

Regeneración de plantas fértiles de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) var. Corojo Especial a partir de protoplastos del mesófilo foliar

Eduardo Menéndez Álvarez, Dubiel Alfonso y Guillermo Selman Housein.

División de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 6162, Código Postal 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 20 de junio de 1998. Aceptado: 25 de marzo de 1999.

Palabras clave: aislamiento, cultivo, protoplastos, regeneración, tabaco.
Key words: isolation, culture, protoplasts, regeneration, tobacco.

RESUMEN. El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es considerado una especie modelo en los trabajos de laboratorio, además del interés económico que tiene para muchas regiones. Por esta razón, se hacen esfuerzos para el mejoramiento genético de diferentes variedades por ingeniería genética y cultivo de tejidos. En este trabajo, se reporta un protocolo eficiente para el aislamiento y cultivo de protoplastos a partir del mesófilo de la variedad comercial de tabaco Corojo Especial, así como la obtención de plantas a partir de ellos. Se obtuvieron entre 3 y $3,5 \cdot 10^6$ protoplastos por gramo de tejido fresco digerido utilizando material vegetal de plantas crecidas por 6 semanas en condiciones de cultivo *in vitro*. La densidad de cultivo requerida para garantizar una constante división debe ser de $0,5 \cdot 10^6$ protoplastos/mL o superior, las primeras divisiones se observan a los 6 ó 7 d. En las condiciones de cultivo, los microcallos pueden ser observados a los 15 d en el medio que contiene la mezcla de K3 y la dilución H con 0,1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0,2 mg/L de 6-benzilaminopurina y 1,0 mg/L de ácido naftalenacético. Más de un 75 % de los protoplastos cultivados formaron colonias celulares. Los callos obtenidos se pusieron a regenerar plantas en medio MS con 1,0 mg/L de 6-benzilaminopurina. La eficiencia de regeneración de plantas a partir de los microcallos alcanzó un 0,88 %, lo que demuestra que no existe una marcada influencia del genotipo al cultivo de protoplastos de *Nicotiana*, ya que las frecuencias de regeneración obtenidas para la variedad Corojo Especial son similares a las reportadas para otras variedades "modelos" de este cultivo, como es el caso de la Petit Havana (SR-1). Las plantas regeneradas crecieron y enraizaron sin dificultad en medio Murashige y Skoog libre de hormonas.

ABSTRACT. To date, *Nicotiana tabacum* L. has been considered a very useful tool as experimental laboratory model and, for many regions worldwide, it also constitutes a very important commercial crop. For these reasons, great efforts are directed to the genetic improvement of different tobacco cultivars by means of genetic engineering and tissue culture techniques. In this paper, an efficient protocol for protoplast isolation, culture and plant regeneration from the leaf mesophyll of the tobacco commercial variety Corojo Especial is described. By using this technology, the authors obtained about 3 and $3,5 \cdot 10^6$ protoplasts per gram of enzymatically digested fresh tissue from *in vitro* cultures plants. A planting density of $0,5 \cdot 10^6$ protoplasts/mL or higher is required for a constant multiplication rate, occurring first divisions after 6 or 7 d culture. The microcalli formation can be observed in about 15 d of culture in a mixture of K3 medium and H solution and containing 0,1 mg/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 0,2 mg/mL of 6-benzylaminopurine and 1,0 mg/mL of naphthalenacetic acid. More than 75 % of cultured protoplasts formed cell clusters. The resultant calli were cultured for plant regeneration in MS medium supplemented with 1 mg/mL of 6-benzylaminopurine. The plant regeneration efficiency reached 0,88 %, which is similar to the values reported for "model varieties" as Petit Havana (SR-1). Based on this observation, it was concluded that protoplast culture in *Nicotiana* is little genotype dependent. Regenerated plants grew and rooted well in Murashige and Skoog medium without hormones.

INTRODUCCION

Los protoplastos son células desprovistas de pared, que pueden ser obtenidas en grandes cantidades a partir de diferentes tejidos y órganos como resultado de un tratamiento enzimático. En la actualidad, los protoplastos de células vegetales generalmente se obtienen a partir de las células del mesófilo de la hoja o de suspensiones celulares establecidas en dependencia del cultivo que se trate.

Los protoplastos constituyen el único sistema para demostrar la totipotencia de la célula vegetal y estudiar la estructura y función de las células vegetales,¹ así como los procesos que en ella se llevan a cabo, que incluyen desde la regeneración de la pared a partir de la membrana plasmática² hasta la división y multiplicación celular.³ Se conocen diferentes aplicaciones de los estudios de protoplastos en la Biología Vegetal (Tabla 1).

Actualmente, los protoplastos son blanco directo en los trabajos de mejoramiento genético moderno, a partir del desarrollo de la manipulación genética *in vitro*, ya sea en la transferencia directa de genes exógenos a su interior con carácter transitorio o estable, o en la obtención de plantas híbridas y/o cíbridas como consecuencia de la fusión de protoplastos de especies incompatibles sexualmente; de aquí se desprende que el éxito en la regenera-

ción de plantas a partir del cultivo de protoplastos es un factor importante en los trabajos de mejoramiento vegetal con el empleo de técnicas de Biología Celular y Molecular.

Por sus características, el cultivo del tabaco ha sido considerado "modelo" en los estudios del cultivo *in vitro* de órganos y tejidos y también es utilizado como tal, junto a *Arabidopsis thaliana* en los estudios básicos de Biología Molecular Vegetal, constituyendo un excelente material para el estudio de promotores y vías para potenciar la expresión de genes exógenos en cultivos de interés económico. Por consiguiente, los trabajos en *Nicotiana tabacum* L. son realizados básicamente en las variedades Xanthy y Petit Havana (SR1) y no en variedades de interés económico.

En los programas de mejoramiento varietal donde la planta de tabaco es considerada una especie de interés económico, se hace necesario optimizar un conjunto de metodologías a nivel celular y molecular que permitan explotar la factibilidad de este cultivo a ser mejorado mediante técnicas de la biología moderna.

Numerosos protocolos de regeneración de plantas a partir de protoplastos han sido reportados hasta la fecha para diferentes géneros y especies, cada uno con su particularidad,¹ aunque todos coinciden en la valoración que se hace del material de partida, la dilución enzimática, la osmoticidad, los elementos nutrientes del medio y el protocolo de obtención de los protoplastos.

El propósito de este trabajo es describir un protocolo eficiente para la regeneración de plantas de la variedad comercial Corajo Especial a partir de protoplastos del mesófilo de las hojas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Semillas de *Nicotiana tabacum* L. de la variedad Corajo Especial, fueron esterilizadas superficialmente en una dilución de hipoclorito de sodio 6,0 % durante 10 min; seguidamente fueron lavadas cuatro veces en agua destilada estéril y finalmente, se cultivaron por 6 semanas en medio MS² libre de hormonas con 0,6 % de fitoagar (Sigma, USA).

Aislamiento de protoplastos

Las hojas de plantas de 6 semanas (Fig. 1A) fueron cortadas en tiras perpendiculares al nervio cen-

tral y se incubaron a 28 °C en la dilución enzimática [1,2 % de celulasa "Onozuka R-10" (Yakult Honsha), 0,6 % macerozima "R-10" (Seishin Pharmaceutical)] disueltas en medio K3 (Tabla 1)³ esterilizado todo por filtración] durante un período de tiempo de 14 a 16 h, en la oscuridad y sin agitación. En cada digestión se utilizó 1 g de hojas con 15 mL de dilución enzimática.

El material digerido se filtró a través de mallas de nylon de 100 y 50 mm (Spectrum, USA), que se lavaron con pequeños volúmenes de medio K3.

La suspensión de protoplastos (Fig. 1B) se homogenizó y distribuyó cuidadosamente en tubos de centrifuga de 15 mL que previamente contenían 1 mL de la dilución W5 (Tabla 2)³ y se centrifugó durante 7 min a 80 g. Los protoplastos viables se encontraron en la interfase, de donde fueron colectados con pipeta Pasteur y pasados a nuevos tubos de centrifuga en alícuotas de 6 mL. Los protoplastos se homogenizaron con 8 mL de la dilución W5 y se centrifugaron durante 5 min a 80 g. Los que precipitaron, fueron resuspendidos en 1 mL de la dilución W5 para repetir este lavado. El precipitado final se resuspendió en 10 mL de medio K3 de donde se tomó una alícuota para el conteo y por último, se ajustó la población de células a una concentración de $1 \cdot 10^5$ protoplastos/mL.

Cultivo de protoplastos

Se tomaron 0,5 mL de la suspensión de protoplastos y se colocaron en forma de gota en el centro de una placa Petri de 6 cm de diámetro, a la cual se le añadieron 4,5 mL de la mezcla (1:1) de medio K3 y la dilución H (Tabla 2)³ con 0,6 % de

agarosa Sea Plaque (Sigma, USA). Se homogenizó y una vez solidificado el medio, se cultivaron durante 24 h bajo condiciones de oscuridad, reposo y 25 °C.

Después de 7 d de cultivo a la luz (Fig. 1C), se cortó la agarosa en cuadrantes que se cultivaron en zaranda a 80 r/min en erlenmeyers con 50 mL de medio A (Tabla 2).³ Después de 2 a 3 semanas, se observaron microcallos originados de los protoplastos, algunos de los cuales, se separaron de la matriz de agarosa quedando libres en el medio líquido (Fig. 1D).

Regeneración de plantas

Los microcallos de 5 a 6 semanas (2 a 3 mm de diámetro) se extrajeron de la agarosa y cultivaron en el medio inductor de brotes (SI) (Tabla 2)³ con 0,6 % agarosa durante 2 semanas en presencia de luz y a 27 °C, donde alcanzaron tallas de aproximadamente 8 mm de diámetro, haciéndose visibles nuevas estructuras verdes (Fig. 1E). Este material se pasó a frascos con el mismo medio, en los que los brotes crecieron definiéndose la estructura de las plántulas (Fig. 1F), que se individualizaron y se cultivaron en medio MS libre de hormonas donde finalmente, crecieron y desarrollaron su sistema radicular (Fig. 1G).

RESULTADOS Y DISCUSION

El empleo de plantas crecidas en condiciones de cultivo *in vitro* garantiza la repetibilidad de los resultados debido a que estas condiciones brindan un material de partida homogéneo. Un requisito indispensable para la exitosa aplicación de este protocolo, es la selección adecuada del material vegetal inicial, porque garantiza la obtención de protoplastos con elevada viabilidad

Tabla 1. Aplicaciones del estudio de protoplastos en la Biología Vegetal.

Método	Aplicación
Aislamiento de protoplastos	Estructura y composición de la membrana plasmática. Organelos citoplasmáticos asociados a la membrana. Metabolismo primario. Metabolismo secundario.
Cultivo de protoplastos	Formación de la pared celular. Regeneración de plantas.
Fusión de protoplastos	Ciclo celular Interacción de la membrana plasmática con otros organelos.
Ingeniería Genética	Estudio de promotores. Expresión de genes foráneos. Híbridos.

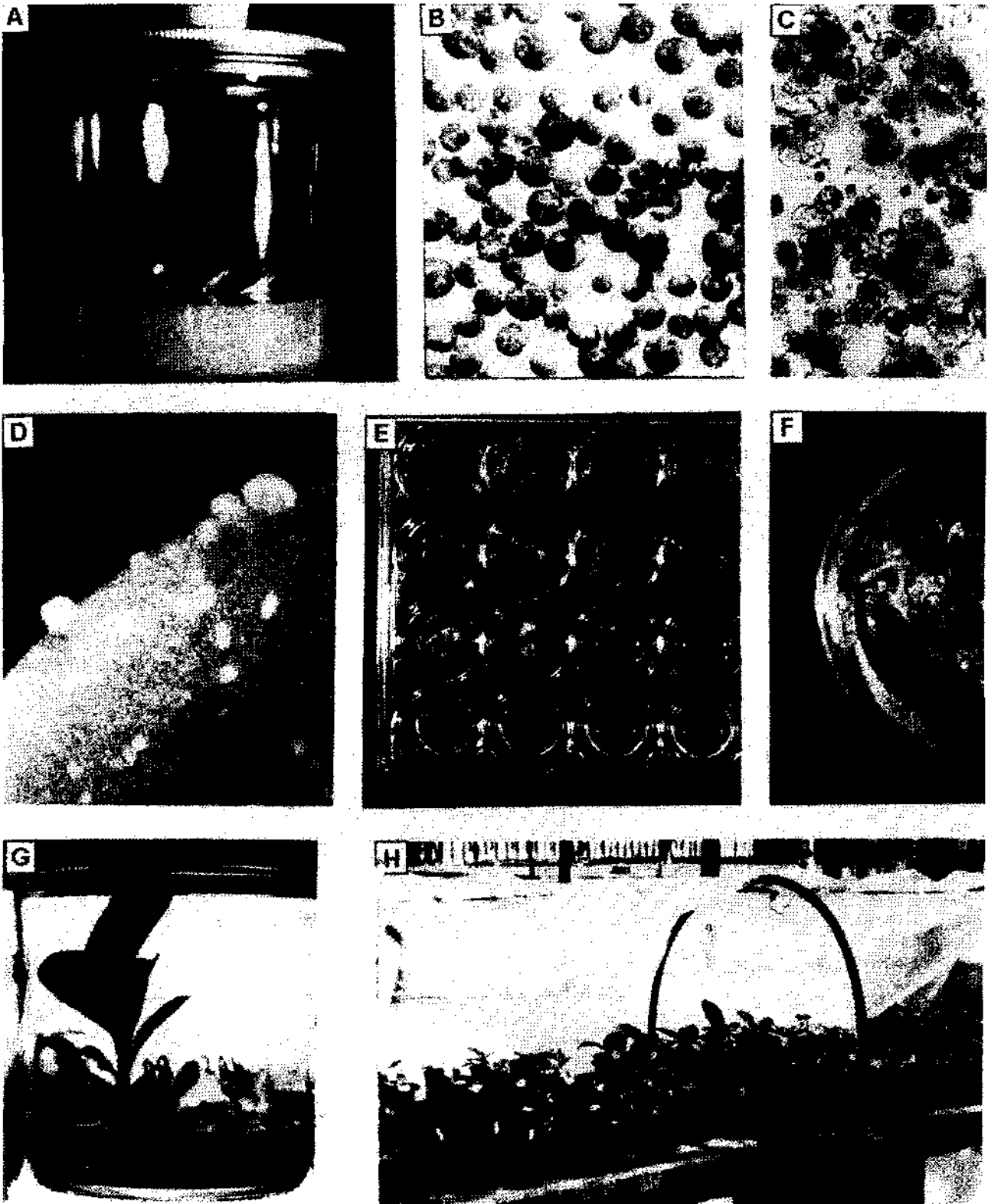


Fig 1. A. Planta de tabaco de 6 semanas. B. Suspensión de protoplastos después de su lavado. C. Cultivo de protoplastos en matriz de agarosa a los 8 d. D. Cultivo de protoplastos en matriz de agarosa embebida en medio líquido a las 2 a 3 semanas. E. Microcallos de 5 a 6 semanas en medio inductor de brotes. F. Brotes regenerando de microcallos. G. Plantas regeneradas a partir de protoplastos. H. Plantas regeneradas a partir de protoplastos, creciendo en condiciones de invernadero.

y calidad, capaces de regenerar la pared y dividirse hasta formar agregados celulares, que luego de cultivados, originan nuevas plantas. El carácter embriogénico de estas cé-

lulas puede estar dañado por la no eliminación total de las enzimas usadas en la digestión del tejido foliar,¹⁰ de ahí, la importancia de los lavados por centrifugación.

Con el empleo de estas metodologías de obtención y cultivo de protoplastos y la de regeneración de plantas fértiles a partir de ellos, vía embriogénesis, se logra obtener

Tabla 2. Composición de los diferentes medios de cultivo (mg/L) utilizados.

Componente	MS	K3	W5	H	A	SI
Nitratos						
NH ₄ NO ₃	1 650				800	1 650
KNO ₃	1 900	2 500		1 900	1 010	1 900
Cloruros						
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	900	18,400	600	440	730
KI	0,83	0,75		0,75	0,75	0,83
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025		0,025	0,025	0,025
NaCl			8 900			
KCl			370			
Sulfatos						
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	250		300	740	370
MnSO ₄ · H ₂ O	16,9	10,0		10,0	10,0	16,9
(NH ₄) ₂ SO ₄		250				
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	2,0		2,0	2,0	8,6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,025		0,025	0,025	0,025
Fosfatos y P, Bo, y Mo						
H ₃ BO ₃	6,2	3,0		3,0	3,0	6,2
KH ₂ PO ₄	170			170	136	170
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		150				
CaHPO ₄		50				
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Fe- EDTA						
Na ₂ EDTA	37,3	37,3		37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8		27,8	27,8	27,8
Azúcares						
D-Celobiosa				0,125		
D-Fructosa				0,125		
D(+)-Glucosa			900	68,40		
D-Manitol				0,125	50 g/L	
D-Manosa				0,125		
D-Ribosa				0,125		
D(+)-Sacarosa	20 g/L	102,69 g/L		0,125	30 g/L	30 g/L
D-Sorbitol				0,125		
D-Xilosa		0,25		0,125		
L(+)-Ramnosa				0,125		
Myo-inositol	100	100,0		100	100	100
Reguladores de crecimiento						
Acido diclorofenoxiacético		0,1		0,1		
Benzilaminopurina		0,2		0,2	1	1
Acido naftalenacético		1		1	0,1	
Vitaminas						
Acido fólico				0,2		
Acido nicotínico	0,5	1		1	1	0,5
D-Biotina				0,005		
D-Pantotenato de calcio				0,5		
L(+)-Acido ascórbico				0,1		
Acido p-aminobenzoico				0,01		
Piridoxina (HCl)	0,5	1		1	1	0,5
Riboflavina				0,1		
Tiamina (HCl)	0,1	10		10	10	0,5
Retinol				0,005		
Colecalciferol				0,005		
Vitamina B ₁₂				0,01		
Nicotinamida				1		
Otros						
Acido cítrico				10		
Acido fumárico				10		
Acido málico				10		
Cloruro de colina				0,5		
Hidrolizado de caseína				5		
Succinato de amonio					50	

buenos resultados para la variedad de tabaco objeto de estudio, tanto en la obtención de protoplastos (3 a $3.5 \cdot 10^6$ protoplastos/g de tejido digerido) como en la eficiencia de cultivo (colonias/protoplastos cultivados) que tuvo valores superiores al 75 %, con un 0.88 % de regeneración de plantas (porcentaje de callos que regeneran plantas comparado con el número total de callos subcultivados en el medio de regeneración). Estos resultados se mantienen cerca de los reportados por Spangenberg y Potrykus en 1994⁹ para este mismo género y son comparables con los de Willison y Klein en 1982³, por lo que se puede apreciar, no se observa una marcada influencia de la variedad al cultivo de protoplastos de esta especie.

Los resultados demuestran que los protoplastos derivados del mesófilo foliar mantienen la capacidad morfogénica que posee el tejido donante, lográndose elevadas frecuencias de regeneración durante el cultivo de estos. Es muy probable que los eventos que deben transcurrir durante la embriogénesis se vean limitados por la presencia de compuestos fenólicos y/o restos de células muertas, por lo que durante los subcultivos es necesario eliminar de los callos todas las zonas de crecimiento necrosadas o que han liberado fenoies.

Las plantas resultantes, una vez individualizadas, enraizan fácilmente durante los 15 d posteriores,

creciendo tal y como si fuesen plantas provenientes de semillas botánicas, pudiendo ser transplantadas a suelo en condiciones de invernadero 3 ó 4 meses después del inicio del cultivo de los protoplastos (Fig. 1H). La regeneración de plantas fértiles a partir de protoplastos de la variedad Corrojo Especial, se mantiene dentro de las frecuencias y de los tiempos reportados para otras variedades "modelos" de este cultivo, como es el caso de la Petit Havana (SR-1).⁹

Los medios utilizados en el cultivo de protoplastos y regeneración de plantas a partir de estos, han sido y son optimizados en cada paso y para cada cultivo,¹¹ por lo que resulta importante tener en cuenta que la calidad de los reactivos empleados para la elaboración de los medios y las diluciones utilizadas sea la mejor, ya que estos y las técnicas de cultivo son dos de los factores que más influyen para lograr el éxito en este tipo de trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Taylor A.R.D. and Hall J.L. An ultrastructural comparison of lanthanum and silicotungstic acid-chromic acid as plasma membrane stains of isolated protoplasts. *Plant Sci. Lett.*, 14, 139, 1979.
2. Fowke L.C. and Gamborg O.L. Applications of protoplasts to the study of plant cells. *Inst. Rev. Cytol.*, 68, 9, 1980.
3. Willison J.H.M. and Klein A.S. Cell wall regeneration by protoplasts isolated from higher plants, in: "Cellu-

lose and Other Natural Polymer Systems: Biogenesis, Structure and Degradation," R.M. Brown, ed., Plenum Press, New York., 1982.

4. Roest S. and Gilissen L.J.W. Plant regeneration from protoplasts: a literature review. *Acta Bot. Neerl.*, 38, 1, 1989.
5. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473, 1962.
6. Nagy J.I. and Maliga P. Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *N. sylvestris*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 78, 453, 1976.
7. Menczel L., Nagy F., Kiss Z. and Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *N. tabacum* + *N. knighiana*: Correlation of resistance to *N. tabacum* plasmids. *Theor. Appl. Genet.*, 59, 191, 1981.
8. Potrykus I. and Shillito R.D. Protoplasts: Isolation, culture, plant regeneration. In *Methods in Enzymology* (A. Weissbach and H. Weissbach ed.), 118, 549, 1986.
9. Spangenberg G. and Potrykus I. Isolation, Culture and Plant Regeneration from Protoplasts. *Cell Biology: A laboratory Handbook.*, 462, 1994.
10. Jähne A., Lazzeri P.A. and Lörz H. Regeneration of fertile plants from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Reports* 10, 1, 1991.
11. George E.F., Puttock D.J.M. and George H.J. *Plant Culture Media*. Vol. 1. Formulations and Uses. Exegetics Limited, Edington, 1987.

SIMPOSIO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

UNIVERSIDAD DE LA HABANA

Ministerio de Educación Superior

Del 11 al 15 de diciembre del 2000.

Ciudad de La Habana, Cuba.

Temáticas: Aislamiento y purificación de biomoléculas. Inmovilización de proteínas. Biología molecular. Inmunología. Toxicología y farmacología. Bioquímica nutricional y clínica. Bioquímica y biotecnología vegetal. Fisiología vegetal. Bioquímica y biotecnología marina. Metabolitos microbianos y biotecnología. Enseñanza.

Cuota de inscripción: 100.00 USD.

Se pagará en el momento de la acreditación del Simposio.

Presidente Comité Organizador: Dra. Mayra Tejuca Martínez

Fax: (53)(7) 32 1321. **Correo electrónico:** tejuca@nova.uh.cu