

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Regeneración de plantas de Tabaquillo *Nicotiana glauca* a partir de
protoplastos**

Diana Ivonne Ayala Tejada

**Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del Título de B.S en
Biotecnología**

Quito

Diciembre de 2007

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Regeneración de plantas de tabaquillo (*Nicotiana glauca*) a partir de
protoplastos**

Diana Ivonne Ayala Tejada

María de Lourdes Torres, Ph.D
Directora de Tesis y
Miembro del Comité de Tesis

.....

Venancio Arahana, Ph.D
Miembro del Comité de Tesis

.....

Mario Caviades, Ph.D
Miembro del Comité de Tesis

.....

Estella de la Torre, Ph.D
Decana del Colegio de
Ciencias Biológicas y Ambientales

.....

Quito, diciembre 2007

© Derechos de autor
Diana Ayala
2007

Dedicatoria

A mis padres por todo el esfuerzo, la confianza y las enseñanzas dadas a lo largo de mi vida; a mi hermana por la compañía y ayuda en todo momento; a mis compañeros y amigos por la colaboración y amistad y a mi novio por su paciencia y apoyo

Agradecimientos

A María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por toda la ayuda y consejos para la elaboración de este trabajo; a mis compañeros y amigos de laboratorio, especialmente a Carina Villacrés y Andrés Torres, por su colaboración y apoyo. A mis padres y hermana por todo, por la ayuda y el amor brindado a lo largo de mi vida. A mis amigos y amigas por estar a mi lado alentándome para seguir con más ánimo.

Resumen

El presente proyecto busca establecer un protocolo de regeneración de plantas a partir de protoplastos de Tabaquillo (*Nicotiana glauca*). El tabaquillo es una especie silvestre utilizada como patrón de injertos de tomate de árbol (*Solanum betaceae*), en suelos infestados de nematodos, dada su inmunidad al ataque de esta plaga, a la cual el tomate de árbol es susceptible. El injertar plantas es costoso, por esto económicamente sería más adecuado generar variedades de tomate de árbol con mayor resistencia a nemátodos. Esto se ha dificultado porque no se ha encontrado esta resistencia en la especie ni en parientes cercanos. Basado en esto se decidió explorar la posibilidad de transferir genes de resistencia de tabaquillo al tomate de árbol mediante fusión de protoplastos. Una etapa previa es la de establecer protocolos de aislamiento y regeneración de protoplastos en las dos especies involucradas, lo cual fue el objetivo del presente estudio, para el caso del tabaquillo. Se trabajó con plantas in vitro de tabaquillo, una vez aislados los protoplastos se sembraron en forma de gotas en medio Mprot + hormonas (2,4-D, BAP y NAA) hasta que desarrollaron colonias que pudieron aislarse de forma individual y sembrarse en MS + NAA 0.05 mg/L y BAP 4 ppm. Entre las 8 y 11 semanas, se observaron brotes que se transfirieron a medio sin hormonas para la formación de raíces. La aclimatación inició a las 18 semanas de la siembra y a las 21 semanas las plantas de *N. glauca*, obtenidas a partir de protoplastos, se transfirieron a bolsas con tierra. La eficiencia fue de 80-90% en formación de callos y 85% en formación de plantas.

Abstract

The aim of this study is to establish a protocol for plants regeneration from mesophyll protoplasts of Tabaquillo (*Nicotiana glauca*). *N. glauca* is a wild species used to graft tree tomato (*Solanum betaceae*) in soils infested by nematodes, due to its immunity against the attack of this plague in which case the tree tomato is susceptible. Grafting is an expensive process, so it would be economically more useful to generate varieties of tree tomato resistant to nematodes. This has been very difficult because the resistance has not been found within the species, or wild relatives of tree tomato. Based upon this it was decided to search the possibility to transfer resistance genes of tabaquillo to tree tomato through protoplasts fusion. A former stage to obtain this goal is to establish isolation and protoplasts regeneration protocols in the two involved species.

Protoplasts were isolated from plants of tabaquillo cultured in vitro. Once isolated, protoplasts were cultured as drops in Mprot medium supplemented with hormones (2, 4-D, BAP and NAA). When they developed into colonies, they were isolated individually and cultured in MS medium supplemented with NAA 0,05mg/L and BAP 4ppm.

Shoots were observed after 8-11 weeks, and then they were transferred to MS medium without hormones for the induction of roots. The acclimatization began after 18 weeks of the culture of isolated protoplasts, and at the 21st week the plants of *N. glauca* obtained from protoplasts were transferred to bags with soil. The efficiency obtained in this study was 80-90% in shoot regeneration, and 85% in plant formation.

Tabla de Contenido

Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
1. Introducción.....	1
1.1. Género <i>Nicotiana</i>	1
1.2. Origen y Distribución de <i>Nicotiana glauca</i>	1
1.3. Características del cultivo.....	2
1.4. Composición Química de <i>Nicotiana glauca</i>	3
1.5. <i>N. glauca</i> como fuente de muchos estudios por sus características genótípicas	3
1.6. Protoplastos	5
1.6.1. Utilidad de los protoplastos.....	6
1.6.1.1 Fusión o hibridación somática	7
1.6.2. Regeneración de plantas a partir de protoplastos	9
1.6.3. Cultivo in vitro	10
2. Objetivos.....	13
2.1. Objetivo General	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. Justificación.....	13
4. Área de Estudio	14
5. Materiales y Métodos	14
5.1. Materiales	14
5.2. Métodos	16
6. Resultados.....	21
6.1. Aislamiento de Protoplastos	21
6.2. Primeras divisiones celulares y formación de colonias	21
6.3. Frecuencia de división celular y eficiencia en formación de microcallos	22
6.4. Crecimiento de microcallos en Mprot 3% sucrosa y en MS con BAP y NAA	22
6.5. Crecimiento de callos en MS con BAP y NAA.....	23
6.6. Viabilidad de los callos	23
6.7. Aparecimiento de brotes aéreos.....	24
6.8. Enraizamiento.....	24
6.9. Aclimatación de plantas obtenidas a partir de protoplastos.....	25
6.10. Comportamiento de plantas regeneradas en bolsas con tierra.....	26
7. Discusión.....	27
7.1. Aislamiento de Protoplastos.....	27
7.2. Divisiones Celulares y Formación de Microcallos.....	29
7.3. Crecimiento de Microcallos en medio Mprot 3% sucrosa y MS + hormonas.....	31
7.4. Crecimiento de Microcallos en MS + hormonas	32
7.5. Aparecimiento de brotes y raíces.....	32
7.6. Aclimatación	33
7.7. Eficiencia en la formación de callos y plantas regeneradas	34
7.8. Comportamiento de plantas regeneradas en bolsas con tierra	35
8. Conclusiones.....	36
9. Recomendaciones.....	38
10. Bibliografía	39
11. Tablas.....	41
12. Figuras.....	50

Lista de Figuras

11. **Tablas** **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 1: Composición de soluciones y medios utilizados para el aislamiento y cultivo de protoplastos..... **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 2: Condiciones de aislamiento de los protoplastos de la primera fase del proyecto **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 3: Condiciones de aislamiento de los protoplastos de la segunda fase del proyecto **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 4: Número de Protoplastos aislados en los experimentos de la primera fase del proyecto **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 5: Número de Protoplastos aislados en los experimentos de la segunda fase del proyecto **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 6: Tiempos de aparición de brotes y raíces, número de brotes en los callos obtenidos de la primera fase del proyecto..... **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 7: Tiempos de aparición de brotes y raíces en los callos obtenidos de la segunda fase del proyecto **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 8: Aclimatación de plantas de *N. glauca* en la primera fase del proyecto.....**¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 9: Aclimatación de plantas de *N. glauca* en la segunda fase del proyecto**¡Error! Marcador no definido.**
12. **Figuras**..... **¡Error! Marcador no definido.**
Fig 1: Primeras divisiones celulares de *N. glauca*, en medio de cultivo Mprot a) estado de 2 células a los 3 días de la incubación, b) estado de 4 células a los 5 días de la incubación, c) pequeños microcallos observados a los 10 días de la incubación..... **¡Error! Marcador no definido.**
Figura 2: Frecuencia de división celular y eficiencia en la formación de callos.....**¡Error! Marcador no definido.**
Fig 3: Crecimiento de callos obtenidos a partir de protoplastos de *N. glauca* a) en medio Mprot 3% sucrosa y b) en medio MS + BAP 4 ppm / NAA 0.05 mg/L.. **¡Error! Marcador no definido.**
Fig 4: Crecimiento de callos de *N. glauca* en medio MS + BAP 4 ppm / NAA 0.05 mg/L **¡Error! Marcador no definido.**
Fig 5: Brotes de *N. glauca* en medio MS + BAP 4ppm / NAA 0,05 mg/L a) a las 9 semanas de la siembra de protoplastos, b) y c) a las 11 semanas de la siembra de protoplastos...**¡Error! Marcador no definido.**
Figura 6: Número de brotes transferidos a medio de cultivo (MS) sin hormonas y número de plantas regeneradas en la primera fase **¡Error! Marcador no definido.**
Figura 7: Número de brotes transferidos a medio de cultivo (MS) sin hormonas y número de plantas regeneradas en la segunda fase..... **¡Error! Marcador no definido.**
Fig 8: Subcultivo de brotes de *N. glauca* a medio de cultivo MS, a) brotes de 11-13 semanas, con un tamaño entre 0.4 y 0.6 cm de longitud..... **¡Error! Marcador no definido.**
Fig 9: Enraizamiento de brotes de *N. glauca* en medio de cultivo MS, a) raíces a las 2 semanas de transferidos los brotes al medio de cultivo, b) raíces muy grandes después de 4 semanas de transferidos los brotes al medio de cultivo MS **¡Error! Marcador no definido.**
Fig 10: Aclimatación de plantas obtenidas a partir de protoplastos de *N. glauca*, a) y b) plantas de 15 – 18 semanas sometidas al proceso de aclimatación **¡Error! Marcador no definido.**
Fig 11: Transferencia de plantas de *N. glauca*, obtenidas a partir de protoplastos, a bolsas con tierra, a) y b) plantas de 21 semanas transferidas **¡Error! Marcador no definido.**

1. Introducción

1.1. Género *Nicotiana*

El género *Nicotiana*, perteneciente a la familia de las Solanáceas, está formado por tres subgéneros que son *Rustica*, *Tabacum* y *Petunioides*. Estos subgéneros comprenden a su vez un conjunto de 70 especies de hierbas y arbustos anuales caracterizados por contener sustancias alcaloides de uso medicinal como la nicotina (en pequeñas dosis), en el caso del tabaco, y la anabasina contenida en el tabaquillo (Kenji, S; et al, 2002; Aoki, 2000).

El género *Nicotiana* es común en las regiones templadas y ha sido estudiado por las características fisiológicas de las especies que lo conforman, así como por la relativa facilidad que implica su cultivo (Aoki, 2000).

Dentro de este género se encuentra la especie *Nicotiana glauca*, un pariente silvestre de *Nicotiana tabacum*, que ha sido ampliamente analizada por sus características de resistencia a algunos patógenos a los que son susceptibles otras especies del género (A.Trojak et al, 2005).

1.2. Origen y Distribución de *Nicotiana glauca*

Nombres comunes:

Tabaquillo, tabaco moruro, tabaco cimarrón, gandul, tabaco negro, tabaco amarillo, tabaco silvestre (Martínez, 1979).

Es un pariente silvestre de *Nicotiana tabacum*, originario del noroeste de Argentina y Bolivia, en Sudamérica; en la actualidad se encuentra ampliamente distribuido en la Región Mediterránea (A.Trojak et al, 2005).

1.3. Características del cultivo

Pertenece al grupo de plantas vasculares (Traqueobionta), dicotiledóneas, con semilla y flor. Es una especie arbustiva cuya floración se da durante todo el año en climas cálidos y se caracteriza por una altura entre 1 y 6 metros.

Es un arbusto diploide ($2n=24$) de color blanco azulado, su tallo es de consistencia muy frágil y de color grisáceo. Sus hojas son grandes con una longitud entre 2.5 y 9 centímetros, lanceoladas y alternas; presentan un pecíolo con una longitud de 3-5 centímetros. Se caracterizan por su color verde brillante (Lemke, 2000).

Su período de floración es mayor en los meses de verano, presentan cáliz de forma tubular con una longitud de 2 a 3 centímetros. Su corola es infundibuliforme con una longitud de 2 a 4 centímetros. Su fruto está encapsulado, compuesto por semillas pequeñas, su longitud alcanza un centímetro. *N. glauca* presenta estambres alrededor del pistilo, son filamentosos y se extienden hasta el borde de la corola (Lemke, 2000).

N. glauca crece en lugares expuestos al sol como cunetas, orillas de ríos, y algunas zonas áridas, con condiciones altitudinales entre 2650 y 3700 msnm. Es poco cultivada, aparece como una planta silvestre en muchas regiones. En España ha sido un problema en algunas islas como las islas Canarias donde ha erradicado especies nativas (Domenech, 2006).

Requiere suelos con alto contenido de nutrientes, especialmente nitrógeno, y ligeramente ácidos, pH entre 5.5 y 6. Su fotoperiodo es de 14 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Guzmán, 1990).

Se puede dispersar por semillas gracias a la acción del viento o del agua. Se propaga por esquejes y semillas. A *N. glauca* se le confieren diferentes usos tanto medicinales como ornamentales. Su uso puede ser tópico para calmar dolores y al ser inhalada tiene una función descongestionante del sistema respiratorio (Conabio, 2004).

1.4. Composición Química de *Nicotiana glauca*

Es una planta silvestre con un alto contenido tóxico por la composición química que presenta.

Contiene en su interior el alcaloide anabasina, un isómero de la nicotina, que le da la toxicidad; además presenta malato y citrato de anabasina, nicotina, ácido oxálico, entre otros (León, 2001).

La anabasina tiene efectos cardíacos y, al igual que la nicotina, en altas cantidades deprime el sistema nervioso central (León, 2001).

1.5. *Nicotiana glauca* como fuente de muchos estudios por sus características genotípicas

Las especies del género *Nicotiana* tienen una gran facilidad de regeneración, en cultivos de tejidos, a partir de células dediferenciadas; por esto han sido utilizadas para el desarrollo de

plantas transgénicas. *N. glauca* cuenta con genes de importancia para el desarrollo de resistencias dentro de especies del mismo género o fuera de éste (A.Trojak et al, 2005).

Ha sido utilizada como fuente de resistencia frente a *Thielaviopsis basicola*, un hongo patógeno del suelo que ocasiona la podredumbre de raíces en cultivos de tabaco. Los estudios realizados demostraron que el germoplasma de *N. glauca* es resistente al patógeno, por lo que al formar híbridos entre *N. tabacum* x *N. glauca* estos podrían contener el o los genes de resistencia al hongo patógeno (A.Trojak et al, 2005).

N. glauca es una fuente de células epidérmicas diferenciadas, con una morfología distinta al resto de células de la epidermis; se encuentran flanqueando los estomas y por medio de mecanismos bioquímicos regulan el intercambio gaseoso entre la hoja y la atmósfera al inducir la apertura de los estomas. Estas células epidérmicas de *N. glauca* son células puras y poco contaminadas con el resto de células del tejido y pueden obtenerse fácilmente por la longitud de sus hojas (Smart et al, 1999). Han sido de mucha importancia en el estudio de regeneración de plantas a partir de protoplastos al demostrar uniformidad en el crecimiento en diferentes medios de cultivo (Tallman, 2000).

N. glauca es transformable por *A. tumefaciens* y su manipulación ha ayudado al estudio de las características de expresión de genes en las plantas transgénicas (Smart, L; et al, 2000).

Al ser un organismo silvestre tiene una gran cantidad de microorganismos benéficos alrededor de sus raíces, los mismos que promueven el crecimiento de la planta. Estudios realizados demostraron que la capa que contiene los microorganismos alrededor de las raíces, puede utilizarse en otras especies de la misma familia, como *Lycopersicon esculentum*, estimulando el crecimiento de la planta (Domenech, 2006).

En Ecuador *N. glauca* es utilizada como portainjerto de tomate de árbol, por la resistencia a patógenos de la raíz como los nemátodos, entre ellos, *Meloidogyne incognita*, y el hongo *Fusarium sp.*, a los que plantas como el tomate de árbol (*Solanum betaceae*) son altamente susceptibles (Espinoza, 2005).

1.6. Protoplastos

Los protoplastos son células vegetales rodeadas por una membrana citoplasmática y desprovistas de pared celular.

Fueron inicialmente aislados, mediante métodos quirúrgicos, por Kiercker en el año de 1892. En el año de 1960, Cocking desarrolló técnicas enzimáticas para el aislamiento de protoplastos; a partir de ello se han desarrollado diferentes protocolos de aislamiento de protoplastos para numerosas especies de plantas (López, 1998).

La pared celular es sensible a la acción de enzimas hidrolíticas como las enzimas celulolíticas, entre ellas la celulasa, que se encarga de la hidrólisis de la celulosa en glucosa, utilizada por las células para la obtención de energía (Kader, J; Othman, O, 1998) y la pectinasa, que degrada la pectina que es una molécula de polisacáridos formada por cadenas de residuos de ácido glucorónico. Además de estas enzimas, en otras se puede utilizar hemicelulasas que ayudan en la rápida digestión de la pared celular (Kader, J; Othman, O, 1998).

La celulasa y pectinasa al igual que algunos preparados enzimáticos, que tienen actividades celulósicas, xilanasas y pectinasas, son dependientes del pH y la temperatura de la solución

en que se encuentran; actúan de forma óptima a pH entre 4 y 6 y temperaturas que oscilan entre 40 y 60° C.

En la solución enzimática utilizada para la degradación de la pared celular en los procedimientos de aislamiento de protoplastos, se deben añadir sustancias que mantienen la osmolaridad, como sorbitol, manitol, glucosa, entre otros derivados de azúcares. Cuando los protoplastos están desprovistos de la pared, tienen la capacidad de regenerarla, crecer y dividirse (Vasil, 1976).

1.6.1. Utilidad de los protoplastos

La degradación de la pared celular expone a la célula con el medio extracelular y le da una mayor flexibilidad por lo que se pueden estudiar procesos como:

- Transporte mediado por la membrana
- División celular
- Morfogénesis
- Mutagénesis in Vitro
- Fusión somática
- Transformación celular

Para el presente trabajo es importante conocer acerca de la fusión o hibridación somática a partir de protoplastos.

1.6.1.1. Fusión o hibridación somática

El objetivo de este proceso es formar protoplastos cargados con información proveniente de fuentes distintas, que pueden ser de la misma o diferente especie, o incluso género. Permite el análisis de procesos como la hibridación simétrica entre especies emparentadas y la hibridación asimétrica con la formación de híbridos; estudios de incompatibilidad sexual, análisis de la segregación nuclear y citoplasmática de genes. Para que la fusión sea factible, en el medio de cultivo se añaden agentes químicos, como polietilenglicol (PEG), que promueven la unión entre las membranas cargadas negativamente. Es un proceso complejo que forma híbridos somáticos, que pueden o no contener la información deseada (Puite, K, 1992; Scowcroft, 1980). Una vez desarrollada la fusión es importante el establecer el medio de cultivo con las mejores condiciones para el crecimiento de la planta (Binding, 1992).

Además de la técnica de fusión mediante el uso de PEG, existe otro tipo de fusión basado en el uso de campo eléctrico. Este método conocido como electro-fusión fue descrito en el año de 1973 y se caracteriza por aumentar, de forma reversible, la permeabilidad de la membrana plasmática. El proceso tiene dos fases, en la primera los protoplastos se colocan en un campo eléctrico de baja conductividad, con dos electrodos y corriente alterna de alta frecuencia. Esto provoca que las cargas dentro de los protoplastos se separen formando un dipolo, al mismo tiempo se produce una fuerza neta que tiene mayor intensidad hacia uno de los dos electrodos. Durante esta etapa los protoplastos se acercan para poder fusionarse (Polci, C, 2005).

La segunda fase del proceso de electro-fusión se basa en someter a los protoplastos a pequeños pulsos de corriente directa por un lapso de 10 a 100 μ segundos. En esta fase la

intensidad del campo eléctrico se aumenta y se añaden pequeñas concentraciones de calcio para producir orificios en la membrana que promuevan la fusión de las células. Como resultado del proceso se obtienen células esféricas que contienen información de dos fuentes distintas (Polci, C, 2005).

La electrofusión es una técnica que aumenta la viabilidad de las células fusionadas, al ser un proceso uniforme que ocasiona la fusión de todos los protoplastos que son sometidos al campo eléctrico (Polci, C, 2005).

Mediante fusión de protoplastos se ha conseguido la transferencia de resistencias a *Fusarium* de *S. pimpinellifolium* a *S. tuberosum*, a virus como el del mosaico de tabaco de *N. remanda* a *N. tabacum* (Cubero, J, 2003).

Hasta la actualidad se ha logrado fusionar con éxito algunas especies de *Nicotiana* como *N. glauca* x *N. langsdorffii* (Carlson, P, et al; 1972), *Petunia*, *Datura*, *Brassica*, *Solanum*, *Medicago*, *Daucus* (Puite, K; 1992; Cubero, J; 2003), así también algunos cruzamientos intergenéricos entre *Datura carota* x *N. tabacum*, *Datura* x *Atropa*, *Nicotiana* x *Petunia* (Puite, K; 1992; Cubero, J; 2003), Los híbridos resultantes de estos cruzamientos son fértiles y han permitido analizar la transferencia de cromosomas del donador al receptor; la mayoría de fusiones intragenéricas tienen una limitada pérdida de cromosomas del donador y han originado poliploidizaciones, por ejemplo en algunas especies del género *Nicotiana* (Puite, K; 1992). Las diferencias biológicas existentes entre el híbrido formado y sus parentales permite la recuperación de los protoplastos híbridos de una población de protoplastos (Carlson, P, et al; 1972).

Además de los objetivos ya mencionados de la fusión de protoplastos, esta técnica ha sido aplicada también en biotecnología fúngica para mejorar la producción de enzimas, antibióticos, producción de cuerpos fructíferos, y el análisis de los procesos genéticos y bioquímicos de acción de los patógenos de plantas (Shabana, Y; et al, 1997).

1.6.2. Regeneración de plantas a partir de protoplastos

El número de especies de plantas regeneradas a partir de protoplastos ha aumentado en las dos últimas décadas aproximadamente a 300 (Tallman, G, 2006). Los protocolos establecidos dependen de la especie, así como de las condiciones externas al cultivo. En algunas plantas como es el caso de *Brassica oleracea* se cultiva los protoplastos en masa pues esto favorece la regeneración (Earle, 1990); en otras como *N. tabacum* y *Brassica napus* se cultivan protoplastos individuales y a partir de ellos se da la formación de plantas (Puite, K, 1992). Uno de los géneros más estudiados por la relativa facilidad de regeneración de plantas a partir de protoplastos es *Nicotiana*, las células de un gran número de sus especies se dediferencian rápidamente dependiendo de las condiciones del cultivo. Es por esto que constituye el modelo para el desarrollo de plantas transgénicas (Kenji, S, 2002).

Se ha logrado avances en cultivos de cereales como cebada y trigo a partir de suspensiones de células embriogénicas; en cultivos de importancia agronómica como *Beta vulgaris*, *Gossypium hirsutum*, entre otros; algunas especies de plantas leñosas como manzana y pera, y otras especies de coníferas se han regenerado partiendo de tejidos o suspensiones de células embriogénicas. Un grupo muy explotado en los últimos años es el de las plantas ornamentales cuyo progreso se ha dado por la importancia comercial de algunos clones de *Rosa persica*, *Chysanthemum* y *Primula malacoides* (Puite, K, 1992).

A pesar de estos logros, ciertos cultivos importantes como *Vitis vinifera*, son recalcitrantes a la regeneración, los procesos por los que estos protoplastos no muestran totipotencia no son conocidos y requieren el estudio de los procesos de diferenciación celular, inducción del ciclo celular y la formación de patrones (Fowke, et al, 1990).

1.6.3. Cultivo in vitro

Es una técnica de regeneración de pequeños propágulos de tejido en condiciones asépticas y controladas. Se utilizan medios de cultivo artificiales con los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo del explante; además se adicionan hormonas de crecimiento como auxinas y citoquininas que favorecen el enraizamiento y la elongación del tallo. Esta técnica ayuda a una rápida y fácil micropropagación de plantas de importancia agronómica libres de patógenos en espacios reducidos; sin embargo, está limitada porque muchos cultivos son recalcitrantes (Aceves, J; 2005).

El cultivo in vitro de protoplastos aislados individualmente requiere las condiciones óptimas para desarrollar callos indiferenciados, que según la combinación hormonal darán origen a diferentes órganos vegetativos y plantas (Cubero, J, 2003). Para su cultivo se puede utilizar tanto medios líquidos como semisólidos que son colocados en cajas Petri. Los medios de cultivo deben contener los compuestos necesarios para que los protoplastos crezcan y puedan desarrollar colonias, entre estos compuestos están sustancias orgánicas e inorgánicas, hormonas, vitaminas, aminoácidos y estabilizadores del pH (Polci, P, 2004).

Una de las técnicas empleadas para el cultivo de protoplastos consiste en mezclar la solución que contiene los protoplastos, con el mismo volumen del medio de cultivo que tiene 1.2% de agarosa y sembrarlos en cajas petri rodeando las gotas con medio de cultivo

líquido. Por medio de esta técnica se logra mantener a los protoplastos en la gota hasta que alcanzan la formación de colonias (Polci, P, 2004).

Otra técnica de cultivo de los protoplastos consiste en utilizar medio líquido, en este caso los protoplastos son sembrados en el medio hasta que forman colonias, que son transferidas a medio semisólido para su desarrollo y formación de callos. Este medio favorece la presión osmótica y el crecimiento porque algunas condiciones, como la densidad celular, pueden modificarse fácilmente añadiendo medio de cultivo o células. Además la concentración de fenoles es mucho menor en medios de cultivo líquidos que en medios de cultivo semisólidos (Polci, P, 2004).

Una técnica utilizada para protoplastos que no pueden dividirse a bajas densidades es la técnica de células nodrizas en que densidades de 10^6 cel/ml se someten a rayos X para inhibir la división celular manteniendo activo el metabolismo de las células. Estos protoplastos se embeben en medios semisólidos y sobre ellos se colocan protoplastos que no han sido irradiados con rayos X, son estas células las que forman las colonias. Finalmente con filtros se separan las células (Polci, P, 2004).

La técnica de microgota es utilizada para cultivar densidades muy bajas de protoplastos, incluso un solo protoplasto. La cantidad de medio de cultivo contenida en cada microgota es muy pequeña de 0.2 a 30 microlitros por lo que las densidades de protoplastos son muy bajas. Se rodea las microgotas con aceite mineral para evitar la deshidratación del medio (Cubero, J, 2003).

Estas técnicas de cultivo toman en cuenta factores como luz, tiempo de incubación y condiciones de aislamiento para mantener la integridad celular y permitir el desarrollo de diferentes procesos como la fusión de protoplastos y la regeneración de plantas a partir de protoplastos (Cubero, J, 2003).

El objetivo general del presente proyecto fue establecer un protocolo de regeneración de plantas de *N. glauca* a partir de protoplastos, con el fin de que en futuras investigaciones se fusione con protoplastos de tomate de árbol (*Solanum betaceae*) susceptibles a plagas de nemátodos, con la posible obtención de plantas resistentes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

- Establecer un protocolo de regeneración de plantas de *N. glauca* a partir de protoplastos.

2.2. Objetivos Específicos

- Ajustar un método para el aislamiento y extracción de protoplastos de *N. glauca*.
- Encontrar un protocolo de generación de callo a partir de protoplastos.
- Determinar el balance hormonal para la regeneración de plantas de *N. glauca* a partir de callos.
- Encontrar las condiciones óptimas para la aclimatación de plantas de *N. glauca* regeneradas a partir de protoplastos.

3. Justificación

N. glauca es una especie silvestre pariente del tabaco, utilizada en Ecuador como patrón de injertos de tomate de árbol (*Solanum betaceae*), por su inmunidad al ataque de nemátodos. Es utilizada porque evita que *S. betaceae* esté en contacto con nemátodos, a los que el tomate de árbol es altamente susceptible. El injertar plantas es un proceso largo y costoso por lo que sería óptimo el desarrollo de variedades de tomate de árbol resistentes a nemátodos. Al no encontrar la resistencia en la especie ni en parientes cercanos, se busca la transferencia de genes de resistencia de *N. glauca* a *S. betaceae* por medio de fusión de protoplastos; para lograr el objetivo planteado es necesario establecer un protocolo de regeneración de plantas de *N. glauca* y *S. betaceae* a partir de protoplastos. De esta forma

se puede lograr la fusión de las dos especies transfiriendo la resistencia al tomate de árbol e incrementando de esta forma la producción de este cultivo.

4. Área de Estudio

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Cumbayá, Ecuador.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Cultivo in vitro de *N. glauca*

Plantas de tabaquillo recolectadas en el puente de ingreso a Cumbayá, Quito- Ecuador

Semillas desinfectadas de tabaquillo

Cámara de flujo laminar *Labconco*

Medio MS (Murashige and Skoog, 1962)

5.1.2. Aislamiento de protoplastos de *N. glauca*

Plantas in vitro de tabaquillo de 1-2 meses

Cajas petri estériles de plástico, de 35 mm

Solución de CPW (Frearson et al, 1973) + manitol al 10%

Solución de CPW + sucrosa al 20%

Solución de Mprot (Reinert, 1982) + agarosa al 1.2%

Solución de Mprot + sucrosa al 10%

Solución de Mprot + sucrosa al 3%

Celulasa

MES

Pectinasa

Cámara de flujo laminar marca *Labconco*

Pipeteador automático marca *Drummand Scientific Co.*

Incubadora (*Clinical Scientific Equipment Co.*) a 28° C

Agitador marca *Lab-Line Rotator*

Centrifuga IEC Centra MP4

5.1.3. Subcultivo de protoplastos

Cajas petri estériles de plástico

Medio MS + hormonas BAP 4ppm/ NAA 0.05 mg/L

Cámara de flujo laminar marca *Labconco*

Esteriomicroscopio marca Ward's (Natural Science Establishment Inc)

5.1.4. Subcultivo de callos a medio de regeneración

Cajas petri estériles de plástico

Medio MS + hormonas BAP 4ppm/ NAA 0.05 mg/L

Cámara de flujo laminar marca *Labconco*

5.1.5. Cambio de brotes a medio de crecimiento MS

Cajas petri estériles de vidrio

Medio MS (Murashige and Skoog, 1962)

5.1.6. Aclimatación de plantas obtenidas a partir de protoplastos

Frascos de aclimatación

Tierra *Agro Terra*

Agua destilada estéril

Agua potable

Bolsas de plástico

5.2. Métodos

5.2.1. Cultivo in vitro de *N. glauca*

Se colectaron frutos maduros de plantas de tabaquillo recolectadas en el puente de ingreso a Cumbayá, se extrajeron sus semillas para germinarlas in vitro. Las semillas fueron desinfectadas siguiendo el protocolo de siembra in vitro de semillas de tomate de árbol, previamente establecido en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, con pequeñas modificaciones. Se colocaron las semillas por 5 minutos en alcohol 70%, luego se lavaron en agua destilada estéril, y fueron transferidas por 20-30 minutos a hipoclorito de sodio 2.5 % más 5 gotas de tween 20. Se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas se sembraron con micropipeta en medio MS para su germinación.

5.2.2. Aislamiento de protoplastos

Se escogieron entre 4-6 frascos de cultivos in vitro de tabaquillo de entre 1 y 2 meses de edad, y se dejaron en oscuridad durante 2 días. Dentro de la cámara de flujo laminar, se cortaron en forma de tiras las hojas jóvenes y se les colocó en una solución 1x de sales inorgánicas CPW (Frearson et al, 1973) más 10% de manitol, previamente autoclavada y enfriada. Se incubó durante una hora para lograr preplasmólisis celular, después se retiró la solución y se añadió filtrando, la misma solución con enzimas celulasa 0.5% y pectinasa 0.1% más 0.587 % del regulador de pH MES. Se incubó en oscuridad a 22° C por 16 horas, se sometió a agitación a 60 rpm por 15 minutos para liberar los protoplastos. La solución con protoplastos se filtró, a través de una membrana de nylon para eliminar los desechos foliares, y se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. El pellet se resuspendió en 10ml de CPW + 20% de sucrosa y se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos. La capa verde localizada en la parte superior de la solución (protoplastos flotando) se transfirió a un nuevo tubo con 10ml de la solución de preplasmólisis para el lavado, este paso se repitió tres veces. Los protoplastos lavados se suspendieron a una densidad de $5-7 \times 10^5$ /ml en el aproximadamente 0,5 mililitros del medio de cultivo Mprot (Reinert, 1982) + agarosa (de bajo punto de fusión) 1.2%. Se sembraron en forma de gotas en cajas petri plásticas de 35mm, y se añadió el medio Mprot + 10% sucrosa líquido alrededor de las gotas. Se cultivaron por 4 días en oscuridad a 28° C (Reinert, 1982) y luego se llevaron al cuarto de cultivo donde recibieron irradiación de luz durante 3 días, fotoperiodo 16/8. Una semana después el medio Mprot + 10% sucrosa líquido fue reemplazado por el mismo medio con una concentración de 3% de sucrosa. En este medio permanecieron los protoplastos durante 2 semanas, después las gotas que contenían los protoplastos se dividieron en 4

partes y se cambiaron a distintos medios para su crecimiento. En la Tabla 1 se observa la composición de los medios utilizados para el aislamiento y cultivo de protoplastos.

5.2.3. Aislamiento por colonias

El proyecto se dividió en dos fases, una fase piloto en la que los protoplastos no fueron aislados por colonias individuales, y una segunda en la que sí fueron aislados. En la fase piloto se dejó que los protoplastos formaran callos y a partir de ellos brotaron pequeñas plántulas que se transfirieron a medio de cultivo MS, sin hormonas, para su crecimiento. Por tanto, en esta fase no era posible evaluar los niveles de eficiencia del proceso.

En la segunda fase, las colonias fueron aisladas a las 5 semanas de la siembra de los protoplastos, utilizando un estereomicroscopio. Se colocaron 10 colonias por caja en el medio de regeneración MS BAP 4 ppm, NAA 0.05 mg/L que resultó el mejor en la primera fase. En las Tablas 2 y 3 se describe las condiciones del aislamiento de las colonias en las dos fases del proyecto.

5.2.4. Pruebas de crecimiento de microcallos en medios Mprot 3% sucrosa y en MS con BAP 4ppm NAA 0.05 mg /L

Las gotas de agarosa conteniendo las colonias, se sembraron en medio MS BAP 4 ppm / NAA 0.05 mg/L y en medio Mprot 3% sucrosa para observar su comportamiento en los dos medios de cultivo. En estos medios permanecieron 2 semanas después de las cuales se escogió el mejor medio para el crecimiento de los callos.

5.2.5. Pruebas de crecimiento de microcallos en medio MS con diferentes concentraciones hormonales de BAP y NAA

A las tres semanas de la siembra de los protoplastos en el medio de cultivo, cada gota de agarosa en la que crecían las colonias resultado de las divisiones de los protoplastos, fue dividida en cuatro secciones y transferida cada sección a medio MS con diferentes concentraciones de BAP (0.5, 1, 2, 3 y 4ppm) y una concentración constante de NAA (0.05mg/L). En estos medios permanecieron por un período de 2 semanas para observar el comportamiento de las colonias en las distintas concentraciones probadas.

5.2.6. Subcultivo de callos

Los callos se subcultivaron cada 2 semanas, se los transfirió al mejor medio de regeneración de brotes que fue MS BAP 4 ppm, NAA 0.05 mg/L. Se esperó que alcanzaran 1 centímetro de diámetro (a las diez semanas de la siembra) para dividirlos en dos mitades, de las cuales se conservó una para seguir subcultivándola y la otra se desechó. Esto se hizo para mantener un número constante de callos y poder extrapolar los resultados. Se ubicó 5 callos por caja petri.

5.2.7. Transferencia de brotes a medio MS sin hormonas

Entre las 11 y 12 semanas de la siembra de los protoplastos, los brotes se cambiaron a frascos de vidrio que contenían medio MS sin hormonas, para lo cual se cortó la base del

retoño eliminando el callo presente. Se mantuvieron en éste medio aproximadamente 5 semanas, hasta cuando se observó un buen desarrollo de la raíz, tallo y hojas de la plántula.

5.2.8. Aclimatación de plantas obtenidas a partir de protoplastos de *N. glauca*

Las plantas obtenidas se transfirieron a tierra a las 18 semanas de la siembra de los protoplastos. Se extrajeron del frasco, procurando eliminar todo el agar presente en la raíz, para lo cual se las lavó con agua destilada estéril y se las trasladó a tierra estéril, contenida en pequeñas vasijas de barro que se colocaron en frascos estériles con agua destilada estéril. Se cubrió el frasco con plástico, al cual se le realizaron pequeños orificios cada 3 días. Se reemplazó el agua destilada estéril por agua potable. El plástico se retiró a las dos semanas del inicio de la aclimatación. A las 21 semanas las plantas aclimatadas fueron transplantadas a bolsas de plástico, con tierra, que fueron colocadas en bandejas a las que se les añadió agua potable en el fondo para mantener húmeda la tierra. Las bandejas se colocaron en el cuarto de cultivo a una temperatura de 22° C.

6. Resultados

6.1. Aislamiento de Protoplastos

En la primera fase del proyecto se realizaron diez ensayos, en los cuales los protoplastos fueron extraídos de hojas jóvenes de plantas de tabaquillo de 1-2 meses de edad. Las concentraciones obtenidas oscilaron entre 5.5×10^5 y 7.0×10^5 cel/ml. En la Tabla 4 se describen los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos de la primera fase del proyecto.

En la segunda fase del proyecto, se realizaron 6 ensayos, de los cuales 3 fueron exitosos y regeneraron plantas de tabaquillo. Los protoplastos de los otros 3 ensayos no mostraron división después de la incubación a 28°C , se reventaron y no continuaron su desarrollo. Las concentraciones celulares obtenidas en los ensayos de esta fase del proyecto, variaron entre 1.56×10^5 - 7.06×10^5 células/ml. En la Tabla 5 se observan los resultados obtenidos en los ensayos realizados en la segunda fase del proyecto.

6.2. Primeras divisiones celulares y formación de colonias

En todos los ensayos se observó que los protoplastos comenzaron a dividirse entre el segundo y tercer día después de la incubación a 28°C . No todos los protoplastos sembrados se dividieron, después de las centrifugaciones e incubación muchos se reventaron. Se observó el estado de 4 células entre el cuarto y quinto día después de la incubación. En la Figura 1 se observan los diferentes estados de desarrollo por los que pasaron los protoplastos. La mejor concentración para la formación de colonias, se encontró a una densidad de protoplastos entre $5 - 7 \times 10^5$ células/ml.

6.3. Frecuencia de división celular (%) y eficiencia en formación de microcallos (%)

La frecuencia de división celular y la eficiencia en formación de microcallos se calcularon para los ensayos de la segunda fase del proyecto. En la Figura 2, se observa un gráfico con el número de colonias y callos obtenidos de cada ensayo realizado. No todos los protoplastos aislados sobrevivieron, algunos no resistieron las fases tempranas del proceso de cultivo, como la incubación a 28° C muchas células se reventaron y no se dividieron. La frecuencia de división obtenida fue de 0.01 a 0.10% y la eficiencia en formación de microcallos fue de 80 a 90%.

6.4. Crecimiento de microcallos en Mprot 3% sucrosa y en MS con BAP 4ppm NAA 0.05 mg /L

En la primera fase del proyecto, a las 5 semanas de la siembra, los microcallos se sembraron tanto en Mprot 3% sucrosa como en MS BAP 4 ppm / NAA 0.05mg/L para observar su comportamiento. Después de 2 semanas en estos medios de cultivo, se observó que los callos en Mprot 3% sucrosa crecieron lentamente, alcanzando un diámetro entre 0.6 y 0.7 cm y se tornaron de color amarillento, mientras que los callos ubicados en el medio MS BAP 4 ppm / NAA 0.05mg/L alcanzaron un mayor tamaño, 1 cm de diámetro, y su color era verde oscuro (Figura 3). Con estos resultados se optó por sembrar los microcallos en medio MS + hormonas (BAP y NAA) y se probaron diferentes concentraciones hormonales para estandarizar el protocolo.

6.5. Crecimiento de callos en MS con BAP y NAA

Se probaron 5 medios de cultivo variando la concentración de BAP (0,5; 1; 2; 3 y 4 ppm) y manteniendo una concentración constante de NAA (0.05 mg/L). Se analizó el aspecto de los callos a las dos semanas de cultivados en los diferentes medios. El mejor desarrollo de callos se consiguió en medio MS BAP 4 ppm / NAA 0.05mg/L (Figura 4), los callos obtenidos variaron entre 0.8 y 1 cm de diámetro y eran de consistencia suave y de color verde. En los medios MS BAP 0.5 ppm /NAA 0.05 mg/L, BAP1 ppm /NAA 0.05 mg/L los callos tenían un diámetro de 0.5 cm, su consistencia era dura y tenían un color blanquecino. Los callos ubicados en MS BAP 2 ppm /NAA 0.05 mg/L se tornaron de color amarillento y su tamaño varió entre 0.5 y 0.7 cm de diámetro. El último medio probado fue MS BAP 3 ppm /NAA 0.05 mg/L, en este los callos crecieron alcanzando un diámetro entre 0.7 y 1 cm de diámetro, tenían un color verde; a pesar de ser callos vigorosos, a partir de ellos solo brotaron hojas.

6.6. Viabilidad de los callos

Los callos obtenidos a partir de protoplastos mostraron una alta viabilidad. En los diferentes ensayos, tanto de la primera como de la segunda fase, los callos alcanzaron 1.2 y 1.5 cm de diámetro entre la séptima y octava semana de la siembra de protoplastos en el medio de cultivo. Se subcultivaron por un lapso entre 6 a 10 meses, tiempo en el que produjeron retoños que cuando alcanzaron los 0.5 cm de longitud fueron transferidos a medio MS sin hormonas para el posterior desarrollo de los mismos a plantas.

6.7. Aparecimiento de brotes aéreos

Los callos fueron colocados en MS BAP 4 ppm /NAA 0.05 mg/L. Se observaron diferencias en las dos fases del proyecto, en la primera al no haber separado las colonias el aparecimiento de brotes fue más rápido y se produjo entre la semana 8 y 9 de la siembra, eran muy pequeños, poco visibles a simple vista. Los brotes se agrandaron y mostraron un buen crecimiento, aproximadamente 0.5 cm de longitud (Figura 5), entre las 9 y 11 semanas de la siembra. En la semana once, todos los callos presentaban uno o varios brotes por callo.

En la segunda fase del proyecto el aparecimiento de brotes tardó más, entre la semana 11 y 13, se observaron pequeños brotes en los callos, estos siguieron su crecimiento y a la semana 14 todos presentaban brotes de 0.4 - 0.7 cm de longitud. En las Figuras 6 y 7 se muestra el número de brotes transferidos a medio sin hormonas y el número de plantas regeneradas a partir de ellos; en la primera fase del proyecto, el segundo y cuarto experimento produjeron 85% de plantas regeneradas a partir de protoplastos. En la segunda fase, el primer ensayo produjo 84% de plantas regeneradas a partir de protoplastos.

6.8. Enraizamiento

En la primera fase, los brotes con una longitud igual o mayor a 0.5 cm se transfirieron a medio MS sin hormonas, entre la semana 11 y 13 de la siembra (Figura 8). Estos desarrollaron raíces a partir de la semana 12 de la siembra, empezaron con pequeñas raíces que crecieron y ocuparon todo el agar (Figura 9).

En la segunda fase, los brotes con un tamaño igual o mayor a 0.5 cm de longitud se transfirieron a MS sin hormonas entre la semana 14 y 20 de la siembra de los protoplastos. Las plantas desarrollaron raíces después de 2 a 3 semanas. En las Tablas 6 y 7 se describe los tiempos en que aparecieron tanto los brotes aéreos como las raíces en las dos fases del proyecto.

6.9. Aclimatación de plantas obtenidas a partir de protoplastos

Las plantas obtenidas en la primera fase del proyecto fueron aclimatadas a partir de la semana 18, mostrando un crecimiento óptimo para su transferencia a bolsas con tierra a la semana 21 de la siembra de los protoplastos. No todas las plantas regeneradas fueron aclimatadas, de un total de 61 plantas regeneradas, se escogieron 28 plantas vigorosas de 3 a 12 cm de longitud para ser aclimatadas, de estas 7 no sobrevivieron. En la Figura 10 se observan algunas plantas sometidas al proceso de aclimatación.

En la segunda fase del proyecto, plantas de entre 5 y 10 cm de longitud fueron aclimatadas a partir de la semana 20, mostrando un crecimiento óptimo para su transferencia a tierra a la semana 23. Se aclimataron 15 plantas regeneradas a partir de protoplastos, de las cuáles 13 sobrevivieron y 2 se secaron. En las Tablas 8 y 9 se muestra el tiempo al que se aclimataron las plantas obtenidas en las dos fases del proyecto.

6.10. Comportamiento de plantas regeneradas en bolsas con tierra

En la Figura 11, se observa algunas de las plantas que se transfirieron a bolsas con tierra a las tres semanas de iniciado el proceso de aclimatación. De las 21 plantas, tres plantas pequeñas no crecieron y se secaron, una planta grande decayó al transferirla a la bolsa y no continuó su crecimiento. El resto de plantas transferidas se desarrollaron de forma normal y aumentaron el número de sus hojas. Fue importante, durante los primeros días de transferidas a bolsas, que las plantas más grandes no estén muy cerca de la luz para evitar la deshidratación.

7. Discusión

Se logró establecer un protocolo de regeneración de plantas de *N. glauca* a partir de protoplastos, partiendo del protocolo descrito por Reinert (1982) con algunas modificaciones. El protocolo establecido fue eficiente para la formación de callos y a partir de ellos la regeneración de retoños y futuras plantas de tabaquillo.

7.1. Aislamiento de Protoplastos

Las plantas utilizadas para el aislamiento de protoplastos tenían entre 1 y 2 meses de edad, esto fue fundamental para el desarrollo del proyecto, ya que con plantas de más de 2 meses, el número y la calidad de los protoplastos aislados se redujo. Los protocolos de regeneración a partir de protoplastos recomiendan el uso de tejidos jóvenes para incrementar la eficiencia de la extracción y siembra (Siemens, 1994). En el proyecto se demostró que hojas de plantas de más de 3 meses de edad, no soportaban el estrés provocado por el aislamiento y por ello el número de protoplastos disminuyó drásticamente (Sinha, 2003).

Una etapa importante a considerar, para aumentar la eficiencia del aislamiento, es la preplasmólisis, a la que fueron sometidos los segmentos de hoja, previo a la acción enzimática. Se utilizó la solución de sales inorgánicas CPW (Frearson et al, 1973) + manitol al 10% y se dejó en incubación, a las hojas cortadas, durante una hora. Este lapso favoreció a una óptima preplasmólisis en que la membrana celular se contrae y se aleja de la pared celular, lo que impide que los protoplastos estallen al ser desprovistos de su pared; la presencia de manitol en el medio contribuyó con este efecto y actuó manteniendo la osmolaridad de la solución entre 600 y 700 mOsm/kg H₂O (Siemens, 1994; Scowcroft,

1980; Kim; et al, 2005). Sinha (2003), Scowcroft (1980) y Siemens (1994) señalan que la preplasmólisis ayuda en el aislamiento de un mayor número de protoplastos e influye en su viabilidad; además favorece la digestión de la pared celular gracias a la solución enzimática. Esta etapa ha sido estudiada en algunas especies regeneradas a partir de protoplastos como *Glycine max*, *Rosa hybrida*, *Dianthus sp.* (Shiba, 2004).

La digestión de la pared celular es esencial para un buen desarrollo de los protoplastos; para este proceso se debió establecer las concentraciones adecuadas de enzimas, estas fueron celulasa 0.5% y pectinasa 0.1% así como un reactivo regulador del pH que fue MES. Las concentraciones de las enzimas utilizadas fueron relativas a la concentración de celulosa y pectina en la pared celular de las células del mesófilo. Sinha (2003) menciona que las concentraciones usadas, así como la interacción entre enzimas, aumentan el número de protoplastos obtenidos por aislamiento. MES no tuvo ningún efecto en el número de protoplastos aislados, actuó como un regulador del pH y lo mantuvo en 5.6 para que las enzimas actuaran al máximo de su actividad.

Las fases tempranas del aislamiento de protoplastos de *N. glauca*, como las centrifugaciones y la incubación, causaron daños en las células, por esta razón, a pesar de haberse aislado un alto número de protoplastos, muchos no se dividieron. Este efecto adverso se sobrellevó con la presencia de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, en mayor cantidad que los otros componentes, en los medios de aislamiento. Scowcroft (1980) menciona que las altas concentraciones de calcio favorecen la regeneración de la pared celular y reducen el daño ocasionado en las células.

El número de protoplastos obtenido en los ensayos en la primera fase, varió entre 5.5×10^5 a 7.0×10^5 cel/ml, estas concentraciones fueron las óptimas para la regeneración de

plantas. Este resultado difiere con el logrado por Tallman (2006) quien aisló protoplastos de las células flanqueantes de los estomas en la hoja de tabaquillo, alcanzando un número entre 1.5 a 2×10^7 cel/ml. Esto probablemente se debe a que estas células se aislan después de un proceso mucho más largo que el requerido para las células del mesófilo y por esto son más puras (menos contaminadas con restos de células epiteliales) y se consiguen en mayor número.

En la segunda fase del proyecto, el número de protoplastos obtenido fue de 1.56×10^5 - 7.06×10^5 cel/ml. En el último ensayo realizado en esta fase se obtuvo una concentración de protoplastos de 1.56×10^5 , este resultado fue el más bajo conseguido y se debió al uso de plantas de tabaquillo de más de 3 meses de edad. Las otras dos concentraciones logradas en esta fase estuvieron entre 5 a 7×10^5 cel/ml, concentraciones óptimas para la regeneración según el protocolo establecido por Reinert, (1982) y utilizado para este estudio.

7.2. Divisiones Celulares y Formación de Microcallos

Los protoplastos empezaron a dividirse entre los 2 y 3 días de incubación a 28° C. La división celular dependió de factores como la concentración hormonal, la luz a la que se expusieron los protoplastos, y las condiciones del aislamiento (Sotiriou, 2007).

La presencia de auxinas y citoquininas, especialmente de una concentración adecuada de BAP, fue fundamental en el medio de crecimiento ya que favoreció la división celular por ser una hormona activadora del ciclo celular (Sotiriou, et al, 2006).

La temperatura y tiempo de incubación fueron dos factores que se tomaron en cuenta en el proceso, fue importante considerarlos para la división y posterior desarrollo de los microcallos. Tallman (2006) señala que a 32° C las células flanqueantes de los estomas se dediferencian y dividen para la formación de callos y regeneración de plantas; para el caso de las células del mesófilo y la epidermis la temperatura recomendada es de 28° C, a temperaturas más altas o bajas las células no se dividen (Taylor, et al, 1997). Esto coincide con las temperaturas de aislamiento de cultivos como *Rosa hybrida* y algunas especies de *Solanum* en que se usan temperaturas entre 24 y 27 grados centígrados (Sotiriou, et al, 2006). En cuanto al segundo factor tomado en cuenta en el proceso de extracción de protoplastos, Kim (2005) sugiere que la mejor incubación se logra con un período de 16 horas en la solución enzimática.

La densidad de protoplastos sembrados en el medio de cultivo influyó en la frecuencia de división y la formación de colonias (Shiba, 2004). Con concentraciones entre 5 a 7 x 10⁵ cel/ml las divisiones celulares empezaron 4 días después de la incubación, pero gran parte de las células no se dividieron; a diferencia de esto, cuando se sembraron concentraciones entre 1 a 2 x 10⁵ cel/ml se observó un mayor número de células dividiéndose. Estos resultados difieren con los encontrados por Tallman (2006) quien requirió una concentración de 1.5 a 2 x 10⁷ cel/ml para obtener una óptima frecuencia de división. Sin embargo, en otras especies del mismo género como en *N. debneyi* (Scowcroft, 1980) las divisiones celulares se asemejan a las obtenidas en *N. glauca* en este estudio.

A partir del cuarto día en que iniciaron las divisiones celulares, éstas fueron sucesivas y aumentaron para la formación de pequeñas colonias que fueron visibles al estereomicroscopio al día 10 después de la incubación.

La frecuencia de división celular, que es el porcentaje de protoplastos inicialmente sembrados que sufrieron al menos una división, fue de 0.01 a 0.10%, muchos protoplastos se reventaron después de la incubación y no lograron dividirse, esto se le puede atribuir a la osmolaridad de la solución. Este porcentaje aumentó a medida que se disminuyó la concentración de protoplastos. El mayor porcentaje obtenido (0.10%) fue para la concentración de 1.56×10^5 cel/ml. Es difícil establecer una comparación con frecuencias obtenidas en otros estudios con la misma planta, Tallman (2006) trabajó con células del estoma de *N. glauca* y con densidades celulares superiores a las utilizadas en este estudio. Este autor obtuvo una frecuencia de división de 30%, en otras especies del mismo género como *N. debneyi*, en que utilizando una densidad de 5×10^4 cel/ml se obtuvo 55% de frecuencia de división (Scowcroft, 1980).

7.3. Pruebas de Crecimiento de Microcallos en medio Mprot 3% sucrosa y MS + hormonas

Esta prueba se realizó en la primera fase del proyecto, las diferencias en el crecimiento de los microcallos en el medio Mprot 3% sucrosa y en el medio MS + hormonas fueron notables a las dos semanas de sembrados los microcallos en estos medios. Scowcroft (1980) y Tallman (2006) señalan la importancia del medio Mprot en las primeras fases del crecimiento de los protoplastos, como se observa en la Tabla 1, el alto contenido de sales de calcio en este medio favorece la formación de la pared celular y por ello la formación de colonias. Sin embargo para la diferenciación de colonias en microcallos, la concentración hormonal es muy baja (Tabla 1) por lo que los callos se tornaron de color amarillento y tuvieron una menor viabilidad. El medio MS + BAP 4ppm / NAA 0.05 mg/L logró el

crecimiento y diferenciación de los callos aumentando rápidamente su tamaño, a esta concentración hormonal se estimuló la división y diferenciación de las colonias

7.4. Crecimiento de Microcallos en MS + hormonas

Cubero (2003) menciona que lograr las concentraciones hormonales adecuadas es básico para que los microcallos crezcan y puedan brotar. La adición de NAA y BAP al medio MS ayudó a la regeneración de la pared celular, la diferenciación y división celular, procesos que llevaron a la formación de callos para la regeneración de plantas.

Tallman (2006) observó en diferentes experimentos de regeneración de protoplastos de tabaquillo que la concentración de BAP entre 4 y 5 ppm incrementó la actividad metabólica y el crecimiento celular. Esto se demostró en este estudio, de las cinco concentraciones hormonales probadas para el desarrollo de los microcallos, MS + BAP 4/NAA 0.05 ppm fue la que dio mejores resultados. Los microcallos se desarrollaron originando callos aproximadamente de 1 cm de diámetro que a las nueve semanas mostraron brotes con una longitud menor a 0.4 cm, debido a que se alcanzó un equilibrio hormonal que estimuló su formación. En las otras concentraciones probadas, no se logró la aparición de brotes aptos para la obtención de plantas, y la viabilidad de los callos disminuyó a medida que se redujo la concentración de BAP en el medio. Este efecto fue similar al observado en los callos que se cultivaron en el medio Mprot 3% sucrosa.

7.5. Aparecimiento de brotes y raíces

El aparecimiento de brotes y raíces fue diferente en las dos fases del proyecto. En la primera, los brotes aparecieron alrededor de la octava semana, más del 50% de los callos presentaban brotes con un tamaño menor a 0.4 cm de longitud; para la onceava semana, el

90% de los callos habían desarrollado por lo menos un brote y 3 o más, en la mayoría de los casos. En la segunda fase del proyecto, al haber aislado por colonias, el aparecimiento de brotes tardó más, a la onceava semana aproximadamente el 40% de los callos presentaban brotes con un tamaño menor a 0.4 cm; los callos continuaron produciendo brotes y a la semana catorceava, el 95% de los callos presentaban uno o varios brotes por callo. Tallman (2006) logró brotación de 80% de los callos obtenidos a partir de protoplastos, en un medio con concentraciones hormonales similares a las utilizadas en este estudio (BAP 5ppm y NAA 0,07 mg/L). Este autor menciona que el incremento en las concentraciones de BAP aumenta el número de brotes. En este estudio cuando las concentraciones de BAP eran menores a 4 ppm los callos sólo brotaron hojas y el número de brotes por callo fue bajo.

7.6. Aclimatación

Durante este período las plantas se fortalecieron por lo que se obtuvo un 75% de viabilidad de las plantas aclimatadas. Las plantas se acoplaron a la tierra y obtuvieron los nutrientes de este medio para continuar su crecimiento y desarrollo ya no en un medio donde las condiciones son controladas. Scowcroft (1980) menciona que el proceso de aclimatación debe tener una duración entre 2 y 4 semanas para lograr la adaptación a las condiciones ex vitro. En este estudio 75% de las plantas aclimatadas tuvieron un crecimiento normal en tierra y el tallo se fortaleció durante el proceso con un período de aclimatación de 3 semanas. Las plantas regeneradas obtenidas eran muy similares a las descritas por Tallman (2006) quien en varios experimentos de regeneración obtuvo plantas de *N. glauca*

en forma de roseta que se elongaron con el tiempo, estos resultados los obtuvo con medios de aislamiento y cultivo similares a los utilizados en este estudio.

7.7. Eficiencia en la formación de callos y plantas regeneradas

Scowcroft (1980) y Shiba (2004) observaron que concentraciones entre 1 y 2×10^5 cel/ml incrementaron la formación de callos. Esto se demostró en el presente estudio ya que a medida que el número de células por mililitro disminuyó, el número de células en división y de formación de callos aumentó de forma notable.

La viabilidad de los callos se vio influenciada por la concentración hormonal, a bajas concentraciones de BAP (0.5, 1 y 2) la consistencia de los callos se volvió dura, el callo no regeneró brotes y mostró un deterioro manifestado en el color blanco que se produjo.

La eficiencia de formación de callo, alcanzó el 90% mostrando que las concentraciones hormonales fueron las óptimas para el desarrollo de plantas de *N. glauca*. Del 90% de los callos formados, un 80% formaron plantas completas que alcanzaron la maduración y pudieron ser aclimatadas exitosamente.

La eficiencia fue similar a la obtenida en otras especies del mismo género, como *N. debneyi* en la que se logró una frecuencia de división entre 50 y 80% en la formación de colonias de los protoplastos inicialmente sembrados (Scowcroft, 1980).

7.8. Comportamiento de plantas regeneradas en bolsas con tierra

Las plantas que reaccionaron bien al proceso de aclimatación, se transfirieron a bolsas con tierra para continuar su crecimiento. La viabilidad de las plantas transferidas a bolsas con tierra fue de 81%, porcentaje similar al obtenido por Tallman (2006) quien consiguió una viabilidad del 87% con plantas regeneradas a partir de protoplastos de las células flanqueantes de los estomas de hojas de tabaquillo. Las plantas pequeñas fueron más susceptibles al cambio a tierra, no se acoplaron a las nuevas condiciones y se secaron. El resto de plantas transferidas tuvieron un crecimiento óptimo y continuaron con su desarrollo. Fue importante mantener a las plantas alejadas de la luz para simular el fotoperíodo natural de estas plantas.

8. Conclusiones

- El objetivo principal del proyecto fue el establecimiento de un protocolo de aislamiento y regeneración de plantas de *N. glauca* a partir de protoplastos; este objetivo se cumplió y se logró la regeneración de plantas de *N. glauca* que fueron exitosamente transferidas a tierra.
- Para que la división de los protoplastos fuera efectiva, se debió considerar la concentración hormonal de los medios de aislamiento y regeneración, las horas y el tiempo de incubación, la densidad de protoplastos cultivados, y las condiciones del aislamiento.
- Las mejores concentraciones de protoplastos obtenidas para el aislamiento y regeneración de plantas de *N. glauca*, se encontraron entre $5 - 7 \times 10^5$ cel/ml, esta densidad de protoplastos sembrados influyó en la división celular.
- El número de protoplastos sembrados en el medio influyó en la división, concentraciones superiores a 7×10^5 cel/ml inhibieron la división y concentraciones menores a 1×10^5 cel/ml producen la muerte de los protoplastos.
- La preplasmólisis fue una etapa esencial para el aislamiento de protoplastos porque los preparó para que respondieran positivamente a la solución enzimática.

- Los protoplastos de *N. glauca* reaccionaron bien a un lapso de 16 horas de incubación con la solución enzimática a 28° C, después de 4 días de incubación se inició la división celular.
- El mejor medio para la regeneración de plantas a partir de callos de *N. glauca* fue MS + BAP 4 ppm / NAA 0.05 mg/L.
- Los callos mostraron una alta eficiencia en la formación de brotes, a las 11 semanas en la primera fase del proyecto, el 90% de callos presentaron uno o varios brotes. En la segunda fase, a las 14 semanas, el 95% de los callos presentaron uno o varios brotes.
- A pesar de que la frecuencia de división de los protoplastos fue baja, la eficiencia en formación de callos fue del 90% y en regeneración de plantas del 80%.
- El enraizamiento se dio sin necesidad de adición de hormonas al medio de cultivo (MS), se produjo 2 semanas después de transferidos los brotes al medio.
- El proceso de aclimatación fue efectivo, alcanzando una viabilidad del 75%, las plantas desarrollaron y se fortalecieron en el proceso.
- Las plantas transferidas a bolsas con tierra tuvieron una viabilidad del 81%, gracias a los nutrientes de la tierra continuaron su crecimiento y desarrollo.

9. Recomendaciones

- Trabajar con plantas in vitro de tabaquillo entre 1 y 2 meses de edad para el aislamiento de protoplastos.
- Controlar la temperatura de incubación de la solución enzimática con las hojas cortadas, se debe mantener una temperatura de 28° C
- Trabajar con concentraciones de protoplastos entre 1 y 2 x 10⁵ cel/ml para incrementar la frecuencia de división, la formación de callos y regeneración de plantas.
- Aislar las colonias después de 6 semanas de la siembra de protoplastos, no antes porque las colonias son muy pequeñas y dejan de crecer, ni después porque el aislamiento se dificulta.
- Transferir brotes de 0.5 cm de longitud al medio de cultivo MS, eliminando todo el callo presente alrededor del brote
- Realizar subcultivos de los callos cada 2 semanas para mantener su viabilidad.
- Las plantas aclimatadas se deben mantener alejadas de la luz, simulando el fotoperiodo de la planta.

10. Bibliografía

1. Binding, H; et al, Plant development from protoplasts of members of Bryophyta, Pteridophyta and Spermatophyta under identical conditions, Dinamarca, 1992.
2. Carlson, P; et al, Parasexual Interspecific Hybridization, USA, 1972
3. Cubero, J; Introducción a la Mejora Genética Vegetal, segunda edición, España, 2003.
4. Domenech, J; et al, Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotiana glauca*, España, 2006.
5. Dong, M; et al, Heat Suppresses Activation of an Auxin-Responsive Promoter in Cultured Guard Cell Protoplasts of Tree Tobacco, USA, 2007.
6. Griffiths, A; et al, Genética Moderna, Editora Interamericana, España, 2003.
7. Kader J, Isolation of Cellulolytic Fungi, Malaysia, 2006.
8. Kim, J; et al, Isolation of Protoplasts, and Culture and Regeneration into Plants in *Alstroemeria*, Holanda, 2005.
9. Komai, F; et al, Application of Nurse Culture for Plant Regeneration from Protoplasts of *Lilium Japonicum*, Japón, 2006.
10. Papadakis, A; et al, Reduced Activity of Antioxidant Machinery Is Correlated with Suppression of Totipotency in Plant Protoplasts, Greece, 2001.
11. Polci, P; Cultivo in Vitro e Hibridación Somática en Protoplastos, INTA, Argentina, 2004.
12. Puite, K; Progress in plant protoplast research, Physiology Plant, Denmark, 1992.
13. Reinert, J; Yeoman, M; Plant Cell and Tissue Culture; Springer-Verlag; New York, 1982.
14. Roberts, C; et al, Temperature and Abscisic Acid Can Be Used to Regulate Survival, Growth, and Differentiation of Cultured Guard Cell Protoplasts of Tree Tobacco, USA, 1995.
15. Scowcroft, R; Larkin, J; Isolation, Culture and Plant Regeneration from Protoplasts of *Nicotiana debneyi*, Plant Physiology, Australia, 1980.
16. Shabana, Y; et al, Preparation and Regeneration of Mycelial Protoplasts of *Alternaria*, Alemania, 1997.
17. Shiba, T; Mii, M; Plant Regeneration from Mesophyll and Cell Suspension Derived Protoplasts of *Dianthus Acicularis* and Characterization of Regenerated Plants, Japón, 2004.

18. Siemens, J; Sacristán, M; Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Matthiola incana*, Alemania, 1994.
19. Sinha, A; et al, Effect of biotic factors on the isolation of *Lupinus albus* protoplasts, UK, 2003.
20. Smart, L; et al, Isolation of genes predominantly expressed in guard cells and epidermal cells of *Nicotiana glauca*, USA, 2000.
21. Smart, L; et al, Isolation of RNA and Protein from Guard Cells of *Nicotiana glauca*, USA, 1999.
22. Sotiriou, P; et al, Protoplast isolation and culture from carob (*Ceratonia siliqua*) hypocotyls: ability of regenerated protoplasts to produce mannose – containing polysaccharides, Greece, 2007.
23. Suzuki, K; et al, Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution, Japón, 2002.
24. Tallman, G; Guard Cell Protoplasts, Methods in Molecular Biology, vol. 318, Plant Cell Protocols, Second Edition, United States, 2006.
25. Taylor, J; et al, Approaches to evaluating the extent to which guard cell protoplasts of *Nicotiana glauca* (tree tobacco) retain their characteristics when cultured under conditions that affect their survival, growth, and differentiation, Journal of Experimental Botany, Vol.49, USA, 1998.
26. Trojak, A; Berbec, A; Potential of *Nicotiana glauca* as a source of resistance to black root rot *Thielaviopsis basicola* Ferr. in tobacco improvement, Poland, 2005.
27. Tylicki, A; et al, Structural and Ultrastructural Analysis of *Solanum lycopersicoides* Protoplasts during Diploid Plant Regeneration, Poland, 2002.
28. Zhan, X; et al, In Vitro Plantlet Formation in *Linum marginale* from Cotyledons, Hypocotyls, Leaves, Roots and Protoplasts, Australia, 1989.

11. Tablas

Tabla 1: Composición de soluciones y medios utilizados para el aislamiento y cultivo de protoplastos

Macroelementos	MPROT (mg/L)	CPW (mg/L)
Ca (H ₂ PO ₄) ₂ .H ₂ O	100.0	-----
CaCl ₂ .2H ₂ O	450.0	1,480.0
KH ₂ PO ₄	-----	27.2
KNO ₃	2,500.0	101.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	250.0	246
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	170.0	-----
(NH ₄) ₂ SO ₄	134.0	-----
Microelementos		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	-----
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
H ₃ BO ₃	3.0	-----
KI	0.75	0.16
MnSO ₄ .4H ₂ O	13.2	-----
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	-----
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.0	-----
Sucrosa	1%	-----
Manitol	100,000.0	-----
Inositol	100.0	-----
Ácido nicotínico	1.0	-----
Piridoxina	1.0	-----
Tiamina HCl	10.0	-----
2,4-D	0.1	-----
NAA	1.0	-----
6BAP	1.0	-----
pH	5.8	5.8

Fuente: Reinert, 1982

Tabla 2: Condiciones de aislamiento de los protoplastos de la primera fase del proyecto

Aislamientos	Fecha	Horas de incubación (solución enzimática)	No. de lavados	No. de cajas obtenidas (siembra de protoplastos)	Días en incubación (medio de cultivo, 22° C)
1	11/01/07	16	2	2	2 días
2	8/02/07	16	3	3	4 días
3	14/02/07	16	3	2	4 días
4	9/03/07	15	2	2	4 días

Tabla 3: Condiciones de aislamiento de los protoplastos de la segunda fase del proyecto

Aislamientos	Fecha	Horas de incubación (solución enzimática)	No. de lavados	No. de cajas obtenidas (siembra de protoplastos)	Días en incubación (medio de cultivo, 22° C)
5	30/03/07	15	2	4	4 días
6	9/05/07	15	2	2	4 días
7	5/06/07	16	2	2	4 días

Tabla 4: Número de Protoplastos aislados en los ensayos de la primera fase del proyecto

Aislamientos	Fecha	Horas de incubación (solución enzimática)	No. de cajas obtenidas (siembra de protoplastos)	Contaje (cel/ml)
1	11/01/07	16	2	5.5×10^5
2	8/02/07	16	3	7.0×10^5
3	14/02/07	16	2	7.0×10^5
4	9/03/07	15	2	5.7×10^5

Tabla 5: Número de Protoplastos aislados en los ensayos de la segunda fase del proyecto

Aislamientos	Fecha	Horas de incubación (solución enzimática)	No. de cajas obtenidas (siembra de protoplastos)	Contaje (cel/ml)
5	30/03/07	15	4	5.14×10^5
6	9/05/07	15	2	7.06×10^5
7	5/06/07	16	2	1.56×10^5

Tabla 6: Tiempos de aparición de brotes y raíces, número de brotes en los callos obtenidos de la primera fase del proyecto

Aislamientos	Cambio de Mprot 3% sucrosa	Cambio a MS + hormonas y Mprot 3% sucrosa sólido	MS BAP 4/NAA 0.05	Aparición de brotes	Brotes a MS	Aparición de la raíz
1 11/01	A las 3 semanas de la extracción (2/02)	A las 5 semanas de la extracción(16/02)	1. A las 7 semanas de la extracción Callos grandes (1 cm de diámetro), verdes 2. A las 9 semanas de la extracción Callos de más de 1 cm de diámetro, verdes con brotes pequeños (menos de 0.4 cm de longitud), 2 o 3 brotes por callo	1. A las 9 semanas de la extracción (14/03) 1 brote por callo, 34 callos 37 brotes 2. A las 11 semanas todos presentan brotes grandes (27/03) 60 brotes	A las 11 semanas de la extracción	A las 13 semanas de la extracción (12/04)
2 8/02	A las 2 semanas de la extracción (23/02)	A las 4 semanas de la extracción(09/03)	1. A las 4 semanas de la extracción Callos grandes (1 cm de diámetro), suaves y verde claros 2. A las 6 semanas de la extracción (26/03) Callos grandes (1.2 cm de diámetro), suaves verde claros	1. A las 9 semanas de la extracción (12/04) 63 callos, 7 brotes 2. A las 11 semanas todos presentan brotes (26/04) 80 brotes	A las 12 semanas de la extracción (9/05)	A las 14 semanas de la extracción (22/05)
3 14/02	A las 2 semanas de la extracción (2/03)	A las 3 semanas de la extracción(09/03)	1. A las 4 semanas de la extracción Callos de 0.8 cm de diámetro, verde oscuro y consistencia suave 2. A las 6 semanas de la extracción (26/03)	1. A las 8 semanas de la extracción (15/04) 80 callos, 21 brotes 2. 60 brotes (26/04)	A las 11 semanas de la extracción (30/04)	A las 13 semanas de la extracción (16/05)
4 9/03	A las 2 semanas de la extracción (26/03)	-----	1. A las 5 semanas de la extracción (15/04) Callos verdes , 1.2 cm de diámetro 3. A las 7 semanas de la extracción (23/04) Callos verdes, 1 cm de diámetro	A las 9 semanas de la extracción (11/05) 16 callos, 2 brotes A las 11 semanas, 28 brotes	A las 11 semanas de la extracción (28/05)	A las 14 semanas de la extracción (15/06)

Tabla 7: Tiempos de aparición de brotes y raíces en los callos obtenidos de la segunda fase del proyecto

Aislamientos	Cambio de Mprot 3% sucrosa	Cambio a MS + hormonas	Aislamiento por colonias	Aparición de brotes	Cambio a MS y aparición de raíces	Aparición de la raíz
5 30/03	A las 2 semanas de la extracción (13/04)	A las 4 semanas de la extracción(27/04) Se dividieron las gotas con los protoplastos y se las colocó en MS	A las 5 semanas de la extracción (7/05) Concentración 5.14×10^5 Número de colonias aisladas 644. Se trabajó con la mitad del número original de colonias.	A las 11 semanas de la extracción (14/06) muy pequeños, solo 3 brotes A las 14 semanas todos presentan brotes (6/07) Brotes de 0.4 cm o más 320 callos, 180 brotes	A las 20 semanas de la extracción (28/08) 90 brotes cambiados a MS normal, frascos	A las 23 semanas de la extracción
6 09/05	A las 2 semanas de la extracción (23/05)	A las 3 semanas de la extracción(30/05) Se dividieron las gotas con los protoplastos y se las colocó en MS	A las 4 semanas de la extracción (7/06) Concentración 7.06×10^5 Número de colonias aisladas 483. Se trabajó con la mitad del número original de colonias.	A las 13 semanas de la extracción (7/08) Brotes pequeños menos de 0.3 cm de longitud 200 callos, 120 brotes	A las 16 semanas de la extracción (27/08) 16 brotes fueron cambiados a MS normal	A las 18 semanas de la extracción
7 05/06	A las 2 semanas de la extracción (19/06)	A las 3 semanas de la extracción(25/06) Se dividieron las gotas con los protoplastos y se las colocó en MS	A las 4 semanas de la extracción (29/06) Concentración 1.56×10^5 Número de colonias aisladas 150. Se trabajó con la mitad del número original de colonias.	A las 12 semanas de la extracción 27/08 Cada callo fue dividido en dos (75 callos) A las 13 semanas de la extracción 30 Brotes de menos 0.3 cm de longitud	Los brotes se cambiaron a las 14 semanas de la extracción Brotes de 0.4 cm de longitud	A las 16 semanas de la extracción

Tabla 8: Aclimatación de plantas de *N. glauca* en la primera fase del proyecto

Número	Fecha de extracción	Inicio Aclimatación	Características
1	11/01	A las 22 semanas de la extracción	11 Plantas entre 3 y 10 centímetros de longitud, con raíces largas rodeando el agar
2	8/02	A las 17 semanas de la extracción	4 Plantas vigorosas entre 3 y 10 centímetros de longitud, raíces largas
3	13/02	A las 18 semanas de la extracción	5 Plantas entre 3 y 8 centímetros de longitud pequeña, raíces largas. Presencia de 5 a 9 hojas grandes
4	9/03	A las 22 semanas de la extracción	8 Plantas entre 9 y 10 centímetros de longitud con hojas grandes

Tabla 9: Aclimatación de plantas de *N. glauca* en la segunda fase del proyecto

Número	Fecha de extracción	Inicio Aclimatación	Características
1	30/03	A las 20 semanas de la extracción	7 Plantas entre 7 y 10 centímetros de longitud, con raíces largas y número de hojas entre 6 y 8
2	9/05	A las 18 semanas de la extracción	5 Plantas entre 5 y 8 centímetros de longitud, con raíces largas
3	5/06	A las 17 semanas de la extracción	3 Plantas pequeñas entre 3 y 6 centímetros de longitud, raíces largas. Presencia de 5 a 9 hojas grandes

12. Figuras

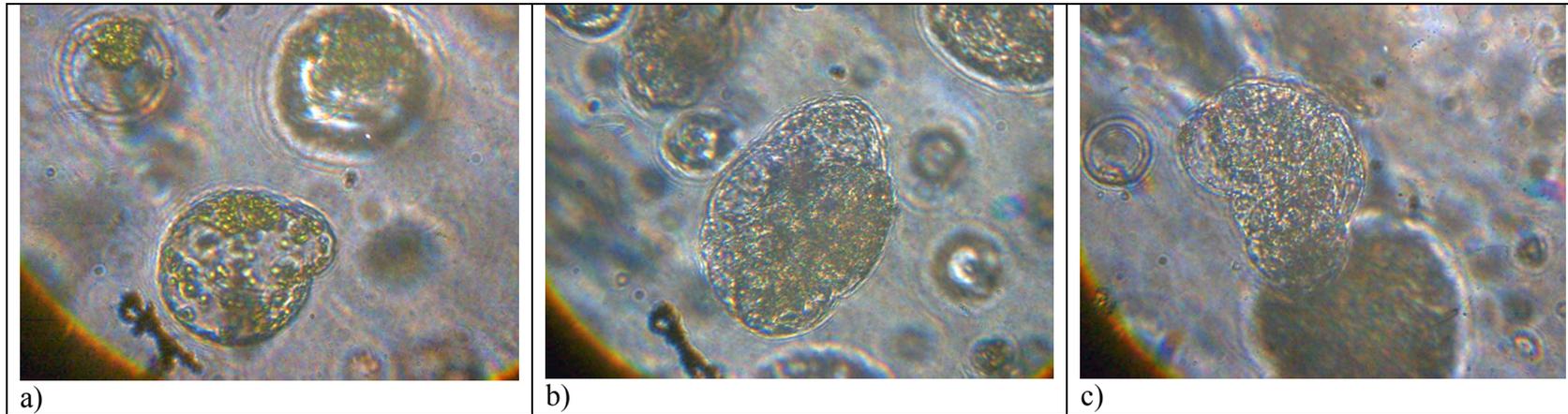
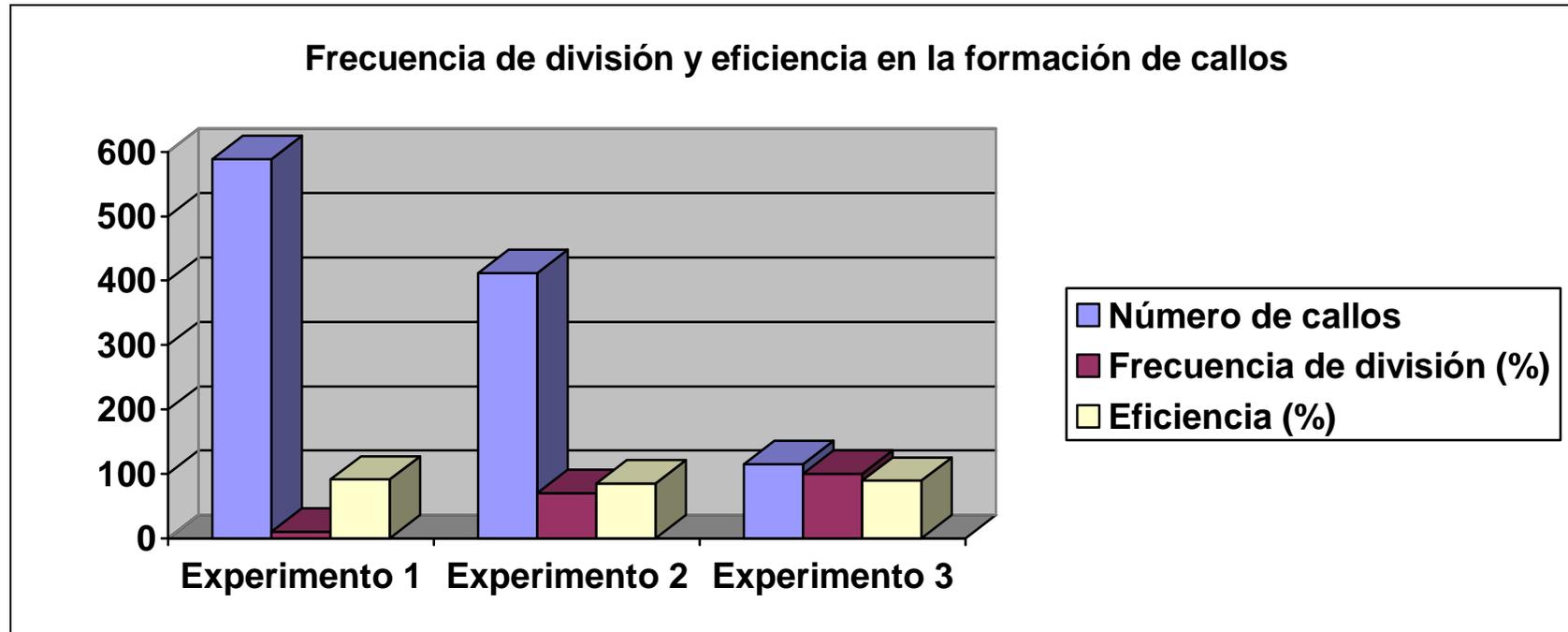


Fig 1: Primeras divisiones celulares de *N. glauca*, en medio de cultivo Mprot a) estado de 2 células a los 3 días de la incubación, b) estado de 4 células a los 5 días de la incubación, c) pequeños microcallos observados a los 10 días de la incubación.

Figura 2: Frecuencia de división celular y eficiencia en la formación de callos



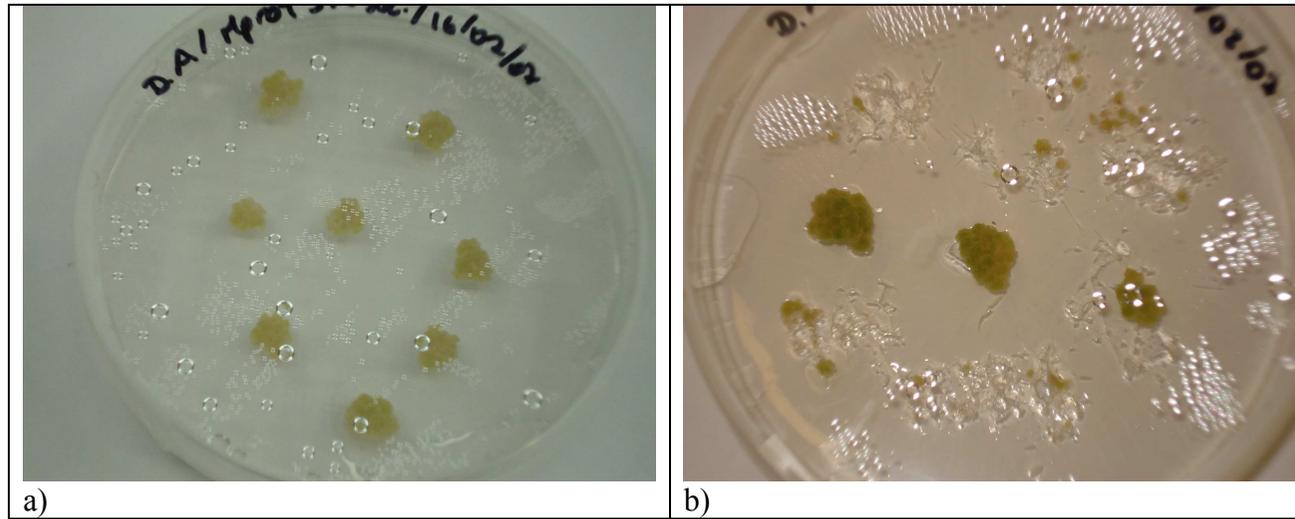


Fig 3: Crecimiento de callos obtenidos a partir de protoplastos de *N. glauca* a) en medio Mprot 3% sucrosa y b) en medio MS + BAP 4 ppm / NAA 0.05 mg/L



Fig 4: Crecimiento de callos de *N. glauca* en medio MS + BAP 4 ppm / NAA 0.05 mg/L

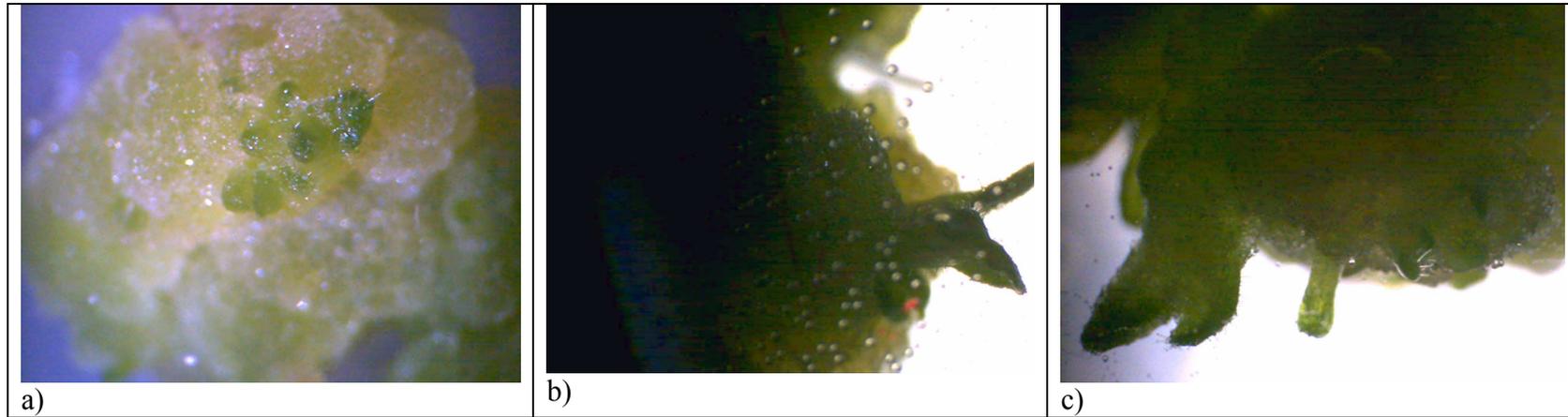


Fig 5: Brotes de *N. glauca* en medio MS + BAP 4ppm / NAA 0,05 mg/L a) a las 9 semanas de la siembra de protoplastos, b) y c) a las 11 semanas de la siembra de protoplastos

Figura 6: Número de brotes transferidos a medio de cultivo (MS) sin hormonas y número de plantas regeneradas en la primera fase

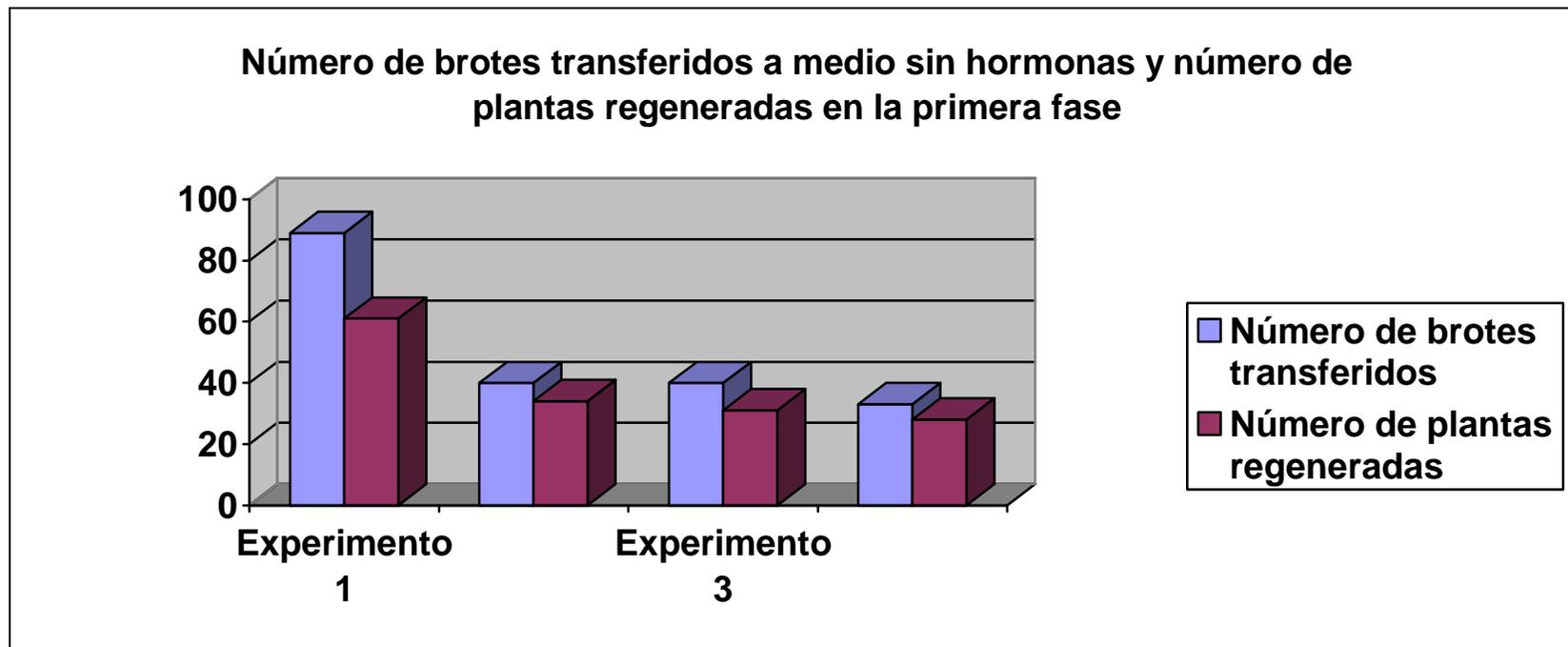
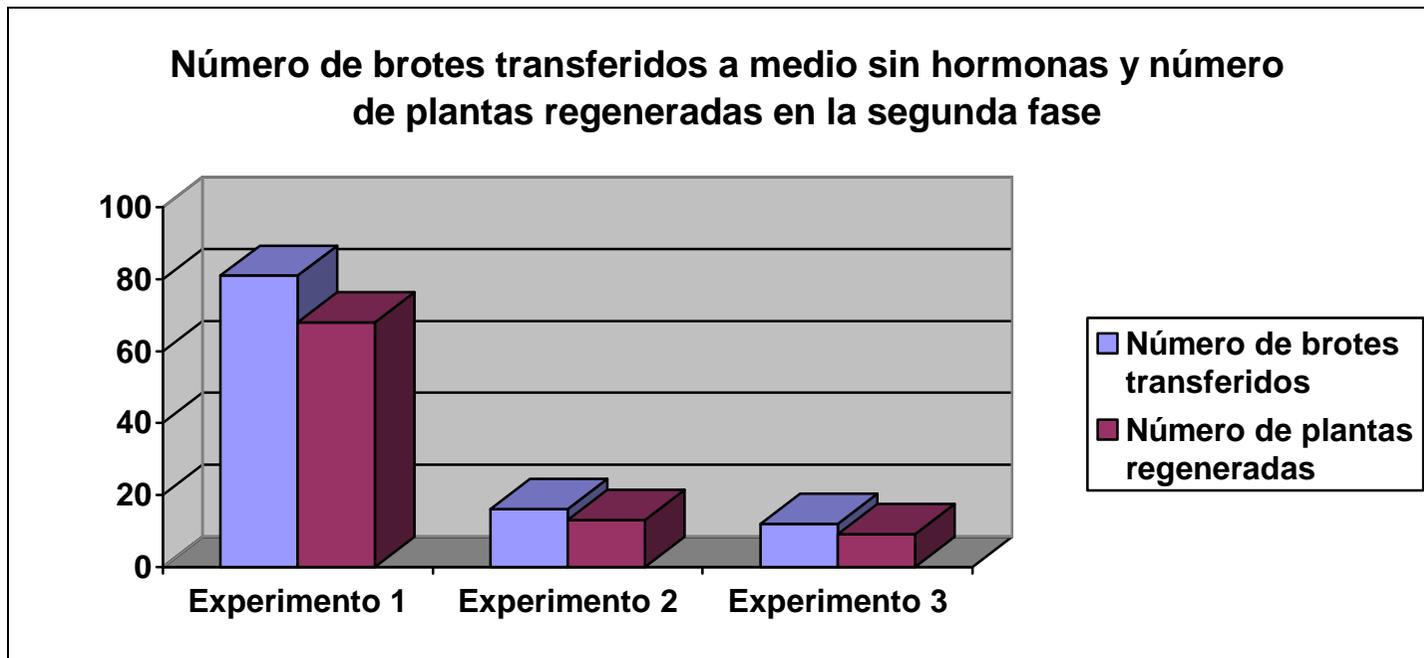


Figura 7: Número de brotes transferidos a medio de cultivo (MS) sin hormonas y número de plantas regeneradas en la segunda fase



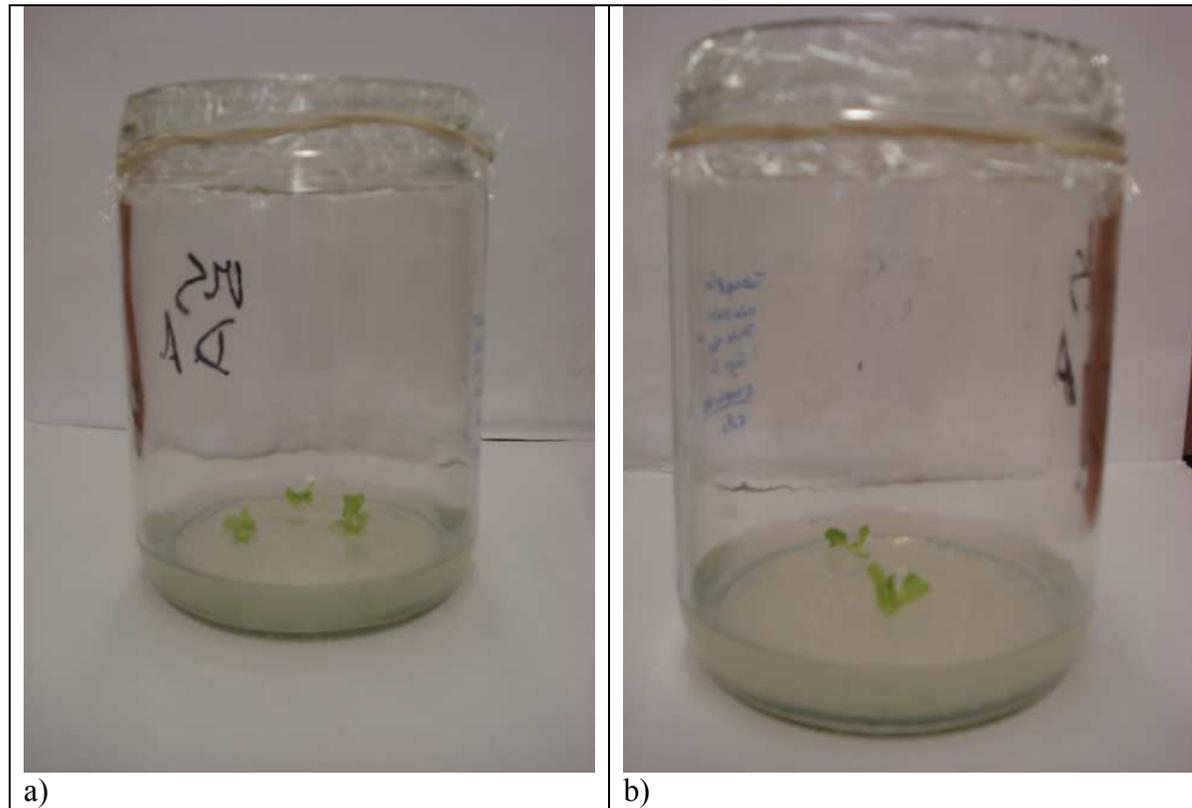


Fig 8: Subcultivo de brotes de *N. glauca* a medio de cultivo MS, a) brotes de 11-13 semanas, con un tamaño entre 0.4 y 0.6 cm de longitud

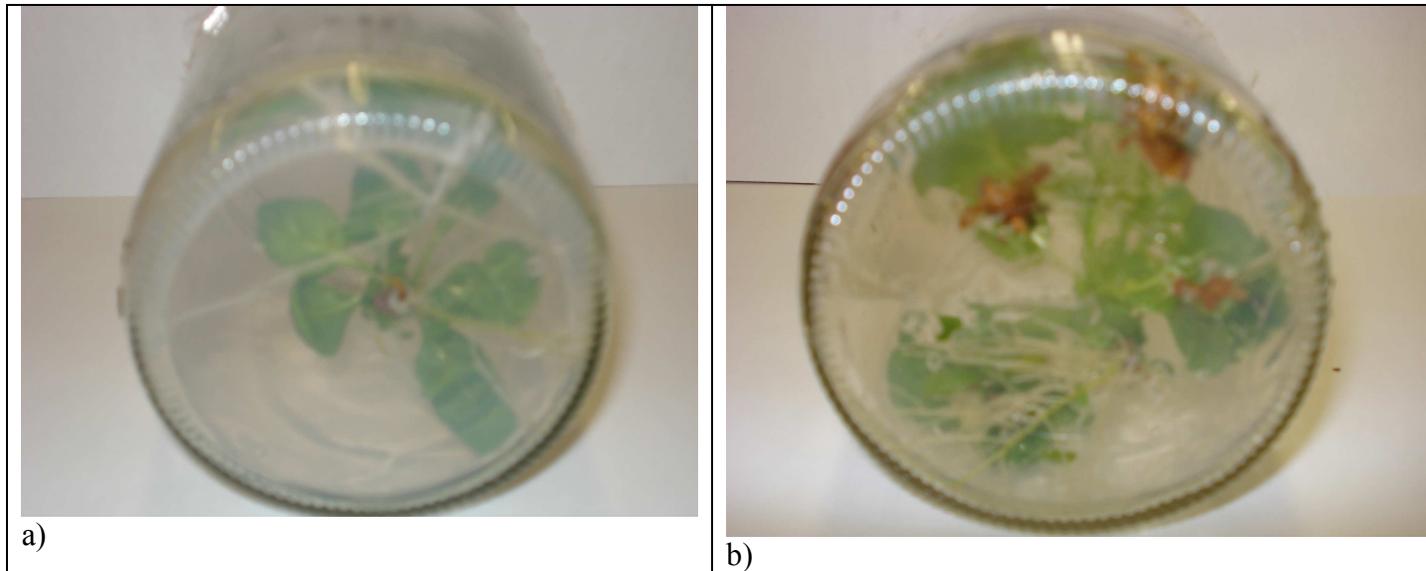


Fig 9: Enraizamiento de brotes de *N. glauca* en medio de cultivo MS, a) raíces a las 2 semanas de transferidos los brotes al medio de cultivo, b) raíces muy grandes después de 4 semanas de transferidos los brotes al medio de cultivo MS

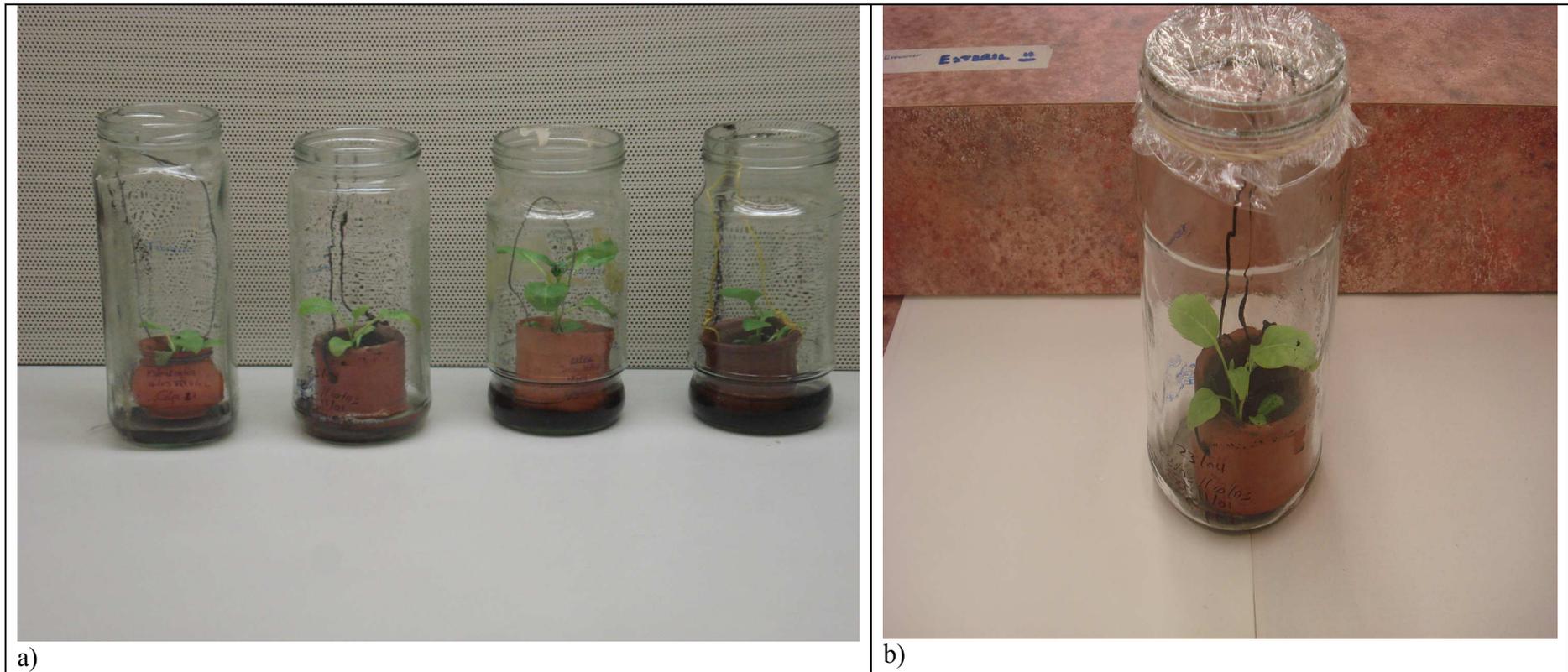


Fig 10: Aclimatación de plantas obtenidas a partir de protoplastos de *N. glauca*, a) y b) plantas de 15 – 18 semanas sometidas al proceso de aclimatación

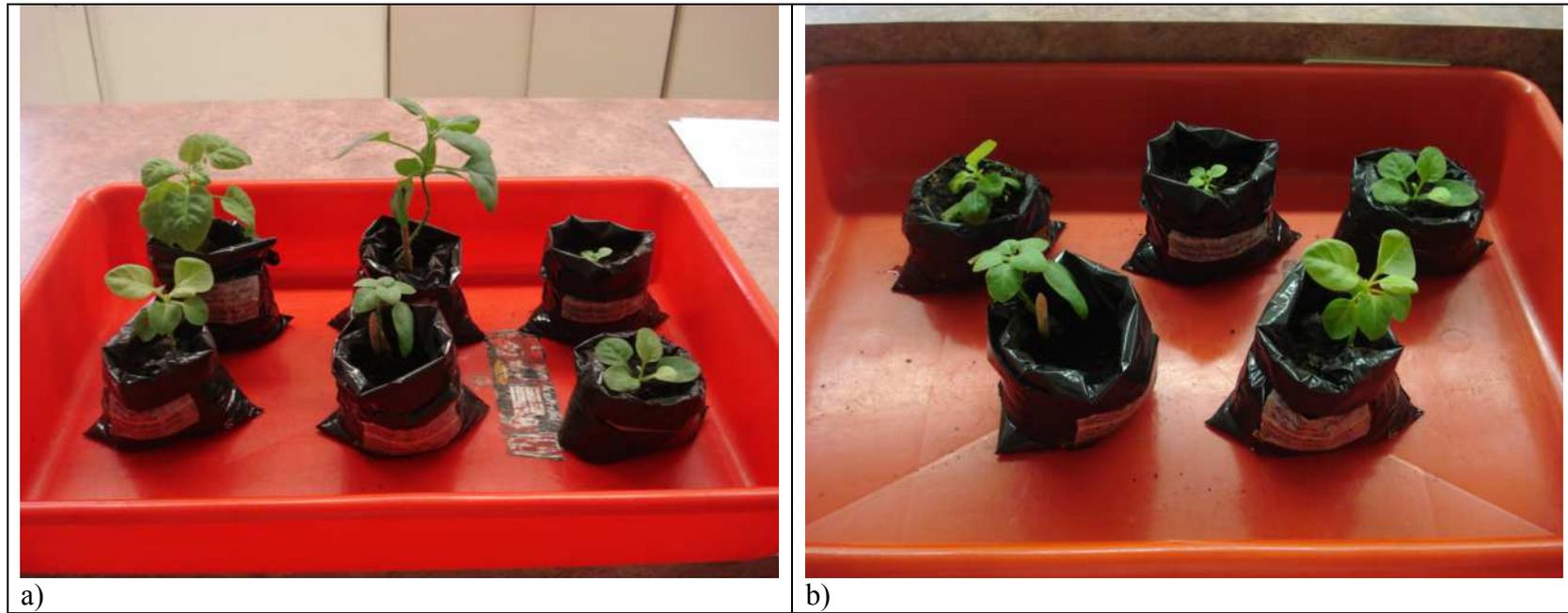


Fig 11: Transferencia de plantas de *N. glauca*, obtenidas a partir de protoplastos, a bolsas con tierra, a) y b) plantas de 21 semanas transferidas

