



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTO-
PLASTOS DE PLANTAS SUPERIORES

T E S I S

que para obtener el título de:

Q U I M I C O
p r e s e n t a

HECTOR MANUEL ARIAS ROJO

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LAB tesis 1977
NO M-27
EXHA _____
PROC _____
S _____



QUÍMICA

PRESIDENTE Dra. Estela Sánchez

V O C A L Dr. Alejandro Blanco

Jurado asignado originalmente
según el tema.

SECRETARIO Dra. Angelina Quintero

1er. SUPLENTE Dr. Blas Lotina

2do. SUPLENTE Dra. Cynthia Cowgill

Sitio donde se desarrollo el tema: Departamento de Bioquímica -
D.E.S. Facultad de Química.

Nombre completo y firma del sustentante _____

Nombre completo y firma del asesor del tema: _____

Angelina Quintero R.

Agradecimiento a la Dra. Angelina Quintero
por su asesoramiento y revisión de la tesis.

Al Dr. Alejandro Blanco y Blas Lotina por
sus valiosas sugerencias.

A la Q. Alba Jofre y al Q.F.B. Jaime Soriano
por su enorme colaboración.

A todos mis maestros y al personal del
Laboratorio de Bioquímica de la División
de Estudios Superiores.

A mis Padres

A mi esposa Marilú

A mi hijo Edgar

A mis Hermanos

A mis Tías

A mis Amigos

I N D I C E

CAPITULO	Página
I.- INTRODUCCION	8
II.- PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE PLANTAS SUPERIORES	10
A).- Procedimientos Mecánicos.....	10
B).- Procedimientos Enzimáticos.....	11
C).- Procedimientos Mixtos.....	14
D).- Comparación del procedimiento enzimático y mecá- nico.....	15
III.- DISCUSION DEL PROCEDIMIENTO ENZIMATICO	18
A).- La pared celular.....	18
B).- El plasmalema.....	23
C).- Condiciones óptimas para el aislamiento de pro- toplastos de plantas superiores.....	25
1.- Selección del material.....	25
2.- Esterilización del material.....	26
3.- Selección de los agentes estabilizantes.....	28
4.- Enzimas y componentes del medio enzimático..	32
5.- pH del medio enzimático.....	36
6.- Temperatura de incubación.....	37
7.- Tiempo de incubación.....	37
8.- Purificación de la suspensión de protoplas- tos.....	38
9.- VÍabilidad de los protoplastos.....	40

IV.- DESARROLLO DE LOS PROTOPLASTOS	
A).- Condiciones apropiadas para el desarrollo de los protoplastos de plantas superiores.....	43
1.- Medios de cultivo.....	44
2.- Condiciones de luz.....	49
3.- Temperatura de incubación.....	50
4.- Velocidad de agitación de la suspensión de - protoplastos.....	50
5.- Concentración ó densidad celular.....	51
B).- Regeneración de la pared celular.....	51
C).- División celular.....	55
D).- Desarrollo de los protoplastos.....	56
V.- UTILIZACION DE LOS PROTOPLASTOS	58
A).- Fusión de protoplastos.....	59
1.- Fusión espontánea.....	59
2.- Fusión inducida.....	60
B).- Absorción de partículas.....	63
VI.- PARTE EXPERIMENTAL	67
MATERIALES Y METODOS	68
A).- Aislamiento de protoplastos.....	68
B).- Cultivo de protoplastos.....	74
RESULTADOS	80
A).- Aislamiento de protoplastos.....	80
B).- Cultivo de los protoplastos aislados de hoja de tomate (<u>L. esculentum</u> , var. homestead 24)	89
DISCUSION Y CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFIA	96

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS DE PLANTAS SUPERIORES

CAPITULO I.- INTRODUCCION

Antes de entrar en tema, es conveniente definir el término protoplasto. El protoplasto es la parte de la célula vegetal que se encuentra dentro de la pared celular. Se han logrado aislar protoplastos de bacterias, hongos, musgos, helechos, algas y Plantas Superiores.

Hanstein (24) en 1880, fué el primero en utilizar el término protoplasto, al observar la separación de la pared celular de unas algas, helechos y Plantas Superiores.

En 1892, Klercker (24) logró aislar protoplastos de algas en cantidades significativas usando procedimientos mecánicos (para una descripción más detallada, ver el inciso A del Capítulo II).

Fué hasta 1960, cuando Cocking (20) logró obtener protoplastos de Plantas Superiores por procedimientos enzimáticos al aislarlos de raíces y frutos de tomate (Lycopersicon esculentum). El y sus colaboradores lograron interesar a otros investigadores sobre las ventajas que presentaban al demostrar que los protoplastos podían absorber partículas (21), así como moléculas de Acidos Nucleicos (22).

Los protoplastos son células desprovistas de la pared celular que presentan la característica especial de resinteti-

zar una nueva pared celular bajo condiciones apropiadas (22) y se comportan como suspensiones celulares, las cuales pueden ser inducidas para crecer y dividirse bajo condiciones adecuadas (35), pueden plaquearse y formar colonias (73).

Resultan apropiados para estudios de hibridación somática de plantas al fundirse protoplastos de diferentes especies ó variedades (23,30,36,85). Forman un sistema de estudio apropiado para la infección sincrónica de células de planta por virus (55,77,109) y por bacterias (48,55). Se utilizan en estudios de la Fisiología de la célula vegetal (25,60,94): en la fotosíntesis (50,72,73), en el efecto de las hormonas (4, 43,80,94,95). También se han usado para aislar DNA con mejores rendimientos, debido a que se produce un menor daño al DNA; en la Genética de plantas (15,62), en estudios sobre Transgenosis (48,76) y en la regeneración de plantas completas (34,38,54, 71,97).

Se han logrado aislar protoplastos de varios tejidos: de frutos (42,87), de aleuronas (47), de coleoptilos (44), de polen (2), de plántulas (58), de callos (tejido no diferenciado)(8,17,41,45,52,75) y de hojas (6,31,34,46,54,71,79).

CAPITULO II.- PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE PLANTAS SUPERIORES.

Los procedimientos usados para el aislamiento de protoplastos son:

- A).- Procedimientos Mecánicos
- B).- Procedimientos Enzimáticos
- C).- Procedimientos Mixtos

A).- Procedimientos Mecánicos

El primer aislamiento de protoplastos fué hecho por procedimientos mecánicos, este procedimiento aún es utilizado por algunos investigadores (82,83,88).

En 1892, Klerker (24) aisló protoplastos de lechugilla de agua (Stratiodes aloides) al plasmolizar (retracción del contenido celular usando una solución hiperosmótica) el tejido y cortarlo con una navaja, liberándose los protoplastos.

Debido a ciertos problemas que presenta el aislamiento enzimático, Pilet (82,83) y Prat (88) han hecho estudios fisiológicos de los protoplastos, aislándolos por procedimientos mecánicos. La técnica de este procedimiento efectuada y modificada por Pilet (83) al aislar protoplastos de raíz de cebolla (Allium cepa), y que han dado buenos resultados es la siguiente:

Se efectúa una preplasmolisis para aligerar el trauma

causado por la fuerte plasmolisis. La preplasmolisis consiste en empapar los segmentos de raíz en una solución de sacarosa al 20 % durante 5 minutos. La plasmolisis es un tratamiento que dura aproximadamente 85 minutos, colocando los segmentos de raíz en una solución de sacarosa al 20 % y NaCl al 1.2 % como medio plasmolítico.

Se coloca el segmento de raíz plasmolizado en un portaobjetos mantenido en una solución de sacarosa al 20 % y se cortan de 20 a 30 secciones con una navaja. El seccionamiento, efectuado a través de un microscopio, debe ser lo más cercano y rápido como sea posible. Cada sección cortada produjo en ambos lados protoplastos que flotaron en la solución de sacarosa. De aquí se separaron por capilaridad usando un tubo de poliestireno. Enseguida se lavan de 4 a 6 veces con la solución de sacarosa al 20 %.

Este procedimiento ha sido poco usado en el aislamiento de protoplastos de plantas superiores en comparación con el procedimiento enzimático, por las razones que se explican al final de este capítulo.

B).- Procedimiento enzimático

En 1949, Ciaja (24) aisló protoplastos de células de levadura al digerir la pared celular por medio del jugo gástrico de un caracol (Helix pomatia). Desde entonces, otros investigadores han intentado aislar protoplastos enzimáticamente de

bacterias, algas, hongos, musgos y plantas superiores.

También en 1949, Chayen (16) logró separar células - de meristemo de raíz de haba (Vicia faba) al digerir el tejido con pectinasa al 10 % durante una hora, pero este trabajo no se efectuó en condiciones plasmolizantes y las células resultantes no fueron viables.

Tribe (24) en 1955, demostró que la muerte de células asociada normalmente con la separación de la pared celular, se disminuye al plasmolizar previamente el tejido. La plasmolisis tiene un efecto estabilizante que hace a los protoplastos menos susceptibles a los efectos dañinos de las impurezas de las enzimas (24).

En 1960, Cocking (20) logró aislar protoplastos de - puntas de raíz y de fruto de tomate (Lycopersicon esculentum) usando una celulasa obtenida de un hongo (Myrothecium verrucaria).

En 1968, Takebe, Otsuki y Aoki (98) tomando en cuenta los resultados de Tribe (24) liberaron células del mesofilo de hoja de tabaco (Nicotiana tabacum) usando una pectinasa en condiciones plasmolizantes. Enseguida aislaron protoplastos, al tratar la suspensión celular con una solución de celulasa obtenida del caracol Trichoderma viride, también en condiciones - plasmolizantes. Este procedimiento, que se le ha denominado - "secuencial" se ha aplicado a muchas especies de mono- y di-co- tiledóneas (98).

En 1969, Power y Cocking (86) hicieron el aislamiento en "una sola etapa" usando una mezcla de pectinasa y celulasa

en presencia de un agente plasmolizante (sorbitol). Este procedimiento ha sido ampliamente usado con algunas modificaciones de acuerdo a las condiciones y el material que se usa (19).

Sin embargo, hay diferencia entre el método secuencial y el de una sola etapa: en el método secuencial se obtienen protoplastos preferentemente del mesófilo empalizado y en el método de una sola etapa se obtienen protoplastos del mesófilo empalizado y esponjoso (35). Otra diferencia es que, usando el método de una sola etapa se puede lograr fusión espontánea, no así por el otro método.

Actualmente el procedimiento enzimático es el más usado debido a la facilidad de manejo y los rendimientos obtenidos. Dentro del procedimiento enzimático, es más usado el método de una sola etapa.

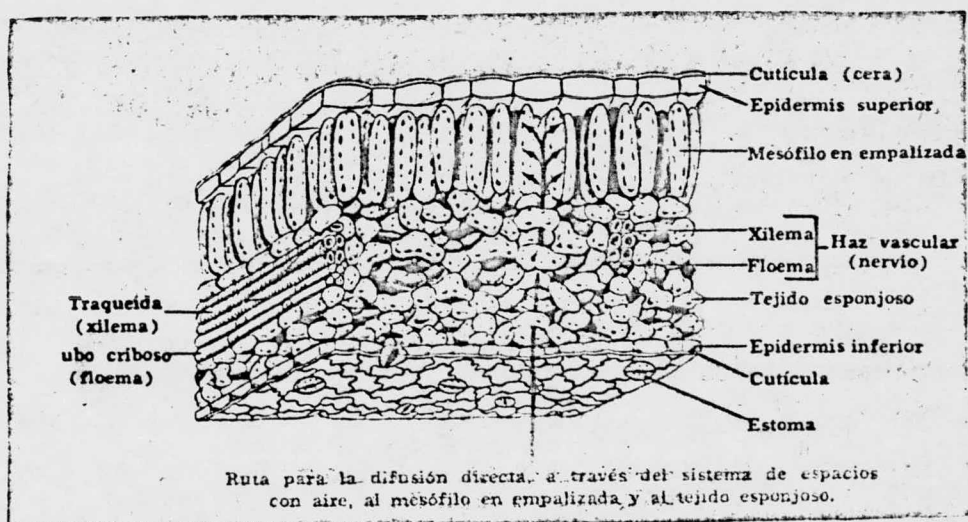


Fig. 1.- Vista de una porción de la lámina foliar de una hoja de tabaco, vista desde abajo y ampliada 200 veces.

C).- Procedimiento mixto

En la mayoría de los cereales y monocotiledóneas no se ha tenido éxito en producir protoplastos por procedimientos enzimáticos debido a que, cuando se trata de aislar protoplastos por procedimientos enzimáticos a partir de hojas, se procede a quitar la cutícula (epidermis) de la hoja para facilitar un contacto más íntimo entre el tejido y la solución enzimática y, en el caso de las monocotiledóneas y cereales es sumamente difícil quitar la cutícula.

Los métodos que se han utilizado en estos casos consisten en cortar las hojas en tiras y poner en contacto estas tiras con la solución enzimática, pero este procedimiento no ha dado buenos resultados, ni el método secuencial, ni el método de una sola etapa del aislamiento de protoplastos por procedimientos enzimáticos.

Harada (27) resolvió este problema aplicando sucesivamente métodos mecánicos y enzimáticos, lo que le ha permitido obtener de manera reproducible grandes cantidades de protoplastos del parénquima foliar de Convolvuláceas. Este procedimiento consta de dos etapas:

i) Separación mecánica de las células que constituyen el parénquima foliar. Gnanam y Kulandaivelu (41) fueron capaces de obtener células libres de 24 especies de plantas al moler las hojas en un buffer de TRIS conteniendo sacarosa y $MgCl_2$. Este homogenado es centrifugado para descartar las partículas rotas las cuales sedimentan y, de esta manera se evita el pro-

blema de quitar la cutícula de las hojas de cereales y monocotiledóneas.

ii) Transformación enzimática de las células libres en protoplastos. Esta transformación se realiza usando celulasa solamente.

Este procedimiento ha sido usado también por Mackenzie y Bui Dang Ha (61) para aislar protoplastos de Espárragos (Asparagus officinalis L.). Este método además excluye la posibilidad de fusión espontánea.

Este procedimiento mixto es una variación del procedimiento enzimático para aquellas plantas donde no se puede extraer fácilmente la cutícula de la hoja.

D).- Comparación del procedimiento enzimático y mecánico.

Varios investigadores han enumerado las ventajas principales del procedimiento enzimático sobre el mecánico (24):

- 1) Produce una mayor cantidad de protoplastos
- 2) Se produce menor daño osmótico del citoplasma
- 3) Ninguna célula se daña al romperse por el corte con navaja.
- 4) En las células meristemáticas no se efectúa plasmolisis (24), por lo que no se puede efectuar el aislamiento me

cánico de protoplastos, mientras que el aislamiento enzimático si se puede efectuar.

- 5) El procedimiento enzimático de una sola etapa puede producir protoplastos multinucleados que resultan de la fusión espontánea durante el aislamiento.

Chupeau y Morel (17) piensan que los procedimientos mecánicos no son utilizables porque la plasmolisis que implica, provoca una fuerte retracción del contenido celular y, no libera cantidades importantes de protoplastos intactos.

En 1972, Pilet (83) aisló protoplastos de la raíz de cebolla (Allium cepa) por ambos métodos y encontró las siguientes diferencias:

- 1) Con el procedimiento mecánico se obtienen mayores cantidades de subprotoplastos (resultado de un fenómeno producido durante la plasmolisis, que se llama "gemación", en el cual el protoplasto se divide en dos porciones, - una nucleada y la otra anucleada).
- 2) La naturaleza de vacuolación no es la misma.
- 3) De una zona de raíz, se lograron aislar protoplastos - por procedimientos mecánicos y enzimáticos, resultando más pequeños los protoplastos mecánicamente aislados - que los aislados enzimáticamente.
- 4) La presión osmótica de los protoplastos aislados mecánicamente es mayor que la de los aislados enzimáticamente, 12.97 y 10.81 atmósferas respectivamente (80).

Concluyeron que ambos procedimientos no son compara--bles, debido a que los protoplastos obtenidos por uno u otro - procedimiento provienen de células de diferente grado de dife--renciación, ya que el grado de diferenciación está relacionado con el grado de vacuolación y la presión osmótica y, siendo las células diferentes, los protoplastos aislados mecánicamente pro--vienen de células más pequeñas que las de los aislados enzimáti--camente de raíz de cebolla (Allium cepa).

El procedimiento enzimático también presenta algunas desventajas: Se tienen evidencias de la presencia de sustancias tóxicas tales como ribonucleasas, enzimas proteolíticas ó lipa--sas, peroxidadas y material no enzimático en las preparaciones crudas de las enzimas. Esta toxicidad puede residir en la ac---ción directa sobre la membrana externa del protoplasto, causan--do una degradación ó una alteración de su permeabilidad, la - cual a su vez provoca la entrada de enzimas ó componentes de ba--jo peso molecular que pueden afectar la ciclosis (fenómeno celu--lar relacionado con las vesículas que acarrean material a tra--vés del citoplasma)(104), al alterar la viscosidad del citoplas--ma (24).

Varios investigadores han encontrado necesario purifi--car las preparaciones crudas y comerciales de enzimas para evi--tar enfrentarse a estos problemas (43) y, obtener mejores rendi--mientos y mayor porcentaje de protoplastos viables.

CAPITULO III.- DISCUSION DEL PROCEDIMIENTO ENZIMATICO.

Antes de discutir el procedimiento enzimático, se va a hacer una corta descripción de la constitución e importancia fisiológica de la pared celular y del plasmalema ó membrana externa del protoplasto.

A).- La pared celular

La pared celular es una estructura dinámica, cuya composición y propiedades responden constantemente al crecimiento, fase de diferenciación y al ambiente en el que se encuentra la célula (76).

En la constitución de la pared celular hay componentes estáticos y componentes que se están formando constantemente, los cuales juegan un papel importante en las propiedades químicas, físicas y bioquímicas de la pared celular.

La proporción de los componentes de la pared celular de los vegetales varía de planta a planta, pero generalmente se compone de:

- 1.- Material clave
- 2.- Material llenador
- 3.- La matriz
- 4.- Agua
- 5.- Material proteico

1.- Material clave: Está compuesto por celulosa cuya estructura son cadenas largas de β -1,4-glucósidos de grado de polimerización de 8 000 a 12 000.

2.- Material llenador: Es el material polimérico conteniendo azúcares diferentes a la glucosa siempre asociados con la celulosa, como arabinosa y galactosa unidas por enlaces β -1,4. Otro material llenador es la lignina, la cuál es derivada de la deshidrogenación enzimática y polimerización subsecuente de alcoholes (cumarilo, coniferilo y sinapilo).

3.- La matriz: Los polisacáridos de la matriz, hemicelulosa y sustancias pécticas, están hechos de polímeros orientados linealmente que están presentes en todas las fases de desarrollo de la planta, la estructura de estos varía de planta a planta.

Entre las hemicelulosas más importantes se encuentran los xilanos, glucomananos y arabinolactanos.

Los xilanos tienen la estructura general β -1,4-xilano piranosilos de grado de polimerización de 150 a 200. A esta cadena principal se encuentran unidas cadenas laterales de ácido 4-O-metilglucurónico unidos a la xilosa por uniones α -1,2 ; grupos arabinofuranosilos por uniones α -1,3 y grupos acetilos en posiciones 2 y/ó 3 de la xilosa.

Los glucomananos son cadenas de radicales de glucosa y manosa unidas al azar por uniones β -1,4. Esta cadena principal se puede ramificar una ó dos veces por galactosa por medio

de uniones α -1,6 formándose los galactoglucomananos.

Los arabinolactanos están formados por arabinosa y galactosa unidas β -1,3 a los que se unen cadenas laterales de oligosacáridos de unidades de galactosa por medio de uniones β -1,6 las cuáles pueden llevar unidades de arabinofuranosa unidas por β -1,3 ó β -1,6 a la galactosa.

Las sustancias pécticas constituyen del 7 al 18 % del total de carbohidratos de la pared celular primaria; los azúcares presentes son: galactosa, arabinosa, ramnosa y ácido galacturónico.

Los arabinolactanos tienen una cadena principal de β -1,4-galactósidos donde la arabinosa forma un polímero altamente ramificado unidas por enlaces α -1,3 y α -1,5.

Los galacturonorhamananos están constituidos por una cadena principal de α -1,4-galacturonopiranosilos teniendo cadenas laterales que contienen fucosa, xilosa, galactosa y ácido glucurónico unido por β -1,4 a la fucosa y a la galactosa por uniones β -1,6.

4.- Agua: Esta es controlada en la matriz por la deposición de material llenador que forma asociaciones intermoleculares y estructurales de tipo gel, ó por un llenador no humectante como la lignina.

5.- Material proteico: Alrededor del 5 % de la pared celular es proteína, y la que existe en mayor cantidad es una glicoproteína estructural compuesta por 13 % de hidroxiprolina,

éste aminoácido se encuentra unido a oligosacáridos de aproximadamente 4 monómeros de galactosa ó arabinosa (0).

Una fracción muy importante del material proteico -- está compuesto por enzimas. Un 80 % de la actividad de la fosfatasa ácida de la célula se encuentra localizada en la pared celular (76). Yung y Northcote(110) encontraron peroxidasa en un 82 a 85 % en la pared celular de mesofilo de tabaco, por medio de electroforesis en gel de acrilamida encontraron 3 bandas de isoenzimas anódicas de peroxidasa en la pared celular. Maeder , Meyer y Bopp (62) obtuvieron los mismos resultados.

Se ha encontrado que las hormonas vegetales como el - Acido Indolacético, citocininas y etileno, pueden inducir la -- síntesis de peroxidasas, las cuáles juegan un papel importante en la lignificación, metabolismo de compuestos aromáticos, oxidación de auxinas y producción de etileno (76), por lo tanto la presencia de peroxidasas es un factor importante en el crecimiento y diferenciación celular.

Las paredes de células adyacentes son mantenidas juntas por medio de una capa llamada "laminilla media" (fig. 2) -- compuesta por polisacáridos no celulósicos, especialmente pectinas. Atravesando la pared celular y aparentemente conectando el protoplasma de células adyacentes, se encuentran filamentos muy finos de protoplasma llamados plasmodesmos.

Algunas células especializadas depositan una ó varias capas de celulosa sobre la pared primaria, a la cuál se le denomina pared secundaria (fig. 2). Esta difiere de la primaria en

la carencia de sustancias pécticas. La pared secundaria consiste de celulosa, hemicelulosa y lignina, los polímeros encontrados son glucanos, xilanos, ácido glucurónico y mananos. La lignina sirve para darle rigidez a la pared.

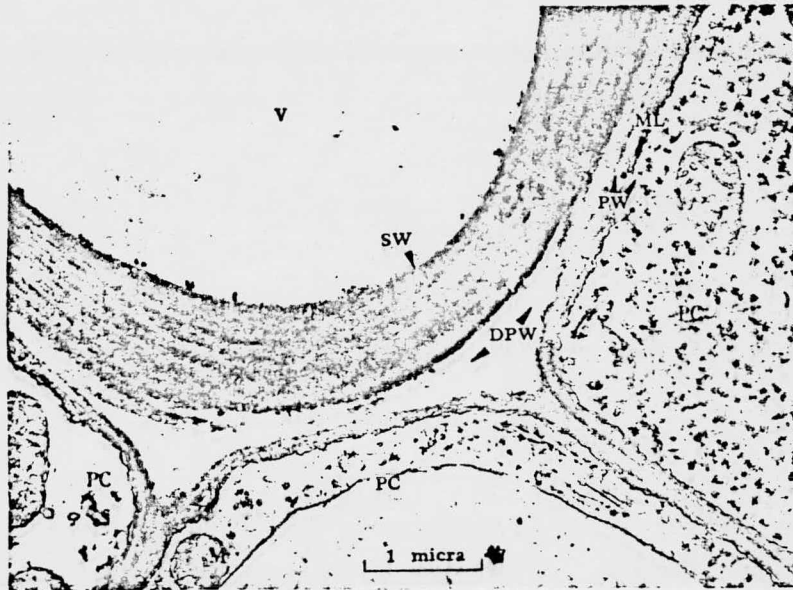


Fig. 2.- Pared Secundaria (SW) de una célula de vaso (V) en una plántula de avena. Las paredes primarias (PW) del vaso y aquellas de las células de parénquima adyacentes (PC) están separadas por la laminilla Media (ML).

Las células de la epidermis segregan una cubierta de cutina y sobre ésta se encuentra una capa de ceras. Esta cubierta exterior es llamada cutícula (fig.1) y su función es retardar la evaporación. La cutina es una mezcla de ácidos grasos poliméricos y las ceras están formadas por una mezcla compleja de alcanos de cadena larga, alcoholes, cetonas y ácidos grasos.

McNeil y col. (63) estudiando la estructura de la pared celular de las células de aleurona de cebada, encontraron que la pared celular consiste de 85 % de Arabinosilanos, 8 % de celulosa y 6 % de proteína.

La extracción de la pared celular tiene como consecuencia la regeneración de una nueva pared celular y la subsecuente división si se encuentra en condiciones adecuadas. La ausencia de la pared celular facilita los estudios de fusión, absorción de partículas extrañas, de regeneración de la pared celular, la interacción de hormonas y enzimas con la membrana externa del protoplasto.

B).- El plasmalema ó membrana externa del protoplasto

El plasmalema está formado de una bicapa asimétrica de fosfolípidos dentro de los cuáles están intercalados sitios ricos en proteínas específicas, funcionalmente diferenciadas. Además Hartmann y col. (47) han encontrado que el plasmalema contiene más esterol que otras membranas celulares, sin embargo, Ruesink (91) encontró que el plasmalema de protoplastos aislados de coleoptilos de avena (Avena sativa) tiene poca cantidad de esterol y no se observa la presencia de tirosina, la cuál juega un papel muy importante en algunas células animales. También observó que el plasmalema se rompe más fácilmente por detergentes catiónicos que por los aniónicos y, los detergentes iónicos son más activos que los no iónicos, sugiriendo la presencia de luga

res cargados electronegativamente en el plasmalema, los cuáles - están implicados en mantener la estabilidad de la membrana. Motoyoshi, Bancroft y Watts (69) encontraron resultados similares en relación a la electronegatividad de la membrana al observar que los virus de un punto isoeléctrico negativo necesitan de un polimerización para lograr la infección, mientras que el virus X de la papa y una variante del Virus del Mosaico del Bromo, que tienen puntos isoeléctricos positivos no necesitan de la polimerización. Todo esto nos lleva a pensar que las proteínas constituyentes del plasmalema presentan grupos fuertemente electronegativos en el exterior de la membrana.

En las células de plantas es característico la continuidad del citoplasma celular por medio de interconexiones con otras células vecinas llamados plasmodesmos, los cuáles son prolongaciones del plasmalema que se pueden observar por Microscopía Electrónica y son responsables de la Fusión Espontánea.

El plasmalema puede expandirse grandemente en presencia de un medio hipotónico y retraerse en un medio hipertónico (fig. 3). Hall y Cocking (45) observaron que el plasmalema se encuentra menos tensionado en medios plasmolíticos hipertónicos que en medios hipotónicos y pueden permitir una deplasmolisis ó sea pueden regresar a su estado original al retornar al medio isotónico.

Ruesink (91) habla de una pérdida del área superficial del plasmalema de hasta 25 % al convertir células de coleoptilo de avena en protoplastos estabilizándolos con manitol 0.5 M. Este material a menudo termina en vesículas en el citoplasma, proba-

blemente por un proceso parecido al de endocitosis.

durante la regeneración de la pared celular, el plasma
lema juega un papel muy importante, como se verá en el Cap. IV.

C).- Condiciones óptimas para el aislamiento de proto-
plastos de plantas superiores.

Es conveniente para aislar protoplastos viables obte-
ner las condiciones óptimas del aislamiento de los protoplastos,
para esto, vamos a revisar los aspectos más importantes, que
son:

- 1.- Selección del material
- 2.- Esterilización del material
- 3.- Selección de los agentes estabilizantes
- 4.- Enzimas y componentes del medio enzimático
- 5.- pH del medio enzimático
- 6.- Temperatura de incubación del medio enzimático
- 7.- Tiempo de incubación del medio enzimático
- 8.- Purificación de la suspensión de protoplastos
- 9.- Viabilidad de los protoplastos

1.- Selección del material: El principal requisito pa-
ra la producción de protoplastos estables es la fuente de plan-
tas crecidas en condiciones óptimas y en la fase de desarrollo -
adecuada.

Quando se tienen plantas apropiadas es relativamente -

fácil preparar protoplastos. Otsuki y Takebe (79) reportan que - la velocidad de maceración y el rendimiento de protoplastos dependen en gran parte de la edad y condición fisiológica de la planta que se usa como fuente de protoplastos, por lo tanto es conveniente determinar las mejores condiciones de crecimiento y la etapa de desarrollo más apropiada para cada variedad, Watts, Motoyoshi y King (103') sugieren:

- i) No se deben usar plantas donde se muestre senescencia en las hojas inferiores, debido a que la acumulación de almidón hace inestables a los protoplastos.
- ii) Las plantas muy jóvenes son demasiado frágiles, de manera que las preparaciones de protoplastos que aparentemente están en buenas condiciones mueren tiempo después.

En el caso de aislamiento de protoplastos a partir de hoja de tabaco, se recomienda usar las hojas más grandes. Sin embargo, Coutts, Cocking y Kassanis (28) encontraron que las hojas más adecuadas para el aislamiento de protoplastos de tabaco son las que no están bien extendidas (20 a 25 cm. de largo), a menudo encontradas de 4 a 6 hojas del ápice.

Cuando los protoplastos aislados tienen una coloración verde cobriza, indica la selección de hojas inmaduras ó condiciones de cultivo de la planta inadecuadas(103').

2.- Esterilización del Material: Para esterilizar el material que se va a utilizar se coloca el tejido u órgano en alcohol durante un corto tiempo con el fin de extraer grasas (en las cuales proliferan bacterias) de la epidermis. Enseguida el

material se remoja en una solución de hipoclorito de sodio ó de calcio ó cloruro mercurioso para eliminar los microorganismos -- presentes. Esta solución se puede complementar con la adición de un detergente para abatir la tensión superficial y lograr una es-
 terilización completa. Después se enjuaga unas tres veces con --
 agua destilada estéril para asegurarnos de la eliminación de las
 sustancias anteriores.

Las semillas son esterilizadas al colocarlas en alcohol absoluto durante 10 min., se remojan en una solución de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ al 10 % durante 20 ó 30 min. y se enjuagan 3 veces con agua des-
 tilada estéril(35). Yamada y col. (108) esterilizaron semillas -
 de arroz (Oryza sativa) con alcohol al 70 % y enseguida con ---
 HgCl_2 al 0.2 % durante 20 min., después se lavaron al chorro de
 agua durante 3 horas y antes de usarse se ponen en contacto nue-
 vamente con una solución de HgCl_2 al 0.5 % durante 10 min., se
 pasan por alcohol al 70 % y se enjuagan 3 veces con agua destila-
 da estéril.

Las frutas se esterilizan con alcohol absoluto durante 10 seg., NaOCl al 2 % durante 10 min. y se enjuagan 3 veces con
 agua destilada estéril(35).

Las hojas se colocan en una solución de alcohol al 70 % durante 30 seg., $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ al 0.8 % conteniendo detergente al 1 % durante 15 min. y se enjuagan 3 veces con agua destilada estéril (6).

Algunas veces no se logra esterilizar completamente el material y se obtienen contaminaciones. Evans, Woodcock y Keates usaron gentamicina para reducir el problema de contaminación bac

teriana en protoplastos aislados de trigo (Triticum aestivum) y arroz (Oryza sativa) con buenos resultados. Shepard y Totten (95) también usaron gentamicina. Davey, Bush y Power (31) usaron penicilina (10 U/ml.) y Carboxibencilpenicilina (200 μ g/ml.).

Watts y King (103) hicieron un estudio comparativo de varios antibióticos, encontrando que los protoplastos de plantas son mucho más sensibles a los antibióticos que las células animales y, que los que menor daño causan a los protoplastos son Carbenicilina (250 μ g/ml.), antibacteriano y, Nistatina (25 U/ml.) ó Amfotericina B (2.5 μ g/ml.) contra hongos. La Nistatina fué muy efectiva al controlar el crecimiento de hongos aún a concentraciones altas sin afectar aparentemente a los protoplastos cultivados en medio líquido, pero en medio sólido fué mejor la Amfotericina B.

Kassanis, White y Woods (55) encontraron que la gentamicina y otros antibióticos en cantidades que inhiben el crecimiento bacteriano también inhiben la multiplicación del virus en protoplastos. Esto se previno usando $MnCl_2$ 10 mM en el medio de incubación, sin quedar claro el efecto inhibitor del $MnCl_2$.

No se ha hecho hasta hoy un estudio exhaustivo sobre el efecto de los antibióticos en células de plantas, por lo que es preferible prescindir de ellos.

3.- Selección de los agentes estabilizantes: La pared celular ejerce una presión determinada sobre el protoplasto. Durante el aislamiento de protoplastos es conveniente reemplazar la presión ejercida normalmente por la pared celular para mante-

ner la integridad de los protoplastos. Al reemplazar la presión de la pared lo haremos a una presión ligeramente más alta, de manera que los protoplastos estén ligeramente plasmolizados.

Se había mencionado anteriormente, que Tribe (24) demostró que la muerte de células normalmente asociada con la separación de la pared es eliminada al plasmolizar a las células.

Cuando el medio en el que se encuentra la célula está más concentrado (medio hipertónico), la célula sufre una plasmolisis (fig. 3), es decir que la membrana celular y su contenido se desprenden de la pared como resultado de la retracción, dejando un espacio libre entre la membrana y la pared que es ocupado por la solución del medio. Al agente que produce la plasmolisis se le denomina plasmolítico, agente plasmolizante ó estabilizador osmótico.

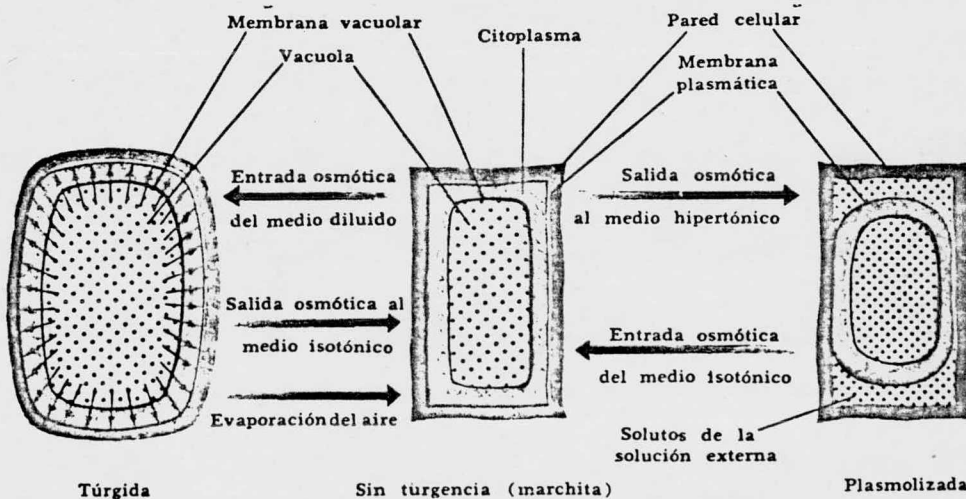


Fig. 3.- Estados osmóticos en una célula vegetal.

El proceso de plasmolisis implica varios eventos interdependientes que pueden ser químicos y estructurales. Las solu-

ciones hipertónicas producen la pérdida de agua en las células y así, las actividades de las células pueden ser alteradas por cambios en las fuerzas iónicas del citoplasma. Una consecuencia estructural muy obvia es que, durante la plasmolisis hay un descenso en el área total del plasmalema (4,91).

Dependiendo de si es apropiada al tejido, la plasmolisis parece que no altera irreversiblemente las estructuras celulares (40), por lo que es muy importante la selección de un agente estabilizante adecuado. Boffey y Northcote (5) observaron que la plasmolisis de protoplastos de mesofilo de tabaco produce un descenso en la síntesis total de pectinas, pero estimula la incorporación de arabinosa.

Los plasmolíticos más usados son las osas-alcoholes (manitol y sorbitol), la sacarosa y las mezclas salinas (por ejm. KCl y CaCl₂) (18). La condición que deben presentar es que no penetren en el protoplasto ó que lo hagan lentamente.

Hay dos procedimientos para seleccionar la concentración óptima del plasmolítico:

i) Observar al microscopio y comparar el rendimiento de protoplastos contra la concentración del medio plasmolítico. Se coloca el tejido que se va a utilizar en varias cajas Petri conteniendo una concentración determinada de enzimas y el medio plasmolítico a diferentes concentraciones, se ponen a incubar entre 3 y 4 horas y se observan al microscopio, relacionando el porcentaje de protoplastos obtenidos contra la concentración del medio plasmolítico (100) y la forma esférica regular que tengan (93). Se comparan los resultados obtenidos contra otros agentes.

Schalskolskaya y col. (93) encontraron que para el aislamiento de protoplastos de mesofilo de hoja de cebada (Hordeum vulgare), la concentración óptima era de 0.34 M y que el manitol era la mejor sustancia plasmolítica. Uchimiya y Murashige (100) aislando protoplastos de suspensiones celulares de tabaco (Nicotiana tabacum), encontraron que la fructosa, galactosa, sorbitol y manitol dieron resultados similares, en cambio la glucosa y la sacarosa dieron rendimientos muy bajos.

ii) La otra manera de encontrar la concentración óptima del agente estabilizante, es comparando la ganancia ó pérdida de peso del tejido en relación con la concentración del medio plasmolítico (comunicación personal del Dr. Guillermo Carrillo), y se efectúa de la siguiente manera:

Se pesan pedazos del tejido que se va a utilizar y se incuban en varias cajas Petri, las cuáles contienen diferentes cantidades del medio plasmolítico, durante 1 ó 2 horas, luego se sacan, se seca el exceso de líquido y se pesan. Enseguida se hace una comparación entre el porcentaje de ganancia ó pérdida de peso contra la concentración del agente plasmolítico. Se recomienda usar un valor ligeramente superior al punto cero para asegurar la plasmolisis del tejido.

Algunos investigadores recomiendan una plasmolisis antes del aislamiento enzimático (37), otros recomiendan usar una mezcla de azúcares, pero lo mejor es que además de usar la concentración y el agente plasmolítico adecuado, se mida la presión osmótica y ajustarla a la de la célula, como lo hacen Kao y col.

4.- Enzimas y componentes del medio enzimático: El procedimiento enzimático consiste en la degradación de la pared celular por medio de enzimas adecuadas. Como ya hemos visto, la pared celular está constituida principalmente por sustancias pécticas y celulosa, aún cuando hay presentes otros polisacáridos, éstos se encuentran unidos a la celulosa. Las enzimas utilizadas son celulasas y pectinasas.

Las celulasas han sido extraídas de hongos y caracoles, también se encuentran presentes en algunas frutas (96'). Estas enzimas rompen las uniones β -1,4 de glucósidos en monómeros terminales (exo) ó en intermedios (endo), produciendo β -1,4-celobiosa, β -1,4-celotriosa y glucosa. También se han encontrado β -1,3-glucanasas (102'). Son inhibidas por la presencia de metales pesados, reactivos sulfhídricos y agentes oxidantes ó reductores.

Una preparación comercial es la celulasa Onozuka R-10 obtenida del hongo Trichoderma viride. Su actividad máxima se -- presenta en un rango de pH de 4.0 a 5.0, entre las impurezas presentes contiene hemicelulasas que hidrolisan xilanos, glucanos, mananos, galactomananos, proteasas y galactonasas.

Las enzimas que destruyen a las sustancias pécticas y pectinas son llamadas pectinasas y hay tres tipos de ellas, las cuáles pueden actuar en monómeros externos ó internos.

i) Esterasas: pectinesterasas ó exo- ó endo-poligalacturonasas, las cuáles producen el rompimiento del grupo ester de los ácidos pécticos, produciendo pectinas y alcohol metílico.

ii) Hidrolasas: Glicosidasas ó exo- ó endo-polimetilgalacturonasas, las cuáles atacan las uniones α -1,4 ó β -1,4 de poliga-

lacturónidos (PMG).

iii) Liasas: Exo- ó endo-poligalacturonato-transelimininasas ó exo- ó endo-pectin-metil-transelimininasas (PMTE) las que eliminan ó añaden una molécula de agua en posición trans- sobre una -doble ligadura.

Una preparación de pectinasa comercial es la Macerocima R-10 extraída de Rhizopus, que exhibe su máxima actividad en un rango de pH de 5.0 a 6.0. Está compuesta por varias poligalacturonasas, pectintranselimininasas y hemicelulasas tales como arabanasas, galactanasas y xilanasas.

Las preparaciones enzimáticas que se usaron en los primeros aislamientos de protoplastos (16,20,24) eran preparaciones enzimáticas crudas, las cuales contenían gran cantidad de impurezas, que podían dañar a los protoplastos. Varios investigadores se han avocado al problema de purificar éstas preparaciones. Un método para purificar estas preparaciones es la elución de la mezcla a través de Sephadex G-25 seguido por un tratamiento con carbón activado y finalmente evaporación del vacío(56) . Algunas preparaciones comerciales se pueden purificar más con un tratamiento con Biogel (35). Actualmente existen preparaciones comerciales altamente purificadas.

En ciertos tejidos, particularmente en frutos, hay un alto contenido de pectinas y los protoplastos se pueden aislar - usando únicamente pectinasas (43,89). Se han encontrado en extractos de fruto de tomate varias enzimas: un complejo de celulasas: dos endo- β -1,4-glucanasas, una exo- β -1,4-glucanasa(96') ,

una β -1,3-glucanasa (96',102') que degradan celulosa insoluble a celodextrinas de bajo peso molecular y glucosa (96') y varias --pectinasas: pectinesterasas (89'), poligalacturonasas (89,102') y β -galactosidasas (102'). Estas enzimas son responsables del ablandamiento del fruto al hidrolizar las pectinas y celulosa.

Gregory y Cocking (43) aislaron grandes cantidades de protoplastos de lóculo de fruto de tomate usando Pectinol R-10 . Raj y Herr (89) también lograron aislar protoplastos de las regiones interplacentales de frutas de Solanáceas al digerir las paredes celulares con pectinasa Sigma.

Schalskolskaya y col. (93) encontraron que no era necesario la adición de pectinasa para aislar protoplastos de mesofilo de cebada. Sin embargo, es necesario hacer un estudio completo de la necesidad de enzimas para cada tejido, pues Willison y Cocking (104) encontraron por estudios en Microscopía Electrónica que, en el caso de protoplastos aislados de lóculo de fruto de tomate por medio de pectinasa solamente, quedaban algunas microfibrillas de celulosa remanentes sobre el plasmalema de algunos protoplastos, por lo que era más conveniente agregar celulasa, con la cuál no se observaban estas microfibrillas.

Indudablemente que un exceso de enzimas provoca daños a los protoplastos, por lo que se tiene que buscar una concentración mínima de enzimas que logre el aislamiento de una gran cantidad de protoplastos. Para esto conviene describir el procedimiento más utilizado, con algunas diferencias, dependiendo del tejido y las necesidades de enzimas, como lo reportan Schalskolskaya y col. (93) quienes solo usaron celulasa.

El procedimiento para encontrar la concentración óptima de enzimas es el siguiente:

Se coloca el tejido que se va a utilizar en varias cajas Petri, las cuales contienen el medio plasmolítico adecuado - en presencia de pectinasa mantenida a una concentración constante y la celulasa en cantidades variables y, después de 3 a 4 horas, se procede a observar al microscopio, relacionando la cantidad de protoplastos morfológicamente intactos (93) y/ó el porcentaje de protoplastos obtenidos, contra la concentración de celulasa utilizada (100); después de obtener la concentración óptima de celulasa, se repite el procedimiento para obtener la concentración óptima de pectinasa. Yamada y col. (109) encontraron que usando celulasa al 5 % y pectinasa al 0.1 % en presencia de sorbitol 0.5 M obtenían un rendimiento de 50 % de protoplastos a partir de una suspensión de células de tabaco (N. tabacum).

Varios investigadores han utilizado otras sustancias - además de las enzimas en el medio de la solución enzimática. Takebe, Aoki y Otsuki (98) usaron sulfato de dextrana y potasio, - el cual mejoró la separación celular. También se ha usado Polivinilpirrolidina (27). Las sustancias tales como el sulfato de dextrana y potasio y la Polivinilpirrolidina reducen el nivel de - las nucleasas de la preparación enzimática, particularmente cuando ésta no está purificada. Uchimiya y Murashige (100) agregaron sulfato de dextrana y potasio a la solución enzimática en diferentes concentraciones, pero no se logró un mejoramiento significativo en la producción de protoplastos aislados de una suspensión celular de tabaco (N. tabacum). Davey, Bush y Power (31) y

kartha y col. (56) utilizan sales minerales en medios de cultivo con la solución enzimática.

5.- pH del medio enzimático: Debido a que las enzimas tienen una actividad máxima a un pH específico, todos los procesos regulados por enzimas son dependientes del pH de la solución. Lo mismo sucede en el aislamiento de protoplastos por procedimientos enzimáticos.

Se ha visto que durante el aislamiento de protoplastos de haba (Vicia faba), el pH de la solución enzimática desciende más ó menos una unidad (81) y la producción de protoplastos dependió del aislamiento enzimático a un pH cercano a 7.0. Schenk e Hildebrandt (24) demostraron que la obtención de protoplastos de un pH menor de 5.0 es reducida enormemente. Algunas veces puede ocurrir que al buscar el pH óptimo para el aislamiento de protoplastos se encuentren dos valores máximos (100), esto posiblemente indica la presencia de 2 isoenzimas ó diferentes requerimientos de pH de la preparación de la celulasa y pectinasa.

Procedimiento para encontrar el pH óptimo: Se colocan varias cajas petri con el tejido que se está utilizando, en las cuales se encuentra el medio plasmolítico y las enzimas en la concentración adecuada y, si es necesario algún componente enzimático. Se hacen pruebas a diferentes pHs durante 3 ó 4 horas de incubación, se observan al Microscopio y se relaciona el pH con la producción de protoplastos.

57

6.- Temperatura de incubación de la solución enzimática: Al igual que los procesos regulados por enzimas son dependientes del pH, también son dependientes de la temperatura de incubación, por lo que tiene que buscarse una temperatura adecuada en la cual se obtenga la mayor cantidad de protoplastos sin que estos se vean dañados. Schalskolskaya y col. (93) encontraron que a 32^o C se lograban aislar un gran porcentaje de protoplastos de mesofilo de hoja de cebada (H. vulgare), al digerir el tejido con celulasa Onozuka R-10, además de obtenerse un mayor rendimiento, la velocidad de maceración fué mejorada notablemente. Uchimiya y Murashige (100) al aislar protoplastos de una suspensión celular de tabaco no encontraron un efecto significativo entre la temperatura de incubación y la producción de protoplastos y usaron una temperatura de 27^o C.

Procedimiento usado para encontrar la temperatura óptima de incubación: Se hace variando la temperatura con las variables anteriores ya definidas.

7.- Tiempo de incubación de la solución enzimática: El período de incubación de la solución enzimática es el tiempo en el cual la pared celular ha sido completamente digerida por el medio de maceración. Una prolongada estancia del medio de digestión con los protoplastos los puede dañar, al alterar la permeabilidad del plasmalema y permitir la entrada de material tóxico dentro del protoplasto, por lo que es conveniente encontrar un tiempo de digestión adecuado.

Algunos investigadores han usado tiempos de maceración

largos, hasta de 16 horas (19,34,86), pero la mayoría usa un tiempo de digestión corto de 3 a 5 horas (6,10,93,100,109).

Uchimiya y Murashige (100) observaron que después de 3 horas de digestión, el porcentaje de protoplastos producidos no aumentaba. Yamada y col. (109) encontraron que a 5 horas de digestión se lograba producir hasta 50 % de rendimiento, el cual no era mejorado con más tiempo de digestión.

Procedimiento para encontrar el tiempo de digestión:

Es el mismo para encontrar la temperatura, con las condiciones ya encontradas se toman muestras en lapsos de tiempo de media hora y se observan al microscopio, buscandose el mejor rendimiento.

8.- Purificación de las suspensiones de protoplastos: durante el aislamiento de protoplastos, forman una suspensión junto con los restos celulares, la cual algunas veces es difícil de purificar.

Existen varias técnicas de purificación de protoplastos reportadas:

i) Suspensión de protoplastos en sacarosa: Esta técnica fué desarrollada por Pojnar y Cocking (85), la cual consiste en filtrar los protoplastos a través de una gasa ó bien a través de una malla metálica para eliminar restos celulares muy grandes; el filtrado se deja reposar 5 minutos para permitir que los protoplastos queden flotando y los restos celulares sedimenten. Se transfiere una cantidad determinada de la suspensión al fondo de un tubo de ensaye y se llena el tubo con una solución de sacarosa; después de media hora los protoplastos se encuentran flotando.

do y se transfieren como una suspensión concentrada a otro tubo de ensaye y se repite el procedimiento; a estos protoplastos se les llama "dos veces lavados". Se hace otro lavado para diluir las enzimas.

Este método ha sido muy utilizado, con algunas innovaciones, por ejm. usar una solución salina en lugar del medio de cultivo (91). Otros en lugar de poner a flotar los protoplastos, los centrifugan a bajas velocidades (400 rpm)(100).

ii) Kanai y Edwards (54) diseñaron un método para purificar suspensiones de protoplastos aislados de mesofilo de plantas de metabolismo de C_3 , C_4 y ácido Crasuláceo. Este método consiste en un sistema de dos fases: Dextrana acuosa (T 40) y Polietilenglicol, quedando la suspensión de protoplastos en la interfase.

iii) Purificación con un gradiente: Chupeau y Morel (17) utilizaron un gradiente de sacarosa/sorbitol para la purificación de protoplastos aislados de tejido de tabaco no diferenciado (callo) con muy buenos resultados.

iv) Gregory y Cocking (43) diseñaron tres aparatos para el aislamiento y purificación en gran escala de protoplastos de fruto de tomate (L. esculentum) con los cuales se puede trabajar hasta con 20 frutos a la vez, y la purificación es por el método de flotación de protoplastos en sacarosa.

v) Koblitz y Scheunert (58) lograron idear un aparato que sirve para purificar la suspensión de protoplastos y, que permite mejoras significativas en cuanto a la obtención de material estéril y a la vez permite la reducción del tiempo de digestión de la pared celular.

9.- Viabilidad de los protoplastos: La viabilidad de los protoplastos es el porcentaje de protoplastos que sobreviven después del tratamiento enzimático.

Una vez que se ha aislado y purificado la suspensión de protoplastos, es necesario saber la viabilidad de los mismos. Benbadis y Baumann (3) hicieron un estudio ultraestructural de los organelos celulares en los protoplastos aislados, el cual no reveló alteraciones solo un incremento en la actividad del Aparato de Golgi, posiblemente relacionado con la síntesis de la nueva pared celular.

Un procedimiento para medir la viabilidad de los protoplastos, es el uso de colorantes vitales, los cuales reaccionan y dan una coloración característica para cada colorante cuando las células ó los protoplastos están vivos. Otra manera de ver la viabilidad de los protoplastos es observando el flujo citoplásmico (100) pero es más significativo relacionar la viabilidad de los protoplastos con la capacidad de regenerar la pared celular, dividirse y formar colonias (73).

A pesar de no ser comparables los procedimientos (mecánicos y enzimáticos) de aislamiento de protoplastos, el procedimiento enzimático es mucho menos tedioso y producen una mayor cantidad de protoplastos viables que el procedimiento mecánico. Es por esto que el procedimiento enzimático de aislamiento de protoplastos es mucho más usado que el mecánico, además de su facilidad de manejo.

Se han aislado protoplastos por procedimientos enzimá-

ticos en frutos (43,89), semillas (91), raíces (20,82), polen - (2), hojas (6,30,34,37,73,81,86), tejido no diferenciado (6,8,9,17,46) y suspensiones celulares (5,17,100,102,109).

Las paredes celulares de algunos frutos están formadas en su mayor parte por pectinas (89) y la obtención de protoplastos se efectúa usando la solución enzimática con mayor cantidad de pectinasa que celulasa. El aislamiento de protoplastos de semillas y raíces se dificulta debido a la constitución de la pared celular de estos tejidos que es más compleja y más gruesa (91, - 82). En el caso del polen son células haploides relativamente difíciles de manejar y con problemas para esterilizarlas. Las hojas han sido muy utilizadas para el aislamiento enzimático de protoplastos, lo mismo que las suspensiones celulares y callos (tejido no diferenciado).

Las suspensiones celulares y callos presentan varias ventajas sobre los tejidos anteriores.

- 1) La cantidad de enzimas utilizadas es menor
- 2) Existen menos problemas de contaminación
- 3) Presentan mayor facilidad de manejo

Sin embargo presentan algunas desventajas:

1) En algunas suspensiones celulares y callos no se han podido aislar protoplastos ó los rendimientos son muy bajos (35).

2) La purificación de la suspensión de protoplastos se hace difícil debido a que los restos celulares y los protoplastos son transparentes y, al no observarse estos no se pueden eliminar fácilmente. Chupeau y Morel (17) solucionaron este problema purifi

cando la suspensión de protoplastos aislados de tejido de tabaco no diferenciado (callo) en un gradiente de sacarosa/sorbitol.

3) Cuando se planea un estudio de fusión de protoplastos --debido a que el mejor material para fusión son los protoplastos con poca vacuolación y considerable cantidad de citoplasma (35) -- los protoplastos resultantes de suspensiones celulares y callos son altamente vacuolados, y por consiguiente con poco citoplasma, es difícil lograr la fusión de estos protoplastos. Este problema se puede resolver utilizando concentraciones bajas de auxinas y concentraciones altas de citocininas en el medio de cultivo, las cuales dan lugar a protoplastos altamente citoplásmicos y en éstos se puede inducir la fusión con un agente tal como el nitrato de sodio (35).

CAPITULO IV.- DESARROLLO DE LOS PROTOPLASTOS.

Los protoplastos presentan características como la regeneración de la pared celular, división celular y regeneración de plantas completas en condiciones adecuadas (34,38,54,71,97).

Es claro que durante el aislamiento una parte de los protoplastos son dañados, durante el cultivo, también algunos son afectados, pero presentan ventajas sobre el cultivo de células. Así, Nagata y Takebe (73) obtuvieron una eficiencia de plaqueo de 40 % en células de empalizado de hoja de tabaco, mientras que los protoplastos aislados enzimáticamente del empalizado de hoja de tabaco dieron una eficiencia de plaqueo de 60 %.

→ A.- Condiciones apropiadas para el desarrollo de los protoplastos de Plantas Superiores.

→ Indudablemente que el desarrollo de los protoplastos también requiere condiciones apropiadas, entre éstas, las más importantes son:

- 1.- Medios de cultivo
- 2.- Condiciones de luz
- 3.- Temperatura de incubación
- 4.- Velocidad de agitación de las suspensiones
- 5.- Concentración ó densidad celular

1.- Medios de cultivo: Los medios de cultivo son soluciones que contienen los requisitos mínimos necesarios para mantener ó desarrollar algunas células.

Para el estudio de los medios de cultivo, lo vamos a subdividir en:

- i) Composición del medio de cultivo
- ii) Técnicas de cultivo

i) Composición del medio de cultivo: Fundamentalmente los medios de cultivo de protoplastos se componen de:

- a) El medio plasmolítico
- b) Sales minerales
- c) Componentes orgánicos
- d) Hormonas vegetales

a) El medio plasmolítico: Ya se ha discutido la importancia de un agente que reemplace la presión ejercida normalmente por la pared celular (pág. 28). Generalmente el estabilizador osmótico es un azúcar ó sales minerales, algunas veces se usan mezclas de azúcares (102). Wallin y Eriksson (102) usaron una mezcla de sacarosa, manitol y Modopeg (Polietilenglicol comercial) con la cual obtuvieron una mayor cantidad de divisiones celulares. El medio plasmolítico juega un papel muy importante en la regeneración de la pared celular (inciso B del Cap. IV).

b) Sales minerales: Los requisitos de sales minerales

de los protoplastos son los mismos que utilizan las células, ya que los protoplastos son células normales desprovistas de la pared celular. Estos requisitos dependen de la especie y variedad de la planta, del tejido y del grado de diferenciación.

Un componente que parece ser crítico en el cultivo de protoplastos es el calcio (102). Este juega un papel muy importante, pues ya hemos visto cómo el plasmalema se encuentra cargado electronegativamente (pág. 23) y cómo la presencia de cationes divalentes como el calcio inactivan las nucleasas (69) las cuales pueden romper el plasmalema. Kao y col. (55) encontraron que hay una relación entre la cantidad del calcio y la cantidad de divisiones celulares. Otro componente que se ha encontrado que favorece la división celular de protoplastos aislados de mesofilo y segmentos de tallo de Becerra (Antirrhinum majus) es el amonio (84).

c) Componentes orgánicos: Entre los componentes orgánicos más importantes se encuentra la sacarosa, la cual juega un papel muy importante en la regeneración de la pared celular (65,66) y en la división celular (55,102).

Poirier-Hamon y col. (84) encontraron que la adición de un hidrolizado de caseína estimuló la división celular. Esto es debido a que en el hidrolizado de caseína se encuentran aminoácidos y polipéptidos. Otros investigadores han preferido agregar aminoácidos y vitaminas al medio de cultivo (17,71,73).

d) Hormonas vegetales: Las hormonas son sustancias -

químicas que actúan a distancia y en pequeñas concentraciones. El mecanismo de acción de las hormonas vegetales no se conoce ampliamente. Los protoplastos han sido sistemas de estudio para la elucidación del mecanismo de éstas.

Entre las hormonas más conocidas están las Giberelinas, el etileno, el Acido Absícico, las auxinas y las citocininas. Las que nos interesan son las dos ultimas: Las auxinas y las citocininas.

Las auxinas más conocidas son:

- Acido Indolacético (IAA)
- Acido Naftalenacético (NAA)
- Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

Las citocininas más conocidas son:

- 6-Furfurilaminopurina (cinetina)
- 6-Bencilaminopurina (6-BAP)
- Benciladenina (BA)
- 6-(4-hidroxi-3-metil-but-trans-enilamino)purina (zeatina)
- 1-etoxi-9-etiladenina (Y-96)

Las hormonas a una concentración alta presentan efectos inhibitorios. Hall y Cocking (45) observaron que el IAA induce el crecimiento, causando inflación en las células las cuales a una concentración muy alta de IAA se puede destruir. La concentración máxima de IAA que se puede usar para el cultivo de protoplastos aislados de coleoptilo de avena (Avena sativa)

-5

es del orden de 10^{-5} M.

Kartha y col. (56) encontraron que la BA sola, induce la síntesis de clorofila en protoplastos aislados de Nabo (Brasica napus L. cv zephyr). La BA sola induce la regeneración de plantas a partir de segmentos de tallo de nabo. Bright y Northcote (8) observaron que la Zeatina aumenta la frecuencia de división de protoplastos aislados de células de plátano. Short, Tepfer y Fosket (97) encontraron que la zeatina estimula la formación de poliribosomas aún en presencia de Actinomicina D.

Se ha encontrado que el IAA, citocininas y etileno inducen la síntesis de isoperoxidases, las cuales tienen un papel muy importante en la lignificación, metabolismo de compuestos aromáticos, oxidación de auxinas y la producción de etileno (76).

ii) Técnicas de cultivo: Las técnicas de cultivo de protoplastos más usadas son:

- a) Medio líquido
- b) Medio sólido
- c) Técnica de las microcámaras
- d) Técnica de cultivo nodriza

a) Medio líquido: Esta técnica consiste en colocar gotas de suspensiones de protoplastos en cajas Petri, donde el medio de cultivo está en medio líquido (55). Esta técnica provee un mejor intercambio gaseoso y la difusión de los compuestos excretados y, lo más importante es que facilita la renovación del

medio de cultivo.

b) Medio sólido: En esta técnica, los protoplastos se colocan en placas de agar (73). El cultivo en medio sólido ha sido ampliamente usado y el plaqueo en agar es superior para protoplastos. Davey y Short (30), observan que el medio de cultivo sólido estimula la regeneración más completa de la pared celular que el medio de cultivo líquido en protoplastos aislados de hojas de legumbres.

c) Técnica de las microcámaras: Esta técnica ha sido desarrollada por Vasil y Vasil (101), en la cual se usan cajas Petri muy pequeñas de un volumen de 0.03 ml.. Esta técnica tiene la ventaja que los protoplastos pueden ser observados continuamente. Esta técnica ha sido usada también por Bajaj (4) en estudios de aislamiento de protoplastos de polen.

d) Técnica de cultivo nodriza: Esta técnica desarrollada por Sharp y Raskin (94) consiste en introducir un pedazo de callo (tejido no diferenciado) en la caja Petri con agar en la que se coloca la suspensión de protoplastos. A densidades celulares bajas, los protoplastos no producen cantidades suficientes de hormonas (7) y, posiblemente el tejido no diferenciado proporciona alguna sustancia necesaria para la división celular.

Es muy conveniente que se renueven los medios de cultivo tan pronto como se hayan formado las colonias, para eliminar las sustancias excretadas por los protoplastos que podrían

ser tóxicas.

2.- Condiciones de luz: Nagata y Takebe (73) encontraron que la formación de colonias de protoplastos dependió de la intensidad de luz. A 400 lux encontraron una eficiencia de plaqueo máxima. Davey y col. (32) usaron 100 lux para la regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de mesofilo de nabo y después de 15 días cambiaron el medio semanalmente - junto con un aumento de 5 000 lux en la intensidad de luz. Constabel y col. (26) encontraron que la sobrevivencia de protoplastos aislados de mesofilo de hoja de papa (Solanum nigrum) dependió del hecho de mantener el material en la oscuridad 30 - horas antes de usarse para el aislamiento. Mackenzie y col. (61) consiguió menos divisiones cuando colocó los protoplastos aislados de Espárragos (Asparagus officinalis) en luz, que cuando los puso en la oscuridad; y más tarde cuando se dediferencian - los coloca en condiciones con luz.

Indudablemente que las condiciones de luz están relacionadas con la actividad fotosintética de los tejidos de los cuales se aíslan los protoplastos. Los organelos que son responsables en primera instancia de la actividad fotosintética son - los cloroplastos.

Los cloroplastos son afectados por la plasmolisis durante el aislamiento (30). Las observaciones ultraestructurales muestran una lenta degradación de algunos cloroplastos durante el cultivo de los protoplastos, la cual, se observa como una liberación de los tilacoides. Se ha visto una amplia variedad -

de comportamientos de los cloroplastos durante el cultivo de los protoplastos; en tabaco, algunos cloroplastos se diferencian, mientras que en otras variedades permanecen verdes y aumentan de tamaño (Disc. II parte Colloq. Inter. C.N.R.S. 212, 1973). Takebe menciona que en el cultivo los cloroplastos llegan a estar menos diferenciados y, cabe la posibilidad de que el número de cloroplastos total aumente durante el cultivo, inclusive ya se ha demostrado la división de cloroplastos por microscopía Electrónica (98).

Existen diferencias en los trabajos reportados en relación a las condiciones de luz para el desarrollo de los protoplastos, por lo tanto es conveniente probar intensidades de luz variables ó fotoperíodo, luz constante y oscuridad para determinar las condiciones de luz en que se desarrollan mejor.

3.- Temperatura de incubación: Otra característica para el desarrollo de los protoplastos es la de poder restituir en el tejido las condiciones normales de la planta. Una de estas es la temperatura; generalmente el rango de temperaturas usado varía entre 25 y 32 ° C. Kartha y col. (56), Vasil y Vasil (101) usan temperaturas de 26 ° C para nabo y tabaco respectivamente, mientras que Uchimiya y Murashige (100) usan 27 ° C para cultivar protoplastos aislados de suspensiones celulares de tabaco (Nicotiana tabacum).

4.- Velocidad de agitación de las suspensiones de protoplastos: Los cultivos en medio líquido de suspensiones de pro

51

toplastos se agitan para facilitar el intercambio gaseoso. No está claro si el oxígeno llega a ser un factor importante durante el cultivo ó si las sustancias que son liberadas durante la agitación puedan ser tóxicas y afecten el crecimiento. La agitación se hace difícil debido a la fragilidad de los protoplastos, por lo que es recomendable que la agitación sea lenta.

5.- Concentración ó densidad celular: Se ha encontrado que uno de los factores críticos de la división celular es la concentración de la suspensión de protoplastos (99). Brett y Northcote (7), proponen que cuando las concentraciones celulares no son adecuadas, los protoplastos no sintetizan suficiente citocinina endógena para iniciar divisiones celulares de los protoplastos que han logrado regenerar la pared celular.

Takebe y Nagata (99) recomiendan usar densidades del orden de 10^4 a 10^5 pps./ml. (pps. protoplastos) al cultivar protoplastos aislados de mesofilo de tabaco en medio líquido, y de 10^3 a 10^4 pps/ml. cuando se usa medio sólido. Además encontraron que los protoplastos haploides de mesofilo de tabaco no logran dividirse en densidades menores de 10^4 pps/ml.

→ B).- Regeneración de la pared celular ←

Los protoplastos tienen la característica de resintetizar la pared celular en condiciones apropiadas. Estas condiciones ya fueron descritas en el inciso A de este Capítulo.

Las primeras observaciones de la regeneración de la pared celular fueron hechas por Townsend (24) quien observó que al plasmolizar una célula, el protoplasto se retrae y regenera una nueva pared celular cuando se cultiva en sacarosa al 20 %, también observó que durante la plasmolisis el protoplasto se separaba en dos mitades, una nucleada y la otra anucleada. De aquí, él demostró que solamente los subprotoplastos nucleados regeneran la pared celular. Las condiciones necesarias para la regeneración de la pared celular fueron sacarosa e iluminación. Después Binding (24) demostró que solamente los protoplastos aislados de musgos que regeneraban pared celular, germinaban a protonema (el protonema es una especie de apéndice que sirve para la reproducción sexual), y esto indicaría que en las plantas superiores deberían primero regenerar la pared celular, para luego dividirse y regenerar plantas completas.

Para seguir el curso de la regeneración de la pared celular se ha usado Microscopía Electrónica debido a que las fibrillas de celulosa remanentes no son visibles usando los métodos de Microscopía óptica, ni campo brillante, contraste de fase, ó interferencia de Normanski y tampoco fluorescen adecuadamente con Calcofluor (fluoresce específicamente con la celulosa). En cambio son detectados fácilmente por estudios de Réplica de superficie y Grabado en congelado (104).

El primer sistema donde se estableció la regeneración de la pared celular por métodos de Microscopía Electrónica fueron protoplastos aislados del lóculo de fruto de tomate por Poinar, Willison y Cocking (85) en 1967. Ellos observaron que la

regeneración de la pared celular es muy lenta cuando los protoplastos se cultivan en sacarosa sola, pero cuando se usa un medio de cultivo adecuado, las primeras etapas de la regeneración de la pared celular aparecen después de 24 horas.

→ El proceso de regeneración de pared puede no ocurrir uniformemente sobre el plasmalema y no todos los protoplastos desarrollan una nueva pared. La regeneración de la pared celular es afectada por la concentración y naturaleza de la fuente de carbón (55), y parece que el uso de una mezcla de azúcares - incluyendo pentosas, tiende a producir un mayor porcentaje de protoplastos con la pared celular regenerada (102). En el caso de protoplastos aislados de *Convolvulus* (*Convolvulus arvensis*) la regeneración de la pared fué afectada muy poco por la presencia de hormonas, vitaminas ó sales, pero si fué afectada por la fuente de carbón (91).

→ Se distinguen varias fases de la regeneración de la pared celular, que son:

- 1).- Traslado de las enzimas que sintetizan la pared celular hacia el plasmalema.
- 2).- Síntesis de polisacáridos
- 3).- Ensamble de los polisacáridos
- 4).- Lignificación

Inmediatamente después del aislamiento de los protoplastos hay una fase en la cual se observa un aumento del Retículo Endoplásmico, polisomas asociados y el Aparato de Golgi. Northcote (76) propone un flujo de material que vá del Retículo

Endoplásmico a las vesículas, de aquí el Aparato de Golgi, a las vesículas de Golgi y finalmente al plasmalema.

Short y Maclachlan (96) encontraron en epicotilos de chícharo (Pisum sativum) en crecimiento, que las actividades de la celulosa-sintetasa están relacionadas principalmente con el Aparato de Golgi, después de un tratamiento con IAA, estas actividades se relacionan con el Aparato de Golgi y una fracción rica en vesículas de Retículo Endoplásmico. Brett y Northcote (7) proponen que las celulosa-sintetasas son exportadas vía Aparato de Golgi y las microfibrillas de celulosa son sintetizadas en el plasmalema, más que en el Aparato de Golgi. Esto ha sido demostrado por los estudios "in vivo" (96).

La síntesis de celulosa es catalizada por enzimas unidas a la membrana, las cuales usan UDP-glucan y GDP-glucan como sustrato, es posible que estén implicados intermediarios glicolípidos y glicoproteínas en la síntesis de celulosa y otros polisacáridos de plantas (8).

Hanke y Northcote (96) hacen notar que la pared que se forma alrededor de los protoplastos de plantas en las primeras etapas tienen una estructura anómala, que puede ser debida a la carencia de pectinas. La ultima fase de la regeneración es precisamente la lignificación.

La lignificación es un proceso de polimerización de los radicales libres formados por la deshidrogenación enzimática de alcoholes, tales como el cumarilo, coniferilo y sinapilo (76).

Las principales diferencias entre la pared resinteti-

zada y la antigua es la densidad de material fibrilar y la presencia ó ausencia de la laminilla central resultante de la citocinesis (13).

En todos los casos en los que se llevó a cabo la regeneración de plantas completas, la regeneración de la pared celular fué una etapa previa a la división celular (39,55,73). La regeneración de la pared celular es una respuesta natural de los protoplastos viables.

→ C).- División celular

El otro aspecto característico de los protoplastos, es que se comportan como suspensiones celulares después de regenerar la pared celular y se dividen formando colonias y callos, que en condiciones apropiadas pueden regenerar plantas completas.

El primer reporte de división celular en protoplastos fué hecho por Eriksson y Jonasson (24) quienes observaron la caricinesis de protoplastos de Haplopapus gracilis, unas plantas de la familia de las Compuestas. En 1971 Nagata y Takebe (73) - observaron la división celular de protoplastos aislados de meso filo de tabaco.

Existe la posibilidad de que los protoplastos puedan sufrir mitosis sin citocinesis (90) y, también es posible que una vez que la regeneración de la pared ha sido iniciada, las relaciones temporales de mitosis y citocinesis puedan llegar a

estar más cercanas hasta que la situación es similar a la encontrada normalmente en las células en cultivo (24). Frearson, Power y Cocking (37) observaron que los protoplastos aislados de petunia (Petunia hybrida) en el medio de Nagata y Takebe (73), son capaces de efectuar la división nuclear dando lugar a protoplastos binucleados y después siguiendo la regeneración de la pared celular, se produce mitosis y citocinesis.

Algunas veces se observan células binucleadas en cultivo y esto puede ser producto de una inhibición de la citocinesis. Se ha podido inducir experimentalmente la presencia de células bi-, tri- y tetra-nucleadas con cafeína (24).

Entre las condiciones más importantes para la división nuclear, la más importante es la densidad celular. También se ha visto que una mezcla apropiada de azúcares puede estimular la división celular. Entre las hormonas, la zeatina aumenta la frecuencia de divisiones de protoplastos aislados de células de plátano (8). ←

D).- Desarrollo de los protoplastos

El subsecuente paso después de lograr la división celular es sostenerla y lograr la formación de colonias para la regeneración de plantas completas.

Entre las condiciones necesarias para lograr el desarrollo del tejido están el cambio de medio de cultivo por uno fresco en cuanto se formen colonias ópticamente visibles y se--

guirlo cambiando frecuentemente. Cuando ya se han formado callos grandes, se puede inducir vástagos ó raices, cambiando las hormonas ó la concentración de hormonas (73). Los requerimientos de hormonas para cada planta ó especie, son diferentes aún entre la misma variedad. Por ejm. Nagata y Takebe (73) obtuvieron mejores resultados usando NAA y 6-BAP, mientras que Bui Dang Ha y col. (11) obtuvieron vástagos usando NAA y BA, y para la inducción de raices usaron IAA y zeatina. También en este caso una condición necesaria es la densidad celular.

Después de que se han inducido vástagos y raices en las colonias formadas y que se llega a una plántula con un tamaño adecuado, se procede a sembrarla en el suelo.

un tiempo prolongado de incubación de las colonias, puede provocar la regeneración de plantas con números cromosomales anormales (73).

Gamborg y col. (39) han logrado regenerar plantas completas por embriogénesis de los protoplastos, lo mismo han hecho Dorion, Chupeau y Burgin (34).

CAPITULO V.- UTILIZACION DE LOS PROTOPLASTOS.

→ El trabajo de cultivo de protoplastos ha ampliado de una manera ilimitada el futuro para el mejoramiento de plantas - (2). Los protoplastos han sido usados por Fisiólogos (51,55,89), Virólogos (57,79,111), Biólogos Moleculares (50,90) Genetistas y Morfogenetistas (23,50,64,73). En la Agricultura, para la regeneración de plantas a partir de híbridos somáticos de protoplastos fundidos de plantas sexualmente incompatibles ó relacionadas de una manera muy lejana. La introducción de bacterias fijadoras de Nitrógeno y algas azul-verdes de plantas no-leguminosas; la introducción de resistencia a enfermedades en la siembra por incorporación selectiva de genomas en el protoplasto; la inducción y fácil detección de mutaciones en protoplastos haploides, el trasplante de cloroplastos "extraños" en plantas con sistemas fotosintéticos inefectivos; la introducción de un genoma completo ó parte de éste por transgenosis, los cuales pueden desplazar en parte las prácticas convencionales usadas para el mejoramiento de plantas.

La rígida pared celular de las plantas presenta dificultades para el aislamiento de DNA. La mayoría de los métodos de aislamiento de DNA incluyen la extracción de proteínas con fenol ó cloroformo-alcohol isoamílico, los cuales dañan al DNA. Ohyama, Gamborg y Miller (77) aislaron protoplastos y lisaron la membrana con SDS (Dodecilsulfato de sodio); después de un tratamiento con pronasa para eliminar proteínas, agregaron ribonuclea

sa para purificar el DNA del RNA, obteniendo DNA de un alto grado de pureza.

En la investigación de la actividad fotosintética, Nishimura y col. (74) encontraron mayores ventajas si usaban protoplastos en lugar de cloroplastos aislados y, de esta manera han podido elucidar el mecanismo bioquímico de la fotorespiración a nivel celular (75). Encontraron también que los protoplastos son fotosintéticamente estables durante nueve horas después del aislamiento (75).

Entre los fenómenos más importantes de la utilización de los protoplastos encontramos:

- A).- Fusión de protoplastos
- B).- Absorción de partículas

A).- Fusión de protoplastos

La fusión de protoplastos implica la combinación de citoplasma ó núcleo ó ambos, de protoplastos vecinos. La fusión puede lograrse espontáneamente ó por inducción con algún agente químico, físico ó biológico.

1.- Fusión espontánea: La fusión espontánea quiere decir la fusión de protoplastos que realmente nunca estuvieron separados completamente uno del otro, la situación resulta debido a que los protoplastos pueden ser aislados cuando éstos están unidos por conexiones plasmodesmáticas (plasmodesmos). Estas cone-

xiones pueden expanderse permitiendo la mezcla de los citoplasmas y organelos de los protoplastos fundidos espontáneamente.

Cocking (23) fué el primero en observar la fusión espontánea y, observó que para tener fusión espontánea es necesario:

- i) Mantener en contacto a los protoplastos adyacentes vía plasmodesmata durante el aislamiento (106).
- ii) El aislamiento de los protoplastos tiene que ser por el procedimiento enzimático de una sola etapa.

Withers (106) al estudiar la fusión espontánea por Microscopía Electrónica aduce que las evidencias son concluyentes al mantenerse los protoplastos en contacto en algunos puntos, implicando expansiones plasmodesmáticas. Además observó que el mínimo movimiento causa un rompimiento de los plasmodesmos. Bourgin, Chupeau y Morel (6) encontraron que el calcio en concentraciones mayores de 2.10×10^{-2} M inhiben la fusión espontánea. Los protoplastos fundidos espontáneamente son útiles para elucidar interacciones nucleares (24).

2.- Fusión inducida: La fusión inducida es la que se logra por presencia ó influencia de algún agente químico, físico ó biológico. La fusión inducida se ha logrado obtener de varias maneras, algunas de éstas son:

- i) Aplicación de presión mecánica a través de micromanipulaciones (27).
- ii) Succión de protoplastos contra una rejilla con micropipetas (27).
- iii) Exposición de los protoplastos a altas concentraciones de NaNO_3 y después presionar con un cubreobjetos (23).
- iv) Centrifugación e incubación con Concavalina (104).
- v) Aglutinación con antisuero
- vi) Aglutinación con Polietilenglicol (27).

La primera vez que se logró inducir la fusión de protoplastos fué en 1971 por Cocking (23) al colocar NaNO_3 en el medio de cultivo de los protoplastos. Grout, Willison y Cocking (44) vieron que el efecto inicial del NaNO_3 es llevar a cabo una reducción de la electronegatividad en la superficie eléctrica del protoplasto, reduciendo interacciones repulsivas. Esto se observa al ver que hay una concentración salina óptima, después de la cual se observa un efecto opuesto.

El otro agente inductor más importante es el Polietilenglicol, el cual induce una alta frecuencia de aglutinación, provocando también la adhesión de los protoplastos a superficies de vidrio y plástico. La solución de Polietilenglicol con un peso molecular de 6 000 y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a pH de 5.5. El tratamiento dura alrededor de 30 minutos y para evitar la adhesión de los protoplastos a las cajas Petri se le agrega papaína (27).

El mecanismo propuesto por Constabel y Kao (27) es que la glutinación provocada por el polietilenglicol puede implicar

la atracción de protoplastos por fuerzas electrostáticas. El polietilenglicol es ligeramente polar y la superficie del plasmalema exhibe preferentemente cargas negativas. Parece ser que los iones calcio establecen puentes entre las moléculas de polietilenglicol y los protoplastos aislados y de esta manera se efectúa la aglutinación. Además el polietilenglicol provoca la aglutinación de protoplastos con las superficies de plástico y vidrio debido a que éstas, en medio ligeramente ácido, están cargadas negativamente. Constabel y Kao (27) lograron aumentar la fusión al agregar lisosima, la cual aparentemente ataca a las glicoproteínas del plasmalema. La lisosima también inhibe la rápida regeneración de la pared celular, dando tiempo a una mejor fusión.

La inducción para la fusión de protoplastos se ha usado para la obtención de híbridos somáticos. Por ejemplo, Fowke y col. (36) lograron la fusión intergenérica de protoplastos aislados de hojuelas de chícharo y de subcultivos de haba al mezclarlos en una solución de 1:1 en presencia de polietilenglicol. Después de tres horas se observó la presencia de una gran cantidad de heterocariotes. Carlson (17,18) logró la producción de un híbrido interespecífico de dos variedades de Nicotiana glauca y Nicotiana langsdorfii, al fundir los protoplastos obtenidos de ambas variedades.

→ Cuando la fusión de protoplastos es lograda entre protoplastos de la misma especie, la fusión es intraespecífica (87) y, al ocurrir la fusión nuclear se produce un homocariote. Cuando la fusión es entre protoplastos de diferente especie, es una

fusión interespecífica y, se produce un heterocariote en el caso de producirse la fusión nuclear. También existe la fusión intergenérica (36).

Cabe hacer notar que los protoplastos fundidos son capaces de regenerar la pared celular, dividirse y aún regenerar plantas completas (11). De aquí la importancia para la Agricultura y la Genética. ↵

➤ B).- Absorción de partículas

La ausencia de la pared celular de los protoplastos - permite la entrada de partículas extrañas dentro del protoplas-- to. Como ya hemos visto, la pared celular contiene varias enzi-- mas (pág.21), las cuales pudieran degradar macromoléculas (DNA, RNA) u organelos (cloroplastos) que se deseen introducir.

Las primeras observaciones sobre la absorción de partí-- culas extrañas en los protoplastos fué hecha por el equipo de Vi-- rólogos japoneses encabezados por Takebe, quienes en 1969 (2) lo-- graron infectar protoplastos aislados de mesofilo de tabaco con RNA aislado del Virus del Mosaico del tabaco (TMV). Poco después, Cocking (21) logró infectar protoplastos aislados de fruto de to-- mate con Virus del Mosaico del tabaco. Desde entonces se han he-- cho grandes avances en este campo (111), convirtiéndose los pro-- toplastos en un sistema para el estudio de Virus. ↵

Es interesante la investigación hecha por Ledoux y - col. (60), quienes lograron introducir DNA a protoplastos de -

plantas de Arabidopsis. Otros estudios interesantes en este campo, son los logrados por Hess y col. (49) quienes lograron aislar DNA de una variedad de Petunia de flores rojas e introducirlo en protoplastos aislados de plantas de Petunia de flores blancas, modificando el color de las flores a rosa.

Carlson (14,15) aisló cloroplastos de hoja de tabaco y logró introducirlos en protoplastos aislados de una planta de tabaco albina, los protoplastos regeneraron la pared celular, dividieron y regeneraron una planta clorofiliana. Los cloroplastos absorbidos funcionan normalmente y se demuestra que son capaces de utilizar la información proveniente del núcleo de los protoplastos huéspedes.

→ Otro de los aspectos muy importantes es el de la infección viral. Los protoplastos presentan dos grandes ventajas de la infección viral de plantas:

- i) Los protoplastos pueden ser infectados sincrónicamente con el virus.
- ii) Se logra obtener una alta proporción de protoplastos infectados.

Los protoplastos pueden ser un sistema de estudio para el mecanismo de infección; se pueden identificar proteínas (79) y otros compuestos de interés bioquímico (57) en las primeras etapas de la infección. Este método es más adecuado que el de hojas inoculadas (29).

Cada virus y tipo de protoplastos pueden requerir un tratamiento especial de aislamiento. Para determinar el proceso

de infección es necesario estudiar las condiciones de aislamiento y cultivo de protoplastos de hojas inoculadas con el virus, - después se aíslan protoplastos sanos y se infectan en las condiciones obtenidas (29).

Motoyoshi y col. (67) demostraron que la infección con Virus del Mosaico del tabaco (TMV) es más alta en protoplastos - que en la planta de tabaco y además es más rápida. Proponen un - mecanismo de infección (70):

- i) Modificación de la carga del virus, posiblemente a un valor neto positivo con adición de partículas virales y un policación (poliornitina ó polilisina).
- ii) Producción de áreas dañadas en la superficie del plasmalema por resuspensión ó daños en el plasmalema.
- iii) Absorción de los agregados virus-policación en el plasmalema, ya en áreas dañadas como propone Burgess y col. - (12) ó a través del plasmalema de alguna manera más permeable por la presencia de discontinuidades locales.

Motoyoshi y Hull (68) encontraron que no siempre es necesario la presencia de un policación para lograr la infección - con un virus, solamente cuando el virus tiene un punto isoeléctricp negativo. Otros virus como el Virus de la Enanez del Chí--charo (68) y una variante del Virus del Mosaico del Bromo no necesitan de un policación para la infección. Otsuki y col. (79) - tuvieron resultados similares con el Virus X de la Papa.

Se ha pensado que los virus entran al protoplasto por pinocitosis ó por un proceso análogo al de transporte activo -

50

(20), sin embargo, los resultados de Motoyoshi, Watts y Bancroft (70) con dextrana DEAE, la cual promueve la pinocitosis en células animales, sugieren la entrada del virus del Mosaico Clorótico de la Vid por una absorción física pasiva más que por un transporte activo.

Sarkar, Upadhya y Melchers (92) proponen que la poliornitina se combina con el virus y lo protege del ataque de ribonucleasas a pH ácido, al comparar la eficiencia de infección al utilizar pH de 9.0 y altas concentraciones salinas con el Virus X de la Papa, y la eficiencia de infección de usar poliornitina en un pH ácido. La eficiencia de infección es la misma. A pH de 9.0 las ribonucleasas son inactivadas y las concentraciones salinas son para disminuir la electronegatividad del plasmalema.

Así hemos visto la aplicación que tienen los protoplastos en varias ramas de la investigación.

CAPITULO VI.- PARTE EXPERIMENTAL

En 1974, Galindo y Belalcázar (38) encontraron que una enfermedad que dañaba en ocasiones hasta el 100 % de la producción de tomate (Lycopersicon esculentum) en los estados de México y Morelos, era producida por un virus. Este, causa la enfermedad que los Agricultores conocen como "Planta Macho".

Debido a que este virus no ha sido caracterizado, se ha iniciado una investigación sobre el mismo (52) y el primer paso en la investigación fué encontrar un sistema de células para el estudio del virus. Varios investigadores (67,111) han reportado que los protoplastos presentan grandes ventajas para el estudio de virus de plantas, por lo que se efectuó una revisión bibliográfica con el fin de encontrar el procedimiento más apropiado para el aislamiento y cultivo de protoplastos.

Se estudiaron en el laboratorio algunos de los parámetros más importantes para el aislamiento y cultivo de protoplastos de hoja y fruto de tomate (Lycopersicon esculentum) con el objeto de saber cuál de estas dos partes de la planta de tomate resulta la fuente más apropiada para la obtención de protoplastos viables. Después de hacer un análisis de los resultados se propone un procedimiento que produce protoplastos en buen estado fisiológico y con buen rendimiento.

MATERIALES Y METODOS

A) Aislamiento de protoplastos

1.- Selección del material: Para el aislamiento de protoplastos de hoja se usaron plantas de tomate (Lycopersicon esculentum, var, homestead 24, PRONASE) de 8 a 12 semanas de edad, - crecidas en el laboratorio. Las hojas utilizadas fueron hojas - grandes bien desarrolladas y de posición intermedia en la planta. Se les quitó la cutícula inferior (fig. 1) con unas pinzas de - disección, con el fin de facilitar la acción de las enzimas sobre las paredes de las células.

En el aislamiento de protoplastos a partir de frutos - se utilizaron las mismas plantas y en las mismas condiciones de crecimiento. Se tomaron frutos inmaduros de aproximadamente tres centímetros de diámetro, los cuáles fueron pelados con un bisturí y se cortaron en rebanadas delgadas para colocarse en el medio enzimático.

2.- Esterilización del material: La esterilización del material se hizo primero tratando el tejido con alcohol al 70 % durante 30 segundos para eliminar grasas del tejido. Se enjuagó el material con agua destilada estéril y se esterilizó durante - 15 minutos en una solución de Hipoclorito de calcio al 0.8 %, - que contenía además detergente Extran líquido (Merck) al 1.0 %. Enseguida se enjuaga el material tres veces con agua destilada - estéril.

3.- Selección de los agentes estabilizantes: Se utilizó Manitol (Merck y Sigma). El procedimiento utilizado para determinar la concentración óptima del medio plasmolítico es el siguiente:

se pesan los pedazos de los tejidos que se van a utilizar y se incuban en varias cajas Petri, cada una con diferente concentración del medio plasmolítico, durante 1 ó 2 horas. Se sacan los pedazos del tejido del medio plasmolítico, se seca el exceso de líquido con papel filtro y se pesan. Enseguida se hace una comparación entre el porcentaje de ganancia ó pérdida de peso contra la concentración del medio plasmolítico (Gráficas 1 y 2).

4.- Enzimas y componentes del medio enzimático: Para el aislamiento de protoplastos de hoja se utilizaron celulasa Onozuka R-10 (Kink Yakult Co.) (pág. 32) al 1.0 % y pectinasa Macerocima R-10 (Kink Yakult Co.) (pág. 33) al 0.5 %, mientras que para obtener protoplastos de fruto se utilizaron también celulasa Onozuka R-10 al 1.0 % y pectinasa Macerocima R-10 al 0.1 %.

Se utilizó también Sulfato de Dextrana y potasio (Meito Sangyo Co.) al 0.03 % con el objeto de aumentar el rendimiento. El Sulfato de Dextrana y potasio se sabe que es un inhibidor de las nucleasas (27), las cuáles pueden dañar a los protoplastos.

Debido a que se tenían problemas de contaminación se usaron antibióticos en el medio enzimático. Los antibióticos usados fueron: Penicilina G-sódica (Lakeside) de 5 000 000 U., 80 µg/ml para controlar la contaminación bacteriana y Micostatin (Squibb) de 2 400 000 U., 50 µg/ml para controlar el crecimiento

de hongos. Las concentraciones usadas son las que recomiendan -
Watts y King (103).

La composición de las soluciones enzimáticas utiliza--
das se encuentran en la Tabla I (pág. 71).

5.- pH del medio enzimático: Tanto la celulasa Onozuka R-10 como la pectinasa Macerocima R-10 tienen una actividad máxima en un rango de pH entre 4.0 y 6.0, pero Schenk e Hildebrandt (24) demostraron que a un pH menor de 5.0 el rendimiento de protoplastos se reduce enormemente, por lo que se utilizó un pH de 5.7 (73).

6.- Temperatura de incubación del medio enzimático: Se utilizó temperatura ambiente en un rango de 20 a 24^o C.

7.- Tiempo de incubación del medio enzimático: Fijadas las condiciones anteriores, se trató de encontrar el tiempo óptimo de incubación de la solución enzimática. Después de una hora y media de incubación se tomaron muestras homogéneas a interva--
los de media hora, se colocaron en un hematómetro (Clay Adams) y se contaron al observarse al Microscopio. La cantidad relativa -
de protoplastos a los diferentes tiempos se muestra en la Tabla IV.

8.- Purificación de la suspensión de protoplastos: La eliminación de enzimas después del aislamiento de los protoplas-
tos es sumamente importante debido a que pueden afectar la capa-

Tabla I. - Composición de las soluciones enzimáticas utilizadas para el aislamiento de protoplastos de hoja de fruto de tomate (Lycopersicon esculentum).

Componentes	Tejidos	
	Hoja	Fruto
Manitol	8.0 %	6.0 %
Celulosa Onozuka R-10	1.0 %	1.0 %
Pectinasa Macerocima R-10	0.5 %	0.1 %
Sulfato de Dextrana y Potasio	0.03 %	0.03 %
Penicilina*	80 µg/ml	80 µg/ml
Micostatin**	50 µg/ml	50 µg/ml
pH ajustado a 5.7 con NaOH 0.1 N. y esterilizado en Millipore - 0.22 µ.		
*Penicilina G-sódica (Lakeside) de 5 000 000 U.		
**Micostatina (Squibb) de 2 400 000 U.		

cidad de regeneración de la pared y la división celular.

Después de la maceración, los restos celulares muy grandes son extraídos de la solución enzimática con pinzas de disección, la solución restante es centrifugada a 400 rpm durante cinco minutos. Una vez que los protoplastos sedimentan se extrae el sobrenadante con una pipeta Pasteur cuidando de no hacer movimientos bruscos que puedan dañarlos, se llena nuevamente el tubo de centrífuga con el medio de cultivo, se mueve suavemente para que la pastilla formada por protoplastos se resuspenda y se vuelve a centrifugar a 400 rpm durante 5 minutos.

Se probaron tres maneras de purificar la suspensión:

i) Power y Cocking (86) purificaron una suspensión de protoplastos aislados de fruto de tomate al suspenderlos en sacarosa al 20 %, el procedimiento es el siguiente:

El tubo de centrífuga conteniendo la pastilla de protoplastos se llena con una solución de sacarosa al 20 % y se vuelve a centrifugar a 400 rpm durante cinco minutos. Los protoplastos quedan flotando en la superficie y los restos celulares sedimentan.

ii) Chupeau y Morel (17) purificaron una suspensión de protoplastos aislados de tejido de tabaco (Nicotiana tabacum) no diferenciado usando un gradiente de sacarosa de la siguiente manera:

La suspensión de protoplastos se coloca en un gradiente de sacarosa de 15 a 20 % y se centrifuga a 400 rpm durante cinco minutos.

iii) El procedimiento de purificación de la suspensión de protoplastos que dió mejores resultados fué lavando la suspen---

si3n de protoplastos con el medio de cultivo. La t3cnica usada - es la siguiente:

La suspensi3n de protoplastos se filtra a trav3s de gasa y se deja reposar unos minutos para que sedimenten los protoplastos, cuando sedimentan completamente se extrae la soluci3n - enzimática usando una pipeta cuidando de no hacer burbujas. Se - agrega un volumen de medio de cultivo equivalente al volumen usa - do para la digesti3n enzimática, se agita ligeramente para elimi - nar las enzimas que hayan quedado, los protoplastos sedimentan y los restos celulares flotan, este proceso se repite dos veces - m3s para eliminar las enzimas, cuya presencia puede afectar la viabilidad de los protoplastos.

9.- Viabilidad de los protoplastos: La viabilidad se - prob3 por medio de colorantes vitales: Rojo de Metilo y Azul de Tripano (Sigma).

La soluci3n de los colorantes se prepar3 al 0.5 % en una soluci3n salina al 0.65 % que consta de:

NaCl	6.5 g.
K HPO _{2 4}	2.8 g.
KH PO _{2 4}	0.4 g.
Aforados al 1 000 ml. de agua destilada	

El procedimiento utilizado para conocer la viabilidad de los protoplastos es el siguiente:

Se toma una muestra homog3nea de la suspensi3n y se co - loca en una proporci3n de 4 partes del colorante por una parte -

de la suspensión, después de cinco minutos el colorante reacciona, se toma una alícuota que se coloca en el hematómetro donde se cuentan los protoplastos viables. El rojo de Metilo reacciona en las vacuolas midiendo la acción proteolítica y el azul de Tripano es oxidado en la mitocondria por el citocromo C.

B) Cultivo de protoplastos

1.- Medios de cultivo: Los medios de cultivo utilizados fueron:

- a) Medio MS, desarrollado por Murashige y Skoog (71)
- b) Medio TMS¹, es un medio MS, modificado por Nagata y Takebe (73).
- c) Medio TMS², es el mismo que el anterior, pero con las hormonas del MS en concentración diferente.

La composición exacta de los medios de cultivo se muestra en la Tabla II (páginas 75 y 76).

2.- Técnicas de cultivo: Se probaron las siguientes técnicas:

- a) Medio líquido
- b) Medio sólido
- c) Cultivo nodriza en medio sólido

a) Medio líquido: Para probar el medio líquido se toma una alícuota de la suspensión de protoplastos dependiendo de la

Tabla II. - Composición de los medios utilizados para el cultivo de protoplastos aislados de hoja de tomate (Lycopersicon esculentum).

Sales Minerales	MS 1)	TMS 2)	TMS 3)
	(mg/1)	(mg/1)	(mg/1)
NH ₄ NO ₃	1 650.00	825.00	825.00
KNO ₃	1 900.00	950.00	950.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.00	220.00	220.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.00	1 233.00	1 233.00
KH ₂ PO ₄	170.00	680.00	680.00
Na ₂ -EDTA	37.34	37.34	37.34
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.84	27.84	27.84
H ₃ BO ₃	6.20	6.20	6.20
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.30	22.30	22.30
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.60	8.60	8.60
KI	0.83	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	- - -	- - -
CoSO ₄ ·7H ₂ O	- - - -	0.030	0.030
Agente plasmolítico			
Manitol	80 000	80 000	80 000

Componentes orgánicos	MS ¹⁾ (mg/l)	TMS ²⁾ 1 (mg/l)	TMS ³⁾ 2 (mg/l)
Sacarosa	30 000.0	10 000.0	10 000.0
mio-inositol	100.0	100.0	100.0
tiamina-HCl	0.1	1.0	1.0
piridoxaldehido	0.5	- - -	- - -
ácido nicotínico	0.5	- - -	- - -
glicina	2.0	- - -	- - -
Hormonas vegetales			
2,4-D (2,4-Diclorofenoxiacé- tico)	1.0	- - -	0.5
cinetina (furfurilaminopurina)	0.5	- - -	0.1
NAA (ácido Naftalenacético)	- - -	3.0	- - -
6-BAP (6-Bencilaminopurina)	- - -	1.0	- - -

pH ajustado a 5.7 con NaOH 0.1 N y esterilizados en autoclave a 15 lbs. de presión durante 15 minutos.

1) Murashige y Skoog (71)

2) Nagata y Takebe (73)

3) Modificación del TMS₁ (ver pág. 74).

concentración deseada, se lleva a 10 ml. y se coloca en una caja Petri de plástico de 3 cm. de diámetro.

b) Medio sólido: El medio de cultivo sólido se probó en varias concentraciones de agar (Bactoagar DIFCO). Para obtener las concentraciones deseadas de agar se esterilizan los medios de cultivo con 1.2 % de agar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Del medio de cultivo con agar todavía caliente se toman alícuotas y se mezclan perfectamente con el medio de cultivo líquido para obtener las concentraciones deseadas (Tabla III).

c) Cultivo nodriza en medio sólido: Es el mismo procedimiento usado para el medio de cultivo sólido con las concentraciones de 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 % de agar solo que, después de plaquear los protoplastos se coloca un callo de hoja de tomate (52) (fotografía 7).

3.- Concentración ó densidad celular de la suspensión de protoplastos. Para conocer este parámetro se toma una alícuota homogénea de los protoplastos aislados y se cuenta en un hematómetro, obteniéndose alrededor de $10 \frac{6}{\text{pps/ml}}$.

La técnica de plaqueo de las colonias es la siguiente: Se hacen las diluciones correspondientes para obtener la concentración de protoplastos deseada, se toma un mililitro de estas muestras y se coloca sobre el agar, enseguida se coloca el callo de hoja de tomate y se procede a cerrar la caja Petri con Para--

Tabla III.- Concentraciones de agar (Bactoagar DIFCO) de los medios de cultivo para el desarrollo de los protoplastos aislados de hoja de tomate (Lycopersicon esculentum).

1) Concentración de agar en las cajas Petri (%)	2) Medio de cultivo con agar al 1.2% (ml)	3) Medio de cultivo líquido (ml)	Volumen final (ml)
1.2	10.0	0.0	10.0
1.0	8.3	1.7	10.0
0.8	6.6	3.4	10.0
0.6	5.0	5.0	10.0

1) Para lograr las concentraciones deseadas, se toman alícuotas del medio de cultivo con agar al 1.2%.

2) Se mezclan perfectamente con el medio de cultivo líquido.

3) Los medios de cultivo probados son MS, TMS₁ y TMS₂.

film.

4.- Condiciones de luz: Después de que los protoplas--
tos son incubados en cajas Petri con el medio de cultivo utili--
zando la técnica de cultivo nodriza, en medio líquido ó sólido,
se probaron las condiciones de luz apropiadas para su cultivo:

- a) Luz constante
- b) Fotoperíodo
- c) Oscuridad

a) Luz constante: En una incubadora Ambi.Lo (Lab Line)
mantenida a 27^o C iluminada con lámparas fluorescentes (Sylva---
nia) de 32 watts, se colocan las cajas Petri conteniendo la sus-
pensión de protoplastos.

b) Fotoperíodo: La suspensión de protoplastos se colo-
caron en cámaras de crecimiento Imperial II (Lab Line) con perío-
dos de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad a 27^o C.

c) Oscuridad: La suspensión de protoplastos se incuba
en la oscuridad y a temperatura ambiente.



QUÍMICA

RESULTADOS

A) Aislamiento de protoplastos

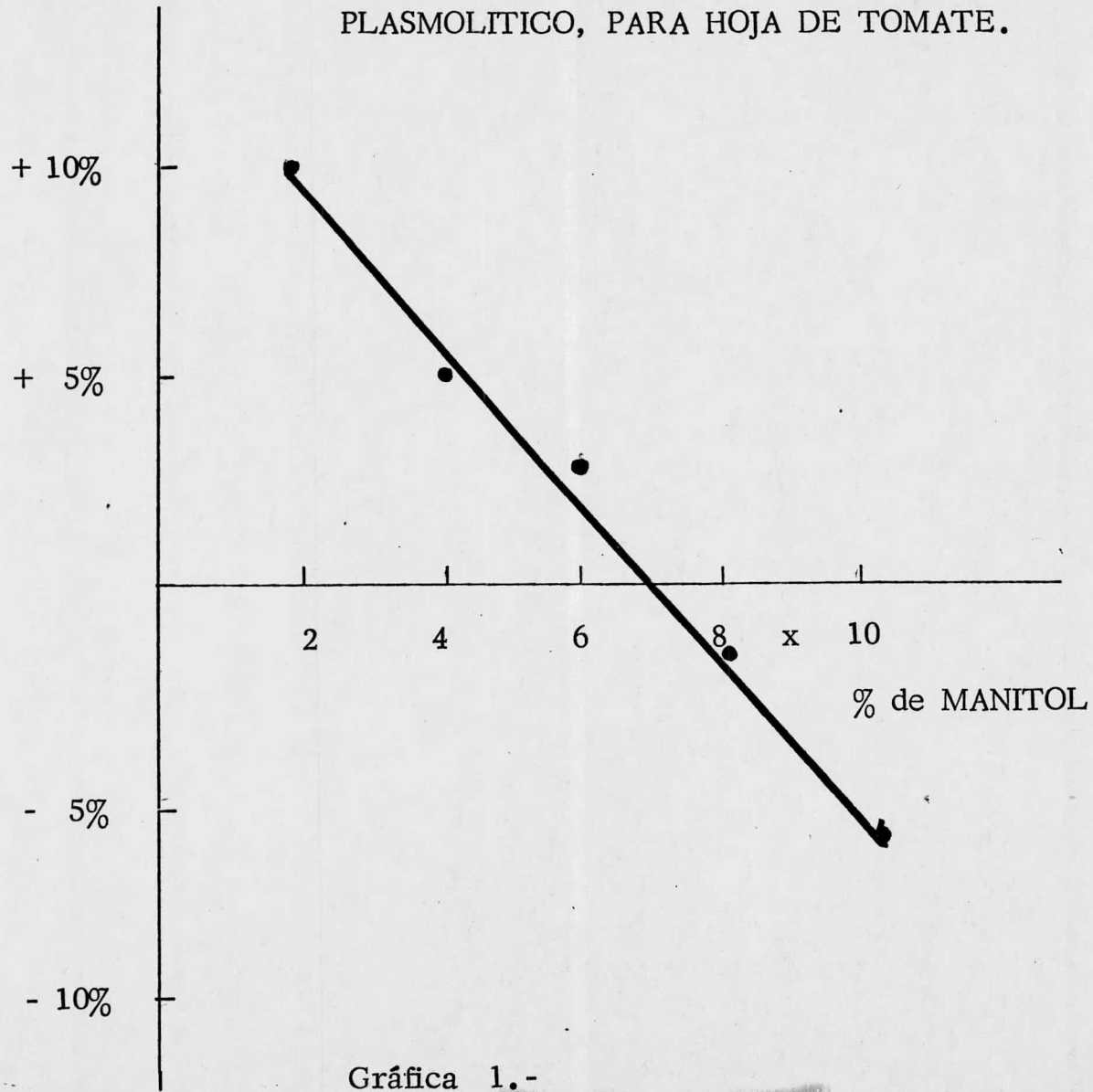
El procedimiento de selección de material mostró ser eficaz en la obtención de protoplastos completamente viables. Se siguieron las recomendaciones de Pojnar, Willison y Cocking (85) de no usar plantas que han sido regadas un día anterior al aislamiento, debido a que dan lugar a protoplastos inestables.

En la selección de los agentes estabilizantes se eligió manitol para la preparación del medio plasmolítico, tanto para los protoplastos de hoja como los de fruto. Se hizo la determinación de la osmolaridad necesaria para ambas partes de la planta utilizando el método descrito en la pág. 69. Los resultados obtenidos se encuentran en las gráficas 1 y 2 (páginas 81 y 82). Como se observa de estos resultados, ambos tejidos requieren una osmolaridad diferente, en el caso de la hoja de 6.8 % y 5.0 % en el caso del fruto. Sin embargo es conveniente utilizar una solución osmótica que plasmolice ligeramente al tejido (Dr. Guillermo Carrillo, comunicación personal), esto es porque cuando ocurre la plasmolisis, el protoplasto se encuentra separado de la pared celular y se facilita el trabajo de las enzimas para digerir la pared. Por esta razón en todas las determinaciones subsecuentes se utilizó una unidad mayor de osmolaridad de la determinada en el experimento.

Habiendo determinado este factor que es de suma importancia para la obtención de protoplastos se intentó el aislamiento

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE
PLASMOLITICO, PARA HOJA DE TOMATE.

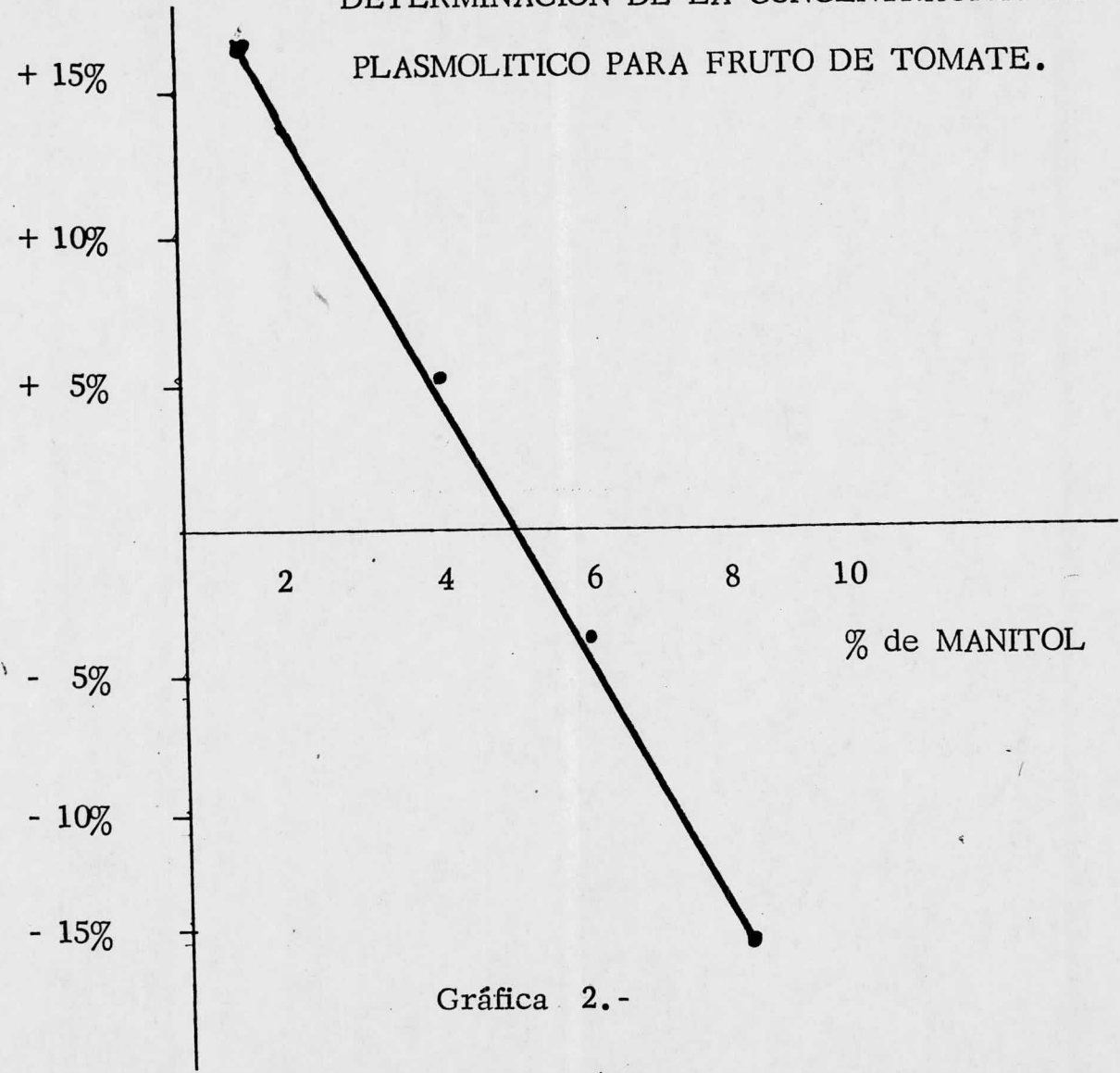
PORCIENTO DEL AUMENTO O DE LA PERDIDA
DE PESO



Gráfica 1.-

PORCIENTO DEL AUMENTO O DE LA PERDIDA
DE PESO

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE
PLASMOLITICO PARA FRUTO DE TOMATE.



Gráfica 2.-

to de protoplastos a partir de hoja y fruto de tomate. Era importante saber cuál de estos dos tejidos resultaba más adecuado para la obtención de protoplastos.

Se incubaron separadamente fragmentos de hoja a los -
cuáles se les había quitado la cutícula inferior, y rebanadas -
delgadas de fruto de tomate en la solución enzimática utilizada
para cada uno de los tejidos (Tabla I). La solución enzimática -
empleada para el aislamiento de protoplastos de fruto no propor-
cionó buen rendimiento, en cambio la utilizada para obtener pro-
toplastos de la hoja, produjo una cantidad de protoplastos del -
orden de 10^6 pps/ml. En las fotografías 1 y 2 se encuentran las
preparaciones de protoplastos de hoja y fruto respectivamente.

Se trató de aislar protoplastos de fruto utilizando -
únicamente pectinasa Macerocima, ya que se sabe que las paredes
celulares de los frutos de Solanáceas están formadas en su mayor
parte por pectinas (89). Gregory y Cocking (43) y Raj y Herr -
(89) habían obtenido protoplastos de fruto de tomate usando pec-
tinasa solamente, sin embargo no se logró obtenerlos, por lo que
se agregó celulasa a la solución enzimática (104). El rendimien-
to de los protoplastos aislados de fruto fué muy pequeño en com-
paración con los obtenidos de hoja.

De los resultados de la Tabla IV se encontró que el -
tiempo mínimo de incubación del tejido en la solución enzimática
es de 3:30 horas. Se examinó hasta 14 horas encontrándose que a
todos los tiempos probados se obtuvieron protoplastos en condi-
ciones aparentemente buenas. Aún cuando el rendimiento obtenido
a 14 horas es mayor, es mejor utilizar el tiempo mínimo para evi

Tabla IV.- Tiempo de incubación del tejido en el medio enzimático.

Tiempo (horas)	Medio MS*	Medio TMS*
1:30	+	+
3:00	+	+
3:30	+++	++
4:00	+++	++
4:30	+++	++
5:00	+++	++
5:30	+++	++
14:00	++++	+++

+ = Cantidad relativa de protoplastos aislados

* = El tejido fué incubado en una solución enzimática compuesta por manitol al 6%, celulosa al 1%, pectinasa al 0.1 % en medio de cultivo: MS (71) y TMS₁ (73).

tar un contacto prolongado con las enzimas, las cuales pueden dañarlos al alterar la permeabilidad y hacerlos osmóticamente inestables.

De los procedimientos utilizados para la purificación de la suspensión de protoplastos, se tienen los siguientes resultados:

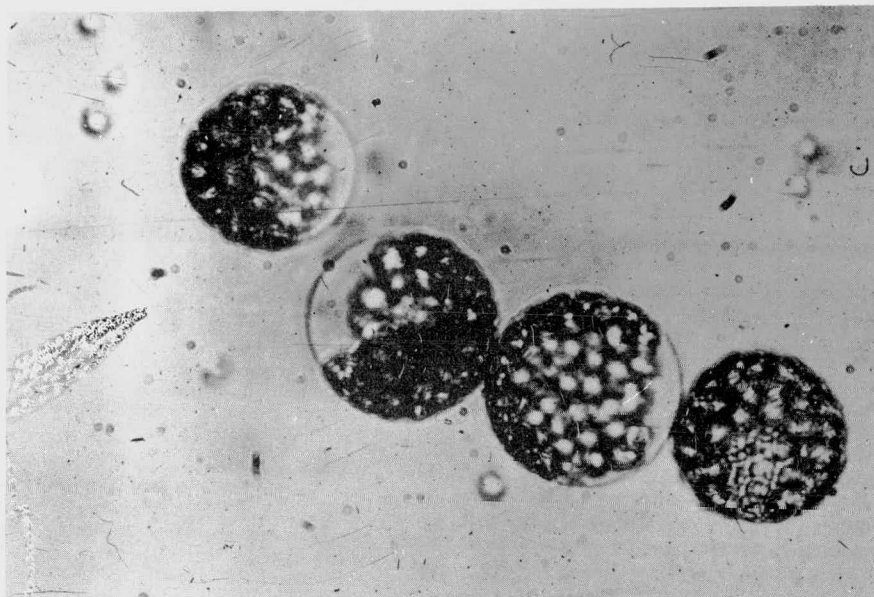
a) Flotación en sacarosa: Los protoplastos aislados de hoja y fruto de tomate no flotaron en sacarosa al 20 %. Se hicieron pruebas con sacarosa desde 14 hasta 25 % sin lograrse resultados positivos. Estos protoplastos son poco vacuolados y posiblemente por esta razón no floten en sacarosa.

b) Gradiente de sacarosa: Al colocarse suspensiones concentradas de protoplastos en gradientes de 15 a 50 % no se pudieron purificar debido a que los protoplastos de fruto tenían diferente tamaño y peso, encontrándose éstos a lo largo del gradiente y encontrándose también muchos protoplastos rotos ó deformes debido a la presión de la solución.

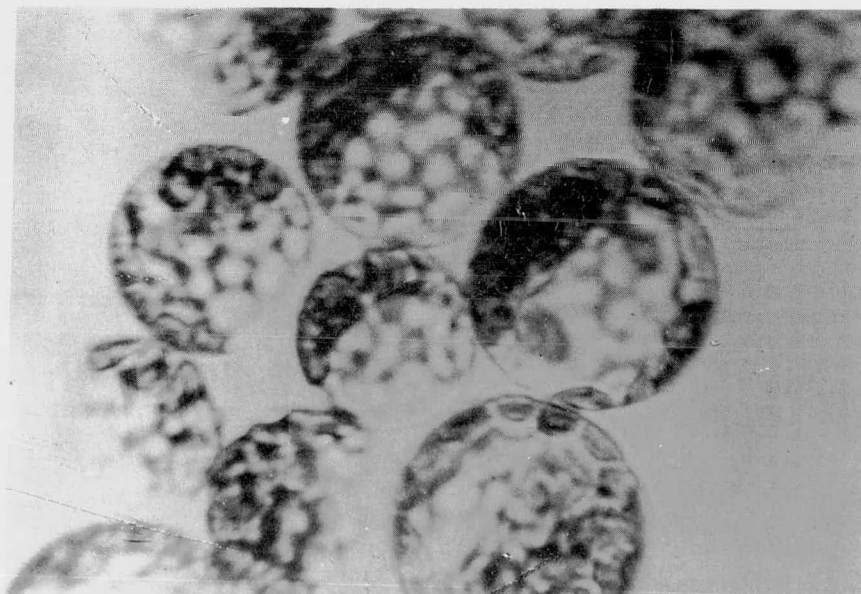
c) El rendimiento obtenido por el procedimiento de lavarlos con el medio de cultivo solamente, fué de 10^6 pps/ml libres de enzimas y restos celulares.

Es importante la eliminación de las enzimas, para que los protoplastos puedan regenerar la pared celular, además de que algunas impurezas de las enzimas puedan dañarlos afectando la permeabilidad del plasmalema (24) ó la ciclosis (104).

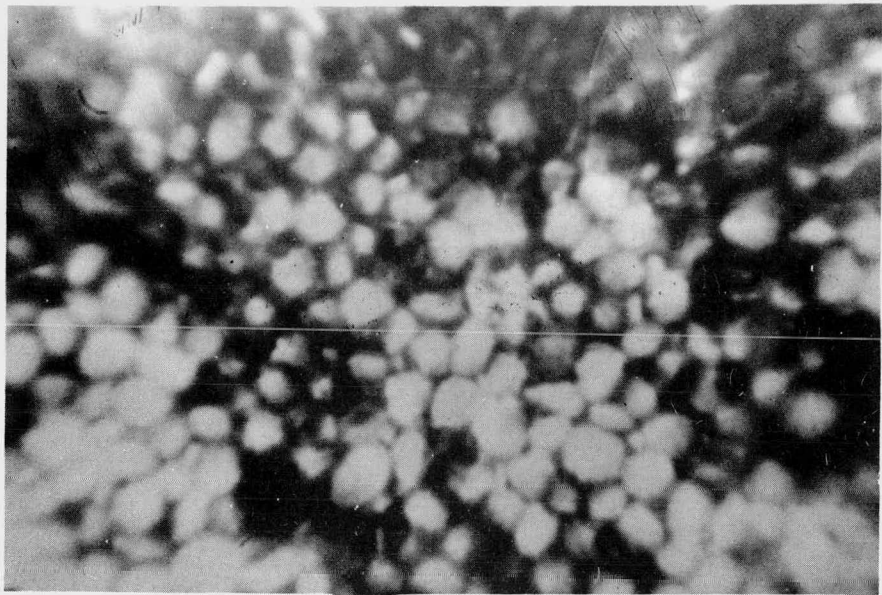
Se determinó la viabilidad de los protoplastos utilizando colorantes vitales, obteniéndose una viabilidad del 80 a 90 % .



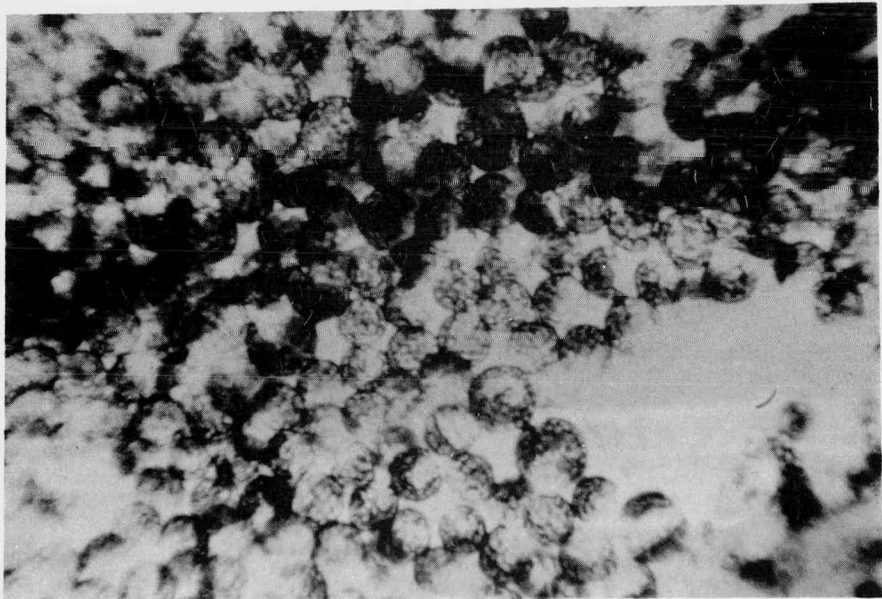
Fotografía 1.- Suspensión de protoplastos aislados de fruto de tomate (Lycopersicon esculentum, var. homestead 24)



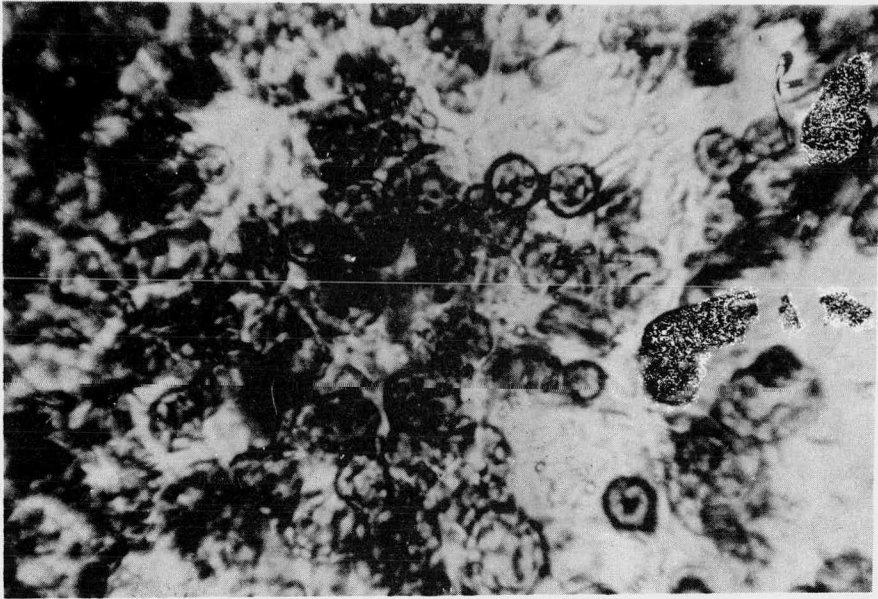
Fotografía 2.- Suspensión de protoplastos aislados de hoja de tomate (Lycopersicon esculentum, var. homestead 24)



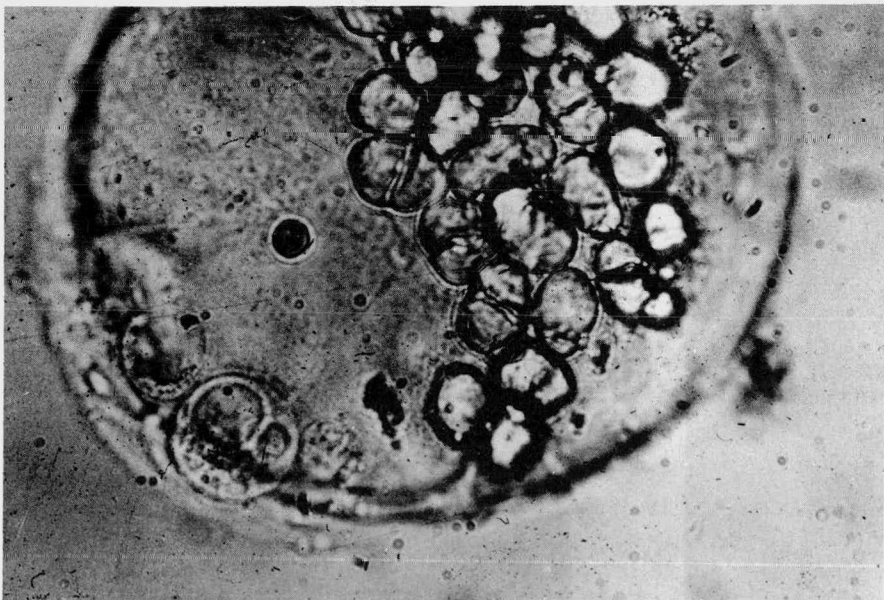
Fotografía 3.- Enseguida se muestra una secuencia del aislamiento de protoplastos a partir de hoja. En esta foto se observa el tejido intacto antes de la plasmolisis.



Fotografía 4.- Después de media hora se observan las células plasmolizadas y algunos lugares vacíos debido a la acción de las enzimas.



Fotografía 5.- Después de tres horas de digestión enzimática, la epidermis superior es visible. También se observan algunas células que todavía no han sido extraídas.



Fotografía 6.- Célula de fruto de tomate durante el aislamiento, donde se observan fragmentos de la pared celular.

B) Cultivo de los protoplastos aislados de hoja de tomate (Lycopersicon esculentum).

Los protoplastos que se utilizaron para cultivarse fueron los aislados de hoja, debido a que se obtienen mejores rendimientos y son más fáciles de manejar.

Los medios de cultivo utilizados (MS, TMS₁ y TMS₂) — dieron resultados similares, no se observaron diferencias significativas.

Al incubarse los protoplastos en luz y oscuridad, no se observaron diferencias significativas, ya que en ambos casos hubo división celular.

Alrededor de los tres días de cultivo se observó que los protoplastos perdieron su forma esférica (fotografías 8 y 9) lo cual quiere decir que los protoplastos estaban regenerando la pared celular y, durante los primeros seis días se observaron las primeras divisiones celulares (fotografía 9).

Utilizando el medio de cultivo en forma líquida no se obtuvieron resultados positivos, mientras que el medio de cultivo en forma sólida si dió resultados.

Al probarse tres concentraciones diferentes de protoplastos en el cultivo en forma sólida y en cultivo nodriza se tuvieron los siguientes resultados: Al utilizarse el medio de cultivo en forma sólida se observó que en las dos primeras concentraciones no hubo división celular, solo cuando se utilizó una concentración de 10^6 pps/ml. (Tabla V), lo cual quiere decir que la densidad celular es un factor muy importante para la división

TABLA V

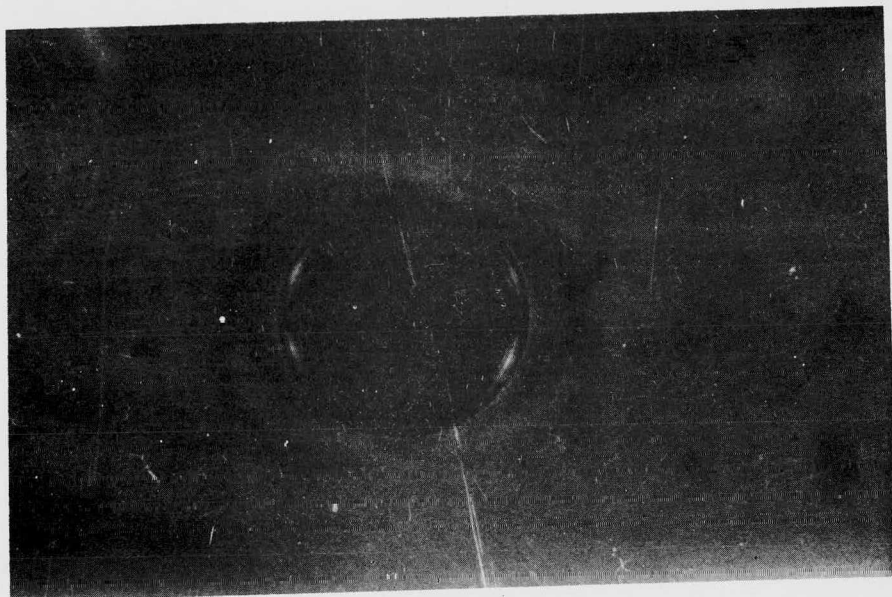
CULTIVO DE PROTOPLASTOS AISLADOS DE HOJA DE TOMATE

(Lycopersicon esculentum)

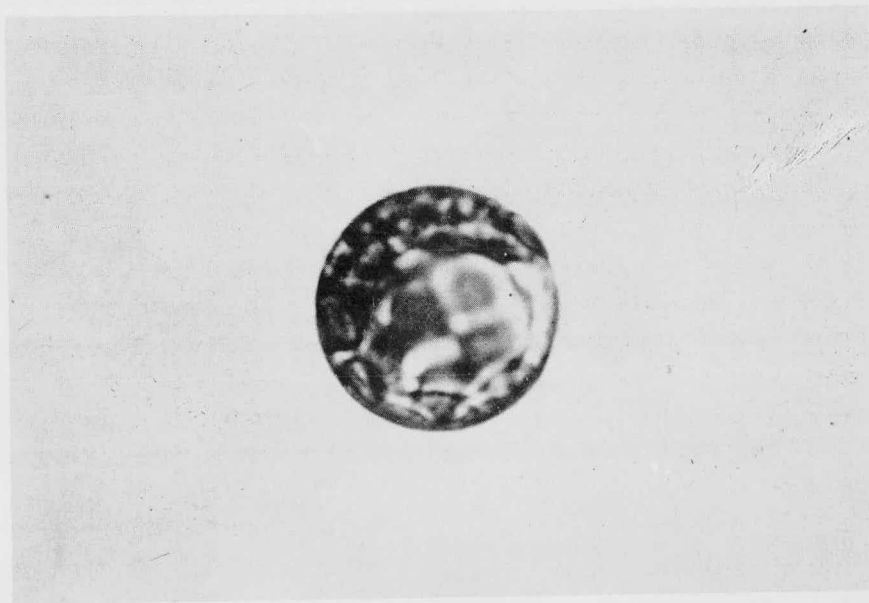
	Concn. de células x ml	Medio de cultivo**	División celular
Plaqueo en agar*	4	TMS ₁ , TMS ₂ , MS	-
	10		
	5		
	10	" " "	-
	6	TMS ₁	+
10			
Plaqueo en cultivo nodriza, en medio solido*	4	TMS ₁ , TMS ₂ , MS	+
	10		
	5		
	10	" " "	+
	6	"	"
10	" " "		

* La concentración de agar fue de 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2%

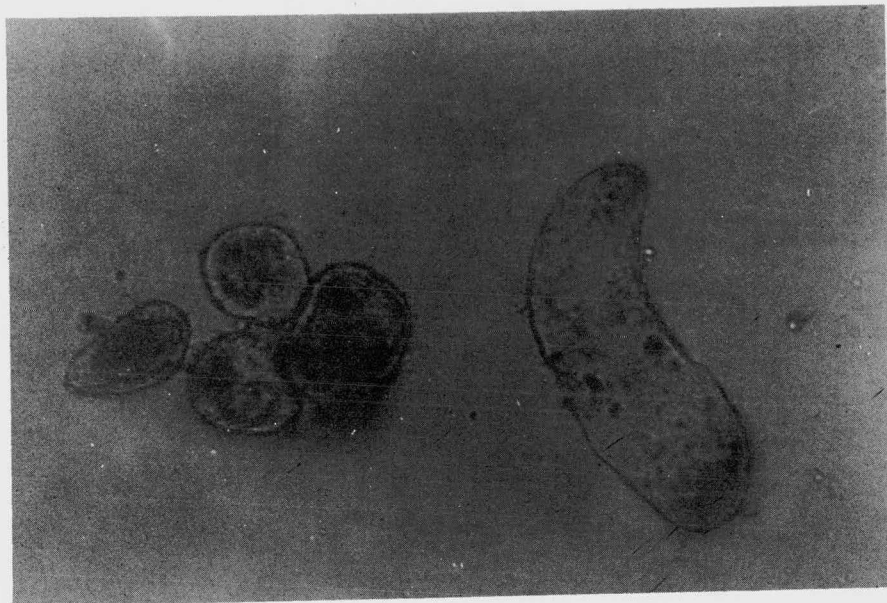
** Medios de cultivo: MS: Murashige y Skoog; TMS: Nagata y Takebe



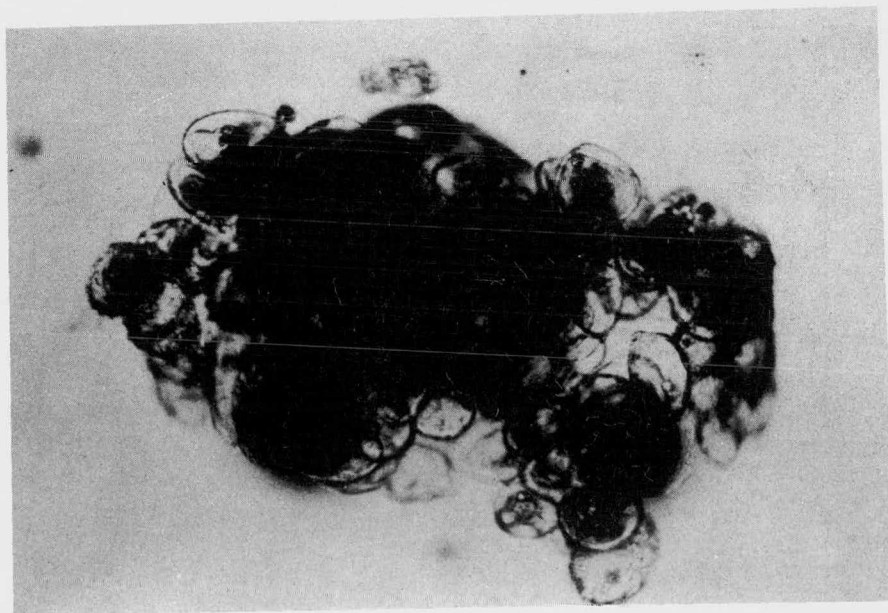
Fotografía 7.- Técnica de cultivo nodriza. En la caja Petri conteniendo el medio de cultivo en estado sólido, se le agrega un pedazo de callo de hoja de tomate después del plaqueo de los protoplastos.



Fotografía 8.- Aquí se puede observar la forma esférica regular característica de los protoplastos aislados.



Fotografía 9.- Un protoplasto durante la división celular, también se observan algunos protoplastos que ya han regenerado su pared celular.



Fotografía 10.- Una colonia de protoplastos aislados de hoja de tomate después de dos semanas de incubación.

celular. En la otra serie de experimentos, en los cuáles se utilizó la técnica de cultivo nodriza (fotografía 7) se observa que cuando se plaquearon las tres concentraciones se tuvieron resultados positivos, lo que sugiere que el callo pudo influir en la división celular.

Las primeras divisiones se observan seis días después del aislamiento (fotografía 9) y al cabo de dos semanas se observa la formación de colonias (fotografía 10), la cuál no se pudo mantener más de tres semanas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos para el aislamiento de protoplastos a partir de hoja y fruto de tomate, la hoja resultó más apropiada, la cuál fué una buena fuente de protoplastos viables.

Debido a que no se pudo mantener una esterilización eficaz en el proceso se usaron antibióticos, los cuales no afectaron aparentemente a los protoplastos ni su división.

La concentración de manitol empleada fué adecuada para estabilizar a los protoplastos durante su aislamiento.

Las concentraciones de enzimas utilizadas produjeron un buen rendimiento (10⁶ pps/ml) de protoplastos de hoja, pero en el caso del fruto los rendimientos fueron muy bajos. Raj y Herr (89') al tratar de aislar protoplastos de fruto de tomate, encontró que las pectinesterasas comerciales y las que se encuen

tran en el fruto no degradan las paredes celulares, solo las poligalacturonasas comerciales liberan protoplastos pero solo de los tejidos interplacentales en ovarios de 1 a 2 semanas. Así -- que sería conveniente un estudio más profundo para lograr aislar protoplastos de fruto en gran cantidad.

Respecto al tiempo de incubación, es conveniente utilizar el tiempo más corto para evitar daños a los protoplastos, y el tiempo más corto resultó 3:30 horas.

El procedimiento de purificación de la suspensión resulto muy eficiente para eliminar enzimas, restos celulares y otras posibles impurezas.

El criterio de viabilidad (colorantes vitales) fué concluyente al observarse la regeneración de la pared y la división celular.

Las condiciones de cultivo más importantes que se observaron fueron:

- 1) La densidad celular
- 2) La técnica de cultivo

A pesar de que se ha reportado que la luz es un factor muy importante para la división celular (26,32,61,73), en esta investigación se encontró que tanto en la oscuridad como en presencia de luz se llevó a cabo la división celular.

1) Un parámetro muy importante para la división celular fué la densidad celular. En el caso de protoplastos aislados de hoja de tomate, la división celular se observó solamente cuando se usó una densidad celular alta (10^6 pps/ml) como se observa

en la Tabla V. Takebe y Nagata (99) encontraron que la división celular de protoplastos aislados de hoja de tabaco (Nicotiana tabacum) es mayor a densidades celulares altas y, cuando la densidad es muy baja no ocurre la división celular.

2) Al compararse las tres técnicas de cultivo empleadas se observó que con el medio de cultivo líquido no se obtuvieron resultados positivos y solo hubo división celular usando el medio de cultivo en forma sólida y en cultivo nodriza en medio sólido. Davey y Short (30) reportaron que el medio de cultivo sólido estimula la regeneración de la pared celular de protoplastos aislados de hojas de legumbres.

La técnica de cultivo nodriza (94) en medio sólido dió mejores resultados, encontrándose la división celular en las tres concentraciones utilizadas. La diferencia entre el cultivo nodriza y el medio sólido es la adición de un callo de hoja de tomate, lo cuál sugiere la posibilidad de que el callo proporcione al medio de cultivo alguna sustancia que estimule la división celular, posiblemente esta sustancia sea una citocinina. Brett y Northcote (7) proponen que cuando las concentraciones celulares no son adecuadas, los protoplastos no sintetizan suficiente citocinina endógena para iniciar la división de protoplastos que han logrado regenerar la pared celular.

La división celular no fué mantenida durante más de tres semanas debido probablemente a la falta de renovación del medio de cultivo. Kao y col. (55) recomiendan renovar el medio de cultivo periódicamente debido a que los nutrientes se pueden agotar ó que las sustancias excretadas por los protoplastos sean

tóxicas e inhiban la división celular. Nagata y Takebe (73) después de obtener colonias a partir de protoplastos aislados de mesofilo de hoja de tabaco, cambiaron el medio de cultivo para lograr mantener la división celular.

Se concluye que el procedimiento que se empleó para el aislamiento y purificación de protoplastos de hoja y fruto de tomate (Lycopersicon esculentum) mostró ser eficaz al obtenerse una viabilidad de 80 a 90 % y, que estos protoplastos después de regenerar la pared celular solo dividen si la concentración celular es alta (10⁶ pps/ml) ó utilizando la técnica de cultivo no--driza (94) en medio sólido.

Los protoplastos aislados por este procedimiento y en estas condiciones de cultivo pueden ser utilizados para estudios de Biología Molecular, Fisiología Vegetal, Genética ó Virología.

B I B L I O G R A F I A

- 0.- Albersheim, P. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:15-26
- 1.- Aoki, S. & Takebe, I. 1969 Virology 39:439-448
- 2.- Bajaj, Y.P.S. 1974 Plant Sci. Lett. 3(2):93-99
- 3.- Benbadis, A. & Baumann, F. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:
429-435
- 4.- Birecka, H. & Miller, A. 1974 Plant Physiol. 53(4):569-574
- 5.- Boffey, S.A. & Northcote, D.H. 1975 Biochem. J. 150(3):433-440
- 6.- Bourgin, J.P.; Chupeau, Y. et Morel, G. 1972 C.R. Acad. Sci. Pa
ris 274:3545-3548
- 7.- Brett, C.T. & Northcote, D.H. 1975 Biochem. J. 148(1):107-117
- 8.- Bright, S.W.J. & Northcote, D.H. 1974 J. Cell Sci. 16(2):445-
463
- 9.- Bui Dang Ha, D. & Mackenzie, J.A. 1972 Protoplasma 76:110-113
- 10.- Bui Dang Ha, D. & Mackenzie, J.A. 1973 Protoplasma 78:215-221
- 11.- Bui Dang Ha, D.; Norreel, B. & Masset, A. 1975 J. Exp. Bot. 26
(91):263-269
- 12.- Burgess, J.; Motoyoshi, F. & Fleming, E.N. 1973 Planta 112:323
-332
- 13.- Burgess, J. & Fleming, E.N. 1974 J. Cell Sci. 44(2):439-449
- 14.- Carlson, P.S. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:497-505
- 15.- Carlson, P.S. 1973 Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 70:598-602
- 16.- Chayen, J. 1952 Nature 170:1070-1072
- 17.- Chupeau, Y. et Morel, G. 1970 C.R. Acad. Sci. Ser D 270:2659-
2662

- 18.- Chupeau, Y.; Bourgin, J.P.; Missonier, C. et Marcel, G. 1973
Bull. Soc. Bot. fr. 120:175-188
- 19.- Chupeau, Y.; Bourgin, J.P.; Missonier, C.; Dorion, N. et Morel,
G. 1974 C.R. Acad. Sci. Paris 278:1565-1568
- 20.- Cocking, E.C. 1960 Nature 187:927
- 21.- Cocking, E.C. & Pojnar, E. 1969 J. Gen. Virol. 4:305-312
- 22.- Cocking, E.C. 1970 Int. Rev. Cytol. 28:89-124
- 23.- Cocking, E.C. 1971 Colloq. Inter. C.N.R.S. 193:303-317
- 24.- Cocking, E.C. 1972 Ann. Rev. Plant Physiol. 23:29-50
- 25.- Condeelis, J.S. 1974 Exp. Cell Res. 88(2):435-438
- 26.- Constabel, F.; Kirckpatrick, J.W. & Gamborg, O.L. 1973 Can. J.
Biol. 51:2105-2107
- 27.- Constabel, F. & Kao, K.N. 1974 Can. J. Bot. 52(7):1603-1606
- 28.- Coutts, R.H.A. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:353-365
- 29.- Coutts, R.H.A.; Cocking, E. C. & Kassanis, B. 1972 J. Gen.
Virol. 17(3):289-294
- 30.- Davey, M.R. & Short, K.C. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:
437-453
- 31.- Davey, M.R.; Bush, E. & Power, J.B. 1974 Plant Sci. Lett. 3(2):
127-133
- 32.- Davey, M.R.; Frearson, E. M.; Withers, L.A. & Power, J.B. 1974
Plant Sci. Lett. 2(1): 23-27
- 33.- Davey, M.R. & Power, J.B. 1975 Plant Sci. Lett. 5(4) 269-274
- 34.- Dorion, N.; Chupeau, Y. et Bourgin, J.P. 1975 Plant Sci. Lett.
5(5):325-331
- 35.- Evans, P.K. & Cocking, E.C. 1973 pp. 100-120 ed. H. Street,
Oxford. Blackwell's Botanical monographs

- 36.- Fowke, L.C.; Rennie, P.J. ; Kirckpatrick, J.W. & Constabel F.
1975 Can. J. Bot. 53(3): 272-278
- 37.- Frearson, E.M.; Power, J.B. & Cocking, E.C. 1973 Develop. Biol.
33(1):130-137
- 38.- Galindo , J. y Belalcázar, S. 1974 Agrocienia 18:79-88
- 39.- Gamburg, O.L.; Kao, K.N.; Miller, R.A.; Fowke, L.C. & Constabel,
F. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:155-173
- 40.- Gamburg, O.L.; Shyluk, J. & Kartha, K.R. 1975 Plant Sci. Lett.
4(5):285-292
- 41.- Gnanam, A. & Kulandaivelu, G. 1969 Plant Physiol. 44(10):
1451-1458
- 42.- Gould, A.R. & Street, H.R. 1975 J. Cell Sci. 17(2):337-348
- 43.- Gregory, D.W.; & Cocking, E.C. 1965 J. Cell Biol. 24:143-146
- 44.- Grout, B.W.; Willison, J.H.M. & Cocking, E.C. 1973 J. Bioener-
getics 4(2):311-328
- 45.- Hall, M.D. & Cocking, E.C. 1974 Protoplasma 79:225-234
- 46.- Hanke, D.E. & Northcote, D.H. 1974 J. Cell Sci. 14(1):29-50
- 47.- Harada, H. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:127-131
- 48.- Hartmann, M.A.; Normand, G. & Benveniste, P. 1975 Plant Sci.
Lett. 5(5):287-292
- 49.- Hess, D.; Potrykus, I.; Donn, G.; Durand, J. & Hoffmann, F. 1972
Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:343-351
- 50.- Heyn, F. & Schilperoort, R.A. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S.
212:385-395
- 51.- Huber, S.C. & Edwards, G.E. 1975 Plant Physiol. 55(5):835-844
- 52.- Jofre Garfias, Alba Estela 1976 Tesis. En preparación.
- 53.- Kameya, T. & Uchimiya, H. 1972 Planta 103(4):356-360

- 54.- Kanai,R. & Edwards,G.E. 1973 Plant Physiol. 52:484-490
- 55.- Kao,K.N.; Gamborg,O.L.; Michaluk,M.R.; Keller,W.A. & Miller,
R.A. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:207-255
- 56.- Kartha,K.R.; Michayluk,M.R.; Kao,K.N.; Gamborg,O.L. & Constabel,
F. 1974 Plant Sci. Lett. 3(4):265-271
- 57.- Kassanis,B.; White,R.F. & Woods,R.D. 1975 J. Gen. Virol.
28(2):185-191
- 58.- Koblitz,H. & Scheunet,E.U. 1974 Ger(E) 107 054. 12 July 1974
Appln. 171 850 26 June 1973
- 59.- Kubo,S.; Harrison,B.D. & Barker,H. 1975 J. Gen. Virol. 28(2):
255-258
- 60.- Ledoux,L. & Huart,R. 1969 J. Mol. Biol. 43:243-262
- 61.- Mackenzie,I.A. & Bui Dang Ha,D. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S.
212:291-299
- 62.- Maeder,M.; Meyer,Y. & Bopp,M. 1975 Planta(ber) 122(3):
259-268
- 63.- McNeil,M.; Albersheim,P.; Taiz,L. & Jones,R. 1975 Plant
Physiol. 33:64-68
- 64.- Melchers,G. & Labib,G. 1972 Colloq. Inter C.N.R.S. 212:
367-372
- 65.- Meyer,Y. & Abel,W.O. 1974 Planta 123(1):33-40
- 66.- Meyer,Y. & Abel,W.O. 1975 Planta 125(1):1-13
- 67.- Motoyoshi,F.; Bancroft,J.B.; Watts,J.W. & Burgess,J. 1973
J. Gen. Virol. 20(2):177-193
- 68.- Motoyoshi,F. & Hull,R. 1974 J. Gen. Virol. 24(1):89-99
- 69.- Motoyoshi,F.; Bancroft,J.B. & Watts,J.W. 1974 J. Gen. Virol.
25(1):31-36

- 70.- Motoyoshi,F.; Watts,J.W. & Bancroft,J.B. 1974 J. Gen. Virol.
25(2):245-256
- 71.- Murashige,T. & Skoog,F. 1962 Physiol. Plant. 15:473-497
- 72.- Nagata,T. & Takebe,I. 1970 Planta(Ber) 92:301-308
- 73.- Nagata,T. & Takebe,I. 1971 Planta 99:12-20
- 74.- Nishimura,M. & Akasawa,T. 1975 Plant Physiol. 55(4):712-716
- 75.- Nishimura,M.; Graham,D. & Akasawa,T. 1975 Plant Physiol.
56:718-722
- 76.- Northcote,D.H. 1972 Ann. Rev. Plant Physiol. 23:113-132
- 77.- Ohyama,K.; Gamborg,O.L. & Miller,R.A. 1972 Plant Physiol.
50(3):319-321
- 78.- Ohyama,K.; Gamborg,O.L.; Shyluk,J.P. & Miller,R.A. 1972
Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:423-428
- 79.- Otsuki,Y.; Takebe,I.; Honda,Y.; Kajita,S. & Matsui,C. 1974
J. Gen. Virol. 22(3):375-385
- 80.- Patterson,R. & Knight,C.A. 1975 Virology 64:10-22
- 81.- Pelcher,L.E.; Gamborg,O.L. & Kao,K.N. 1974 Plant Sci. Lett.
3(2):107-111
- 82.- Pilet,P.E. 1972 C.R. Acad. Sci. 275:43-46
- 83.- Pilet,P.E. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:99-107
- 84.- Poirier-Hamon,S.; Rao,P.S. & Harada,H. 1974 J. Exp. Bot.
25(87):752-760
- 85.- Pojnar,E.; Willison,J.H.M. & Cocking,E.C. 1967 Protoplasma
64:460-480
- 86.- Power,J.B. & Cocking,E.C. 1969 Biochem. J. 111:3
- 87.- Power,J.B. & Frearson,E.M. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S.
212:409-421

- 88.- Prat,R. 1974 J. de Microscopie 18:65-86
- 89.- Raj,B. & Herr,J.M. 1970 Protoplasma 69:291-300
- 89'.- Raj,B. & Herr,J.M. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:85-91
- 90.- Reinert,J. & Hellmann,S. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:
273-279
- 91.- Ruesink,A.W. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:41-48
- 92.- Sarkar,S.; Upadhya,M.D. & Melchers,G. 1974 Molec. Gen. Genet.
135(1):1-9
- 93.- Schalskolskaya,N.D.; Sacharolskaya,G.N. & Sacharova,E.V.
1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:83-98
- 94.- Sharp,W.R. & Raskin,R.S. 1972 Planta 104:357-361
- 95.- Shepard,J.F. & Totten,R.E. 1975 Plant Physiol. 55(4):689-694
- 96.- Shore,G. & MacLachlan,G.A. 1975 J. Cell Biol. 64(3):557-571
- 96'.- Sobotka,F.E. & Stelzig,D.A. 1974 Plant Physiol. 53:759-769
- 97.- Sort,K.C.; Tepfer,D.A. & Fosket,D.E. 1974 J. Cell Sci.
15(1):75-87
- 98.- Takebe,I.; Otsuki,Y. & Aoki,S. 1968 Plant Cell Physiol.
9:115-124
- 99.- Takebe,I. & Nagata,T. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:
175-187
- 100.- Uchimiya,H. & Murashige,T. 1974 Plant Physiol. 54:936-944
- 101.- Vasil,V. & Vasil,I.K. 1972 Colloq. Inter. CN.R.S. 212:
139-140
- 102.- Wallin,A. & Eriksson,T. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:
301-307
- 102'.- Wallner,S.J. & Walker,J.E. 1975 Plant Physiol 55(1):94-98
- 103.- Watts,J.W. & King,J.M. 1973 Planta 113(3):271-277

- 103.- Watts, J.W.; Motoyoshi, F. & King, J.M. 1974 Ann. Bot. 38
(156):667-672
- 104.- Willison, J.H.M. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:215-241
- 105.- Willison, J.H.M. & Cocking, E.C. 1975 Protoplasma 84(6):
363-372
- 106.- Withers, L.A.W. & Cocking, E.C. 1972 J. Cell Sci. 11:59-75
- 107.- Withers, L.A.W. 1972 Colloq. Inter. C.N.R.S. 212:517-545
- 108.- Yamada, Y.; Tanaka, K. & Takahashi, E. 1967 Proc. Japan Acad.
43(2):156-160
- 109.- Yamada, Y.; Kiso, K.; Sekiya, J. & Yasuda, T. 1972 Agr. Biol.
Chem. 26(6):1055-1059
- 110.- Yung, K.H. & Northcote, D.H. 1975 Biochem. J. 151(1):141-144
- 111.- Zailtrin, M. & Beachy, R.N. 1974 Adv. Virus Res. 19:1-35