

Observación y fusión de protoplastos en hojas de tres especies vegetales: Maíz (*Zea mays*), lechuga (*Lactuca sativa*) y acelga (*Beta vulgaris*)

Observation and fusion of protoplasts in leaves of three plant species: Corn (*Zea mays*), lettuce (*Lactuca sativa*) and chard (*Beta vulgaris*)

Oscar Jesús. Romero Oliva ^a y Luis Alejandro García-Hernández ^b

Abstract:

Introduction: Protoplasts are vital cellular units in plant biotechnology, as they can regenerate the cell wall and form colonies. Protoplast fusion involves the fusion of cellular membranes from different cells, making it an important technique in plant biotechnology. **Materials and Methods:** Protoplasts from maize, lettuce, and chard leaves were isolated through cellular plasmolysis followed by enzymatic digestion of cell walls. Osmotic pressure and pH were controlled during this process. Finally, protoplast fusion was induced by manipulating the electrochemical charge of DNA. **Results:** Various stages of cell wall reduction were observed in the leaves used, facilitating the release of protoplasts to different extents. These results demonstrate the efficacy of the method in obtaining a variety of protoplasts. **Conclusion:** Protoplasts are useful in introducing molecules such as proteins and DNA into plant cells. Their fusion and regeneration capabilities make them valuable tools in genetic engineering and biotechnology.

Keywords:

Cell wall, plant biotechnology, polyethylene glycol, protoplast fusion, protoplast isolation

Resumen:

Introducción: Los protoplastos son unidades celulares vitales en la biotecnología vegetal, ya que pueden regenerar la pared celular y formar colonias. La fusión de protoplastos implica la unión de membranas celulares de distintas células, es una técnica importante en la biotecnología vegetal. **Materiales y métodos:** Se aislaron los protoplastos de hojas de maíz, lechuga y acelga mediante plasmólisis celular y posteriormente digestión enzimática de las paredes celulares. Se controló la presión osmótica y el pH durante este proceso. Finalmente, se indujo la fusión de protoplastos mediante la manipulación de la carga electroquímica del ADN. **Resultados:** Se observaron diversas etapas de reducción de la pared celular en las hojas utilizadas, lo que facilitó la liberación de protoplastos en diferentes grados. Estos resultados demuestran la eficacia del método para obtener una variedad de protoplastos. **Conclusión:** Los protoplastos son útiles en la introducción de moléculas como proteínas y ADN en células vegetales. Su capacidad de fusión y regeneración los convierte en herramientas valiosas en la ingeniería genética y la biotecnología.

Palabras Clave:

Aislamiento de protoplastos, biotecnología vegetal, fusión de protoplastos, pared celular, polietilglicol.

Introducción

El término *protoplasto* (Figura 1) se refiere a la porción viva de una célula vegetal que está encerrada por la pared celular (Feingold *et al*; 2023), lo que se traduce en la célula desnuda de la planta, que comprende la membrana celular y el citoplasma con sus organelos (Figura 2). La obtención de protoplastos se lleva a cabo a partir de

células o tejidos vegetales mediante el empleo de enzimas que degradan la pared celular (Blasques, 2022).

Los protoplastos aislados representan suspensiones de células que carecen de pared celular y se encuentran rodeadas únicamente por la membrana plasmática (Ricardo-Navarro *et al*; 2023). La falta de una pared celular rígida los convierte en candidatos idóneos para la

^a Oscar Jesús. Romero Oliva, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo | Escuela Preparatoria Número 3 | Pachuca de Soto-Hidalgo, México | <https://orcid.org/0000-0003-4440-8932>, Email: oscar_romero@uaeh.edu.mx

^b Luis Alejandro García Hernández, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo | Instituto de Ciencias Agropecuarias | Tulancingo-Hidalgo, México | <https://orcid.org/0009-0008-7366-607X> E-mail: ga449000@uaeh.edu.mx

realización de estudios fisiológicos y bioquímicos, así como para llevar a cabo diversas manipulaciones genéticas (Sánchez-Raya *et al*; 2021).

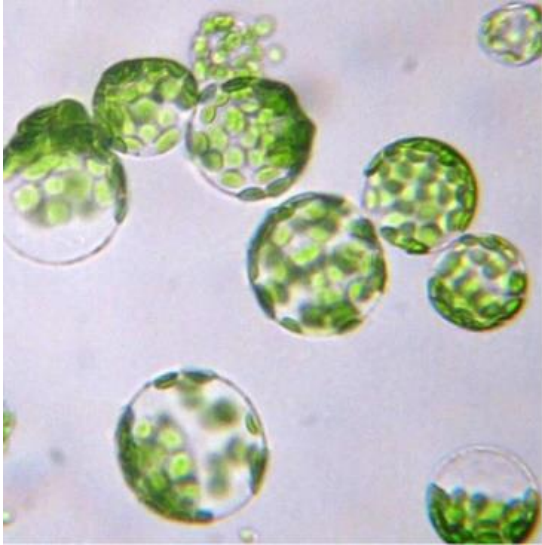


Figura 1. Microfotografía de protoplastos. Tomada de: <https://thebiotechnotes.com/2016/12/22/protoplasts-ptc/>

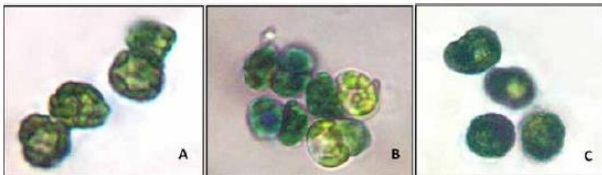


Figura 2. Protoplastos aislados de mesófilo en diferentes genotipos de tomate. Tomada de: <http://www.scielo.org.co/img/revistas/acbi/v33n94/v33n94a3f4.jpg>

Estos protoplastos tienen la capacidad de regenerar la pared celular, dividirse y formar colonias celulares (Figura 3), siempre y cuando sean cultivados de manera apropiada (Carvajal, 2020). Además, un amplio número de especies vegetales son capaces de regenerar plantas fértiles a partir de colonias celulares derivadas de protoplastos. La alta frecuencia de regeneración de plantas es un requisito fundamental cuando se emplean los protoplastos para estudios genéticos (Arciniegas, 2020).

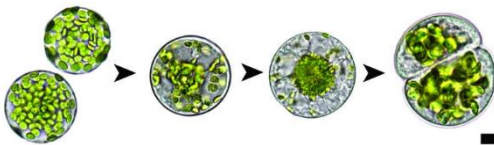


Figura 3. División celular de protoplastos. Tomada y modificada de:

https://www.researchgate.net/figure/Mesophyll-protoplast-culture-and-peroxisomes-in-isolated-protoplasts-A-The_fig8_281675446

A pesar de que existen reglas generales (Figura 4), no hay métodos estandarizados para el aislamiento y cultivo de protoplastos de plantas. Cada especie de planta y cada tipo de tejido requiere procedimientos específicos para su aislamiento y cultivo, lo que implica la necesidad de optimizar el sistema mediante ajustes empíricos de los procedimientos de aislamiento y cultivo (Lara-Zúñiga, 2021; Quevedo, 2023; Reyna-Llorens *et al*; 2023).

Además del cultivo, la fusión de protoplastos es una técnica de biotecnología vegetal que implica la fusión de las membranas de dos o más células, lo que da lugar a un híbrido somático (Xu *et al*; 2022). Esta técnica se emplea en programas de mejora genética, como la generación de poliploides, que generalmente son más productivos.

Díaz-García *et al*. (2023), menciona que para llevar a cabo la fusión de protoplastos, se aplican pulsos eléctricos a células en suspensión (electroporación) o se induce la desorganización de las membranas mediante el uso de polietilenglicol. Es importante destacar que, aunque esta técnica mezcla el contenido genético de dos líneas distintas, no se considera ingeniería genética, ya que no se emplea la tecnología del ADN recombinante en su ejecución (Scintilla *et al*; 2022).

Ventajas de esta técnica

Hibridación somática: Permite la creación de híbridos interespecíficos o intraespecíficos, que no pueden ser logrados mediante métodos convencionales de cruzamiento. Esto es útil para la introducción de nuevas características genéticas en las plantas, como resistencia a enfermedades o estrés ambiental.

Transferencia de genes: Facilita la transferencia de material genético entre células de diferentes especies o variedades, lo que permite la introducción de genes específicos de interés en una planta receptora. Esto puede incluir genes de resistencia a plagas, tolerancia a herbicidas, o mejora de la calidad nutricional.

Creación de variabilidad genética: La fusión de protoplastos puede generar variabilidad genética adicional en las poblaciones de plantas, lo que puede ser útil en programas de mejora genética para la selección de nuevas características deseables.

Creación de quimeras: Permite la producción de quimeras vegetales, en las cuales células de diferentes orígenes genéticos se combinan en una planta. Esto puede ser útil para el estudio de la regulación génica y el desarrollo de la planta (Rizzo *et al*; 2020; Yu *et al*; 2021; Sánchez-Carrillo *et al*; 2023).

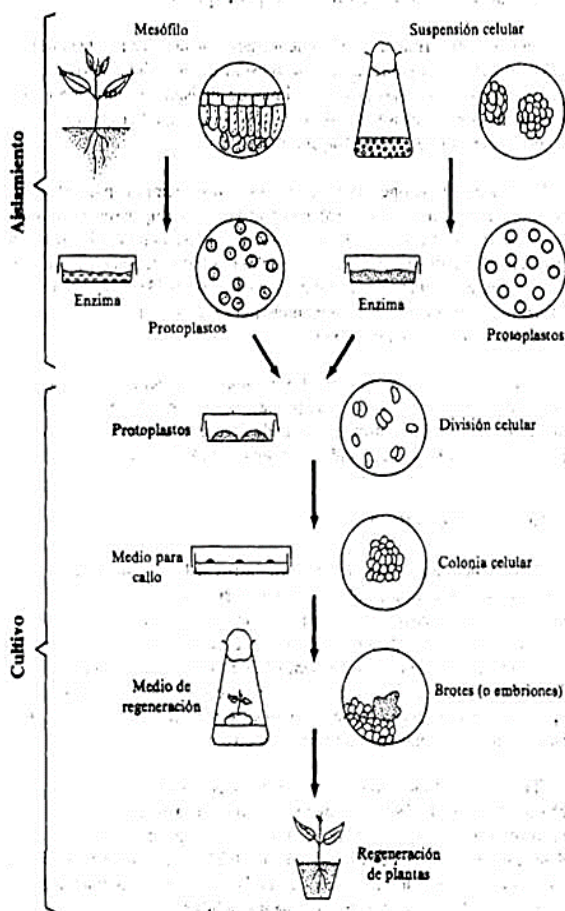


Figura 4. Esquema general y sintetizado sobre el aislamiento y cultivo de protoplastos. Tomado de:

https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo1_0_parte1.pdf

El objetivo del presente trabajo es profundizar en la técnica de fusión de protoplastos para la hibridación somática, centrándose en la obtención de protoplastos a partir de la digestión enzimática de fragmentos de hojas de maíz, lechuga y acelga. Se busca comprender el proceso de digestión enzimática para la eliminación de las paredes celulares, aislar los protoplastos resultantes y abordar la gestión de residuos generados durante este proceso. Además, se pretende explorar la viabilidad de la fusión de protoplastos a través del uso de incubación con polietilenglicol (PEG), con el objetivo de obtener híbridos de interés para la investigación en biotecnología vegetal.

Materiales y métodos

A. Aislamiento de los protoplastos

El proceso de aislamiento de protoplastos se llevó a cabo utilizando hojas de maíz, lechuga y acelga. Inicialmente, las hojas fueron lavadas minuciosamente para eliminar cualquier residuo de tierra y contaminantes presentes en

la superficie. Posteriormente, se realizaron cortes con un bisturí en cuadrados de aproximadamente 0.4 cm de largo y se provocaron heridas en ellos para facilitar la liberación de los protoplastos (Feingod *et al*; 2023).

Estos fragmentos de hoja se colocaron en una solución de sorbitol al 13% para inducir la plasmólisis celular, utilizando diferentes cantidades de sorbitol según la especie vegetal: 2 ml para maíz, 1 ml para lechuga y 500 µl para acelga. Los explantes de hojas se incubaron a 38°C durante 15 minutos.

Una vez finalizada la etapa de plasmólisis, se procedió a la digestión enzimática de las paredes celulares utilizando una solución que contenía 4% de celulasa y 2% de pectinasa (Figuras 5 y 6). Se adicionaron 2 ml de esta solución a las muestras de maíz, 2 ml a las muestras de lechuga y 1.5 ml a las muestras de acelga. Además, se añadió cloruro de calcio para mantener la presión osmótica de las células (Ricardo-Navarro *et al*; 2023).

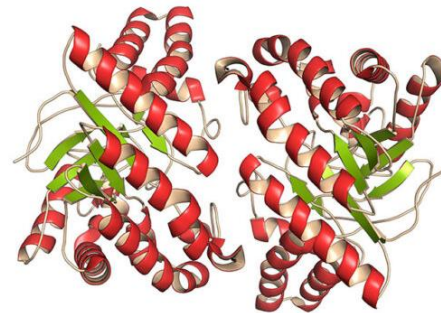


Figura 5. Estructura tridimensional de la celulasa. Tomada de: <https://naturalpoland.com/es/productos/enzimas/depanaderia/celulasas/>

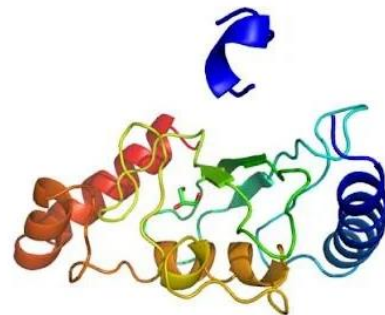


Figura 6. Estructura tridimensional de la pectinasa. Tomada de: https://issuu.com/citeagroindustrialica/docs/bo-19-015_insumos_enol_gicos/s/10769556

Se agregó un tampón Hepes al buffer enzimático para mantener el pH dentro del rango óptimo de 6 a 8, ajustándose a un pH inicial de 6. Las muestras se incubaron a 38°C durante 2 horas con agitación constante para liberar las células de los tejidos.

Ya liberadas las células de los tejidos, se transfirió 1 ml de cada cultivo a tubos Eppendorf utilizando una micropipeta previamente modificada para evitar el maltrato de las células. Los tubos se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos para eliminar la mayoría del líquido sobrenadante. Posteriormente, se retiraron los tubos de la centrifugadora y se eliminó el sobrenadante restante. Se recolectó el pellet de cada muestra y se tomó una gota de cada cultivo, la cual se colocó en un portaobjetos para su observación bajo un microscopio óptico a 10x de magnificación con el fin de verificar la presencia de protoplastos (Arciniegas, 2020; Sánchez-Raya *et al*; 2021).

Para aumentar la concentración de protoplastos, las muestras se centrifugaron nuevamente a 1000 rpm durante 5 minutos. Se tomó una gota de cada cultivo, se colocó en un portaobjetos y se observó en el microscopio óptico a 10x de magnificación para identificar protoplastos adicionales y confirmar su presencia de manera más precisa.

B. Fusión de los protoplastos

En otro portaobjetos, se depositó una gota de cada cultivo de protoplastos, seguido de la adición de 2 gotas de PEG (Figura 7) al 50%. Este paso fue crucial para inducir la pérdida de carga del ADN y facilitar la fusión de los protoplastos. La muestra se incubó a una temperatura de 38°C durante 5 minutos para permitir que ocurriera la fusión. Posteriormente, se realizó la observación de la muestra bajo un microscopio óptico con un aumento de 10x para evaluar el éxito de la fusión de los protoplastos y la formación de híbridos.

Resultados y discusiones

Por microscopía óptica y de contraste de fase, se llevó a cabo la observación de protoplastos de hojas de tres las especies vegetales estudiadas en el presente trabajo. Es importante recalcar que un protoplasto vegetal se define como la parte de la célula vegetal que está rodeada por la membrana plasmática y que puede ser aislada mediante la eliminación mecánica o enzimática de la pared celular y que estas células desnudas tienen el potencial de regenerar la pared celular, crecer y dividirse (Rizzo *et al*; 2020). La observación de protoplastos en las hojas de maíz se realizó después de una hora de incubación, mientras que en las especies de lechuga y acelga fue necesario un tiempo adicional de incubación de 30 minutos para que la observación fuera posible.

Esta diferencia en el tiempo de incubación puede atribuirse a las diferencias en el grosor de las paredes celulares entre las especies. Está reportado que las

paredes celulares de la lechuga y la acelga tienden a ser más gruesas en comparación con las del maíz (Figuras 7) (Wirth, 2022; Pérez, 2022; Crespo-Sierra 2023).

Es importante señalar que, aunque este período de incubación fue suficiente para obtener resultados, un tiempo prolongado podría haber permitido una observación más detallada de las células procesadas (Blasques, 2022).

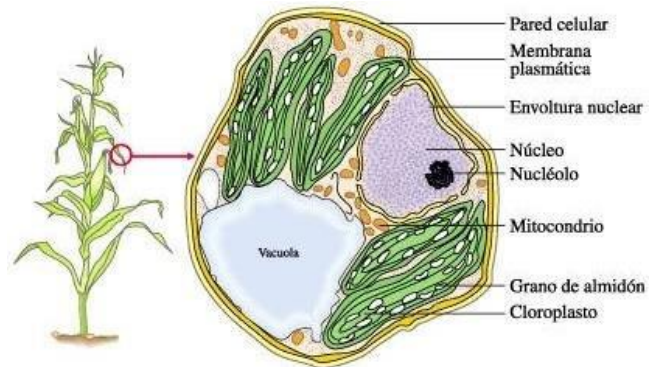


Figura 7. Esquema general de una célula de hoja de maíz. Es notoria la pared celular delgada. Tomada de: https://www.researchgate.net/figure/Figura-15-Esquema-de-celulas-de-una-hoja-de-maiz_fig4_360398822

Descripción de los casos

Todas las fotografías reportadas se observaron en el microscopio CX-31 de la marca OLYMPUS: La observación de la hoja del maíz revela que la célula se encuentra en una etapa avanzada del proceso, mostrando signos de estar cerca de completarse. La adición de polietilenglicol ha facilitado la fusión de las células al inducir la pérdida de carga negativa del ADN, lo que sugiere que el proceso de fusión de protoplastos está en marcha (Reyna-Llorens *et al*; 2023) (Figura 8).

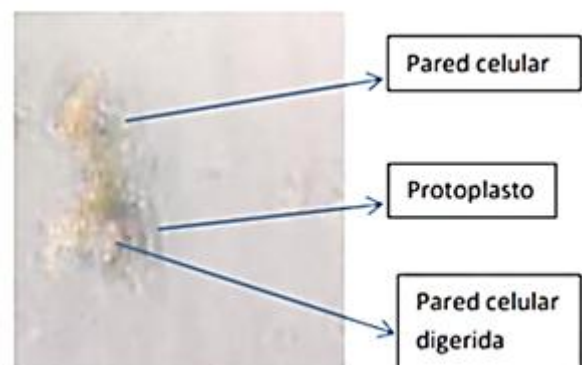


Figura 8. Hoja de maíz (*Zea mays*) observada a 10x en el microscopio óptico CX-31 marca OLYMPUS.

Por otra parte, al observar a la hoja de la lechuga, se muestra que más de la mitad de la célula presenta una

reducción significativa en la presencia de la pared celular, lo que indica un progreso notable en el proceso de digestión enzimática (Xu *et al*; 2022). Este hallazgo sugiere que las enzimas han logrado degradar con éxito gran parte de la estructura de la pared celular, preparando el camino para la liberación de los protoplastos (Figura 9).

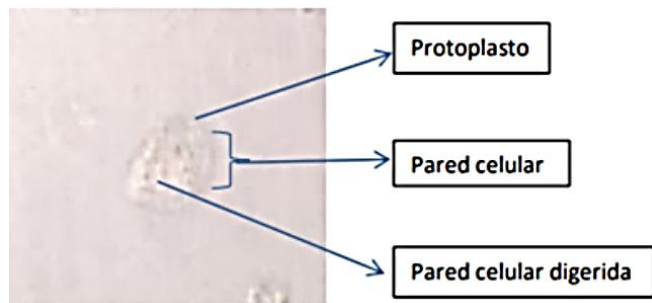


Figura 9. Hoja de lechuga (*Lactuca sativa*) observada a 10x en el microscopio óptico CX-31 marca OLYMPUS.

El caso particular para la hoja de acelga, se revela un avance notable en el proceso, con una reducción significativa en la presencia de pared celular en las células. Este indicio sugiere una etapa avanzada en el aislamiento de protoplastos, donde las células muestran una mayor desnudez y una menor presencia de estructuras celulares externas (Figura 10).

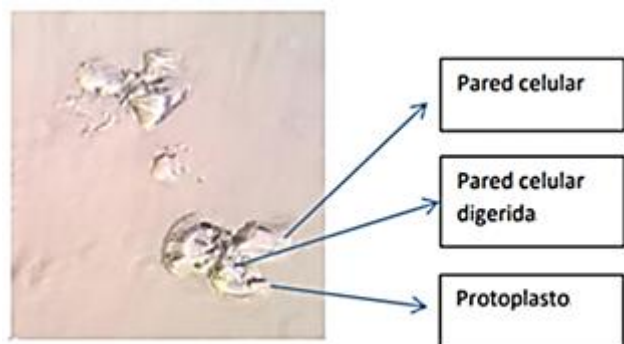


Figura 10. Hoja de acelga (*Beta vulgaris*) observada a 10x en el microscopio óptico CX-31 marca OLYMPUS.

Conclusiones

La técnica de fusión de protoplastos para la hibridación somática se revela como un proceso prometedor en la investigación en biotecnología vegetal. La obtención de protoplastos a partir de la digestión enzimática de fragmentos de hojas de maíz, lechuga y acelga demuestra ser factible, permitiendo la eliminación de las paredes celulares y el aislamiento de los protoplastos resultantes. Además, se evidencia la importancia de abordar la gestión de residuos generados durante este proceso, aspecto relevante en la práctica científica responsable.

La exploración de la viabilidad de la fusión de protoplastos mediante incubación con polietilenglicol (PEG) abre

nuevas perspectivas para la obtención de híbridos de interés en la investigación en biotecnología vegetal. Este enfoque ofrece oportunidades para la generación de variedades vegetales con características deseables, contribuyendo así al avance en la mejora genética de cultivos agrícolas.

Los hallazgos de este trabajo resaltan la relevancia y el potencial de la técnica de fusión de protoplastos en la obtención de híbridos vegetales, así como su importancia en el campo de la biotecnología vegetal para la investigación y el desarrollo de cultivos con características mejoradas.

Los protoplastos representan una herramienta fundamental en la investigación tanto en biología básica como aplicada. Actualmente, una de las aplicaciones más importantes de los protoplastos es la transformación genética mediante hibridación o fusión somática. Además, los protoplastos pueden utilizarse para la introducción y absorción de proteínas, ADN (vegetal, vírico o bacteriano), macromoléculas, entre otros. A partir de un protoplasto, es posible regenerar una planta completa utilizando técnicas de micropropagación, lo cual demuestra que esta es una técnica moderna ampliamente utilizada en el cultivo de tejidos vegetales.

Referencias

- [1] Arciniegas Vega, J. P. (2020). Desarrollo de un protocolo para la regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de estructuras embriogénicas organizadas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).
- [2] Blasques, G. M. (2022). Isolamento, cultivo e fusão de protoplastos de *Dendrobium nobile*.
- [3] Carvajal Campos, P. (2020). Hibridación somática de *Carica papaya* var. Pococí y *Vasconcellea* sp. (Brassicales: Caricaceae) mediante electrofusión de protoplastos.
- [4] Crespo Sierra, E. (2023). Obtención y caracterización de oligosacáridos de la pared celular de maíz: evaluación de su capacidad inmunoestimulante.
- [5] Díaz-García, G., Enciso-Maldonado, G. A., & Lozoya-Saldaña, H. (2023). *Solanum demissum* Lindl. In potato breeding. Revista Chapingo. Serie horticultura, 29(3), 131-148.
- [6] Feingold, S., Massa, G., Oneto, C. D., & González, M. (2023). Producto 1. Protocolo: Aislamiento y transfección de protoplastos para Edición Génica.
- [7] Lara Zuñiga, J. L. (2021). Optimización de un sistema de transformación genética de *Aspergillus niger* como herramienta para su estudio molecular en biotecnología.
- [8] Pérez Pérez, Y. (2022). Efectores positivos y negativos de la embriogénesis somática y de microsporas de especies cultivadas y forestales: regulación hormonal, pared celular y muerte celular.
- [9] Quevedo Tumailli, V. F. (2023). Comparación de dos métodos para analizar single-cell transcriptomics en plantas.
- [10] Reyna-Llorens, I., Ferro-Costa, M., & Burgess, S. J. (2023). Plant protoplasts in the age of synthetic biology. *Journal of experimental botany*, 74(13), 3821-3832.

- [11] Ricardo-Navarro, L. R., Beltrán Herrera, J. D., & Baquero Garrido, M. J. (2023). Aislamiento enzimático de protoplastos a partir del mesófilo de vitroplantas de *Gynierium sagittatum* Aubl. Beauv. Cv. "Criolla". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 25(1), 26-35.
- [12] Rizzo, J., Chaze, T., Miranda, K., Roberson, R. W., Gorgette, O., Nimrichter, L. & Rodrigues, M. L. (2020). Characterization of extracellular vesicles produced by *Aspergillus fumigatus* protoplasts. *MSphere*, 5(4), 10-1128.
- [13] Sanchez Carrillo, I. B., Hoffmann, P. C., Barff, T., Beck, M., & Germain, H. (2023). Preparing *Arabidopsis thaliana* root protoplasts for cryo electron tomography. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1261180.
- [14] Sánchez-Raya, C., López-Casado, G., Blanco-Portales, R., Pose-Albacete, S., Pliego-Alfaro, F., Matas, A. J., & Mercado, J. A. (2021). Optimización de la transfección de protoplastos para la edición génica en fresa.
- [15] Scintilla, S., Salvagnin, U., Giacomelli, L., Zeilmaker, T., Malnoy, M. A., Rouppe van der Voort, J., & Moser, C. (2022). Regeneration of non-chimeric plants from DNA-free edited grapevine protoplasts. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1078931.
- [16] Wirth, S. (2022). Enzimas microbianas activas sobre polisacáridos estructurales de pared celular vegetal: producción recombinante y caracterización bioquímica y funcional (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires).
- [17] Xu, Y., Li, R., Luo, H., Wang, Z., Li, M. W., Lam, H. M., & Huang, C. (2022). Protoplasts: small cells with big roles in plant biology. *Trends in Plant Science*, 27(8), 828-829.
- [18] Yu, J., Tu, L., Subburaj, S., Bae, S., & Lee, G. J. (2021). Simultaneous targeting of duplicated genes in *Petunia* protoplasts for flower color modification via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Reports*, 40, 1037-1045.