

UCH-FC
Biotecnología
E776
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

"Establecimiento de una plataforma de obtención y validación de protoplastos, que resulte experimentalmente viable y reproducible"

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

FELIPE GERMÁN ESPINOZA MORALES

Directora de Seminario de Título: **Dra. Lorena Norambuena**

Co-director de Seminario de Título: **Dra. Claudia Stange**

Abril 2012

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

FELIPE GERMÁN ESPINOZA MORALES

“Establecimiento de una plataforma de obtención y validación de protoplastos, que resulte experimentalmente viable y reproducible”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. Lorena Norambuena Morales
Directora del Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul de la Dra. Lorena Norambuena Morales.

Dra. Claudia Stange Klein
Co-Director del Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul de la Dra. Claudia Stange Klein.



Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Michael Handford
Presidente

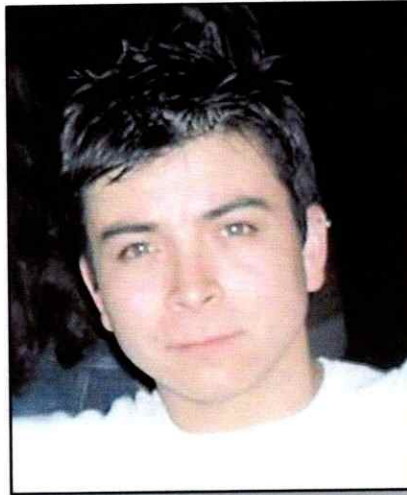
Firma manuscrita en tinta azul de Dr. Michael Handford.

Dr. Alexander Vargas Milne
Evaluador

Firma manuscrita en tinta azul de Dr. Alexander Vargas Milne.

Santiago de Chile, Abril de 2012

Biografía



Mi nombre es Felipe Germán Espinoza Morales, nací el día 8 de marzo de 1984. Desde pequeño siempre demostré interés por las ciencias y por los animales, desde pequeño quería ser veterinario.

En kinder estuve en el colegio llamado Peter College, la enseñanza básica en el colegio Saint Maurice's en donde siempre obtuve las mejores calificaciones y siempre interesado en ciencias. La enseñanza media la cursé en el INBA en donde seguí con las mejores notas en general aunque en ciencias siempre mostré un mayor interés, en segundo medio decidí ser de la especialidad biólogo que impartía el internado y siempre cooperé en las actividades del ramo biología llevando mis cultivos de microorganismos para observación al microscópio.

Durante esos años comenzó mi interés también por las enzimas, por lo que mi padre me sugirió que podía estudiar ingeniería en biotecnología. Me pareció bastante bien tener una formación sólida en varias ramas de la ciencia.

Durante el paso de tercero a cuarto medio mi padre falleció y todo se volvió mucho más difícil, de todas formas conservé mi promedio de notas.

Rendí la P.A.A. en donde me fue bastante bien y pude quedar segundo entre los seleccionados de ingeniería en biotecnología.

El primer año de universidad me fue bastante bien pero con el tiempo me fui desmotivando al ver que la carrera no se acercaba a una realidad laboral. Al segundo año congelé la carrera.

Finalmente decidí retomar ya que había caído en una fuerte depresión y si no terminaba la carrera no estudiaría otra cosa.

Sin mucho ánimo logré terminar los ramos de la carrera, inicialmente pensaba no hacer tesis pero finalmente me convencí de que era lo mejor para mi futuro.

Ahora la tesis está finalizada y busco un trabajo con el que pueda vivir bien y desarrollarme como el profesional de las ciencias que logré ser.

Agradecimientos

Los agradecimientos son bastante pocos o débiles debido a que mayormente el esfuerzo fue mío. Entonces agradezcó a mi madre que me ayudó desde pequeño en mi afán por las ciencias, a mi padre que me apoyó siempre con el tema de los peces y otras macotas.

Siento que hay muchas cosas que desagradecer por que me sacaron del camino central pero no vale la pena mencionarlas.

Agradezco a mi tutora la Doctora Lorena Norambuena que me ayudó a ser más responsable. Y agradezco al centro de biotecnología de la UCN que me dio mi primera experiencia laboral en donde estuve a cargo de la Doctora Lorena Escudero quién me apoyó y confió en mis capacidades.

Financiamiento

PROYECTO FONDECYT 11080240.

"Secretory and Endocytic System in *Arabidopsis thaliana*: cellular and molecular mechanism of Sortin2, a synthetic compound that affects endomembrane system" (2008–2011).

Índice de contenidos

Índice de contenidos 01

Listado de figuras 03

Índice de tablas 04

Listado Abreviaturas 05

Resumen 07

Abstract 08

1.-Introducción 09

1.1.-Pared Celular **09**

1.2.-Sistema de endomembranas **11**

1.3.-Protoplastos **13**

1.3.1.-Experimento de revisión del proceso de endocitosis en protoplastos **14**

1.3.2.-Experimento de revisión de la ruta secretoria en protoplastos **14**

1.3.3.-Ensayos de micropropagación de protoplastos **15**

1.3.4.-Demostración de la validez del uso de protoplastos en ensayos vegetales **15**

2.-Objetivos 16

2.1- Objetivo general **16**

2.2 -Objetivos específicos **16**

3.-Materiales y métodos 17

3.1.-Materiales **17**

3.1.1.-Material biológico a utilizar en la obtención de protoplastos **17**

3.1.2.-Medio de cultivo para el crecimiento de las plantas **17**

3.2.-Soluciones **17**

3.2.1.-Soluciones a utilizar en la obtención y mantención de protoplastos **17**

3.2.2.-Soluciones utilizadas para el ensayo de western blot **18**

3.3.-Métodos **19**

- 3.3.1.-Esterilización y estratificación de semillas **19**
- 3.3.2.-Cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* **19**
- 3.3.3.-Procedimiento para la digestión de la pared celular vegetal de plantas de *Arabidopsis thaliana* **20**
- 3.3.4.-Extracción y purificación de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* **20**
- 3.3.5.-Cálculo del rendimiento de la extracción de protoplastos **21**
- 3.3.6.-Mantención de los protoplastos obtenidos **22**
- 3.3.7.-Ensayo de secreción en protoplastos bajo la presencia de Sortin1 en el medio **22**
- 3.3.8.-Ensayo de secreción de proteínas en el sobrenadante **23**
 - 3.3.8.1.-Separación de la fracción celular y el sobrenadante de protoplastos **23**
 - 3.3.8.2.-Extracción de proteínas desde la fracción celular y el sobrenadante de protoplastos **23**
 - 3.3.8.3.-Cuantificación de proteínas **24**
 - 3.3.8.4.-Análisis de las proteínas secretadas mediante Western blot **24**
- 3.3.9.-Tinción con FM4-64 de protoplastos **25**
- 3.3.10.-Tinción de la pared celular en protoplastos **25**
- 3.3.11.-Ensayo de transformación transiente en protoplastos **26**

4.-Resultados 28

- 4.1.- Lograr reproducibilidad en la extracción, purificación y mantención de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* **28**
- 4.2.- Establecer distintos ensayos de biología celular utilizando protoplastos para demostrar la validez de la técnica **34**
 - 4.2.1.-Evaluación del estado de la ruta endocítica en protoplastos **34**
 - 4.2.2.-Ensayo de secreción en protoplastos **36**
 - 4.2.2.1.-Detección de AtCPY en el ensayo de secreción **38**
 - 4.2.3.-Tinción de la pared celular de protoplastos **41**
 - 4.2.4.-Ensayo de transformación transiente en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* **42**
- 4.3.-Micropropagación de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* **43**

5.- Discusión 46

6.- Conclusión 49

7.- Proyecciones 50

8.- Referencias 51

Listado de figuras

- Figura 1.** Esquema de la estructura de la pared celular vegetal. **10**
- Figura 2.** Esquema simplificado del sistema de endomembranas en células vegetales. **12**
- Figura 3.** Cámara de recuento celular de Petroff-Hausser. **21**
- Figura 4.** Protocolo para la obtención de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. **29**
- Figura 5.** Evaluación de la integridad de protoplastos aislados de plantas de *Arabidopsis thaliana*". **30**
- Figura 6.** Sobrevida de los protoplastos, mantenidos en medio W5. **32**
- Figura 7.** Curso temporal de protoplastos mantenidos en solución W5 durante ocho días desde extraídos. **33**
- Figura 8.** Evaluación de la ruta endocítica en protoplastos. **35**
- Figura 9.** Ensayo de sobrevida de protoplastos frente a la adición de Sortin1 al medio de cultivo. **37**
- Figura 10.** Ensayo de secreción en protoplastos. **39**
- Figura 11.** Revisión de la inespecificidad del anticuerpo secundario. **40**
- Figura 12.** Ensayo de recuperación de pared celular en protoplastos. **42**
- Figura 13.** División sostenida de protoplastos incubados en la solución W5 modificada. **45**

Índice de tablas

Tabla 1.-

Cuantificación de proteína obtenida del ensayo de secreción de protoplastos en Sortin1. **37**

Tabla 2.-

Soluciones evaluadas en este trabajo para conseguir la división sostenida en protoplastos. **44**

Listado Abreviaturas

°C = Grado Celsius.

2,4-D = Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

AtCPY = *Arabidopsis thaliana* – Carboxi Peptidasa Y.

BCIP = Sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato.

BSA = Sero Albúmina Bovina.

cm = Centímetros.

Col-0 = *Arabidopsis thaliana* Ecotipo Columbia-0.

D.O. = Densidad Óptica.

DMSO = Dimetil sulfoxido.

DNA = Ácido desoxirribonucleico.

DTT = Dithiothreitol.

EDTA = Ácido etilendiamino tetraacético.

FM 4-64 = N-(3-trietil amonio propil)-4-(p-dietil amino fenil hexatrienil) Piridinio dibromuro.

HA = Hemaglutinina humana del virus influenza.

Hepes = Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico.

IAA = Ácido 3-indolacético.

IgG = Inmuno globulina G.

Kda = Kilo Dalton

L = Litro

M = Molar

MaMg = Mannitol – Magnesio.

MES = Ácido 2-(N-morfolino)-Etanosulfónico Monohidrato.

mg = Miligramos.

µl = Microlitros.

mL = Mililitro.

µm = Micrómetro.

µM = Micromolar.

MS = Murashige y Skoog.

NAA = Ácido α -naftilacético.

NBT = Cloruro de tetrazolio nitro-azul.

nm = Nanometro.

PEG = Polietilenglicol.

pH = Potencial de Hidrógeno.

P/V = Peso / Volumen.

PVC = Compartimento Prevacuolar.

RPM = Revoluciones Por Minuto.

SDS = Dodecilsulfato De Sodio.

SDS-PAGE = Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio.

TCA = Ácido Tricloro Acético.

TGN = Red Trans Golgi.

UV = Ultravioleta.

V/V = Volumen / Volumen.

Resumen

Una de muchas formas de trabajar con organismos vegetales es utilizar protoplastos vegetales, los que corresponden a una célula vegetal a la cual se le ha removido su pared celular mediante digestión enzimática. Por lo tanto se encuentra con su membrana plasmática completamente expuesta a la solución en que son mantenidos. Más allá de la definición está la importancia que representa el poder utilizar para estudios vegetales este tipo de células modificadas debido a que presentan ventajas al no poseer la barrera mecánica que representa la pared celular, lo que nos permite hacer modificaciones genéticas, trabajar con drogas, etc además de que obtenemos el tejido vegetal disociado en forma de células esféricas individuales. A pesar de todo lo anterior la técnica presenta también desventajas, dado que las células quedan extremadamente delicadas, con una muy baja tolerancia a estrés mecánico y osmótico. Por lo que se debe poner especial atención en este punto con el fin de llevar a buen término las manipulaciones y técnicas realizadas con los protoplastos.

El objetivo principal de este estudio fue describir de manera práctica un protocolo para la obtención y purificación de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*, pero también validar su utilización en determinadas técnicas de biología molecular, como por ejemplo tinción con N-(3-trietil amonio propil)-4-(p-dietil amino fenil hexatrienil) Piridinio dibromuro (FM 4-64), un fluoróforo que se utiliza para revisar el estado general de la ruta endocítica en los protoplastos, entregando de este forma pistas sobre la validez del uso de protoplastos en estudios de endocitosis. Se evaluó también el efecto de una droga llamada Sortin1, que afecta a los cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* produciendo la secreción de una proteína vacuolar llamada AtCPY. Mediante estas metodologías evaluamos si el comportamiento de los protoplastos se corresponde con el de las células en tejidos. Finalmente con todo lo anterior se presenta un protocolo reproducible para la obtención de protoplastos, además de una nueva solución nutritiva que permite la división sostenida de estos. También mediante los ensayos presentamos ciertos parametros de validación de esta técnica que presenta grandes proyecciones en estudios de la biología celular vegetal.

Abstract

One of many ways of working with plant organisms is to use plant protoplasts, plant cells that have had their cell wall removed by enzymatic digestion. Therefore the plasma membrane is completely exposed to the solution in which are maintained. Beyond this definition is the importance of being able to use this type of modified cell for plant studies, which have advantages because they do not present the mechanical barrier of the cell wall, allowing us to make genetic modifications, work with drugs, etc as well as getting plant tissue dissociated into spherical shaped individual cells. Despite the above the technique also has disadvantages, because the cells are extremely sensitive, with a very low tolerance for mechanical and osmotic stress. Special attention must be given to this point in order to be successful in manipulations and techniques performed with protoplasts.

The main objective of this study is to describe a practical protocol for the preparation and purification of protoplasts from *Arabidopsis thaliana*, but also validate its use in certain molecular biology techniques such as staining with N-(3-triethyl ammonium propyl) -4 - (p-diethyl phenyl hexatrienil amino) pyridinium dibromide (FM 4-64), a fluorophore that is used to check the general condition of the endocytic pathway in protoplasts, providing insight about the validity of using protoplasts in endocytosis studies. We also evaluated the effect of a drug called Sortin1, which affects *Arabidopsis thaliana* cell cultures producing the secretion of a vacuolar protein called AtCPY. Using these methodologies evaluated if the behavior of protoplasts corresponds to cells in tissues. Finally, along with the with the above I present a protocol for obtaining reproducible protoplasts, and a new nutrient solution that allows sustained delivery of cell division. Also by testing certain parameters we validate this technique which has great potential for studies of plant cell biology.

1. – Introducción

1.1.-Pared Celular.

Una diferencia fundamental entre plantas y animales es que las células vegetales se encuentran rodeadas por una pared celular rígida, que les brinda soporte mecánico, pero a la vez les otorga una interacción dinámica entre la célula y el medio, sin impedir la difusión de agua y iones hacia la membrana plasmática (McCann y Carpita, 2008). La pared celular además tiene la capacidad de condicionar el desarrollo de las células durante la morfogénesis (McCann y Carpita, 2008). La pared se encuentra formada por polisacáridos como celulosa, hemicelulosa, pectina y proteínas como lectinas y expansinas, aunque la abundancia de cada uno de estos componentes es propia para cada tipo celular, tejido y especie (Taiz and Zeiger, 2010).

Las macromoléculas de celulosa son muy estables químicamente e insolubles en agua; están formadas por unidades de glucosa unidas mediante enlace covalente β -1,4 formando una estructura en forma de cinta aplanada, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno formando una estructura cristalina llamada microfibrilla (Taiz and Zeiger, 2010). Estas microfibrillas poseen una alta fuerza tensional que actúa reforzando la pared celular. Grupos de microfibrillas se unen formando las macrofibrillas que son los componentes más importantes de la pared y se mantienen unidas mediante una matriz de polisacáridos formada por hemicelulosa, celulosa y pectina mayoritariamente como se ve esquematizado en la figura 1, (Taiz and Zeiger, 2010).

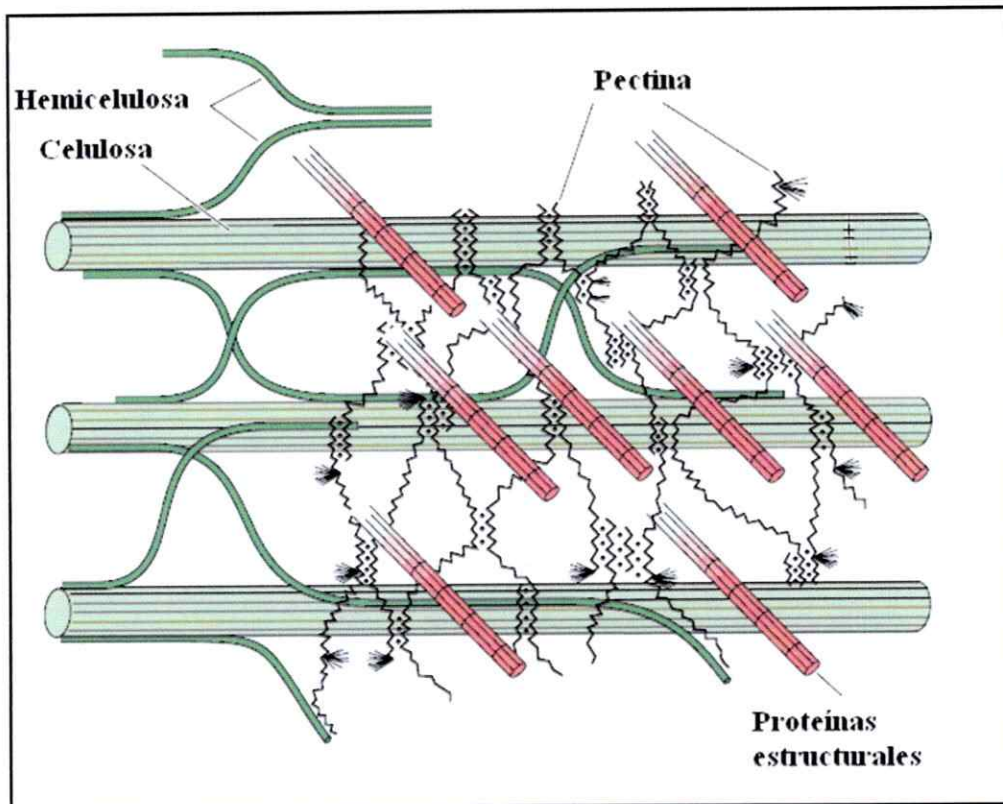


Figura 1.-Esquema de la estructura de la pared celular vegetal. La figura muestra la estructura de la pared celular mostrando la disposición de los principales polisacáridos y proteínas presentes (Taiz and Zeiger, 2010).

1.2.-Sistema de endomembranas.

En la célula vegetal los productos proteicos sintetizados deben ser destinados a los lugares donde su función sea requerida. Además, en sistemas eucarióticos vegetales muchas proteínas, para que puedan ejercer su función, deben ser procesadas en sitios específicos de la célula; algunas deben ser secretadas al medio externo. Estas funciones son moduladas por un sistema intracelular conservado en los eucariontes llamado sistema de endomembranas (Alberts y col. 2008). Este sistema está conformado por compartimientos subcelulares como son: el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y la vacuola donde ocurren los procesos de síntesis y modificación de macromoléculas como por ejemplo proteínas. Además, se encuentra compuesto por estructuras membranosas implicadas en el tráfico y distribución de proteínas que son la red trans-Golgi (TGN), endosomas y el compartimento prevacuolar (PVC), además de la membrana plasmática (Nebenführ 2002; Foresti y Denecke 2008; Alberts y col. 2008).

Los componentes del sistema de endomembranas están conectados mediante el tráfico de vesículas (Figura 2) las cuales se forman por el curvamiento progresivo y estrangulamiento de la membrana de determinado organelo como también de la membrana plasmática, inducido por proteínas accesorias como Clatrina, donde el producto proteico a transportar es enriquecido al interior de las vesículas mediante receptores integrales de membrana (Alberts y col. 2008). El reconocimiento específico del destino subcelular está regulado principalmente por un set de proteínas que reconocen e identifican a las vesículas según su origen y destino (Moreau y col. 2007; Alberts y col. 2008). Esta destinación del material proteico también conlleva un flujo de membranas, el cual asegura la existencia y mantenimiento de estos organelos membranosos en la célula (Carter y col. 2004).

Esta especificidad en la destinación subcelular se refleja en el establecimiento de diferentes rutas, las que muestran un alto grado de conservación entre diferentes modelos de estudio eucariotas. Estas rutas presentan nodos o intersecciones entre ellas y además existe un flujo retrógrado (Foresti & Denecke, 2008). Una de las rutas es la ruta secretoria en la cual los productos proteicos son sintetizados en el Reticulo Endoplasmático, luego son transportados al Aparato de Golgi en

donde las proteínas pueden ser modificadas, después al TGN. Posteriormente son transportadas controlada y selectivamente, mediante vesículas, al compartimiento de destino, ya sea a componentes del sistema de endomembranas o al espacio extracelular al fusionarse con la membrana plasmática (Alberts y col. 2008).

Además existe la ruta endocítica, la cual toma y captura partículas tanto del exterior de la célula como elementos de la propia membrana plasmática para internalizarlas y transportarlas a compartimentos endosomales que pueden seguir su tránsito hacia compartimentos prevacuolares y después hacia la vacuola o bien reciclarlas a la membrana plasmática, proceso llamado reciclaje endocítico (Richter y col. 2009; Ueda & Nakano, 2002).

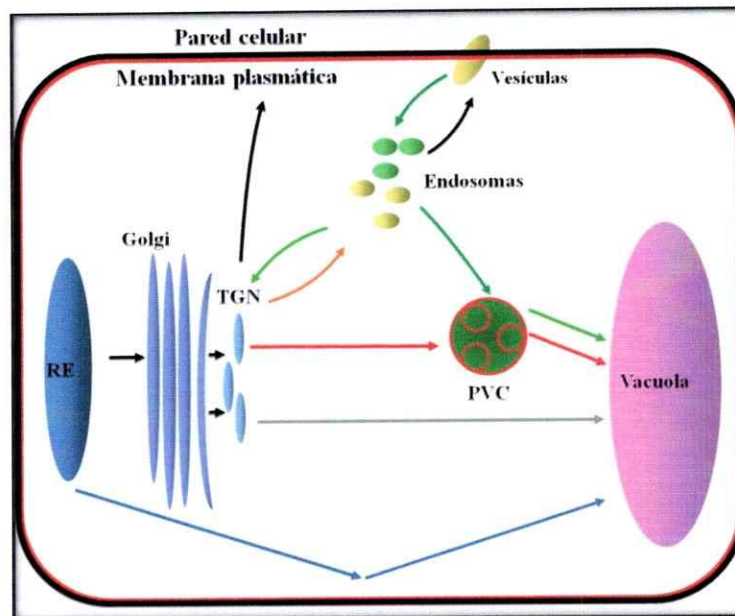


Figura 2.-Esquema simplificado del sistema de endomembranas en células vegetales. En la figura se muestran los componentes del sistema de endomembranas, las flechas indican las distintas rutas que pueden seguir las moléculas proteicas desde su síntesis en el retículo endoplásmico a su destinación ya sea a la vacuola o al medio extracelular. (RE) Reticulo endoplásmico, (Golgi) Aparato de Golgi, (TGN) Red trans Golgi y (PVC) Compartimento prevacuolar.

1.3.-Protoplastos

Los protoplastos se definen como una célula desprovista de pared celular, ya sea bacteriana o eucariontes como levaduras o plantas. La formación de protoplastos se logra por un proceso enzimático el cual para el caso de plantas disocia el tejido vegetal al digerir los polisacáridos presentes en la pared celular y por tanto deja la membrana plasmática completamente expuesta sin la barrera física que representa la pared celular, lo que permite la manipulación de estas células de forma individual y no como un tejido, además manteniendo las potencialidades de células vegetales completas (Davey y col. 2005). Por lo tanto la técnica nos permite observar como se comportan las células pertenecientes a una estructura definida como por ejemplo pétalos, raíz u hoja de una forma individual, viable y accesible ya que presentan una accesibilidad uniforme todas las células ya que se encuentran en una misma solución, por lo tanto la penetración en un ensayo por ejemplo con drogas es uniforme y no dependiente de la capa celular en que la célula se encuentre. Además presentan la posibilidad de una recuperación de la planta completa si se suministran las condiciones adecuadas.

En este trabajo se utilizarán protoplastos de *Arabidopsis thaliana*, que se consiguen realizando una digestión total de la pared celular mediante enzimas específicas tales como Celulasa y Macerozima en una solución isotónica que impide la lisis de los protoplastos extraídos. Una vez digerida la pared, las células pueden observarse completamente esféricas y son especialmente sensibles a las concentraciones de soluto en el medio en que son mantenidos debido a la remoción de la pared celular que actúa como soporte mecánico (Davey y col. 2005). Si el medio es muy bajo en solutos o hipotónico, el resultado es la lisis celular, en cambio si el medio es concentrado en solutos o hipertónico el resultado será la crenación o pérdida del volumen de los protoplastos.

Las técnicas de obtención de protoplastos se han desarrollado desde hace unos 40 años (Nagata and Takebe, 1970) utilizando plantas de tabaco en estudios de regeneración de pared celular. Posteriormente, se reportó la regeneración de brotes de plantas de *Arabidopsis thaliana* a partir de protoplastos (Damm y Willmitzer, 1988), aunque los rendimientos se han mantenido bajos para protoplastos provenientes desde hojas, habiéndose conseguido rendimientos algo mas altos

agregando finas capas de alginato, que corresponde a una matriz sólida obtenida desde algas (Dovzhenko y col. 2003).

El presente estudio pretende estandarizar un protocolo para la obtención de protoplastos y validar su utilización como herramienta celular para determinados ensayos vegetales como el análisis del estado de algunas vías de tráfico en la célula luego de la remoción de la pared celular debido a la interacción dinámica que existe entre el citoesqueleto y la pared celular vegetal (Crowell y col. 2009). Por ello, se propone revisar el proceso de endocitosis y de la ruta secretoria que nos permitan ir entendiendo similitudes y diferencias entre ensayos realizados con tejido vegetal y ensayos realizados con protoplastos.

1.3.1.-Evaluación del proceso de endocitosis en protoplastos

Es sabido que el fluoróforo N-(3-trietil amonio propil)-4-(p-dietil amino fenil hexatrienil) Piridinio dibromuro (FM 4-64) funciona como trazador endocítico (Vidal y Erm, 1995). Este compuesto marca temporalmente los componentes del sistema de endomembranas participantes en la ruta endocítica que son en orden temporal: membrana plasmática, endosomas, PVC, y finalmente vacuola. Este ensayo se realizó con el objetivo de analizar la viabilidad e integridad de los protoplastos, al comparar los resultados con aquellos obtenidos en una planta completa. Al observar el mismo comportamiento en protoplastos nos permitirá tener la confianza de trabajar con ellos y descartar que la técnica a que son sometidos para retirar la pared celular y la falta de pared en la célula misma, no generen resultados anómalos.

1.3.2.-Evaluación de la ruta secretoria en protoplastos

Existe una droga llamada Sortin1 la cual adicionada al medio en que son crecidos cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* produce como efecto la secreción de una proteínas entre ellas

una proteína vacuolar llamada AtCPY (Zouhar y col. 2004). Sortin1 afecta de manera determinada a la ruta secretoria de células vegetales y la utilizamos en esta validación para comprobar si afecta de la misma forma a protoplastos que a células vegetales que forman parte de un tejido.

1.3.3.-Ensayos de micropropagación de protoplastos

Micropropagación corresponde a la recuperación de una planta completa a partir de pequeñas partes como por ejemplo brotes, en este ensayo lo que se pretende lograr es la división sostenida de los protoplastos obtenidos hasta la recuperación de una planta completa de *Arabidopsis thaliana*. Lo que de ser logrado abre la posibilidad de recuperar plantas completas a partir de protoplastos individuales, encontrando aún más utilidad para éstos frente a futuros ensayos de transformación estable para la obtención de plantas transgénicas.

1.3.4.-Demostración de la validez del uso de protoplastos en ensayos vegetales

Aparte de clarificar los pasos para obtener y mantener protoplastos es necesario demostrar que es posible trabajar con ellos de manera simple por lo que se propone utilizar distintas técnicas tales como transformación transientes de protoplastos mediante Polietilenglicol (PEG), ensayos de recuperación de pared celular en protoplastos y ensayos de micropropagación, que una vez obtenidos y procesados los datos nos entregarán la información necesaria para comprender de mejor forma el uso y la manipulación de protoplastos para así entregar las técnicas mas adecuadas y la confianza de agregar el uso de protoplastos a nuestros ensayos de biología molecular.

2.-Objetivos

2.1.-Objetivo general

“Establecimiento de una plataforma de obtención y validación de protoplastos, que resulte experimentalmente viable y reproducible”

2.2.-Objetivos específicos

- 1.- Estandarización de la extracción, purificación y mantención de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*.
- 2.- Establecer distintos ensayos de biología celular utilizando protoplastos, para demostrar la validez de la técnica.
- 3.-Micropropagación de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*.

3.-Materiales y métodos

3.1.-Materiales.

3.1.1.-Material biológico a utilizar en la obtención de protoplastos

Para la obtención de protoplastos se utilizarán plantas de 3 semanas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0), crecidas en Medio de cultivo Gamborg en condiciones de esterilidad.

3.1.2.-Medio de cultivo para el crecimiento de las plantas

-Medio Gamborg: sacarosa 2% p/v, mioinositol 0,01% p/v, MES [ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico monohidrato] 0,05% p/v pH 5,7, medio de cultivo Gamborg 0,32% p/v y fitoagar (Phyto Technology Laboratories) 0,7% p/v, esterilizado en autoclave.

-MS líquido: sacarosa 2% p/v, mioinositol 0,01% p/v, MES 0,05% p/v pH 5,7 y medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 0,44% p/v. El medio es esterilizado en autoclave.

3.2.-Soluciones

3.2.1.-Soluciones a utilizar en la obtención y mantención de protoplastos.

-Solución de enzimas que digieren la pared celular vegetal: Celulasa 1% p/v, Macerozima 0.25% p/v, Mannitol 0.4M, CaCl₂ 8mM, Mes-KOH 5mM pH 5.7 y BSA (Sero Albúmina Bovina) 0.1% p/v. La solución es esterilizada mediante una unidad de filtración de poro 0.22µm.

-Colchón de sacarosa: Sacarosa 21% V/V

-Medio W5: NaCl 154mM, CaCl₂ 125mM, KCl 5mM, Glucosa 5mM y MES-KOH 1.5mM pH 5.7. El medio es esterilizado en autoclave.

-Medio MaMg (Mannitol – Magnesio): Mannitol 0.5M, MgCl₂ 15mM y MES 0.02% p/v pH 5.7. El medio es Esterilizado en autoclave.

-Solución de PEG: Mannitol 400mM, Ca (NO₃)₂ 100mM, PEG (polietilenglicol, P.M. 8000) 40% P/V.

-Medio W5 Modificado: Este medio se consiguió luego de utilizar otras soluciones nutritivas descritas que no dieron los resultados esperados por lo que se procedió a modificar la solución W5 que fue la solución que mejor dio resultados en la mantención de protoplastos agregándole hormonas y agua de coco como nutriente adicional (Gopikrishna V y col. 2008).

Para la obtención del agua de coco se utiliza un coco panameño maduro de venta en expendios de fruta, al cual se le extrae el líquido que posee en su interior y se esteriliza mediante una unidad de filtración de poro 0.22µm y se almacena a -20°C.

Se preparó la solución W5 más un 2% V/V de agua de coco panameño. Se agregó IAA (ácido 3-indolacético) 2mg/L y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) 0.5mg/L, ambos son análogos de la hormona auxina. Luego se esterilizó en una unidad de filtración de poro 0.22µm y se almacenó a 4°C.

3.2.2.-Soluciones utilizadas para el ensayo de western blot.

-Buffer de homogenización: Sacarosa 250mM, ácido N-2-Hidroxiethylpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico (Hepes) 25mM pH 7,7, MgCl₂ 1mM y Dithiothreitol [DTT] 1mM. El medio es esterilizado en autoclave.

-Tampón de carga 5x: Tris-HCl 60mM pH 6,8, Glicerol 25% V/V, Dodecilsulfato de sodio (SDS) 2% V/V, 2-Mercaptoetanol 28,8mM, Azul de Bromofenol 0,1% V/V.

-TTBS: Tris 10mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,05% V/V.

-Tampón alcalino: Tris-HCl 100mM pH 9,5, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM.

3.3.-Métodos.

3.3.1.-Esterilización y estratificación de semillas

Las semillas utilizadas de *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 fueron esterilizadas mediante el protocolo especificado a continuación. Primero se lavan las semillas en 1 mL de etanol 95% v/v por 5 minutos, para después descartar el etanol. Luego se agita por 15 minutos en una solución de etanol 70% v/v con Tritón X-100 0,1% v/v previamente filtrado para evitar contaminaciones. Por último se lavan las semillas en agua estéril 5 veces, retirando cada vez el líquido para eliminar todo el etanol y el Tritón X-100. Finalmente, para estratificar las semillas se dejan en 1mL de agua estéril a 4°C, en oscuridad por 2 días. Para asegurar la esterilidad se utilizó en todo el proceso una cámara de flujo laminar con 15 minutos previos de UV germicida.

3.3.2.-Cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas esterilizadas y estratificadas se sembraron en condiciones estériles en placas de Petri que contenían el medio sólido de cultivo Gamborg (estéril) y se dejaron crecer sobre agar durante tres semanas en un incubador con ciclos de 16 horas luz y 8 de oscuridad a 22° C.

Para los cultivos líquidos se agregaron las semillas esterilizadas y estratificadas en MS líquido con agitación a 100 rpm y oscuridad durante tres semanas a fin de evitar la presencia de cloroplastos en las células que interfirieran con fluorescencia en la microscopía confocal y epifluorescencia.

3.3.3.-Procedimiento para la digestión de la pared celular vegetal de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *Arabidopsis thaliana* con 3 semanas de crecimiento y cultivadas en esterilidad se removieron desde el agar con una pinza estéril y se agregaron a un tubo falcon de 50mL ocupando un volumen aproximado de 25mL. Se agrega 15mL de solución de enzimas y se incuba a 22° C durante 15 horas con agitación mínima que permita un suave desplazamiento del líquido al interior del tubo falcon, minimizando así la pérdida de protoplastos por estrés mecánico.

3.3.4.-Extracción y purificación de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

Luego de tratar el tejido vegetal por 15 horas con la solución de enzimas, se vertió la solución de enzimas y tejido vegetal sobre un colador de poro 100µm para permitir el paso de los protoplastos y retener el tejido vegetal no disociado. Se recogió el filtrado en una placa Petri y se colocó cuidadosamente sobre 25mL de sacarosa 21% de manera que se formen dos fases por diferencia de densidad. Se centrifugó a 700 rpm durante 10 minutos a 4°C. Luego de la centrifugación, se colectó la fase superior que es donde permanecen los protoplastos que se encuentran intactos y por lo tanto esféricos, mientras los desechos sedimentan al fondo del tubo y se descartan. Se agregó un volumen de medio W5 con el objetivo de retirar las enzimas que digieren la pared celular que están presentes, dado que estas producen una disminución del rendimiento de la extracción si no son retiradas (datos no mostrados). Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Se descartó cada vez el sobrenadante y se agregaron 5mL de W5 como medio de mantención de protoplastos y se almacenaron los protoplastos a 4°C hasta su utilización (no más de unas horas).

3.3.5.-Cálculo del rendimiento de la extracción de protoplastos

Para cuantificar el rendimiento de la extracción se utiliza una cámara de conteo celular. En este caso se utilizó la cámara de Petroff-Hausser, la cual posee un cuadrículado de dimensiones conocidas que nos permite contar el número de células en un volumen determinado y extrapolarlo al volumen total (Figura 3). Su capacidad de conteo es válida desde 1×10^6 células/mL, cualquier valor inferior es considerado bajo el límite de detección de la cámara.

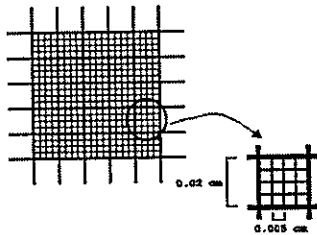


Figura 3.- Cámara de recuento celular de Petroff-Hausser. Cuadrículado presente en la cámara de Petroff-Hausser, este cuadrículado posee dimensiones conocidas lo que permite contar del número de células en determinados cuadrantes y así poder extrapolar la cantidad de células presentes sabiendo la profundidad de la cámara (0,1mm) <http://www.monografias.com>.

El procedimiento de llenado de la cámara es con una alícuota homogénea de una extracción de protoplastos. Se deja llenar por capilaridad la región entre el cubreobjetos y la cámara. Luego bajo el microscopio óptico se contó por separado el número de protoplastos intactos que hay en 5 cuadros distribuidos uniformemente. Estos datos se promediaron y se extrapoló la cantidad para 1mL, de manera de obtener la concentración aproximada.

3.3.6.-Mantención de los protoplastos obtenidos

Independientemente del uso que se les fuese a dar a los protoplastos, estos se mantuvieron en un incubador a 22°C con ciclos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Además se incubaron en condiciones que permitan el intercambio gaseoso, que en este caso corresponde a un tubo Falcon con la tapa semicerrada, con el fin de no perder la población de protoplastos carentes de cloroplastos, como aquellos provenientes de raíces. Además fue necesario cambiar el medio W5 en que se encuentran los protoplastos retirando el sobrenadante y agregando medio W5 fresco cada 48 horas para que no se agotaran los nutrientes.

3.3.7.-Ensayo de secreción en protoplastos bajo la presencia de Sortin1 en el medio

Para el ensayo de secreción realizado por triplicado se utilizó 6mL de una suspensión homogénea de protoplastos que contenía aproximadamente $2,0 \times 10^7$ células/mL que se dividió en 3 tubos de ensayo con 2 mL cada uno. Los protoplastos fueron incubados en presencia del compuesto que Sortin1 que causa la secreción de proteínas vacuolares. La incubación se realizó en 12,5mg/L y 25mg/L de Sortin1 y condición control (sin Sortin1). Cada condición contenía la concentración final de 0,5% de Dimetil sulfóxido (DMSO), en el medio para impedir que Sortin1 precipite. Las 3 condiciones fueron incubadas durante 24 horas. Luego de esto se contó el número de protoplastos viables en la cámara de Petroff-Hausser y posteriormente se separó el sobrenadante de las células para hacer ensayos de western blot y detectar la proteína AtCPY presente en el sobrenadante de los protoplastos ensayados. El agregado celular obtenido desde la situación control se utilizó para extracción de proteínas, las que fueron utilizadas como control positivo para la observación de las isoformas de la proteína AtCPY, ya que en el extracto celular es posible encontrar las tres isoformas (Zouhar y col. 2004). De esta manera podemos comparar con el sobrenadante la presencia o ausencia de isoformas de AtCPY.

3.3.8.-Ensayo de secreción de proteínas en el sobrenadante.

3.3.8.1.-Separación de la fracción celular y el sobrenadante de protoplastos

Para la separación de los protoplastos de su medio de cultivo, se transfirió el contenido de cada uno de los tubos de ensayo a un tubo Eppendorf. Se centrifugó durante 7 minutos a 700 rpm para permitir la sedimentación de los protoplastos sin destruirlos y así separarlos del sobrenadante donde se encuentran las proteínas secretadas. Una vez terminada la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se guarda a -80°C.

El tubo que contiene los protoplastos se centrifuga nuevamente a 5.000 rpm durante 5 minutos para concentrar la fracción celular y así poder retirar el sobrenadante restante, el que se retira con una pipeta P200 y se descartó guardando el tubo en que queda la fracción celular a -80°C.

3.3.8.2.-Extracción de proteínas desde la fracción celular y el sobrenadante de protoplastos

Para la obtención de las proteínas desde la fracción celular fue necesario lisar las células y para esto se agregaron 100µl de buffer de homogenización. Luego se agitó en vortex durante 10 segundos y se congeló a -80°C.

La concentración de proteínas presentes en el sobrenadante de los ensayos de secreción es muy baja por lo que fue necesario precipitarlas para así poder concentrarlas. Para esto se agrega 1µl de BSA al tubo que contiene el sobrenadante que contiene las proteínas secretadas por los protoplastos y se adicionó a éste tubo ácido tricloro acético (TCA) 100% hasta una concentración final de 20%. Para la homogenización se puso en vortex por 1 minuto y se incubó en hielo por 30 minutos para permitir la precipitación. Se centrifugó 5 minutos a 10.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó el conjunto de proteína precipitada con 100% acetona, se centrifugó nuevamente y se descartó la acetona. Posteriormente se permite que el solvente residual se

evapore del precipitado de proteínas, durante 15 minutos. Finalmente, el precipitado se disolvió en 100µl de NaOH 0.1 N y se guardó a - 80°C.

3.3.8.3.-Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las proteínas presentes en las fracciones obtenidas del ensayo de secreción se utilizó el método de Bradford. La reacción se realizó en un volumen final de 1mL. Se resuspendió la proteína en un volumen final de 500µL y se agregaron 500µL del reactivo de Bradford. Se mezcló y luego se midió la D.O. a 562nm en un espectrofotómetro. Se construyó una curva de calibración utilizando un gradiente de concentración conocida de BSA. Así obtuvimos los valores para las concentraciones de BSA elegidos para la curva. Posteriormente, se interpola el resultado de la medición de proteínas en la curva de calibración.

3.3.8.4.-Análisis de las proteínas secretadas mediante Western blot

Las muestras provenientes del ensayo de secreción fueron analizadas mediante Western-blot para revisar la presencia de AtCPY además de la isoforma presente en el sobrenadante. Para esto fueron separadas en geles SDS-PAGE por lo que fue necesario realizar el paso de denaturación de las muestras. Para ello, se descongeló el sobrenadante y la fracción celular durante 10 segundos a 42°C en un baño termostático. Se añadió tampón de carga a la muestra hasta la concentración 1x y se incubaron a 100°C durante 5 minutos en un baño seco. Las muestras se almacenaron a - 80°C hasta su utilización.

Para western blot se utilizaron geles SDS-PAGE al 12% de agarosa, cargando en el primer carril una concentración de 40µg de proteína total proveniente de un extracto celular a modo de control positivo donde observamos las isoformas presentes de la proteína AtCPY (Zouhar y col. 2004), y volúmenes iguales de 20µl para los carriles donde se cargaron los sobrenadantes provenientes del ensayo de secreción. Posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa utilizando un trans blot. Se bloqueó la membrana con TTBS leche 5% P/V en agitación durante dos horas a temperatura ambiente (W. Neal Burnette, 1981).

Para detectar la proteína de interés, AtCPY, se utilizó como anticuerpo primario suero de Conejo anti-AtCPY, suero hecho en el laboratorio de Natasha Raikhel, en una dilución 1:300 en TTBS 1% P/V de leche. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:10.000 en TTBS 1% P/V de leche, ambos se mantuvieron en agitación y a temperatura ambiente durante tres horas.

Para revelar se utilizó 10mL de tampón alcalino con cloruro de tetrazolio nitro-azul (NBT) 0,33mg/ml y sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato (BCIP) 0,33 mg/ml sobre la membrana, una vez aparecidas las bandas se detuvo la reacción con 10mL de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 20mM pH 8,0.

3.3.9.-Tinción con FM4-64 de protoplastos

Se realizó el ensayo de tinción con FM4-64 el cual es un fluoróforo que se une a membrana plasmática y tiene un ingreso secuencial a la célula mediante endocitosis marcando las estructuras del sistema de endomebranas (Bolte y col. 2004). Se agregó el FM4-64 hasta una concentración de 50µM a una preparación de protoplastos provenientes desde plantas crecidas en medio MS líquido. Los protoplastos son mantenidos en solución W5 al cual se agregó el fluoróforo. Se incubó durante 10 minutos a 4 °C para permitir la unión del FM4-64 a la membrana plasmática y luego a temperatura ambiente para observar la internalización del marcador a diferentes tiempos mediante microscopia confocal excitando con el láser 543nm. La señal fluorescente del FM4-64 se recogió a 640nm.

3.3.10.-Tinción de la pared celular en protoplastos

Para el ensayo de tinción de la pared celular se utilizó calcoflúor White que es un fluoróforo que se une a celulosa en la pared celular (Sigma-aldrich). El modo de utilización fue agregando un

volumen de calcoflúor white a una concentración de 0.1% V/V directamente sobre una muestra de protoplastos en el portaobjetos. Se incubó durante un minuto a temperatura ambiente y se observó en un microscopio de epifluorescencia excitando con luz UV a una longitud de onda de 365nm con emisión a 435nm (sigma-aldrich.com).

3.3.11.-Ensayo de transformación transitoria en protoplastos

Para este tipo de transformaciones se utilizó un vector no integrativo, así queda como un elemento extracromosomal, y la ventaja es que posee una mayor eficiencia que la transformación estable, además permite una detección temprana de la expresión de la proteína de interés (Yansong Miao & Liwen Jiang, 2007).

Para este experimento se utiliza un vector no integrativo pCAMBIA1300MCS el cual lleva inserto el gen de la proteína Aleurina, la que posee el epítipo hemaglutinina humana del virus influenza (HA) el cual permite su reconocimiento en ensayos de western blot, además del vector sin inserto como control.

El ingreso del vector se realizó mediante la adición al medio de PEG que permite desestabilizar las membranas de los protoplastos y así poder hacer ingresar el DNA a los protoplastos.

La extracción completa de protoplastos con $2,0 \times 10^7$ células/mL se concentró mediante centrifugación suave (600 rpm) y se resuspendió en solución MaMg, 300µL por cada evento de transformación. Se preparó aproximadamente unos 2,5 mL de la solución de PEG descrita en el apartado soluciones. La solución se calentó en el microondas de manera cuidadosa para evitar la desecación de la solución de PEG, hasta que se disuelvan los sólidos, luego se dejó enfriar la solución de PEG antes de mezclarlo con los protoplastos, para no dañarlos.

A cada condición (Vector con inserto y sin inserto) se agregó 25µg de DNA y 300µL de solución de PEG frío, se mezclan cuidadosamente utilizando la pipeta con la punta cortada para aumentar su diámetro y así no dañar a los protoplastos. Luego se incubó a 25 °C durante 30 minutos.

Una vez transcurrida la incubación es necesario retirar el PEG de la solución por lo que se diluyó mediante adiciones de W5. Se agregaron 700 μ L de W5 y se mezclaron cuidadosamente utilizando la punta de la pipeta cortada, luego 1mL de W5 y mezclar rotando el tubo, entonces se agregaron 2ml de W5. Para recuperar los protoplastos se centrifugó la solución a 600 RPM durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron los protoplastos de cada condición de transformación en 1ml de W5.

Luego del procedimiento de transformación, los protoplastos se llevaron al incubador durante 24 a 48 horas y posteriormente se aíslan las proteínas de cada condición de transformación para análisis de western blot (ver sección 4.2.4 de resultados).

4.-Resultados

4.1.- Estandarización de la extracción, purificación y mantención de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*.

Teniendo como referencia los distintos métodos de obtención de protoplastos descritos por Nagata y Takebe en 1970; Dovzhenko y col, 2003; Mathur y col, 1995 y Wu y col, 2009, entre otros, se probaron las extracciones de protoplastos propuestas y se conservaron las soluciones que dieron mejor resultado, que finalmente nos permitieron establecer un nuevo protocolo en el laboratorio, el que quedó luego del ensayo de las soluciones propuestas por estos, definido de la siguiente manera (figura 4). Paso 1: Utilizando una solución de enzimas (ver sección 3.2.1 de materiales y métodos) preparada en el momento, se agregan plantas de *Arabidopsis* de tres semanas. La solución de enzimas con las plantas se incubó en agitación extremadamente suave durante 15 horas. Paso 2: Luego de las 15 horas de agitación, aún queda tejido vegetal no disociado, por lo que es preciso filtrar la solución mediante un poro 100µm, lo que permite el paso de los protoplastos extraídos desde el tejido vegetal y retiene el tejido no disociado. Paso 3: El filtrado se recoge y se pone sobre una solución de sacarosa 21% P/V cuidando de no mezclar ambas fases. Este paso permite la purificación de los protoplastos en buen estado, ya que estos flotarán sobre la fase de sacarosa, frente a los protoplastos dañados que sedimentan. Paso 4: La fase que contiene los protoplastos en buen estado se diluye en solución W5 lo que permite la dilución de las enzimas del medio, que de no ser retiradas seguirían afectando a los protoplastos evitando que éstos puedan recuperar la pared celular en pasos posteriores. Paso 5: Se resuspenden los protoplastos para revisar el estado general de éstos mediante microscopía óptica y contarlos utilizando una cámara de Petroff-Hausser de manera de calcular el rendimiento de la extracción.

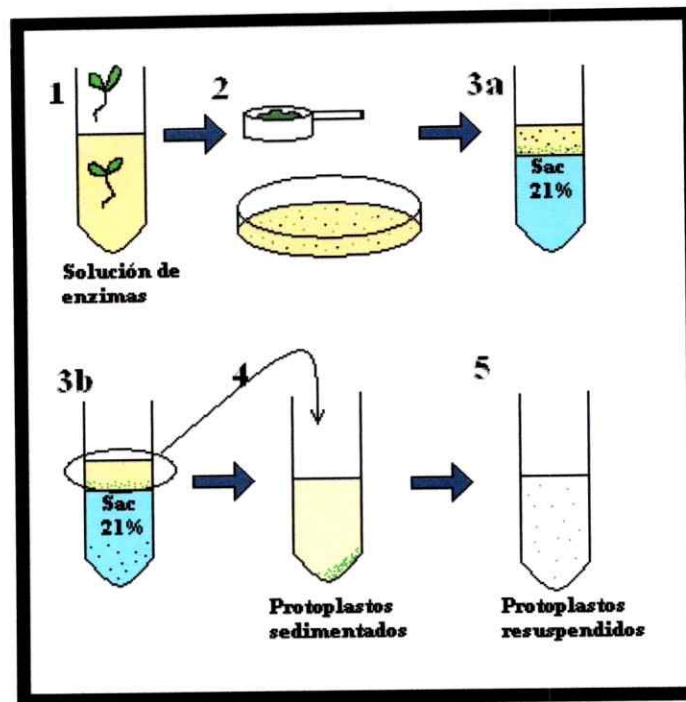


Figura 4.-Protocolo para la obtención de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. Resumen gráfico-secuencial de los pasos necesarios para la obtención de protoplastos desde plantas completas. Paso 1 – Incubación de las plantas en la solución preparada para la digestión de la pared y dejar en agitación lenta durante 15 horas. Paso 2 – separación del tejido no disociado de los protoplastos mediante filtración. Paso 3a – Purificación de los protoplastos mediante flotación sobre colchón de sacarosa. Paso 3b – Centrifugación y recuperación de la fase superior que contiene los protoplastos intactos, sin impurezas. Paso 4 – Centrifugación agregando y retirando medio W5 para diluir las enzimas de digestión de pared. Paso 5 – Resuspensión de protoplastos en medio W5 para contarlos y su posterior almacenaje a 4°C hasta su utilización.

En la obtención de protoplastos hay que tener en cuenta la fragilidad mecánica de éstos dado la ausencia de pared celular. Por ello, se debe proceder con extremo cuidado en las manipulaciones que se realicen, tales como las resuspensiones, las que deben ser suaves, y las transferencias de medio en las cuales se deben usar puntas de micropipetas cortadas en la punta para aumentar su lumen y así no someter a estrés mecánico innecesario a los protoplastos. Todas estas medidas permiten evitar la pérdida de protoplastos y obtener un buen rendimiento de las células en perfectas condiciones para utilizar en los experimentos.

Para evaluar el método de obtención de protoplastos es necesario revisar el estado general de los protoplastos obtenidos (Figura 5), su integridad y la calidad de la purificación (baja presencia de restos celulares en el sobrenadante), con el fin de asegurar resultados reproducibles y confiables en los ensayos en los que estos puedan ser utilizados.

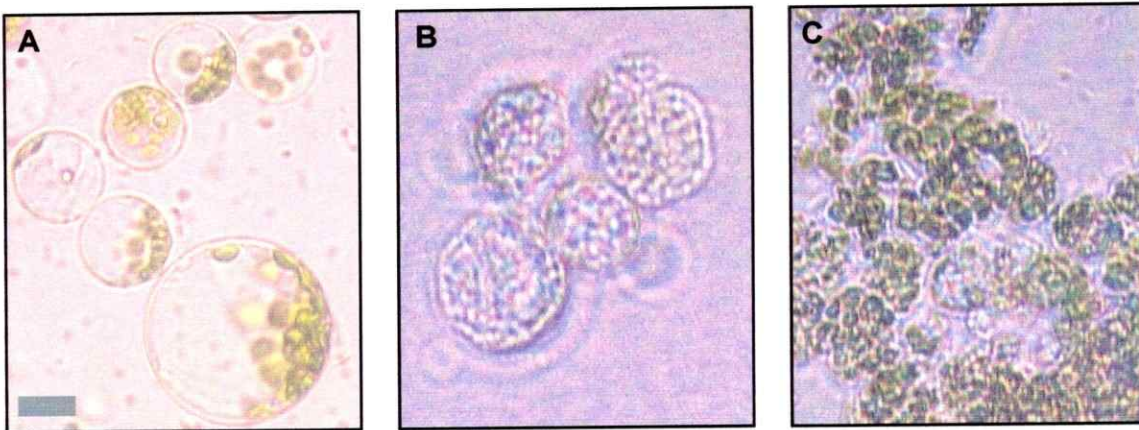


Figura 5.- Evaluación de la integridad de protoplastos aislados de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Imágenes utilizando microscopía óptica que ejemplifica los estados en que es posible encontrar los protoplastos una vez finalizada la extracción: A.- protoplastos integros, B.- protoplastos deteriorados y C.- protoplastos lisados. La barra de tamaño corresponde a 10 μ m.

Otro punto importante en experimentos que se vayan a utilizar los protoplastos extraídos, es necesario trabajar con un número constante de protoplastos por lo que es esencial el recuento de estos. El conteo se hace en una cámara de Pretroff-Hausser que es un portaobjetos que junto al cubreobjetos genera una cámara de volumen conocido. Posee un cuadrículado de medidas

conocidas que nos permite calcular el número de células en un volumen de suspensión (Bakker y col. 2007). El conteo se realiza por duplicado en cada muestra y descartando el resultado si ambos no concuerdan en orden de magnitud, procediendo nuevamente a contar.

Para la mantención de los protoplastos fue necesario ensayar todas las soluciones en que estos fueran a ser sometidos (descritas en la sección 3.2 de materiales y métodos) a fin de revisar el comportamiento de los protoplastos frente a éstas. De esta forma se vió la importancia de la osmolaridad de las soluciones que se utilizan con los protoplastos debido a que algunas de las soluciones ensayadas producían la lisis o la crenación de los protoplastos. Este fue el caso de la solución MaMg utilizada para resuspender los protoplastos en el protocolo de transformación (Sección 3.2.1 de materiales y métodos). Esta solución se encontraba descrita según literatura conteniendo 0,4M de manitol, pero producía la lisis celular inmediata. En cambio con 0,5M manitol, según se describe en Mathur y Koncz, permitió que los protoplastos se mantengan en buen estado y sin cambios de volumen observables (datos no mostrados).

Como se observó un buen comportamiento de los protoplastos, en lo que se refiere a forma y volumen celular al prepararlos con la solución W5, fue necesario revisar su sobrevivencia en esta solución. Esto debido a que los posteriores ensayos en que estos pueden ser utilizados requieren la sobrevivencia de los protoplastos por varios días. Entonces, luego de la extracción de protoplastos, estos se pusieron en solución W5 y se monitoreó el número de células durante tres días como se observa en la figura 6 que muestra un ensayo representativo. Se observa un decaimiento en el número de protoplastos, sin embargo a las 48 horas de incubación aún 50% de los protoplastos se encuentra integro de acuerdo a la observación en el microscopio (figura 7). Posterior a las 72 horas, el número de protoplastos va decreciendo con una pendiente negativa suave, aunque siguen conservándose integros. El conteo de los protoplastos se vuelve poco confiable ya que los restos provenientes desde protoplastos lisados impiden una correcta resuspensión. Además, la concentración de células cae por debajo de la capacidad de conteo de la cámara de Petroff-Hausser (1×10^6 células/mL). Entonces se revisó, mediante microscopía óptica, la presencia de protoplastos en el decantado del tubo en el cual son mantenidos. De esta manera es posible observar protoplastos sanos, manteniendo su forma esférica durante ocho días después de

extraídos, como vemos en las imágenes de la figura 7 donde se observan protoplastos siendo mantenidos en solución W5 desde su extracción hasta ocho días después. Se observa que los protoplastos están en buen estado manteniendo su forma esférica característica.

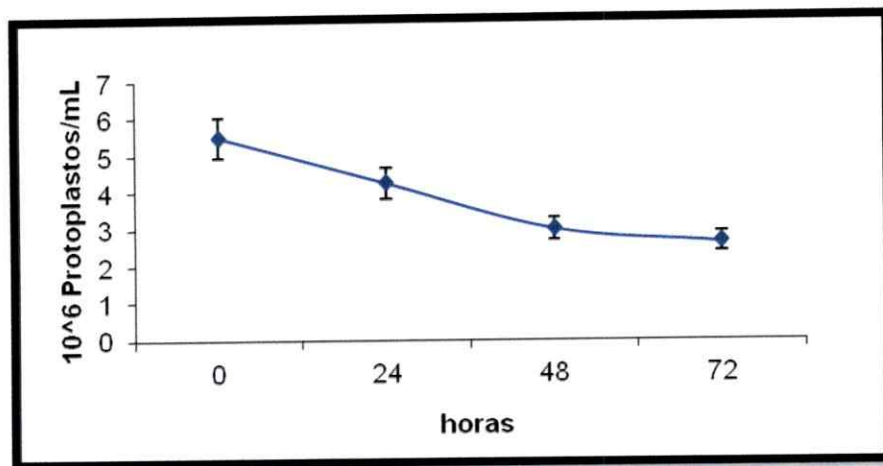


Figura 6.- Sobrevida de los protoplastos mantenidos en medio W5. La gráfica muestra el número de células/mL al incubar protoplastos en medio W5 a 22°C en condiciones de fotoperiodo. Para el conteo se utilizó una cámara de Petroff-Hausser. La figura muestra un experimento representativo de tres experimentos que mostraban la misma tendencia. Las barras muestran el error estándar promedio.

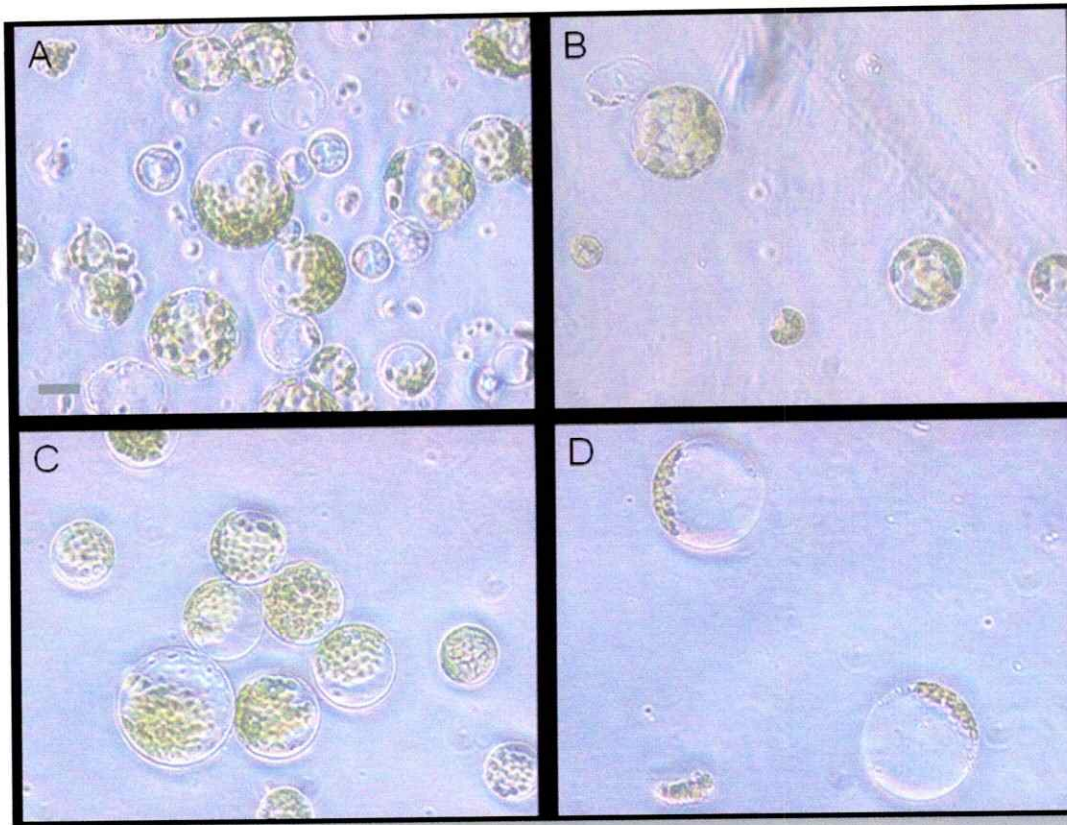


Figura 7.- Curso temporal de protoplastos mantenidos en solución W5 durante ocho días desde la purificación. Se observan mediante microscopía óptica protoplastos mantenidos en medio W5. A.-Día 1, B.-Día 2, C.-Día 4, D.-Día 8. Barra de tamaño: 10 μ m.

4.2.- Establecer ensayos de biología celular utilizando protoplastos.

Para poder validar como herramienta biotecnológica la utilización de protoplastos es necesario revisar su comportamiento frente a técnicas moleculares comunes, ya que éstos son muy sensibles dado que no poseen pared celular, la que normalmente le brinda soporte mecánico a las células.

4.2.1.-Evaluación del estado de la ruta endocítica en protoplastos.

Está descrito que la pared celular interactúa con el citoesqueleto (Szymanski y Cosgrove 2009) por lo que podrían haber procesos celulares alterados en los protoplastos. Esto hace necesario revisar si el citoesqueleto sigue funcionando correctamente como por ejemplo en el transporte de vesículas del sistema de endomembranas. Para evaluar este proceso en protoplastos, analizamos el estado de la ruta endocítica y así es posible aportar una evidencia sobre el transporte intracelular que está mediado por el citoesqueleto.

Con el fin de revisar el comportamiento de la ruta endocítica se utilizó el trazador endocítico FM4-64 (Vida y Emr 1995). Este trazador es un fluoróforo capaz de marcar membranas, lo que nos permite registrar su ingreso secuencial hacia la célula, el cual es mediado por endocitosis. FM4-64 se une primero a la membrana plasmática, luego secuencialmente se ubica en endosomas y finalmente en la vacuola. Para visualizar el fluoróforo se utiliza microscopía confocal que además nos permite realizar cortes ópticos dentro de la célula.

Como vemos en la figura 8, al incubar los protoplastos con FM4-64 observamos repetido el comportamiento descrito para la ruta endocítica en células vegetales en los protoplastos vegetales obtenidos (Bolte y col. 2004). Podemos observar el comportamiento del trazador en dos células distintas pero con distinto corte óptico e igual temporalidad desde la incubación con FM4-64 (100 minutos), en que podemos observar al fluoróforo marcando membrana plasmática, endosomas, compartimento prevacuolar y tonoplasto, que corresponde a la membrana vacuolar. Este resultado conseguido por triplicado indicaría que el proceso de endocitosis es activo en protoplastos y con la misma temporalidad de ingreso que la descrita para tejidos vegetales, lo que sugiere un correcto funcionamiento de la vía endocítica.

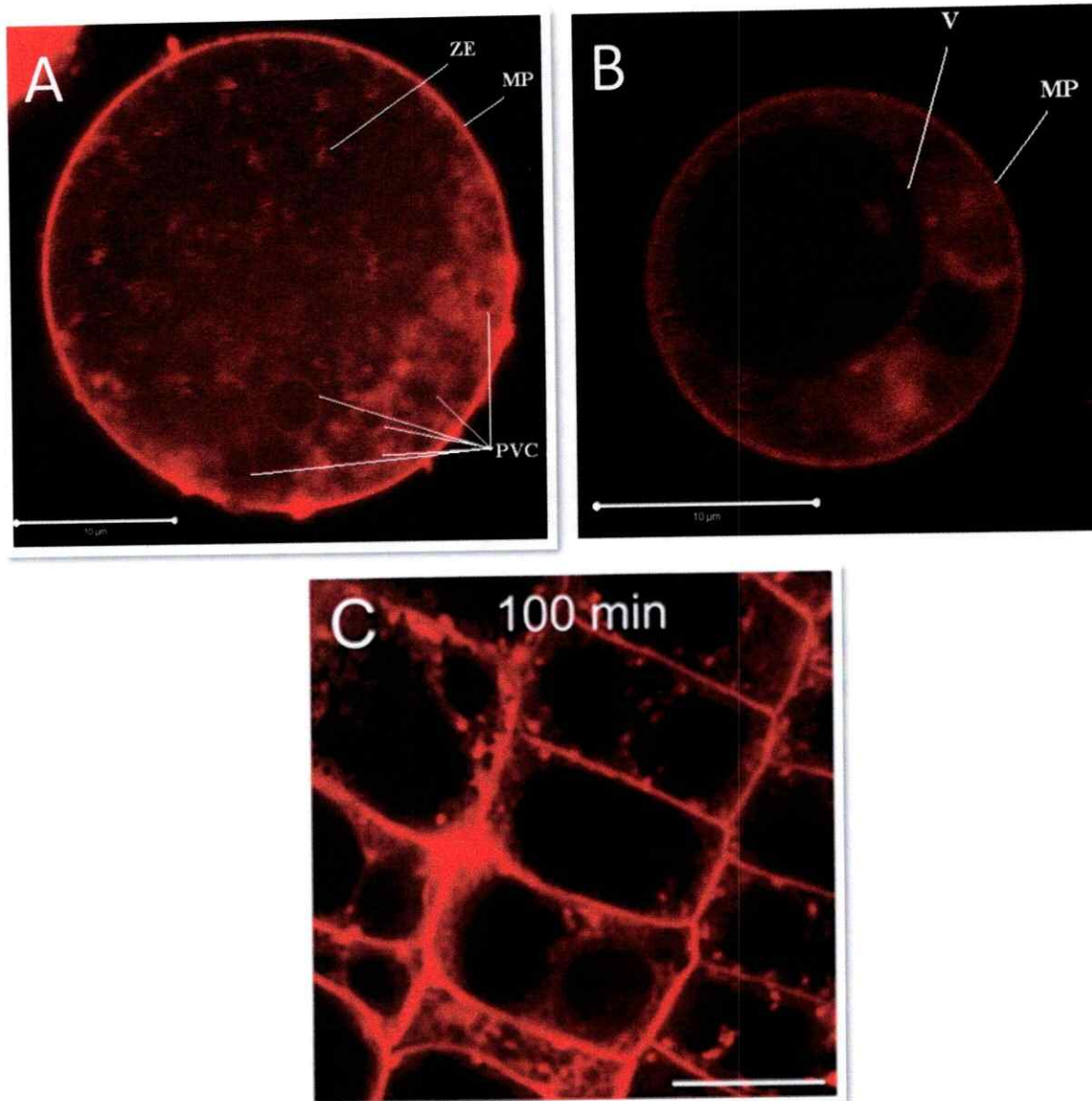


Figura 8.- Evaluación de la ruta endocítica en protoplastos. Los protoplastos fueron incubados con FM4-64 durante 100 minutos y observados mediante microscopía confocal. Se muestran dos células distintas. A.- Corte óptico donde se observa el trazador localizado en membrana plasmática (MP), además al interior del protoplasto observamos una zona rica en endosomas (ZE) que se observan en forma de pequeños puntos. También se observa el complejo prevacuolar (PVC) en forma de argollas. B.- Corte óptico donde la tinción muestra al trazador FM4-64 marcando la membrana plasmática (MP) y la vacuola (V). C.- FM4-64 en tejido vegetal de *Arabidopsis thaliana* luego de 100 minutos para comparación de las estructuras marcadas (Gu and Innes, 2011). Barra de tamaño 10µm.

4.2.2.-Ensayo de secreción en protoplastos.

Se ha mostrado que la droga Sortin1 produce en cultivos celulares vegetales la secreción de la proteína AtCPY que posee destinación vacuolar (Zouhar y col. 2004). Entonces, con el fin de revisar la ruta secretoria en protoplastos, se realizó un experimento de secreción utilizando la droga Sortin1 para revisar si la droga se encuentra afectando de la misma forma a cultivos celulares como a protoplastos.

A una preparación de protoplastos recién obtenida se incubó durante 24 horas utilizando dos concentraciones de Sortin1, 12,5mg/L y 25mg/L además de la situación control que tiene 0,5% de DMSO que se utiliza para solubilizar a Sortin1

Posteriormente, se realiza el conteo celular para revisar la sobrevivencia de los protoplastos en presencia de Sortin1 debido a que no conocemos el grado de toxicidad para esta droga en protoplastos, (figura 9). Podemos observar una alta letalidad de protoplastos en Sortin1, sin embargo vemos que DMSO no estaría afectando la sobrevivencia de los protoplastos. En la concentración 12,5mg/L de Sortin1 se obtiene el 26,5% de protoplastos aún vivos, lo que corresponde a 2.25×10^6 protoplastos. Este es un número apropiado para seguir adelante con el experimento. Entonces, considerando válidos los números obtenidos de sobrevivencia de protoplastos en 12,5mg/L de Sortin1 se procede a la cuantificación de proteínas totales de las muestras, tanto en la fracción celular como en el sobrenadante, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 1. Es posible observar una mayor cantidad de proteínas reconocidas por el anticuerpo en el sobrenadante de las muestras tratadas con Sortin1. Este resultado permite sugerir que se produjo la secreción generalizada de proteínas, entre ellas de AtCPY debido a la presencia de Sortin1 o bien la proteína obtenida del sobrenadante es producto de la lisis de los protoplastos. Es por ello que intentamos detectar AtCPY en el sobrenadante de los protoplastos sometidos a tratamiento con Sortin1 y en los extractos celulares de los protoplastos de la situación control para detectar AtCPY y sus isoformas tempranas, para así poder confirmar si hubo o no secreción y en que estado de maduración se encuentra la proteína secretada.

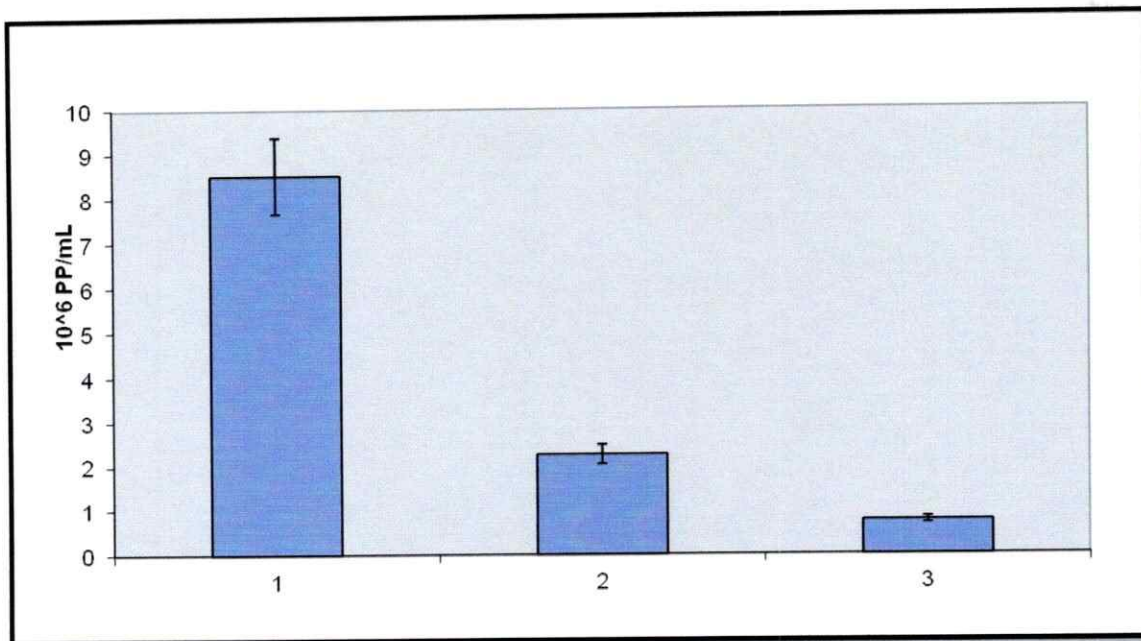


Figura 9.- Ensayo de sobrevivencia de protoplastos frente a la adición de Sortin1 al medio de cultivo. Sobrevivencia de protoplastos frente a la incubación con Sortin1. Los protoplastos son mantenidos en 2mL durante 24 horas en Sortin1. 1.-Condición control, con 0.5% de DMSO, 2.- 0.5% DMSO y 12,5mg/l de Sortin1, 3.- 0.5% DMSO y 25mg/l de Sortin1. Las barras de error muestran la desviación estándar promedio.

Tabla I.- Cuantificación de las proteínas obtenidas del ensayo de secreción de protoplastos en Sortin1. Cuantificación mediante el método de Bradford de la proteína presente en los sobrenadantes y la fracción celular del ensayo de secreción de protoplastos en Sortin1. Ensayo realizado por triplicado técnico entregando el promedio de las mediciones.

	Fracción celular (μg de proteína total)	Sobrenadante (μg de proteína total)
Control	$2,33 \times 10^3$	$5,08 \times 10^2$
12,5 mg/L Sortin1	$1,51 \times 10^3$	$9,90 \times 10^2$
25 mg/L Sortin1	$1,02 \times 10^3$	$9,12 \times 10^2$

4.2.2.1.-Detección de AtCPY en el ensayo de secreción.

Debido a que suponemos la proteína AtCPY estaría siendo secretada al medio desde protoplastos bajo la influencia de Sortin1, es necesario identificar AtCPY mediante anticuerpos y de esta forma revisar si se encuentra presente en el sobrenadante del ensayo de secreción mediante western blot. Este ensayo permite detectar además de AtCPY las etapas anteriores a la proteína madura presentes en el retículo endoplásmico. AtCPY posee tres isoformas: precursor de 60KDa, intermediario de 48KDa y proteína madura de 24KDa presente en la vacuola (Zouhar y col. 2004). Se utilizó un extracto celular de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* como control positivo para que fuese posible detectar la presencia de todas las isoformas de AtCPY que en condiciones normales se encuentran dentro de la célula. Aunque la estandarización del anticuerpo primario fue difícil finalmente se llegó a determinar la concentración de suero anti-AtCPY de conejo en 1:300, detectando con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina. Al revelar se produce un precipitado de color rosado marcando la ubicación de AtCPY en la membrana, obteniéndose el resultado representativo de cinco ensayos mostrado en la figura 10. Observamos como resultado del Western blot una banda de alrededor de 24KDa que correspondería a la proteína AtCPY madura de intensidad similar en todos los pocillos cargados con sobrenadante, pero en la condición control (S1) se observa una menor intensidad de la banda (recuadro inferior figura 10). En cambio, para la banda que correspondería al intermediario de 48KDa es posible solamente observarlo en el control positivo, ya que en las muestras de sobrenadante casi no se detecta, viéndose algo más marcado en la muestra de sobrenadante sometida a Sortin1 25mg/L (recuadro medio figura 10). La banda que correspondería al precursor de 60KDa se detecta débilmente en el control positivo y en las muestras de sobrenadante con 12,5 y 25mg/L de Sortin1, proveniente posiblemente de una secreción alterada o bien de los protoplastos lisados (recuadro superior figura 10). Estos resultados nos llevan a pensar que podría existir secreción alterada y selectiva de proteínas en los protoplastos sometidos a tratamiento con Sortin1 debido a que la intensidad de las otras bandas correspondientes a formas inmaduras de la proteína AtCPY en el sobrenadante no aumentan notoriamente a medida que aumenta la

concentración de Sortin1 en el medio y por lo tanto no correspondería a un aumento debido solo a la lisis celular.

Las otras bandas marcadas y no mencionadas se deben a la inespecificidad que presenta el suero anti-AtCPY quedando como evidencia que reconoce incluso la banda correspondiente a 17KDa del estándar de tamaño molecular. Y la banda de cerca de 30KDa que es reconocida por el anticuerpo secundario como se muestra en la figura 11, que corresponde a un ensayo de western blot en el que se hibrida solo el anticuerpo secundario sobre un extracto de proteína de *Arabidopsis thaliana*. Por lo que nos muestra solo las inespecificidades presentadas por el anticuerpo secundario.

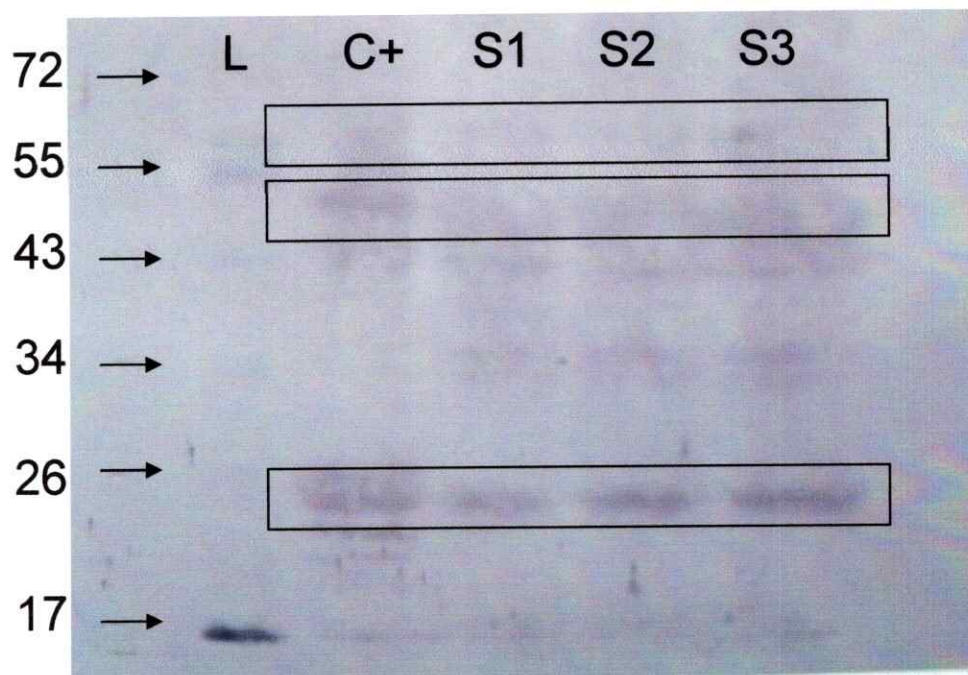


Figura 10.- Ensayo de secreción en protoplastos. Gel representativo de cinco ensayos mostrando la detección de AtCPY mediante Western blot. Los carriles corresponden a estándar de peso molecular (L), extracto celular o control positivo (C+) utilizado para ver las isoformas de AtCPY, sobrenadante de la condición control del ensayo de secreción (S1), sobrenadante de la condición 12,5mg/L de sortin1 (S2) y sobrenadante de la condición 25mg/L sortin1 (S3) Los recuadros representan los pesos esperados para las isoformas de AtCPY.

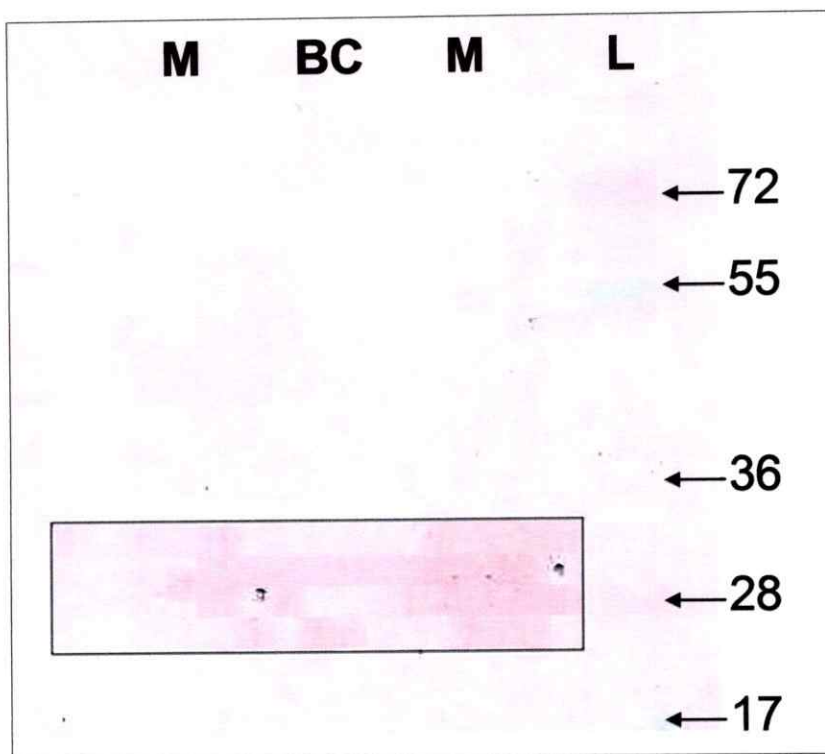


Figura 11.- Revisión de la inespecificidad del anticuerpo secundario. Western realizado hibridando sobre la membrana de nitrocelulosa solo con el anticuerpo secundario. Ensayo realizado en una muestra de una extracción proteínas desde un extracto celular de *Arabidopsis thaliana* (M). Podemos observar en el recuadro una banda inespecífica que correspondería a una proteína detectada inespecíficamente por el anticuerpo secundario. (L) corresponde al estándar de peso molecular, (BC) corresponde a tampón de carga utilizado como espaciador entre las muestras.

4.2.3.-Tinción de la pared celular de protoplastos

Para saber en cuanto tiempo se recupera la pared celular de los protoplastos, se realizó un ensayo con calcoflúor White, un fluoróforo que permite visualizar polímeros de celulosa (Jens y col. 2007) presentes en la pared celular de los protoplastos. De esta forma sabremos en que momento recuperan su protección mecánica los protoplastos, que puede resultar favorable o desfavorable dependiendo del experimento a realizar.

La tinción fue aplicada sobre distintas muestras de protoplastos sometidos a soluciones de mantención que corresponden a W5 y W5 con ácido α -naftilacético (NAA), en diferentes tiempos hasta seis días (datos no mostrados) sin lograr encontrar mayores diferencias en los protoplastos sometidos a tinción con Calcoflúor White. Razón por la cual se probó el ensayo con protoplastos que habían sido mantenidos por 10 días en W5 modificado, que es un medio nutritivo y que teóricamente permitiría la regeneración de la pared celular de los protoplastos. Los resultados se muestran en la figura 12, donde se logró observar pequeñas diferencias entre las muestras teñidas. En la figura 12A se observa un protoplasto en condiciones controles, sin el fluoróforo, donde solo es posible observar la fluorescencia basal de los cloroplastos. Al realizar la tinción se observa un protoplasto con un patrón punteado en la superficie de la célula (Figura 12B). Se esperaba una fluorescencia uniforme sobre la membrana plasmática del protoplasto lo que permitiría definir de mejor manera la existencia de una nueva pared celular. Posiblemente la recuperación de otros polisacáridos ocurre antes que la recuperación de la celulosa, o la recuperación de la pared celular no es de manera uniforme, razón por la que no se observa la fluorescencia uniforme esperada de forma teórica sobre la membrana plasmática de los protoplastos.

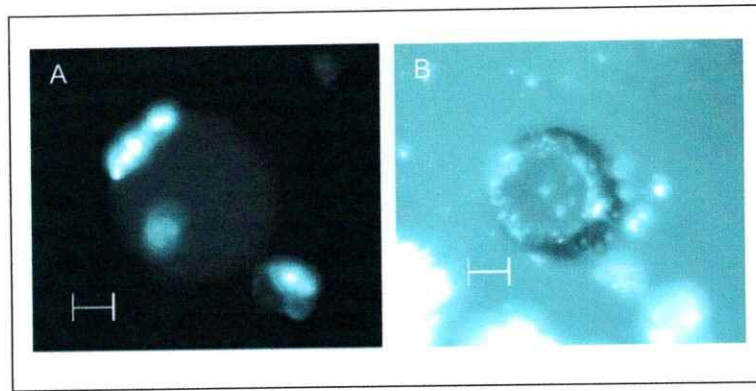


Figura 12.- Ensayo de recuperación de pared celular en protoplastos. Protoplastos vistos mediante epifluorescencia A.- Condición control, protoplasto sin fluoróforo. La fluorescencia que se observa dentro de la célula corresponde a cloroplastos (Autofluorescencia), B.- Protoplasto incubado con calcoflúor White, la fluorescencia se observa en un patrón punteado en la superficie de la célula. Barra de tamaño 10µm.

4.2.4.-Ensayo de transformación transtoria en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

El ensayo de transformación se realizó en tres oportunidades utilizando los vectores de expresión transitoria de la proteína aleurina con epitopo HA para poder ser detectado mediante western blot. Además, como condición control se utilizó el vector sin el inserto de aleurina HA. A pesar de que se utilizó cuidadosamente el método del PEG (Martínez-Zapater & Salinas, 1998) en todas las oportunidades los protoplastos resultaron lisados luego del paso con PEG, revisado el estado mediante microscopía óptica. Por lo que para este ensayo se propone utilizar algún otro procedimiento como por ejemplo electroporación (Yansong Miao and Liwen Jiang. 2007).

4.3.-Micropropagación de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*.

El ensayo de micropropagación se refiere a generar una planta completa desde un protoplasto. La importancia de este ensayo se proyecta ante futuros experimentos para lograr recuperar plantas transgénicas completas desde protoplastos transformados establemente. Para llevar a cabo este objetivo fue necesario ensayar distintos medios propuestos en literatura que fuesen capaces de producir división celular sostenida de los protoplastos.

En la tabla II está descrita la composición de las soluciones evaluadas en protoplastos para lograr su división. Las soluciones obtenidas desde literatura no dieron un buen resultado. La solución descrita por Koop en 1997 produjo la crenación de los protoplastos, lo que nos indicaría que la solución descrita sería hipertónica. La solución descrita por Mathur y col. en 1995 produjo la lisis de los protoplastos que se utilizaron en el ensayo, por lo que suponemos resulta una solución hipotónica para protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. Por lo anterior fue necesario obtener primero una mezcla nutritiva que fuese capaz de permitir la sobrevivencia de los protoplastos obtenidos y se produjera la división de estos. Entonces, utilizando información desde la literatura acerca de divisiones en protoplastos vegetales y además con el antecedente de la capacidad de la solución W5 para mantener protoplastos, se buscó establecer una modificación nutricional a la solución W5. Primero, se intentó agregando al medio la hormona auxina ácido naftalen acético (NAA), pero este medio solo aumentó levemente la sobrevivencia de los protoplastos (Datos no mostrados). La segunda modificación que se hizo a la solución W5 fue más completa y se encuentra detallada en la sección 3.2.1 de materiales y métodos. Esta solución se formuló utilizando las cualidades nutritivas que brinda el agua de coco (Gopikrishna y Col. 2008). Entonces se agregó un 2% de esta según lo descrito por Dovzhenko y Col. 2003 en W5 más una combinación de las auxinas IAA (ácido 3-indolacético) y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). De esta forma se logró conseguir la modificación a la solución W5 que permitió obtener a las cuarenta y ocho horas eventos de división en algunos protoplastos y con el pasar de los días conseguimos cada vez más eventos de división. El desarrollo temporal de los eventos de división hacia la formación de microcolonias se muestra en la figura 13. Para que se den las divisiones sostenidas es necesario mantener el nivel

nutricional del medio en que se encuentran los protoplastos, esto se hace posible mediante el cambio del medio W5 modificado cada 48 horas.

Tabla II.- Soluciones evaluadas en este trabajo para conseguir la división sostenida en protoplastos. Medios nutritivos probados para micropropagar protoplastos con su referencia, composición y el resultado obtenido en protoplastos.

Solución	Composición	Resultado
Koop 1997	MgSO ₄ x7H ₂ O 746 mg/l, CaCl ₂ x2H ₂ O 450 mg/l L-glutamina 50 mg/l, hidrolizado de caseína 100 mg/l, agua de coco 20 ml/l, Dicamba 3 mg/l, NAA (ácido α-naftilacético) 0.5 mg/l.	Crenación de los protoplastos
Mathur y col.1995	0.5MS medio, IAA 2mg/L, 2.4-D 0,5mg/L	Lisis total de los protoplastos
W5 modificación 1	Solución W5, NAA 0,5mg/L	Mantención de protoplastos sin lograr división con sobrevivida de 10 días.
W5 Modificación 2	Solución W5, agua de coco 2%, IAA 2mg/L, 2.4-D 0,5mg/L.	Mantención de protoplastos y divisiones a las 48 horas, con formación de microcolonias a los 6 días.

Debido a razones prácticas, el objetivo se considera alcanzado con la obtención de microcolonias ya que conseguir las divisiones sostenidas era el paso más complicado. Posteriormente, estas microcolonias deberían ser recuperadas en medios de regeneración para obtener la planta completa.

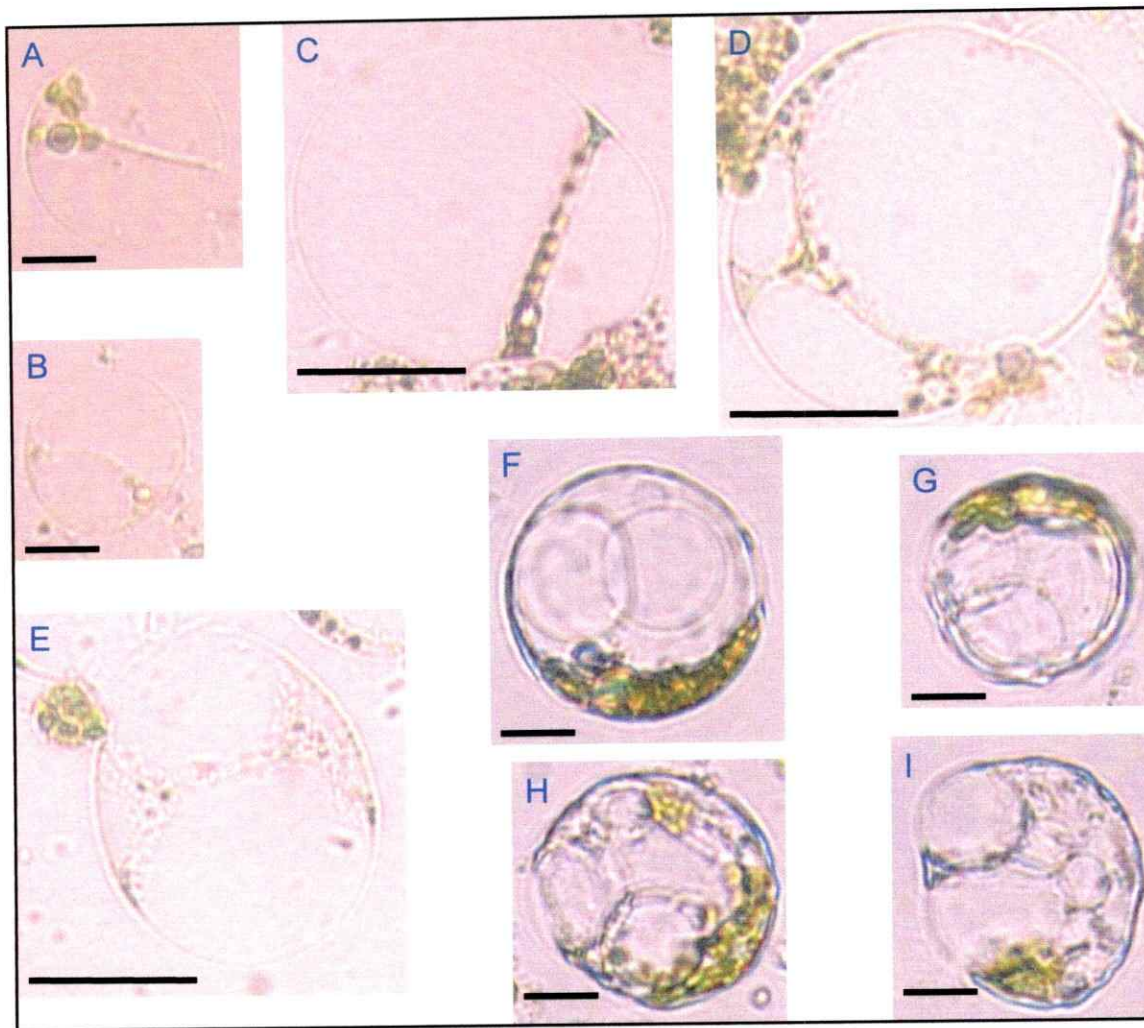


Figura 13.- División sostenida de protoplastos incubados en la solución W5 modificada. Imágenes de microscopía óptica de protoplastos en división mantenidos en solución W5 modificada. A, B, C.- Corresponden a protoplastos en división a las 48 horas. D, E.- Corresponden a divisiones sucesivas luego de 6 días. F, G, H, I.- Corresponden a microcolonias obtenidas a los 9 días post tratamiento con W5 modificado. Barra de tamaño corresponde a 10 μ m.

5.-Discusión

Durante este trabajo se estandarizó la obtención de protoplastos, una técnica etiquetada como complicada dadas las restricciones presentadas debido a la fragilidad de estas células vegetales sin pared celular.

Los protoplastos vegetales obtenidos durante este trabajo soportaron adecuadamente la manipulación en el desarrollo de distintas técnicas moleculares, demostrando así que es posible utilizarlos en nuestros ensayos cotidianos de laboratorio si tenemos en cuenta sus restricciones mecánicas y osmóticas.

Una vez demostrada la factibilidad de utilización de protoplastos, tanto su obtención como manipulación y mantención es posible hablar sobre las razones y ventajas que presenta esta técnica, además de respaldar el presente estudio en protoplastos. Aunque la técnica en este trabajo se describe para *A. thaliana*, es de importancia tener un protocolo estandarizado de utilización de protoplastos en todo laboratorio de fisiología vegetal, ya que con los principios de manejo que posee la técnica podemos montar ensayos para diferentes especies vegetales. Entre estas especies podemos pensar en algunas especies difíciles de manipular a nivel de laboratorio como especies vegetales de gran tamaño por ejemplo árboles, los cuales por su lento ciclo de vida hacen imposible realizar ensayos en plantas adultas. Sin embargo mediante la técnica de protoplastos es posible realizar ensayos válidos utilizando fragmentos de la planta original.

Otro punto que se considera de gran importancia es el avance realizado en cuanto a la validación de la técnica de protoplastos como células inalteradas metabólicamente, ya que debido a la técnica a que son sometidas podrían presentar comportamientos anómalos. Entonces la validación de la técnica nos permite saber si los resultados obtenidos en protoplastos son propios de las células vegetales o son un artefacto producido por el procedimiento a que son sometidas las células.

Por lo anterior fue de gran importancia hacer la revisión de la ruta secretoria. Es así como observamos resultados similares en tratamientos de Sorfin1 a los resultados encontrados por Zouhar y col. (2004) que fueron realizados a cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*, en ambos

casos es posible sugerir una secreción alterada de proteínas debido a la presencia de la droga Sortin1 en el medio de cultivo.

En este seminario de título se utilizó para detectar la secreción alterada de proteínas la proteína AtCPY. De igual forma es posible teñir un gel de proteínas del sobrenadante con coomasie y ver el aumento de proteínas extracelulares en presencia de Sortin1, aunque en este caso dada la toxicidad de Sortin1 para los protoplastos se descartó debido a la gran cantidad de protoplastos que se lisaron durante los tratamientos. Lo que por si mismo aumenta las proteínas en el sobrenadante. Al hacerlo selectivamente detectando AtCPY constatamos que la forma madura es diferencialmente secretada desde protoplastos expuestos a Sortin1.

También es posible realizar los western blot a los extractos celulares de protoplastos expuestos a Sortin1, de esta forma podemos ver como decrece la presencia de AtCPY intracelular y aumenta AtCPY extracelular.

En cuanto a la validación de la ruta endocítica en que utilizamos el trazador endocítico FM4-64 y nos basamos en los experimentos realizados por Bolte y col. (2004) en plantas, Obtenemos algunas evidencias del normal funcionamiento de esa ruta en protoplastos al observar el marcaje específico de estructuras de la ruta endocítica en estas células dado que se corresponde con el normal comportamiento que se presenta en células vegetales en cuanto a marcaje de estructuras y temporalidad.

Otro punto a discutir es el ensayo de transformación, que si bien no dio resultados positivos a pesar de seguir los pasos descritos por Martínez-Zapater & Salinas (1998) en su libro *Methods in Molecular Biology*, resultando los ensayos realizados en una lisis generalizada de los protoplastos cada vez que se agregó el PEG, nos permite proponer otros tipos de transformación que no sean basados en PEG como por ejemplo la electroporación de protoplastos recién obtenidos. (Yansong Miao and Liwen Jiang. 2007). La transformación de protoplastos permitiría, en conjunto con la técnica de micropropagación, obtener plantas transgénicas completas a partir de partes de plantas en este caso de *Arabidopsis thaliana*, pero pudiendo hacerse extensible a otras especies, además del gran número de células con que se trabaja que podrían generar un gran número de transformantes.

El ensayo de recuperación de pared celular en protoplastos aunque no logró quedar bien definido nos hace pensar en otros polisacáridos aparte de celulosa formando la pared de los protoplastos y sería por esta razón que no observamos una fluorescencia más definida y solo se obtiene un patrón punteado sobre la membrana plasmática. También se podrían realizar ensayos de resistencia osmótica que nos permitan detectar aumentos en la resistencia de los protoplastos atribuibles a la recuperación de la pared celular.

Se obtiene una novedosa y económica solución nutritiva que permite obtener la división sostenida de protoplastos, un punto crítico en la micropropagación. La solución se obtiene a partir de una modificación nutricional al medio W5 utilizando las propiedades que brinda el agua de coco, como son elementos trazas y hormonas (Gopikrishna y col. 2008).

La solución obtenida presenta cortos tiempos para la obtención de divisiones en protoplastos, similares a los tiempos de división obtenidos por Dovzhenko y col. (2003).

Con todo lo anterior este estudio no es solo un ensayo de prueba de un protocolo, sino también una validación del método. Además permite avanzar en la recuperación de protoplastos mediante micropropagación.

Finalmente se consideran alcanzados los objetivos propuestos en un principio para esta técnica y se espera que los avances conseguidos sean un aporte de nuevas herramientas a utilizar en los ensayos de biología molecular en los laboratorios de ciencia.

6.- Conclusiones

Las conclusiones alcanzadas en este trabajo se detallan a continuación:

- Se definió un protocolo reproducible de obtención de protoplastos desde plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- Se establecieron diferentes ensayos a los que se sometieron los protoplastos obtenidos que son de utilidad para conocer el manejo y los alcances del uso de los protoplastos.
- La ruta endocítica, evaluada utilizando el fluoróforo FM-464, se encontró inalterada, por lo que consideramos que esta ruta podría no verse afectada por la técnica a que son sometidos los tejidos vegetales para obtener protoplasto.
- La ruta secretoria, evaluada mediante la secreción de AtCPY por el químico Sortin1, sugiere que en los protoplastos producidos se afecta la ruta secretoria resultando en la secreción de la forma madura de AtCPY, tal como ha sido reportado para cultivos celulares.
- Se encontró una condición experimental que permite lograr la división de protoplastos *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*.
- Se logró que la división de protoplastos fuese sostenida lo que lleva a la obtención de microcolonias de *Arabidopsis thaliana*, paso determinante para la micropropagación.

7. – Proyecciones.

Una vez mejoradas las técnicas de mantención de protoplastos, transformación y micropropagación es posible pensar en el nuevo uso biotecnológico que podemos dar a diferentes especies vegetales sin valor comercial actual agregando vías de síntesis de compuestos de interés comercial, o podemos aumentar el valor de especies ya comerciales al dar resistencia a plagas como por ejemplo con la toxina *Bacillus thuringiensis* o Bt (Broderick y col. 2006).

Dependiendo de los rendimientos alcanzados en micropropagación podemos pensar en una obtención en masa de plántulas de algunas especies en peligro de extinción para su recuperación o para especies de gran valor comercial en que sea necesaria una gran cantidad de ejemplares y una rápida propagación.

Debemos seguir validando la técnica de obtención de protoplastos para entender de mejor manera los resultados entregados por estos en los ensayos realizados, además mejorar por ejemplo la solución de mantención de protoplastos para que podamos almacenarlos durante un mayor tiempo y quizá algún día llegar a almacenarlos tal como las células competentes.

8. – Referencias

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. And Walter, P. 2008. Molecular biology of the cell. Ch. 10, 12 and 13. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, 5º edición.

Bakker, G., Li, C., Miller, R., Cunningham, C., and Charon, W. 2007. Identification of Specific Chemoattractants and Genetic Complementation of a *Borrelia burgdorferi* Chemotaxis Mutant: Flow Cytometry-Based Capillary Tube Chemotaxis Assay. *Applied and environmental microbiology*. 73: 1180–1188.

Bolte, S., Talbot, C., Boutte Y., Catrice O., Read N. D. And Satiat-Jeunemaitre B. 2004. *Journal of Microscopy*. 214: 159–173.

Broderick. N., Raffa. K., Handelsman. J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS*. 41: 15196–15199.

Burnette, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 112:195-203.

Carter, C., Bednarek, S., Raikhel, N. 2004. Membrane trafficking in plants: new discoveries and approaches. *Current Opinion in Plant Biology*. 7 : 701 – 707.

Crowell, E., Bischoff, V., Desprez, T., Rolland, A., Stierhof, ., Schumacher, K., Gonneau, M., Hofte, H. and Vernhettesa, S. 2009. Pausing of Golgi Bodies on Microtubules Regulates Secretion of Cellulose Synthase Complexes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 21: 1141–1154.

Damm, B. And Willmitzer, L. (1988) Regeneration of fertile plants from protoplasts

of different *Arabidopsis thaliana* genotypes. *Molecular and General Genetics*. 213: 15–20.

Davey, R., Paul, A., Brian, J. and Kenneth, C. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*. 23: 131-171.

Dovzhenko, A., Dal Bosco, C., Meurer, J., and Koop, H. U. 2003. Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*. 222: 107–111.

Foresti, O. & Denecke, J. 2008. Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. *Traffic*. 9: 1599 – 1612.

Fu-Hui Wu, Shu-Chen Shen, Lan-Ying Lee, Shu-Hong Lee, Ming-Tsar Chan and Choun-Sea Lin. 2009. Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods*. 5: 1-10.

Gopikrishna, V., Baweja, P., Venkateshbabu, N., Thomas, T., and Kandaswamy, D. 2008. Comparison of Coconut Water, Propolis, HBSS, and Milk on PDL Cell Survival. *Basic Research—Technology*. 34:587–589.

Gu, Y. and Innes, R. 2011. The KEEP ON GOING Protein of *Arabidopsis* Recruits the ENHANCED DISEASE RESISTANCE1 Protein to Trans-Golgi Network/Early Endosome Vesicles. *Plant Physiology*. 155: 1827–1838.

Hafke, J., Furch, A., Reitz, M. and Van Bel Aart J.E. 2007. Functional Sieve Element Protoplasts. *Plant Physiology*. 145: 703–711.

Koop, H.U. 1997. Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Planta* 202: 387–396.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Ch. 3 & 15. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición online.

Martinez- Zapater, J. And Salinas, J. 1998. Methods in Molecular Biology, Vol. 82: Arabidopsis Protocols. Ch. 29. Humana Press.

Mathur, J., Koncz, C. and Zabados, S. 1995. A simple method for isolation, Liquid culture, transformation and regeneration of Arabidopsis thaliana protoplasts. Plant Cell Reports. 14: 221 - 226.

Maureen C., Mc Cann and Carpita, N. 2008. Designing the deconstruction of plant cell walls. Current Opinion in Plant Biology. 11: 314–320.

Moreau P., Brandizzi F., Hanton S., Chatre L., Melsner S., Hawes C. And Satiat-Jeunemaitre B. 2007. The plant ER–Golgi interface: a highly structured and dynamic membrane complex. The journal of experimental Botany. 58: 49 – 64.

Nagata, T. and Takebe, I. 1970. Cell Wall Regeneration and Cell Division in Isolated Tobacco Mesophyll Protoplasts. Planta. 92: 301-308.

Neberführ, A. 2002. Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, RABs and SNAREs. Current Opinion in Plant Biology. 5: 507 – 512.

Richter, S., Voß U. And Jürgens G. 2009. Post-Golgi traffic in plants. Traffic. 10: 819 – 828.

Szymanski, D. and Cosgrove, D. 2009. Dynamic Coordination of Cytoskeletal and Cell Wall Systems during Plant Cell Morphogenesis. Current Biology. 19: 800-811.

Ueda, T. And Nakano, A. 2002. Vesicular traffic: an integral part of plant life. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 513– 517.

Vida, T. and Erm, S. 1995. A New Vital Stain for Visualizing Vacuolar Membrane Dynamics and Endocytosis in Yeast. *The Journal of Cell Biology*. 128: 779-792.

Yansong, M. and Liwen, J. 2007. Transient expression of fluorescent fusion proteins in protoplasts of suspension cultured cells. *Nature Protocols*. 2: 2348- 2353.

Zouhar, J., Hicks, G. and Raikhel, N. 2004. Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in Arabidopsis. *PNAS*. 101: 9497–9501.