



# ¿Qué son los protoplastos y para qué sirven?

Wilberth Poot-Poot y Teresa Hernández-Sotomayor



## Introducción

Las plantas, además de ser fuente de alimentos, generar oxígeno y retirar dióxido de carbono del ambiente, pueden utilizarse como materia prima en el área de la biotecnología. A través de ésta se ha logrado obtener diferentes especies vegetales con un alto grado de producción de alimentos, y especies con resistencia al ataque por patógenos.

Sin embargo, para obtener cultivos vegetales con las cualidades antes mencionadas es necesario aplicar procesos de transformación que demandan largos tiempos para evaluar la transformación y la regeneración de la planta.

Por otro lado, las diferentes partes de las plantas (hojas, raíces, polen, etcétera) o los diferentes tejidos vegetales que se originan a partir de éstas, pueden utilizarse para obtener células que carecen de pared celular, denominadas *protoplastos*. Éstos, junto con procedimientos de transformación transitorios, pueden aplicarse como una alternativa para evaluar la función de uno o varios genes en respuesta a un cambio biótico o abiótico.

En este trabajo nos enfocamos a describir qué son, cómo son y dónde se pueden utilizar los protoplastos.

etapas de su desarrollo. En animales, las células embrionarias tienen la habilidad de moverse de un lugar a otro para formar tejidos y órganos. Las células vegetales, en cambio, carecen de este movimiento debido a la pared celular, compuesta de lignina y celulosa, que las rodea; ésta es una de las diferencias más importantes entre las células vegetales y las animales.

La pared celular vegetal se divide en pared primaria y pared secundaria, que varían en composición química, grosor y propiedades físicas (Figura 1 y Cuadro 1). En el genoma de la planta *Arabidopsis thaliana* se ha determinado que existe un número muy grande de genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de la pared.

La pared celular, además de ser una estructura compleja, dinámica, que proporciona rigidez y protege a la membrana plasmática de daño físico y mecánico, funciona como mediadora en todas las relaciones de la célula y su entorno, y permite así a las células mantenerse viables. Pero en ocasiones, cuando se desea hacer experimentos de transformación genética –que requieren introducir ADN (ácido desoxirribonucleico) foráneo en una célula vegetal– la pared puede ser un problema, por lo que es necesario eliminarla.

## ¿Qué es la pared celular?

Las células vegetales, a diferencia de las animales, presentan una cubierta que las rodea en casi todas las

## ¿Qué son los protoplastos?

Un protoplasto es una célula vegetal a la cual se le ha removido completamente la pared celular, mediante



*Arabidopsis thaliana*. Tomada de John Innes Centre (<http://news.jic.ac.uk>)

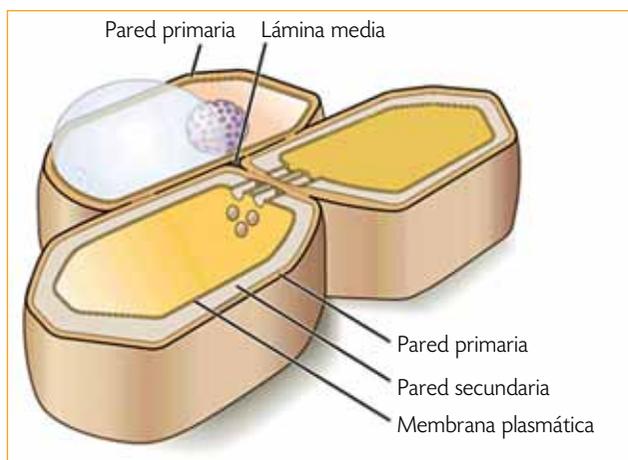


Figura 1.

**Cuadro 1. Composición general de la pared celular de las plantas**

Componentes	Pared primaria	Pared secundaria
Polisacáridos	90%	65-85%
Celulosa	30%	50-85%
Hemicelulosa	30%	5-30%
Pectina	30%	–
Proteína	10%	–
Lignina	–	15-35%

métodos mecánicos o enzimáticos. Observados al microscopio, los protoplastos presentan una forma esférica, con el citoplasma rodeado por una membrana plasmática; en el interior de la célula se puede visualizar el núcleo (Figura 2). En 1960, Cocking fue el primero en producir, con métodos enzimáticos, protoplastos a partir de plantas superiores. En sus experimentos utilizó extractos crudos con actividad de celulasa obtenidos del hongo *Myrothecium varrucana*. Actual-

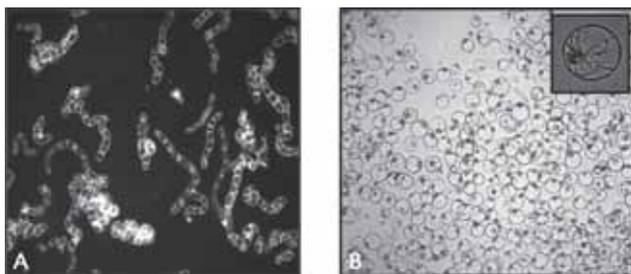


Figura 2.

mente, por este método es posible obtener protoplastos de órganos completos de las plantas y de tejidos en cultivo.

### Fuentes de protoplastos

Como ya se mencionó, es posible obtener protoplastos a partir de cualquier órgano, tejido y tipo de planta. Las fuentes más comunes son las hojas (mesófilo foliar) y tejidos cultivados *in vitro*, como suspensiones celulares, callos, etcétera. Sin embargo, dependiendo de las necesidades experimentales, se pueden utilizar tejidos diferenciados o no diferenciados para obtener protoplastos.

Uno de los factores que también afecta el aislamiento, rendimiento y viabilidad de los protoplastos (Figura 3) es el estado fisiológico del tejido de la planta de la cual se parte. Para obtener protoplastos de excelente calidad, las plantas deben ser cultivadas en condiciones controladas, y en ocasiones es necesario proporcionarles un pretratamiento con hormonas vegetales (fitohormonas). Normalmente, para aislar protoplastos, el material vegetal (hoja, callo y suspensiones celulares) debe incubarse con la mezcla enzimática durante 4 a 18 horas, a una temperatura de 28 °C, en oscuridad y con agitación ligera para liberar los protoplastos del tejido.

### Métodos para preparar protoplastos

Los protoplastos pueden aislarse por medios mecánicos, por métodos enzimáticos o por una combinación de ambos.

Para lograr éxito al aislar protoplastos se ha recomendado exponer el material de partida (hoja, raíz, suspensiones celulares, etcétera) a un medio ligeramente hiperosmótico para que la membrana se contraiga y se separe de su pared celular. Esta contracción se logra mediante el uso de soluciones salinas como cloruro de potasio, sulfato de magnesio o azúcares-alcoholes (manitol). El proceso de separación de la membrana plasmática de la pared celular es llamado *plasmólisis*.

Klercker (1892) fue el primero en utilizar el método mecánico para aislar protoplastos vivos utilizando



Figura 3.

cebolla como fuente de partida. Dicho método consiste en aplicar un choque osmótico para producir plasmólisis en las células, las cuales se rompen luego de un corte. Posteriormente, los protoplastos son liberados de las células mediante el restablecimiento de su nivel osmótico.

Actualmente, este método ha sido reemplazado casi en su totalidad por el enzimático. En el mercado existen preparaciones comerciales de enzimas para aislar protoplastos (pectinasas, celulasas o hemicelulasas), cuyas fuentes pueden ser de origen fúngico o bacteriano. Usando una mezcla de estas enzimas se puede hidrolizar las paredes celulares y obtener altos rendimientos de protoplastos viables, adecuados para diferentes fines en la investigación.

### Transformación de protoplastos

La primera metodología desarrollada para la transformación genética de plantas (introducción de material genético ajeno) fue la de *A. tumefaciens*. Sin embargo, esta tecnología no fue de utilidad para abordar la transformación de especies de importancia económica como los cereales, debido a que no son hospedantes naturales de esta bacteria, y por tanto no se lograba un mejoramiento genético. Esto originó que se buscaran métodos alternativos, lo que condujo al desarrollo de los métodos físicos de transformación. En ellos, el transgen (gen foráneo) es introducido en la

célula vegetal mediante distintas técnicas, que mencionaremos a continuación.

En 1983 se informó sobre los primeros experimentos de expresión de un transgen en células vegetales, y al año siguiente se obtuvieron las primeras plantas transgénicas (tabaco y petunia). Desde entonces se ha extendido la aplicación de esta tecnología a un gran número de especies. Entre sus aplicaciones se encuentran la obtención de plantas con resistencia a virus, insectos, hongos y bacterias; la tolerancia a herbicidas y a diferentes tipos de estrés abiótico, y la modificación de la calidad nutritiva de los cultivos, entre otras.

A continuación se mencionan algunos de los métodos más comunes para la transformación de protoplastos:

**Agrobacterium:** La transformación vegetal mediada por *Agrobacterium* consiste en hacer cortes circulares del tejido vegetal, generalmente hoja, y dejarlos en contacto con una suspensión bacteriana por el tiempo necesario, y luego evaluar si se llevó a cabo la transformación. Sin embargo, este método también se ha aplicado para transformar protoplastos vegetales. De igual manera que en hoja, los protoplastos son puestos en contacto con la bacteria *Agrobacterium*, y luego son lavados con una solución adicionada con antibióticos, para eliminar a la bacteria. Dependiendo de las necesidades experimentales, los protoplastos pueden observarse con un microscopio de fluorescencia, si el gen foráneo tiene fusionada una proteína fluorescente, o también cultivarse en un medio sólido, para regenerar plantas.

**Poli(etil)englicol:** La introducción y expresión de ADN foráneo en protoplastos fue el primer método de transferencia directa claramente demostrado en plantas, y esto se debió a que se disponía, para algunas especies, de procedimientos eficientes para regenerar las plantas a partir de protoplastos. Se basa en el hecho de que la pared celular es la principal barrera para introducir ADN en las células vegetales, por lo que ésta tiene que ser temporalmente removida. La transformación mediada por poli(etil)englicol (PEG) es el método más comúnmente usado. El PEG genera orificios en las membranas plasmáticas, llamados poros, debido a que altera la polaridad de la misma, y por ellos penetra el ADN foráneo.

**Electroporación:** Consiste en aplicar una corriente eléctrica con un aparato llamado electroporador a una población de protoplastos depositados en una celda, la

cual presenta dos electrodos de aluminio localizados a una distancia definida. El principio de este método consiste en desestabilizar eléctricamente la membrana celular, generando agujeros transitorios en ella, lo que permite que el ADN viaje al interior de la célula.

**Microinyección:** Este método de transformación consiste en la introducción de ADN en el núcleo o citoplasma mediante un microcapilar de inyección y un micromanipulador. Durante la introducción del ADN en el núcleo, las células son inmovilizadas con una pipeta de sujeción y una pipeta de succión. La transformación por este método es ampliamente utilizada en células grandes de animales. En células vegetales su aplicación es complicada debido a que presentan una pared celular compuesta por lignina y celulosa y, como consecuencia, representa una barrera para las herramientas de vidrio utilizadas en microinyección. Sin embargo, el uso de protoplastos para la transformación vegetal pudiera ser adecuado para contrarrestar el efecto de la pared celular. En este caso, se utilizan polímeros de lisina o agarosa para fijar los protoplastos a un soporte de vidrio. Aunque este método se puede aplicar a células vegetales desprovistas de su pared celular, no deja de ser un sistema poco usado y laborioso.



## ● Aplicación de los protoplastos

El uso de los protoplastos como modelo en el área de la ciencia se debe a que, como se ha mencionado en las secciones anteriores, éstos no presentan pared celular y, por consiguiente, dejan expuesta a la membrana plasmática, la cual es blanco para cualquier modificación. Los protoplastos se han aplicado en estudios de procesos de transporte y división celular, morfogénesis, mutagénesis, selección, transformación genética por hibridación o fusión somática, e introducción de ADN foráneo por métodos biológicos y directos, entre otros (Cuadro 2).

Sin embargo, tal vez las aplicaciones más recientes de estas células sin pared sean en el estudio de mecanismos de ARN (ácido ribonucleico) de interferencia y en el aislamiento de núcleos para la localización de metales tóxicos, como cadmio y aluminio, entre otros.

## ● Conclusiones

El cultivo de tejido vegetal fue desarrollado a partir de la investigación de botánicos y fisiólogos vegetales y se ha convertido en una herramienta importante en la selección, el cruzamiento, el control de enferme-

**Cuadro 2. Aplicaciones del uso de los protoplastos en diferentes procesos celulares**

Autores	Especie	Año	Aplicación
Leister y Katagiri	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2000	Reconocimiento de genes involucrados en la patogénesis de plantas
Sheen	<i>A. thaliana/Zea mays</i>	2001	Elucidación de los mecanismos de transducción de señales en plantas
Yasukawa	<i>Bryopsis plumosa</i>	2002	Análisis electroquímico del flujo metabólico
Fan	<i>Brassica chinensis</i>	2003	Estudios electrofisiológicos de canales de potasio
Choi	<i>Cucurbita pepo</i>	2003	Patogénesis viral
Cormeau	<i>Helianthus annuus</i>	2002	Importe de un péptido sintético a través de la membrana plasmática
Liang	<i>Hibiscus cannabinus</i>	2002	Procesos de replicación viral
Zhou	<i>Hordeum vulgare</i>	2000	Comparación de mecanismos de estrés entre plantas y células humanas cancerígenas
Shapka y Nagy	<i>Nicotiana benthamiana</i>	2004	Replicación y recombinación viral
Ding	<i>Nicotiana tabacum</i>	2004	Regulación del transporte de agua a través de las membranas celulares
Suga	<i>Raphanus sativus</i>	2003	Evaluación inmunocitoquímica de la acumulación de acuaporinas
Kim	<i>Vigna radiata</i>	2004	Respuesta intracelular a sequía y salinidad
Vermeer	<i>Vigna unguiculata</i>	2004	Estudios de la organización de la membrana plasmática
Bart	<i>Oriza sativa</i>	2006	Silenciamiento genético mediante siRNA (pequeños ARN interferentes)
Ramírez-Benítez et al.	<i>Coffea arabica</i> L.	2009	Tratamiento y localización del aluminio intracelular en dos líneas celulares de café

dades y la producción en masa de cultivos agrícolas, hortícolas, forestales y frutales.

Desde que el investigador Klercker (1892) obtuvo por primera vez preparaciones crudas de protoplastos, hoy es posible obtenerlos a partir de cualquier parte de las plantas y cualquier especie. Estos sistemas celulares actualmente son utilizados como herramientas para realizar estudios de localización de proteínas, de canales iónicos, y evaluación de función de genes mediante ARN de interferencia.

Además, su aplicación en la hibridación somática puede permitir que diferentes especies de la misma familia sean cruzadas. Esto normalmente es imposible siguiendo el proceso convencional de regeneración sexual de las plantas. Esta técnica se realiza mediante el cultivo de los protoplastos de cada una de las especies de interés, su mezcla y la selección de aquellos que presentan fusión. Mediante una cuidadosa selección y cultivo, se podrán regenerar plántulas a partir de estos protoplastos híbridos, para evaluar sus características deseables *in vivo*. Sin embargo, plantas como los cereales son recalcitrantes a la gran mayoría de los procesos de transformación y de cultivo, lo que ha dificultado en cierta manera su mejora genética.

La obtención de protoplastos, en teoría, puede realizarse en cualquier planta; no obstante, su cultivo y conservación son tediosos. Cuando los procesos de recalcitrancia sean superados en todas las especies vegetales, será posible obtener plántulas a partir de protoplastos y, como consecuencia, introducir o mejorar las características de interés.

### Agradecimientos

El trabajo desarrollado en el laboratorio de la Dra. Teresa Hernández Sotomayor y la beca posdoctoral han sido apoyados por el proyecto de Conacyt (98352). Se agradece al M. C. José Armando Muñoz Sánchez por la revisión crítica de este trabajo y a la M. C. Gabriela Herrera por la edición ortotipográfica y gramatical.

**Wilberth Poot-Poot** estudió la licenciatura en la Facultad de Ingeniería Química (Universidad Autónoma de Yucatán), la maestría en el Instituto Tecnológico de Mérida, Yucatán, y el doctorado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Actualmente realiza una estancia posdoctoral en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY.  
waflaco@yahoo.com.mx

**Teresa Hernández-Sotomayor** es profesora titular del CICY. Tiene los grados de maestría y doctorado en investigación biomédica básica. Ha publicado más de 80 trabajos en el área de transducción de señales y ha formado recursos humanos a nivel de licenciatura, maestría y doctorado. Es miembro del SNI. Su línea de investigación actual versa sobre los mecanismos de transducción de señales en plantas en respuesta al estrés abiótico.  
ths@cicy.mx

### Lecturas recomendadas

- Bart, R., M. Chern, C. J. Park., L. Bartley y P. C. Ronald (2006), "A Novel System for Gene Silencing using siRNAs in Rice Leaf and Stem-Derived Protoplasts", *Plant Methods*, 2:1-9.
- Cocking, E. C. (1960), "A Method for Isolation of Plant Protoplasts and Vacuoles", *Nature*, 187:962-963.
- Davey, M. R., P. Anthony, J. B. Power y K. C. Lowe (2005), "Plant Protoplasts: Status and Biotechnological Perspectives", *Biotechnology Advances*, 23:131-171.
- Fosket, D. E. (1994), *Plant Growth and Development. A Molecular Approach*, San Diego, California, Academic Press.
- George, E. F., M. A. Hall y G. J. de Klerk (2008), *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3ª edición, Springer.
- Klercker, J. (1892), "Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten", *Ofvers. Vetensk. Akad. Forh. Stock*, 49: 463-475.
- Ramírez-Benítez, J. E., S. M. T. Hernández-Sotomayor y J. A. Muñoz-Sánchez (2009), "The Location of Aluminium in Protoplasts and Suspension Cells Taken from *Coffea arabica* L. with Different Tolerance of Al", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103:1491-1496.
- Somerville, C., S. Bauer y colaboradores (2004), "Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls", *Science*, 306:2206-2211.
- Sheen, J. (2001), "Signal Transduction in Maize and *Arabidopsis* Mesophyll Protoplasts", *Plant Physiology*, 127: 1466-1475.
- Taiz, L. y E. Zeiger (2002), *Plant Physiology*, 3ª edición, Sunderland, EUA, Sinauer.