzimática de la pared celular, las observaciones de este trabajo fueron muy importantes ya que el método permitió aislar altas cantidades de protoplastos.

Cocking (1960) fue quien utilizó por primera vez degradantes de pared celular para aislar protoplastos de plantas superiores; usando una preparación de celulosa cruda del hongo *Myrothecium varrucaria*, este investigador aisló protoplastos de raíces de tomate.

Aislamiento de Protoplastos

Aunque existe un método mecánico para aislar protoplastos, el método enzimático es actualmente la forma más importante y efectiva para ese propósito.

El método mecánico tiene, ante todo, un interés histórico, ya que su rendimiento es bajo, su procedimiento tedioso y su aplicabilidad limitada (Vasil et al., 1980). Dicho método consiste en aplicar un choque osmótico para producir plasmólisis en las células, las cuales se rompen luego mediante un corte; luego se pueden liberar los protoplastos de las células rotas mediante el restablecimiento de su nivel osmótico.

El método enzimático para el aislamiento de los protoplastos consiste en incubar las células en una mezcla de enzimas que degradan la pared celular. Los principales factores que se deben considerar para el éxito de este método son:

- a. el tipo de enzimas que se usarán;
- b. la composición del medio en que ellas actuarán; y
- c. el material de origen de los protoplastos.

Enzimas para el aislamiento de protoplastos

Para el aislamiento de protoplastos por el método enzimático es necesario usar mezclas de enzimas, en lugar de usarlas individualmente. Se utilizan enzimas de las siguientes clases generales: celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Ruesink, 1980), las cuales se obtienen generalmente de preparaciones comerciales (Cuadro 10.1); éstas no son puras sino que contienen otras enzimas como proteasas, nucleasas y lipasas.

Cuadro 10.1. Enzimas que se utilizan para el aislamiento de protoplastos.

Enzimas	Producto comercial
Celulasas	
Celulasa Onozuka R 10	Kinki Yakult Biochemicals Co. Ltd., Nishiromiya, Japón.
Driselasa	Kyowa Hakko Kogyo Co., Tokio, Japón.
Celulisina	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Meicelasa	Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokio, Japón.
Pectinasas	
Pectinasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.
Macerozima R 10	Kinki Yakult Biochemicals Co., Ltd.
Macerasa	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Pectoliasa Y 23	Seishiu Pharmaceutical Co. Ltd., Tokio, Japón.
Hemicelulasas	
Rhozima HP 150	Rohm & Haas, Filadelfia, PN, U.S.A.
Hemicelulasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.

Para utilizar las preparaciones enzimáticas comerciales en algunos tejidos, se aconseja eliminar de ellas las sales que contienen; esto se puede hacer filtrándolas con una columna de Biogel o de Sephadex G25 ó G50, como se indica en el Procedimiento I más adelante (Dos Santos et al., 1980; Slabas, 1980; Shekhawat et al., 1983).

El medio de incubación

El material de incubación que se utiliza para el aislamiento de protoplastos consta de los siguientes elementos: enzimas disueltas en una solución que contenga algunas sales (como CaCl_2 , KH_2PO_4 , MgCl_2), un medio de cultivo, un amortiguador (solución tampón), y un estabilizador o regulador osmótico. El calcio (1 a 10 mM) es un ingrediente esencial y el ion fosfato (0.5 a 2.0 mM) es benéfico para conservar la viabilidad de los protoplastos.

A menudo la solución contiene como amortiguadores (buffer) fosfato o MES [ácido 2(N-morfolino)-etanosulfónico] a una concentración de 3 mM. Los estabilizadores osmóticos más comunes son el manitol, el sorbitol, la glucosa y la sacarosa; generalmente, el potencial osmótico se ajusta de tal manera que las células sean levemente plasmolizadas durante la digestión de la pared. La osmolaridad óptima varía de 0.3 a 0.7 M. Un pH ácido en el rango de 5.0-6.0 es el óptimo.

Fuentes para la obtención de protoplastos

En teoría, es posible aislar protoplastos de cualquier tipo de planta, órgano o tejido, pero las fuentes que se usan corrientemente son mesófilo foliar y tejidos cultivados in vitro como células en suspensión, callos, y ápices de plántulas generadas in vitro (Ruesink, 1980; Vasil et al., 1980a).

El mesófilo es una fuente adecuada de protoplastos. Se utilizan, en general, hojas completamente abiertas de plantas jóvenes, o brotes nuevos; a menudo se prefieren las hojas de brotes de cultivos in vitro a las hojas de plantas cultivadas en invernadero.

Los protoplastos también se aíslan de suspensiones celulares; en cambio, los callos cultivados en agar resultan con frecuencia inadecuados para ese propósito.

El mesófilo como fuente de protoplastos. El estado fisiológico del tejido foliar influye sustancialmente en el rendimiento y viabilidad de los protoplastos. Para liberar protoplastos de buena calidad, las plantas se deben

cultivar en condiciones controladas (invernadero, cámara de crecimiento), donde se puedan optimizar la luz, la temperatura, la fertilidad del suelo y la humedad. Usualmente se utilizan una luz de 10,000 a 30,000 lux y un fotoperíodo de 18 ó 16 h. Es esencial contar con un buen suministro de agua y con fertilización regular, como se indica en el Procedimiento II, más adelante.

Algunas veces los protoplastos aislados resultan más estables si las plantas se conservan previamente en la oscuridad durante algunos días. En ciertos casos, para mejorar la viabilidad de los protoplastos aislados, es aconsejable el pretratamiento del tejido foliar en un medio con hormonas de crecimiento, en diferentes condiciones de luz y temperatura (Kao et al., 1980; Shepard et al., 1977; Shahin et al., 1980).

Las suspensiones celulares como fuente de protoplastos. Debido a que las suspensiones son heterogéneas y a menudo están compuestas de agregados de diferentes tamaños y de células libres, no todas las células están en condiciones óptimas para la liberación de protoplastos; la liberación en este caso depende también de las condiciones de crecimiento de las células cultivadas.

Los protoplastos se deberían aislar de agregados de células de tipo meristémico; en estas células en activa división, el rendimiento puede elevarse a casi el 100% mediante la manipulación del período de subcultivo y de la tasa de dilución (ver Procedimiento III, más adelante).

Antes del aislamiento de los protoplastos, la suspensión celular debería subcultivarse con una frecuencia de 1 a 4 días (Potrykus et al., 1979b).

Procedimientos para aislar los protoplastos

Procedimiento I: purificación de las enzimas. La viabilidad de los protoplastos aislados se puede mejorar purificando las enzimas de sales y de otras impurezas. Se procede así:

- 1) Disuelva 5 g de la preparación enzimática en 20 ml de un amortiguador de fosfato 1 mM (pH 6.0).
- 2) Después de una hora, centrifugue la solución a 12,000g durante 10 minutos, para remover las impurezas insolubles.
- 3) Lleve la fracción sobrenadante a una columna de Sephadex G 50 (4 x 20 cm) y recoja fracciones de elución de 20 x 10 ml.
- 4) A los 280 minutos mida el contenido de proteínas de cada fracción. Reúna las fracciones que contienen proteína y almacénelas a 4 °C.

Procedimiento II: aislamiento de protoplastos del mesófilo. Todas las operaciones se deben efectuar asépticamente en una cámara de flujo laminar de aire estéril. Se procede así:

- 1) Esterilice superficialmente las hojas, sumergiéndolas en etanol al 70% durante 30 segundos, y trasfíeralas luego a una solución al 2% de NaOCl (con una gota de Tween-80 por cada 20 ml) durante 20 minutos. Lave las hojas tres veces con agua destilada estéril y luego con una solución de manitol o sorbitol, con la osmolaridad y el pH ajustados a los de la solución enzimática que se utilizará después.

El empleo de hojas de brotes cultivados in vitro tiene la gran ventaja de que los tejidos ya son axénicos y, por lo tanto, se puede omitir el procedimiento de esterilización. Utilice hojas jóvenes pero expandidas, de cultivos de cuatro a seis semanas de edad.

- 2) Remueva la epidermis inferior desprendiéndola con pinzas finas de relojero; si la epidermis es difícil de remover —por ejemplo, en las hojas de los cereales— corte estas hojas en bandas delgadas (2 mm, aproximadamente). Algunas veces los protoplastos resultan más estables si el tejido se deja durante 1 a 2 horas en el regulador osmótico para buscar equilibrio en él antes de iniciar el tratamiento enzimático.
- 3) Trasfiera las secciones de hoja a una caja Petri de 15 x 100 mm, que contenga 10 ml de una solución de mezcla enzimática E₂ o E₃ y de medio A₂ para el cultivo de protoplastos (Cuadros 10.2 y 10.3), en una proporción 1:1. La mezcla E₂ se ha utilizado exitosamente para el aislamiento de protoplastos del mesófilo de hojas de diferentes especies como tabaco, remolacha azucarera, zanahoria y perejil, mientras la mezcla E₃ se encontró superior para el aislamiento de protoplastos de hojas de yuca y de *Stylosanthes* spp.

Cuadro 10.2. Soluciones (de 100 ml) para el aislamiento de protoplastos.

Compuestos	Cantidades según tipo de solución (mg)	
	A ₁	A ₂
CaCl ₂ (mg)	100	100
NaH ₂ PO ₄ (mg)	10	10
Sorbitol (mg)	6400	
Manitol (mg)	6400	7300
Tampón (bófer MES, mg)	60	60
pH	5.8	5.8

Cuadro 10.3. Mezclas enzimáticas (de 100 ml) para el aislamiento de protoplastos.^a

Enzimas	Cantidades (g) según tipo de mezcla ^b		
	E ₁	E ₂	E ₃
Onozuka R 10	2	3	3
Driselasa	0.5		
Hemicelulasa	0.5	1	1
Pectinasa	1	1	
Pectoliasa Y 23			0.3

a. Esterilizar con filtro y almacenar a 0-4 °C.

b. Usar la solución A₁ (Cuadro 10.2) para la mezcla E₁, y la solución A₂ para las mezclas E₂ y E₃.

- 4) Incube las partes foliares en la mezcla de enzimas durante 4 a 12 horas en la oscuridad, a 22-25 °C; hágalo con agitación lenta, esto es, a 50 rpm en un agitador giratorio, o agitando suavemente cada hora. Observe la liberación de los protoplastos en un microscopio invertido.
- 5) Lave los protoplastos así:
 - 5.1) Con una pipeta Pasteur, remueva de la caja Petri la suspensión de protoplastos y pásela por un tamiz de nylon para extraer el tejido no digerido.
 - 5.2) Trasfiera la suspensión tamizada a un tubo de ensayo cónico y centrifugue a 100g durante 3 minutos.
 - 5.3) Remueva el sobrenadante y vuelva a suspender los protoplastos en 9 ml de la solución A₄ (Cuadro 10.4). Añada lentamente 1 ml de la solución A₃, colocándola en capas sobre la suspensión de protoplastos en la solución A₄. Centrifugue a 100g durante 5 minutos.
 - 5.4) Remueva los protoplastos de la interfase de las soluciones A₃/A₄ con una pipeta Pasteur, suspéndalos de nuevo en 10 ml de medio, y centrifugue a 100g durante 3 minutos. Con la centrifugación, los protoplastos se sedimentan si el osmótico es manitol (solución A₃), sorbitol, glucosa o diferentes sales, y flotan si el osmótico es sacarosa, en cuyo caso los desechos se sedimentan. La flotación, en el procedimiento de lavado da como resultado una población pura de protoplastos de mesófilo viables e intactos.

Cuadro 10.4. Soluciones (de 100 ml) para el lavado de protoplastos.

Compuesto	Cantidades (mg) según el tipo de solución		
	A ₃	A ₄	A ₅
CaCl ₂ (mg)	50	50	50
KH ₂ PO ₄ (mg)	10	10	10
Sacarosa (mg)	—	13,680	—
Manitol (mg)	7280	—	7280
Percoll® (%)	—	—	30
pH	5.6	5.6	5.6

- 5.5) Remueva el sobrenadante, vuelva a suspender los protoplastos en el medio de cultivo, y cultive según se describe más adelante.

Procedimiento III: aislamiento de protoplastos de suspensiones celulares. Las suspensiones celulares para el aislamiento de protoplastos deberán estar en la fase de división activa, con 2 ó 3 días de edad. Se procede así:

- 1) Trabajando con 5 ml de suspensión, separe las células por sedimentación y recójalas en tubos de ensayo cónicos de 15 ml; lave una vez con el medio de cultivo líquido.
- 2) Ajuste la suspensión a 2 ó 3 ml y añada un volumen igual de la mezcla de enzimas E₁ (Cuadros 10.2 y 10.3); transfiera la solución a una caja Petri de 100 x 15 mm. La solución de enzimas E₁ se ha utilizado con éxito en el aislamiento de protoplastos de suspensiones celulares establecidas de trigo, zanahoria, perejil, remolacha y soya. A menudo se obtiene de las células hasta un 100% de protoplastos y no quedan restos importantes.
- 3) Incube las células a 22-25 °C durante 12 a 16 horas, con agitación lenta (50 rpm en un agitador giratorio).
- 4) Lave los protoplastos según el procedimiento que se describe para los protoplastos del mesófilo.

Procedimiento IV: aislamiento de protoplastos de puntas de brotes. Las puntas se obtienen de brotes estériles de rápido crecimiento obtenidos por cultivo de tejidos. Se procede así:

- 1) Corte puntas de 1 a 2 mm (meristemas con primordio foliar) dividiéndolas en varios pedazos, y colóquelas en una solución A₂ (Cuadro 10.2) en una caja Petri estéril.

- 2) Trasfiera las secciones a una mezcla 1:1 de la solución enzimática E₃ y de un medio de cultivo de protoplastos (Cuadros 10.2 y 10.3). Selle la caja Petri con Parafilm.
- 3) Incube las secciones toda la noche (12 a 16 horas) en la mezcla enzimática a 22-25 °C con agitación lenta (10 rpm).
- 4) Lave los protoplastos así:
 - 4.1) Con una pipeta Pasteur, pase los protoplastos en suspensión por un tamiz de acero inoxidable de malla de 60-70 µm o por un filtro de nylon.
 - 4.2) Trasfiera la solución de protoplastos a un tubo de ensayo cónico (15 ml) y centrifugue a 100g durante 5 minutos.
 - 4.3) Remueva el sobrenadante y vuelva a suspender los protoplastos en 9 ml de la solución A₂ (Cuadro 10.4). Coloque cuidadosamente una capa de 1 ml de solución A₃ sobre la solución A₂, y centrifugue a 100g durante 10 minutos. Debido a que muchos protoplastos de origen meristémico son pequeños y tienen citoplasma denso, a menudo se sedimentan cuando el regulador osmótico es sacarosa. Por consiguiente, para la flotación de estos protoplastos no es útil una solución A₄; en una solución A₅, que contine manitol 0.4 M como regulador osmótico y 30% de Percoll, todos estos protoplastos flotarán y formarán una banda definida en la interfase de las soluciones A₃/A₅.
 - 4.4) Con una pipeta Pasteur recoja los protoplastos de la interfase de las soluciones A₃/A₅, vuelva a suspenderlos en 10 ml de medio, y centrifugue a 100g durante 5 minutos.
 - 4.5) Remueva el sobrenadante, vuelva a suspender los protoplastos en el medio de cultivo, y cultive según se describe más adelante.

Características de los protoplastos aislados

Las poblaciones de protoplastos recién aislados reflejan las propiedades morfológicas y fisiológicas de las células de las cuales se derivan, y representan por tanto un material útil para los experimentos bioquímicos y fisiológicos (Galun, 1981).

Así, los protoplastos de mesófilo (Figura 10.1, A) contienen cloroplastos verdes y en la luz muestran actividad fotosintética (Gutiérrez et al., 1974). Los protoplastos de las suspensiones celulares (Figura 10.1, B), por

su parte, contienen a menudo granos de almidón; su tamaño y su actividad metabólica se asemejan a las del ciclo de crecimiento de la suspensión (Tewes et al., 1984). Los protoplastos aislados de las capas de aleurona de las semillas de avena secretan amilasa y RNAsa en presencia del ácido giberélico (Hooley, 1982). Los protoplastos de los nódulos de raíces de las leguminosas pueden reducir el acetileno, bajo ciertas circunstancias (Broughton et al., 1976).

Dado que los tejidos de la planta constan generalmente de diferentes tipos de células, las poblaciones de protoplastos aislados conservan la heterogeneidad del tejido original (Magnien et al., 1982); estas poblaciones mixtas de protoplastos se pueden reagrupar, por centrifugación, en gradientes iso-osmóticos de densidad (Harms et al., 1978; Fitzsimons et al., 1983; Nomura et al., 1982), o clasificarse por flujo y citometría (Harkins et al., 1984).

Otra característica de los protoplastos libres, adicional a la de su similitud con las células intactas, son los cambios claramente caracterizados en su metabolismo por efecto del estrés osmótico, de la remoción de la pared celular, de la ruptura de los plasmodesmos y del ambiente nuevo a que éstos están sometidos. El choque osmótico ocasiona cambios en el patrón del ARN y de la síntesis de proteínas, los cuales conducen a la aparición de las características 'proteínas de choque osmótico' (Fleck et al., 1982). En los protoplastos aislados se han detectado nuevas actividades enzimáticas como las de las nucleasas (Schaefer et al., 1981).

En comparación con lo que ocurre en los tejidos intactos, es relativamente más fácil aislar y purificar orgánulos celulares en los protoplastos mediante un proceso que incluye métodos graduales para que éstos conserven su integridad estructural y funcional. Así, los protoplastos del mesófilo constituyen una fuente adecuada para el aislamiento de cloroplastos (Horvath et al., 1978; Nishimura et al., 1976). También se pueden aislar vacuolas de diferentes células vacuolizadas; por ejemplo, de protoplastos originados en el tejido de almacenamiento de la remolacha roja (Smith et al., 1980). Se ha aislado la membrana plasmática de diferentes fuentes como de los protoplastos radicales (Lin, 1981) o de los protoplastos foliares (Perlin et al., 1980).

Los protoplastos de suspensiones celulares se pueden utilizar para el aislamiento de núcleos celulares (Ohya et al., 1977; Tallman et al., 1980). También se han aislado cromosomas mitóticos de los protoplastos de suspensiones celulares sincronizadas (Hadlaczyk et al., 1983; Malmberg et al., 1980; Szabados et al., 1981), y se pueden aislar cromosomas meióticos de protoplastos originados a partir de microesporocitos (Griesbach et al., 1982; Malmberg et al., 1980).

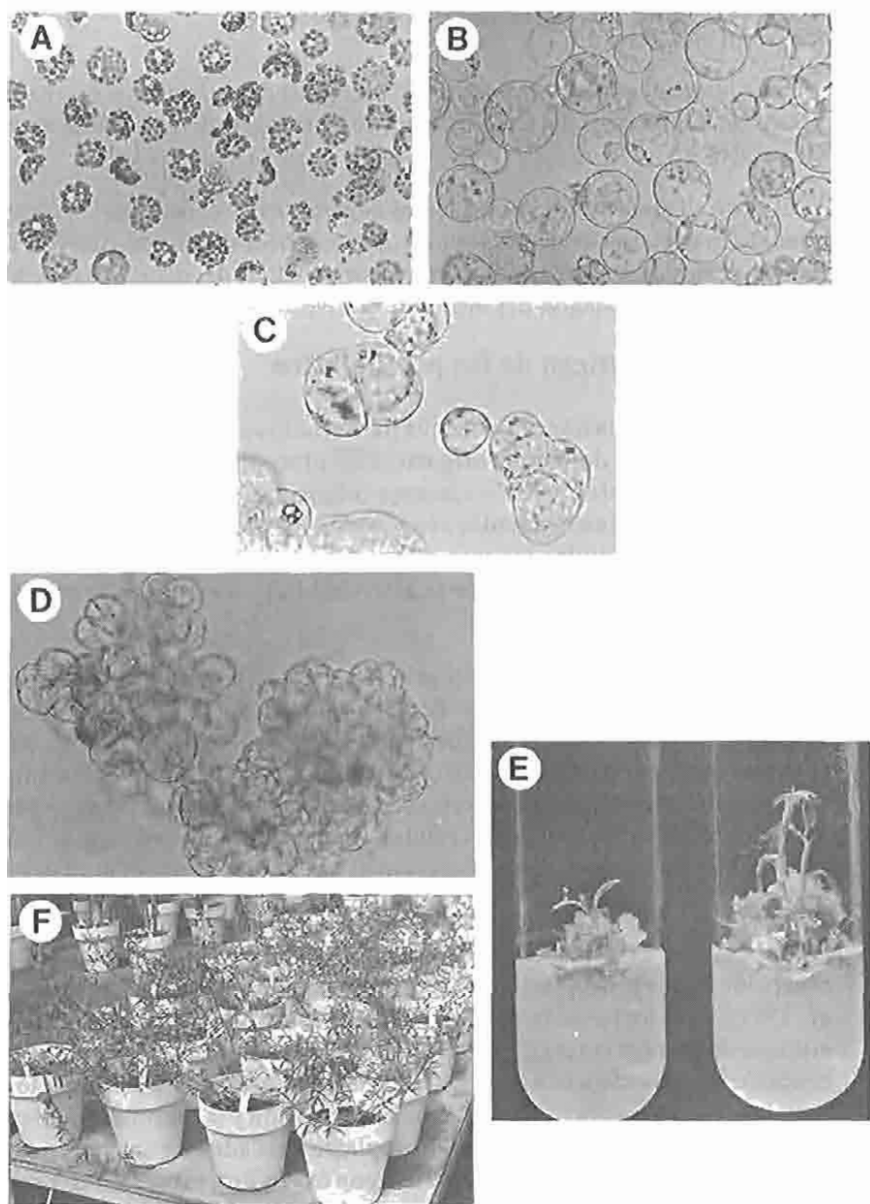


Figura 10.1. Aislamiento y desarrollo de protoplastos. Protoplastos recién aislados, ya sea de mesófilo (A) o de suspensión celular (B); primera división celular (C) y primeras colonias (D); finalmente, transferencia a un medio (E) para lograr la regeneración final de la planta (F).

Cultivo de Protoplastos Aislados

Una de las principales aplicaciones de la técnica de aislamiento de protoplastos es el cultivo de los mismos hasta obtener la regeneración de plantas (Figura 10.2).

El éxito en el cultivo de protoplastos depende de factores como a) tipo y edad del material de origen de los protoplastos; b) el sistema de cultivo y la densidad de los protoplastos contenidos en él; y de manera especial, c) adecuada composición del medio de cultivo.

Material de origen de los protoplastos

Se ha recalcado la importancia que para el cultivo de protoplastos tiene el carácter juvenil del tejido original. Los protoplastos de las regiones apicales de las plantas y de los vástagos originados por cultivo de tejidos generalmente brindan resultados superiores a los del mesófilo (Binding et al., 1981); en las células jóvenes es posible manejar más fácilmente la inducción y el mantenimiento de la actividad mitótica que en las células altamente especializadas.

Se ha encontrado que cuando se cultivan protoplastos derivados de suspensiones, el éxito del cultivo depende claramente de la calidad de la suspensión celular que se ha utilizado. Los protoplastos de suspensiones celulares que están en crecimiento logarítmico comienzan a dividirse muy rápidamente, mientras que los derivados de suspensiones más viejas —por ejemplo, en la fase de expansión celular— regeneran la pared celular y se dividen con menor frecuencia (Potrykus et al., 1979b; Tewes et al., 1984).

Por otra parte, también se ha encontrado que los protoplastos de las gramíneas son extremadamente recalcitrantes al cultivo; con la única excepción de los protoplastos provenientes de tallos de maíz (Potrykus et al., 1977), no se han podido cultivar exitosamente protoplastos de cereales aislados de plantas enteras. Los resultados negativos de numerosos experimentos han llevado a la conclusión de que las células diferenciadas de los cereales deben haber perdido el potencial de división y la totipotencialidad (Potrykus, 1980); en cambio, los protoplastos aislados de suspensiones celulares embriogénicas se han cultivado con éxito (Potrykus, 1979b; Vasil et al., 1980b; Lu et al., 1981; Jones et al., 1982; Vasil, 1983; Deka et al., 1976).

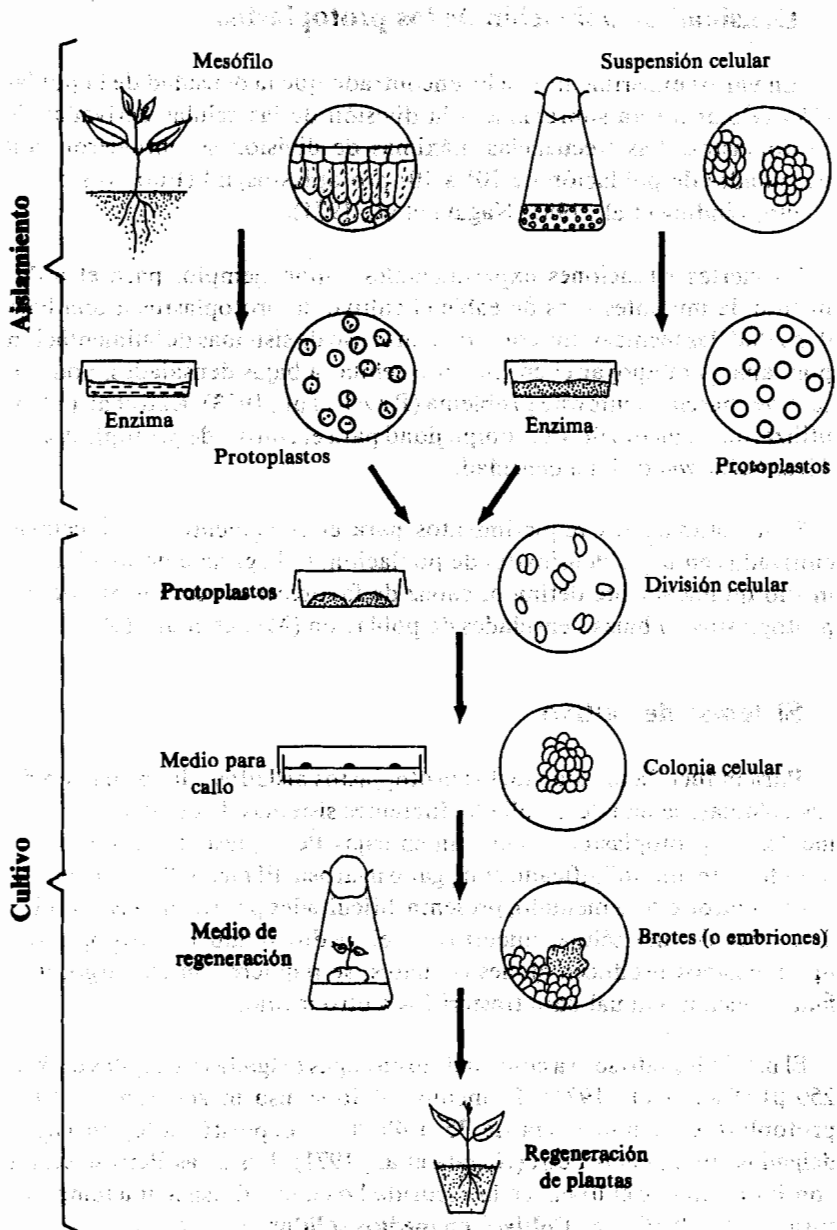


Figura 10.2. Proceso para el aislamiento de protoplastos de dos fuentes (mesófilo y suspensión celular) y para el cultivo de los mismos, hasta la regeneración de las plantas.

Densidad de población de los protoplastos

En varios experimentos se ha encontrado que la densidad de la población celular afecta sobremanera la división de las células derivadas de protoplastos. Las frecuencias máximas de división se obtuvieron con densidades de población de 10^4 a 10^5 protoplastos/ml (Potrykus et al., 1979b; Binding et al., 1981; Nagata et al., 1971).

En ciertas situaciones experimentales —por ejemplo, para el aislamiento de mutantes— es deseable el cultivo de protoplastos a una baja densidad; las técnicas que comprenden el uso de sistemas de 'alimentación por capa' para apoyar el crecimiento celular a bajas densidades, podrían resolver parcialmente este problema (Raveh et al., 1973). Kao et al. (1975) utilizaron un medio de alta complejidad para el cultivo de protoplastos de *Vicia hajastana* de baja densidad.

Si se estudian los requerimientos para el crecimiento de las células cultivadas en bajas densidades de población, se llegaría a desarrollar un medio químicamente definido, capaz de favorecer el crecimiento de los protoplastos en bajas densidades de población (Muller et al., 1983).

Sistemas de cultivo

Para inducir la división de los protoplastos aislados y la formación de sus colonias, se han desarrollado diferentes sistemas de cultivo. Generalmente, los protoplastos se cultivan en cajas Petri plásticas en un medio líquido, o en uno solidificado con agar o agarosa. El medio líquido tiene la desventaja de que, a menudo, presenta dificultades para aislar las colonias derivadas de una célula, mientras en el medio sólido los protoplastos inmovilizados producen clones celulares; se requiere, sin embargo, una manipulación manual para transferirlos a otro medio.

El medio líquido se usa colocándolo en capas delgadas o en gotas de 50 a 250 μ l (Kao et al., 1971). El medio sólido se usa mezclando en él los protoplastos cuando tenga de 35 a 40 $^{\circ}$ C, y depositándolo, en capas delgadas, en las cajas Petri (Nagata et al., 1971). Las cajas Petri se sellan con Parafilm y se cultivan en la oscuridad o en luz difusa a una temperatura de 24 a 28 $^{\circ}$ C (ver **Cultivos en medios sólidos**, más adelante).

Para obtener una alta frecuencia de división celular y lograr un crecimiento rápido de las células y colonias derivadas de los protoplastos, es necesaria la adición gradual de medio fresco con niveles reducidos de

estabilizadores osmóticos, o bien la transferencia de las colonias en crecimiento a medios frescos (Binding et al., 1981; Jia, 1982; Kohlenbach et al., 1982; Shepard, 1982; Shekhawat et al., 1983).

En los sistemas de cultivo mencionados se han desarrollado varias combinaciones y modificaciones. Frecuentemente, los protoplastos se cultivan en un medio líquido, y las células en división o las microcolonias derivadas se cultivan en un medio sólido. Adams et al. (1983) utilizaron un medio solidificado de agarosa para el cultivo de protoplastos; cuando las colonias se habían desarrollado, el medio se volvió a derretir a 40 °C y las colonias se transfirieron por medio de una pipeta.

Potrykus et al. (1979a) desarrollaron la técnica de las 'gotas múltiples en serie' (MDA, siglas en inglés de 'multiple drop array') para el ensayo rápido de numerosas combinaciones de componentes del medio de cultivo. Este sistema utiliza, como unidad experimental, el cultivo de gotas colgantes de 40 µl, las cuales se disponen en las cajas Petri según la combinación de gradientes de los factores. Las gotas colgantes permiten la observación de los protoplastos con el microscopio normal.

Para el cultivo individual de protoplastos se han desarrollado varios sistemas de cultivo. Kao (1977) y Gleba et al. (1973) utilizaron platos de 'Cuprak' con pequeños alvéolos donde era posible cultivar protoplastos individuales con solamente 0.25 µl de medio de cultivo. Koop et al. (1983) cultivaron protoplastos individuales en microgotas de medio de 10 a 25 µl; éstas se colocaban en una cámara de cultivo fabricada con un cubreobjetos y un marco de nitrato de celulosa, y sellada con una capa delgada de aceite universal.

Composición de los medios de cultivo

Los medios adecuados para el cultivo de protoplastos siguen generalmente el modelo de los utilizados para el cultivo de células *in vitro*; a menudo se han desarrollado diferentes modificaciones de los medios de Murashige et al. (1962) o de Gamborg et al. (1968).

Además de las similitudes con las células *in vitro*, en cuanto a sus requerimientos nutricionales, los protoplastos tienen ciertos requerimientos que se han analizado en varios experimentos (Kao et al., 1973; Jones et al., 1984; Tewes et al., 1984). Sin embargo, no existe un medio estándar para el cultivo de protoplastos aislados, a pesar de las extensivas investigaciones realizadas. Frecuentemente, los protoplastos originados de diferentes genotipos de la misma especie tienen diferentes requerimientos, los

cuales se deben satisfacer mediante el ajuste empírico de los procedimientos de cultivo (Shepard, 1982; Vardi et al., 1982).

Entre los medios de cultivo que se han utilizado con éxito en diferentes sistemas de protoplastos están: el medio '8p.' de Kao et al. (1975), el medio de Kao (Cuadro 10.5), el medio 'To' de Caboche (1980), el medio de Nagata et al. (1971).

Sales inorgánicas. Puesto que los protoplastos aislados tienen una eficiente captación de nutrimentos, la mayoría de los medios contienen bajos niveles de sustancias inorgánicas; la concentración del ion Ca^{++} puede ser mayor, ya que es crítico para la estabilización de los protoplastos (Kao et al., 1973).

Estabilizadores osmóticos. Todos los medios de cultivo de protoplastos contienen estabilizadores osmóticos, conocidos simplemente como osmóticos. Hay en los protoplastos diferentes niveles óptimos en relación con la presión osmótica y con el tipo de osmótico empleado; si se cultivan en medios no óptimos osmóticamente, es posible que haya un estrés celular y, como resultado, una baja eficiencia del cultivo (Takeuchi et al., 1982; Vardi et al., 1982; Smith et al., 1984).

Como osmóticos se utilizan generalmente azúcares como el sorbitol, el manitol, la glucosa y la sacarosa, en una concentración de 0.3-0.7 M. De ellos, la glucosa posee características superiores, ya que los protoplastos pueden metabolizarla gradualmente y de esta manera la presión osmótica disminuye paulatinamente (Binding et al., 1981; Kao et al., 1973).

Reguladores del crecimiento. La mayoría de los protoplastos requieren necesariamente las auxinas, y muchos también las citocininas, para la división celular; sin embargo, el tipo de las hormonas de crecimiento y su concentración en el medio se debería optimizar de manera cuidadosa, ya que las auxinas pueden ocasionar la vacuolización y ruptura de los protoplastos (Harms et al., 1979; Jia, 1982; Jones et al., 1982; Negrutiu, 1981; Takeuchi et al., 1982).

Ciertos protoplastos, como los de remolacha y los de *Lolium multiflorum*, derivados de suspensiones celulares se dividen también en un medio carente de hormonas (Szabados et al., 1985; Jones et al., 1982). Es interesante señalar además que las hormonas tienen un efecto inhibitorio en la división de los protoplastos de *Citrus* (Vardi et al., 1982).

Otros componentes. La mayoría de los medios para el cultivo de protoplastos están enriquecidos con algunos extractos naturales (AC, extracto de levadura, CH, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, azúcares, etc.).