Aislamiento, purificación y fusión de protoplastos de babaco (*V. heilbornii*) y jigacho (*V. stipulata*)

María Alejandra Rivera Ulloa
& Jadán, M.,¹

Resumen— En una primera fase se estandarizó protocolos de desinfección, inducción a callos friables y hojas in vitro de babaco y jigacho, material vegetal necesario para el aislamiento, purificación y fusión de protoplastos. En la fase de aislamiento se valoró la acción de tres soluciones enzimáticas que contenían celulasa Onozuka R-10 (1,5 2,25 y 3% p/v), macerozima R-10 (1,5 2,25 y 3% p/v) y pectoliasa Y-23 (0,2 0,3 y 0,4% p/v) sobre callos y hojas de las dos especies; dando los mejores resultados en número de protoplastos y tiempo de digestión el coctel que llevó las concentraciones 3% celulasa-macerozima y 0,4% pectoliasa, incubadas a 26-28°C por un período de 33 horas para hoja y 7 horas para callo. Los protoplastos aislados fueron exitosamente purificados usando la técnica de Jadán (2000) que consistió en la aplicación de tres tipos de purificación (filtración, centrifugación directa y diferencia de gradientes en dos fases), en esta etapa se usó el medio BH3 además de sacarosa y manitol como estandarizadores osmóticos. Los protoplastos purificados de callo de babaco y hoja de jigacho fueron fusionados utilizando una solución de PEG (polietilenglicol) como agente fusionante y la solución para estabilizar la membrana de los protoplastos obtenidos, el medio BH3 fue usado posteriormente para realizar una serie de lavados con el fin de eliminar los restos de PEG, finalmente luego de culminado el proceso de fusión se observó células fusionadas de las dos especies. El siguiente paso será estandarizar un protocolo para la regeneración de plantas a partir de fusionantes.

Abstract— In a first stage, disinfection and induction protocols about callous and in vitro leave were standardized; it's a necessary material for the isolation, purification and fusion of

protoplast. Protoplast isolation stage was evaluated for three enzymatic solutions with cellulose: Onozuka R-10 (1,5 2,25 & 3% p/v), macerozyme: R-10 (1,5 2,25 & 3% p/v) and pectolyase: Y-23 (0,2 0,3 & 0,4% p/v) above callus and leaves in both species; higher yields of protoplast number and times was achieve with enzymatic solution: cellulase-macerozyme (3%) and pectolyase (0,4%), it was incubated at 26-28°C during 33 hours for leave and 7 hours for callous. Protoplasts isolation were successfully purified using Jadán (2000) techniques that consist in three purification types (filtration, direct centrifugation and aqueous two-phases systems), in this stage, BH3 media (specific by protoplast) was used, sucrose and mannitol were used as osmotic stabilizers. Babaco callous protoplast purification with jigacho leaves protoplast where fused with a PEG solution (polyethylene glycol) and a A+B solution was used for the cellular membrane osmotic stabilizer. In addition, BH3 media was used in some washes to eliminate PEG, after finished the fusion process, cells were observed in an optic microscopy. A successful application for technique of fusion protoplasts demands a protocol for plant regeneration from these "new protoplasts".

Palabras clave— Protoplastos, babaco, jigacho, fusión celular, Vasconcellea.

Introducción

El Babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) es un híbrido natural entre *V. pubescens* y *V. stipulata*, es la papayuela de mayor difusión comercial, especialmente en Ecuador y sur de

¹ María Alejandra Rivera Ulloa,
Universidad Tecnológica Equinoccial

Colombia, introducida a Nueva Zelanda, Australia, Israel, Italia, California, Grecia y Brasil (Falcón y Brito, 2006). En el país se cultiva babaco, sin embargo, el problema principal es la forma de reproducción de las plantas. El fruto es partenocarpio, (no produce semillas) lo que reduce su propagación a una forma asexual es decir a la obtención de clones por estacas en otras plantas del mismo género, lo cual ha repercutido en la falta de diversidad genética y la contaminación masiva del babaco con varias enfermedades.

El Jigacho *Vasconcellea stipulata* es una planta que tiene su origen en América, en países como: Panamá, Bolivia, Colombia y Ecuador. Se la conoce con diferentes nombres: Chilhualcán en Perú, Papayito de los Andes en Venezuela, Papaya Arequipina en Bolivia, Papaya tierna en Colombia, Papayo en Chile; en el Ecuador la conocemos como Jigacho, Chichalán, Chiglacón o Tronche. Es una especie muy utilizada como porta injerto para la producción de babaco y presenta mayor resistencia a varias enfermedades (Soria & Viteri., 1999).

La fusión de protoplastos, es una técnica muy utilizada en la actualidad para el estudio de varias técnicas moleculares como transporte y división celular, mutagénesis, morfogénesis, variación somaclonal y en especial transformación genética mediante hibridación somática o fusión, dicha técnica consiste en fusionar dos células de Babaco y Jigacho respectivamente para obtener un genotipo con características de los dos progenitores.

Este estudio es el inicio de una investigación científica para la obtención de nuevos genotipos de *Vasconcellea*.

En la última década cientos de estudios de aislamiento y purificación de protoplastos en varias especies han sido publicadas y evaluadas por varios investigadores, sin embargo la mayoría coinciden en que el aislamiento depende de varios factores, entre ellos la complejidad del tejido utilizado para el aislamiento, su edad, la historia ambiental de la planta, el estado físico y sobre todo la composición de la pared (Hui-Yin, et al., 2007).

Varios estudios reportados en cítricos como la naranja, maracuyá y en tubérculos como la papa, muestran excelentes resultados, aunque no se reportan resultados en *Vasconcellea* son varias técnicas por las cuales se pueden aislar, purificar y fusionar protoplastos. La metodología más utilizada para la obtención de células desprovistas de pared es la aplicación de enzimas digestivas que actúan sobre la celulosa y pectinas existentes en la pared celular, los protoplastos aislados mediante esta técnica pueden ser purificados y fusionados creando híbridos somáticos, en este artículo se detalla las técnicas estandarizadas para el aislamiento, purificación y fusión de protoplastos en células obtenidas de callos friables y hojas in vitro babaco y jigacho.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plantas saludables de babaco y jigacho fueron obtenidas de Patate-Tungurahua y llevadas a condiciones de invernadero en la Facultad de Ingeniería en Biotecnología en la Escuela Politécnica del Ejército. Se las sometió a una desinfección que consistió en la aplicación de un fungicida con principio activo carbendazim (0.5%) y sulfato de cobre pentahidratado (0.24%) en una solución al 1% durante 7 días, con lo cual se aseguró plantas sanas y viables para la toma de muestras de yemas y hojas, las mismas que posteriormente fueron inducidas a la formación de hojas in vitro y callos de las dos especies.

Tanto hojas como yemas de las dos especies fueron desinfectadas utilizando la técnica estandarizada por Rivera y Freire, (2007). Debido a que las dos especies son muy parecidas fenotípicamente el protocolo estandarizado fue el mismo para babaco y jigacho.

Las yemas desinfectadas fueron colocadas sobre un medio líquido M&S (1962) con vitaminas y el regulador de crecimiento Brasinolida para la obtención de hojas in vitro, mientras que las hojas desinfectadas se cortaron en pedazos de 5mm y fueron sembradas en un medio M&S semisólido con los reguladores de crecimiento BAP (bencil-amino -purina) y AIA (ácido-indol-acético) en concentraciones 3 mgL⁻¹ y 2 mgL⁻¹ respectivamente.

Después de 15 días de siembra, se observó la elongación de las yemas y el inicio de la formación de hojas in vitro (Figura 1a). Para callo se observó crecimiento 25 días después de la siembra (Figura 1b).

Figura 1 a). Obtención de hojas in vitro a partir de jigacho (*V. stipulata*).

Figura 1 b). Obtención de callo friable a partir de babaco (*V. Herlbornii*).

Aislamiento y purificación de protoplastos

Tanto los callos friables como las hojas fueron sometidas a un proceso de aislamiento de protoplastos que consistió para hoja se mezcló 3g de hoja finamente picada con 8 ml de medio BH3 y 5 ml de solución enzimática según la técnica aplicada por Jadán (2000), se evaluó número de protoplastos mediante conteo en una cámara de Neubauer desde la hora 24 hasta la hora 34. Para callo, la técnica consistió en realizar una mezcla de 1g de callo con 2 ml de solución enzimática y 3 ml de medio BH3, la mezcla fue incubada y evaluada desde 1 hora hasta las 10 horas. Las concentraciones evaluadas en el coctel se muestran en el tabla 1. Una vez estandarizados tiempos y las mejores concentraciones se procedió a purificar las soluciones que contenían protoplastos liberados, para lo cual se filtro las soluciones a travez de una malla de acero de 50 μm mesh, para remover el material indigerido, la solución filtrada que contenía protoplastos se resuspendió en medio BH3 (específico para protoplastos según Grosser & Gmitter, 1990) y se centrifugó durante 8 minutos a 500 rpm, el precipitado, fase en donde se encuentran los protoplastos. Fue sometido a una purificación en un sistema acuoso en dos fases, con la aplicación de 5 ml de solución de sacarosa al 25% con sales CPW y una 2 ml de solución de manitol al 13% con sales CPW, aplicada gota a gota, finalmente se obtuvo un halo de protoplastos en el medio de las dos fases. Los protoplastos ya purificados fueron resuspendidos en medio BH3 equivalente a 10x el volúmen de protoplastos.

Tabla 1.

Cantidad de enzimas digestivas colocadas en cada uno de los tratamientos probados para la digestión de protoplastos de hoja.

Tratamientos	Celulosa (mg.mL ⁻¹)	Macerozima (mg.mL ⁻¹)	Pectoliasa (mg.mL ⁻¹)
1	0.015	0.015	0.002
2	0.0225	0.0225	0.003
3	0.03	0.03	0.004

Fusión de protoplastos

Previo a la fusión, los protoplastos purificados fueron mezclados en un tubo falcom en proporción 3:1 protoplastos de hoja y callo; se centrifugó la solución durante 5 minutos a 500 rpm y se desechó el sobrante. Se colocó de 2-3 gotas de protoplastos de callo y hoja sobre el centro de una caja petri con 2 gotas de solución PEG y se esperó durante 8 minutos, a continuación se colocó 2 gotas más de PEG y 2 gotas de la solución A+B encargada de aumentar la resistencia de las membranas de los protoplastos para que resistan el proceso de fusión, después de 15 minutos se añadió 12 gotas de medio BH3 con el fin mantener húmedos los protoplastos y eliminar los restos de PEG, al cabo de 10 minutos con la ayuda de una micropipeta se retiró el medio de la periferia y se volvió a colocar durante 10 minutos más el medio BH3. Finalmente se retiró nuevamente el medio de la periferia y se repitió el proceso desde la solución A+B durante 3 veces. Al cabo de todo el proceso se observó en un microscopio óptico las células fusionadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y purificación de protoplastos.

Los mejores parámetros en el aislamiento de protoplastos fueron evaluados de acuerdo al mayor rendimiento de protoplastos (Figura 2a y b) en tiempo de incubación con cada concentración de enzimas en la solución, para lo cual se realizó una ANOVA y las respectivas pruebas de Tukey en los casos de significancia.

Figura 2. a) Protoplastos obtenidos a partir de hoja de jigacho a las 33 horas de incubación.

Figura 2. b) Protoplastos obtenidos a partir de callos de jigacho a las 6 horas de incubación

En células desprovistas de pared a partir de hoja, la primera solución que contenía las concentraciones más bajas de enzimas en combinación 1,5% celulasa-macerozima y 0,2% pectoliasa no dio buenos resultados, debido a que no se observó disgregación celular ni protoplastos hasta la hora 25; con la segunda solución que contenía 2,25% celulasa-macerozima y 0,3 pectoliasa se observó protoplastos desde la hora 24, teniendo el mejor rendimiento con estas concentraciones a la hora 33 con número aproximado de 15×10^6 protoplastos por ml de solución; sin embargo los mejores resultados fueron obtenidos con la solución enzimática 3 con 3% celulasa-macerozima y 0,4% pectoliasa, solución con la que se obtuvo a las 33 horas de incubación un número de 18×10^6 protoplastos por ml de solución (Figura 3a). En el aislamiento de protoplastos a partir de callo se obtuvo protoplastos con todas las concentraciones, la figura 3b muestra los mejores resultados en el caso de callo, los mismos que se obtuvieron con la solución enzimática 3 a las 6 horas de incubación con un número de 1×10^8 protoplastos por ml (Fig. 3 b)

Figura 3. a) Medias marginales estimadas del número de protoplastos obtenidos en un ml de solución por hora a partir de hoja de jigacho.

Figura 3. b) Medias marginales con 3 soluciones enzimáticas obtenidas del conteo de protoplastos obtenidos por hora de incubación en células de callo de babaco.

Fusión de protoplastos

Las condiciones en las que se fusionaron los protoplastos aislados y purificados fue exitosa, obteniéndose un porcentaje de fusión aproximado del 30-35%, varios heterocariotes fueron observados y distinguidos debido a que

los protoplastos de hoja presentan una coloración verde y los protoplastos de callo presentan una apariencia translúcida. De esta forma se observó células en proceso de fusión y células ya fusionadas (Fig. 4 a y b).

Figura 4. a) Protoplasto de callo fusionado con un protoplasto de hoja, en la figura se observa el material celular de hoja en color verde.

Figura 4. b) Células de callo en proceso de fusión, formación de un poro inducido por la solución de PEG que promueve la unión de las dos células.

Conclusiones

Se logró estandarizar un exitoso protocolo para el aislamiento de protoplastos con una solución que contiene una combinación de enzimas de 3% celulasa-macerozima y 0,4% de pectoliasa, esta concentración mostró los mejores resultados tanto para el aislamiento de protoplastos a partir de hoja de jigacho así como de callos friables de babaco.

La purificación de protoplastos mostró buenos resultados al aplicar la técnica usada por Jadán (2000), la misma que se corroboró al dar altos porcentajes de purificación usando una malla con tamaño de poro de 50 μm mesh para la filtración, y las soluciones de sacarosa al 25% y manitol al 13% con sales CPW para la purificación en un sistema acuoso en dos fases, seguido de la centrifugación directa.

La fusión de protoplastos entre células de callo y hoja

mostró excelentes resultados obteniéndose de un 30 a 35% de células fusionadas, entre homocariotes y heterocariotes. Por lo cual se puede concluir que el método de fusión mediante la aplicación de una solución de PEG es una alternativa viable para la obtención de nuevas células con variabilidad genética en estas especies.

Bibliografía

[1] Anthony, P; W.Otoni.; B. Power; C. Kenneth & Davey, M. (1999) "Plant cell culture methods in molecular biology" "Protoplast Isolation, culture and plant regeneration from *Passiflora*", Totowa- New Jersey USA. vol III, editorial Robert D.Hall, Pág 167- 181.

[2] Bernadett, O. (2000) « Avances en la morfogénesis in vitro de trinitaria (*Bougainvillea glabra*) cvs 'Glabra' y 'Sanderianavariegata' " Tesis de grado. Facultad de Agronomía. UCV. Maracay, Venezuela.

[3] Bernal, H. y Correa, J. (1990) Especies promisorias de los países de convenio Andes Belto. Tomo IV. Editorial Guadalupe. Bogota-Colombia. Pág 268-300.

4] Blackhall. N; M. Davey & J. Power. (1994) "Plant cell culture a practical approach". "Isolation, culture, and regeneration of protoplast" Dixon, Universidad de Oxford, , Oklahoma USA.

segunda edición, editorial R:A. Pág 27- 49.

[5] Dodds. H & L. Roberts. (1995) "Experiments in plant tissue culture", "Isolation and culture of protoplasts" Cambridge university, Oxford-UK. tercera edición. Pág 167- 177.

[6] Falcón. C. y Brito. M. (2005) "Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador". Proyecto SICA. Banco Mundial. [electronicversion]. Extraído el 2 de Julio de 2009. www.articulosbabaco\Babaco SICA ecuador.mht

[7] INIAP, (1999) Guía de Cultivos. Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. INIAP. Pág 186, 187.

[8] Jadán. M. (2000) Tesis: "Obtención de protoplastos a partir de callos y suspensiones celulares de *Citrus sinensis* cv. 'Acosta 6' y cv. 'Washington', y su fusión con protoplastos de hoja de patrones comerciales". Universidad de Costa Rica

[9] Roca, W. & Mroginski, L. (1991) "Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Colombia": CIAT. Pág. 240- 247.

[10] Soria. N; y Viteri P. (1999) "Guía para el cultivo de Babaco en el Ecuador". Quito – Ecuador. INIAP. CONSUDE. Pág 23-26

Autora Principal de la Investigación

María Alejandra Rivera Ulloa

Nació el 5 de abril de 1985, está por graduarse de Ingeniera Biotecnóloga de la Escuela Politécnica del Ejército, como

Tesis de Grado realizó la investigación Aislamiento, purificación y fusión de protoplastos de babaco (*V. heilbornii*) y jigacho (*V. stipulata*). Investigación realizada durante 3 años y que tiene por objeto obtener posteriormente una variedad de Babaco resistente al hongo *Fusarium oxysporum* para aumentar la productividad de la fruta en el país; ha realizado además varias investigaciones relacionadas con cultivo de tejidos in vitro en violetas, babaco y jigacho, orquídeas y tomate de árbol. Además fue expositora del V congreso de Ciencia y Tecnología ESPE 2010 participando con el mismo tema de su investigación. En la actualidad participa en una investigación en la Universidad Tecnológica Equinoccial para la obtención de un nuevo genotipo de fresa.

ESTUDIOS SUPERIORES: Escuela Politécnica del Ejército.
Egresada de la carrera Ingeniería en Biotecnología.

EXPERIENCIA.

- Curso de cultivo de tejidos vegetales en Agricultura, (Universidad Central del Ecuador). (Asistente)
- Segundo Congreso de Ciencia y Tecnología (ESPE). (Asistente)
- Quinto Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE 2010. (Expositora).
- Estandarización de un Método eficaz, para la micropropagación de violetas.
- Establecimiento de un Protocolo para desinfección y generación de callos de Babaco a partir de meristemas.
- Micropropagación de orquídeas a partir de semillas germinadas, optimizando una técnica para aclimatación y trasplante de las mismas.
- Optimización de técnicas para la creación de un Banco de Germoplasma de Babaco.
- Micropropagación de Tomate de árbol, a partir de meristemas de plantas elite de la provincia de Tungurahua.