



Optimización de un protocolo para la obtención de protoplastos de olivo

Laia Ribalta^{1*}, Jose A. Mercado-Hornos¹, Araceli Barceló-Muñoz², Kamil Szymonik³, José Ángel Mercado¹, Fernando Pliego-Alfaro¹, Ewa Grzebelus³, Elena Palomo-Ríos¹

¹Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora', Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Campus de Teatinos, 29010 Málaga, España

²IFAPA Centro de Churriana, 29140, Churriana, Málaga, España

³Department of Plant Biology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Horticulture, University of Agriculture in Krakow, Ave. Mickiewicza 21, Krakow 31-120, Poland

ribalta@uma.es

1 INTRODUCCIÓN

Los protoplastos ofrecen un sistema versátil para la introducción y edición de genes o la obtención de híbridos somáticos. Algunos trabajos en olivo (*Olea europaea* L.) han permitido obtener microcallos a partir de protoplastos derivados de cotiledones, hoja o peciolo, utilizando driselasa para la digestión de la pared celular, aunque sin lograr la regeneración de plantas.

El objetivo principal de esta investigación es la optimización de un protocolo para la obtención de protoplastos viables de olivo a partir de células embriogénicas y hojas.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se probaron dos protocolos para el material embriogénico; Sahouli et al. (2022) y Grzebelus et al. (2012), y para hoja se probó el de Yoo et al. (2017). En la Figura 1 se incluyen de forma esquemática los protocolos optimizados para la obtención de protoplastos de olivo.

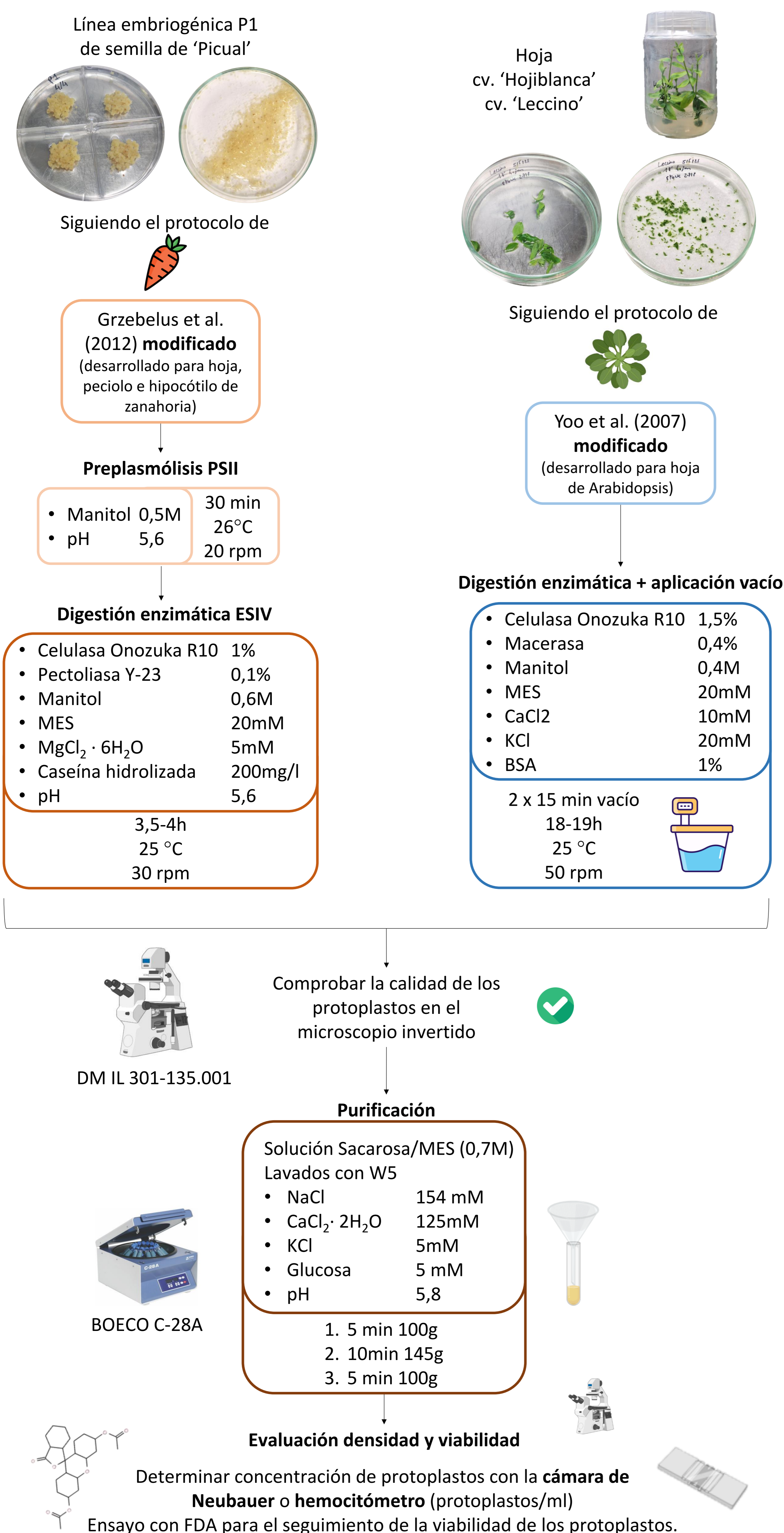


Figura 1. Protocolos seguidos en la obtención de protoplastos de olivo. El proceso para obtener protoplastos consta de distintas fases: 1) Obtención del material en crecimiento activo 2) Preplasmólisis (opcional en algunos casos) 3) Digestión enzimática 4) Purificación 5) Conteo y viabilidad 6) Cultivo.

3 RESULTADOS

En el caso de callo embriogénico, el protocolo descrito por Sahouli et al. (2022), cuya mezcla enzimática incluye driselasa, no fue eficaz, ya que indujo necrosis celular sin lograr la liberación de protoplastos. En cambio, el protocolo modificado de Grzebelus et al. (2012) permitió obtener un buen rendimiento de liberación de protoplastos (Figura 2).

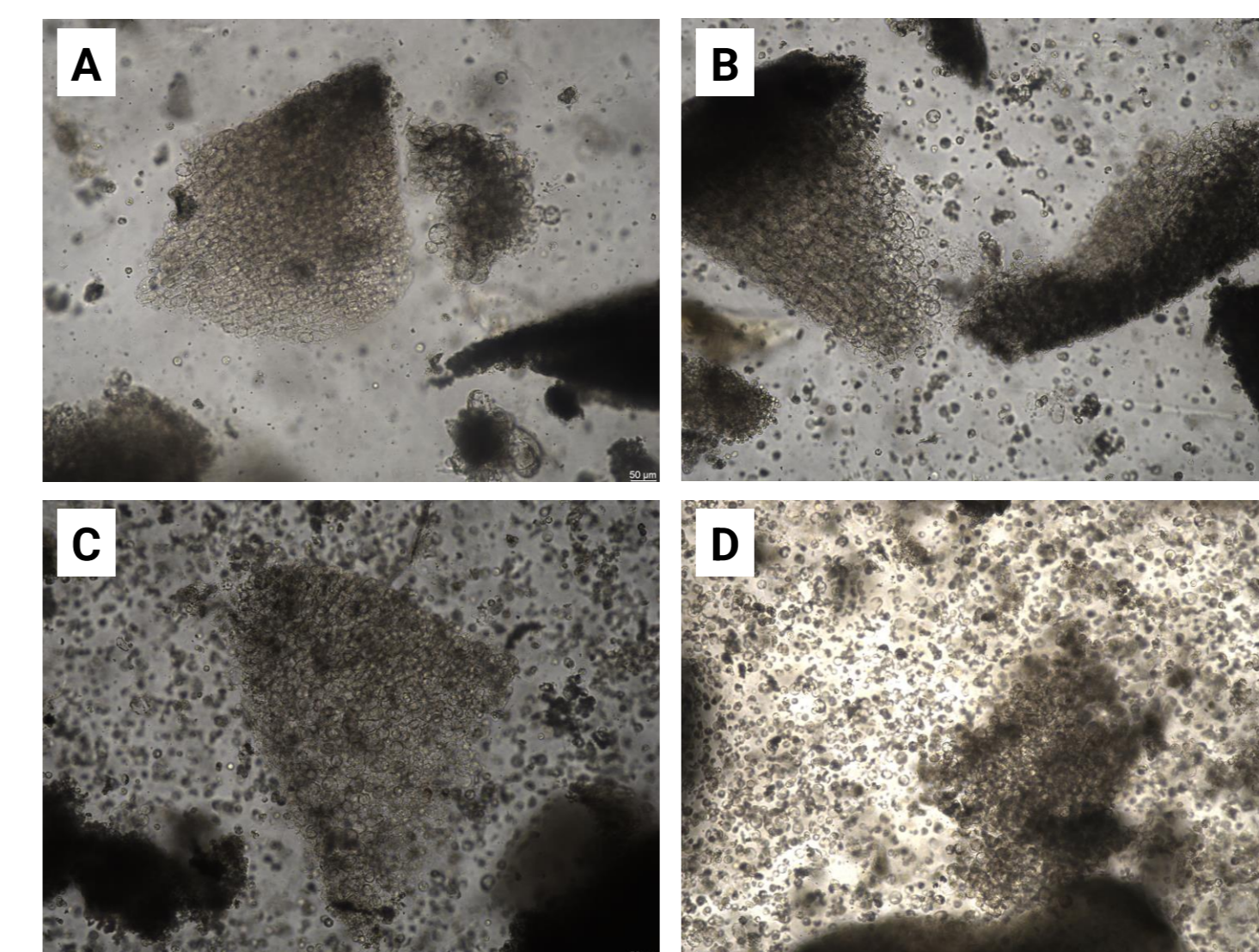


Figura 2. Observación de protoplastos en el microscopio invertido en la solución enzimática ESIV (A) Después de 1h de incubación (B) 2h de incubación (C) 3h de incubación (D) 3,5h de incubación (escala 50 µm)

La purificación de protoplastos requiere el establecimiento de un gradiente osmótico y de densidad que preserve su integridad y permita una separación eficaz de los protoplastos viables frente a restos celulares y células dañadas. Sahouli et al. (2022) utilizan un gradiente de sacarosa al 21%, Grzebelus et al. (2012) una solución de 0,5 M sacarosa/MES, mientras Yoo et al. (2007) dejan precipitar en hielo los protoplastos. En este estudio, la concentración más efectiva fue de 0,7 M de sacarosa/MES, con la cual se obtuvo la mayor recuperación de protoplastos viables (Figura 3). Las densidades obtenidas fueron de 1×10^6 y 3×10^6 protoplastos/ml en callo embriogénico y hoja, respectivamente (Tabla 1) y la viabilidad entre 80-99% (Figura 4).

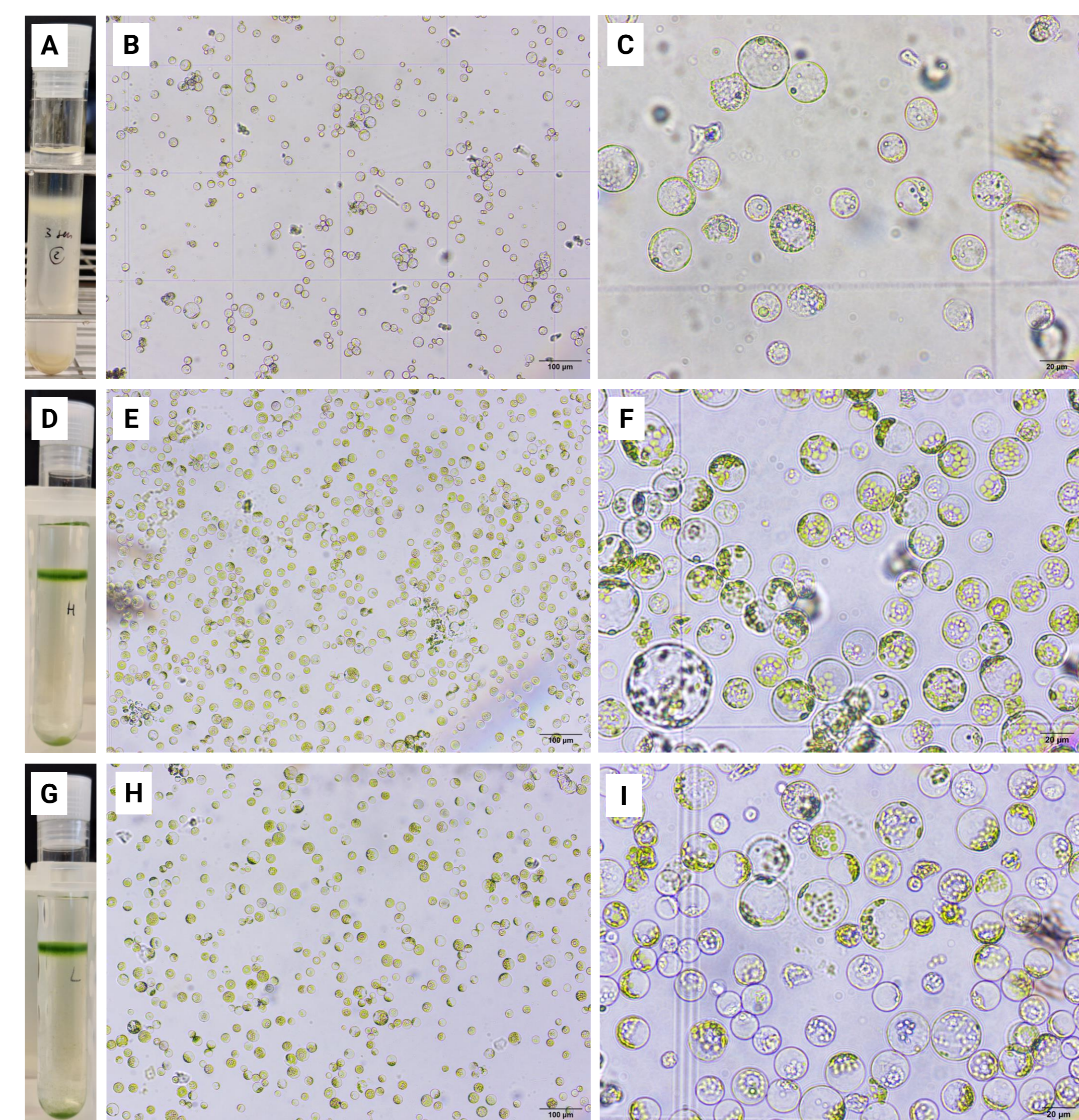


Figura 3. Purificación de protoplastos viables de callo embriogénico de olivo y hoja. (A) Obtención del anillo de protoplastos viables de callo embriogénico procedente de semilla de 'Picual' (B-C) Conteo de protoplastos viables de callo embriogénico en el microscopio (D) Obtención del anillo de protoplastos viables procedentes del cv. 'Hojiblanca' (E-F) Conteo de protoplastos viables del cv. 'Hojiblanca' (G) Obtención del anillo de protoplastos viables procedentes del cv. 'Leccino' (H-I) Conteo de protoplastos viables del cv. 'Leccino' (escala en B, E, H 100 µm y en C, F, I 20 µm)

Tabla 1. Eficacia del aislamiento de protoplastos liberados de callo embriogénico y hojas, expresado en protoplastos por gramo de peso fresco de material utilizado en la extracción.

Genotipo	Tejido	Densidad de protoplastos (protoplastos/g peso fresco)	
		$\bar{x} \pm DE$	n ^a
Semilla de Picual	callo embriogénico	6,19 ± 2,22x10 ⁵	12
cv. 'Hojiblanca'	hoja	1,1 ± 5,48x10 ⁷	5
cv. 'Leccino'	hoja	7,92 ± 5,88x10 ⁶	2

^a número de réplicas

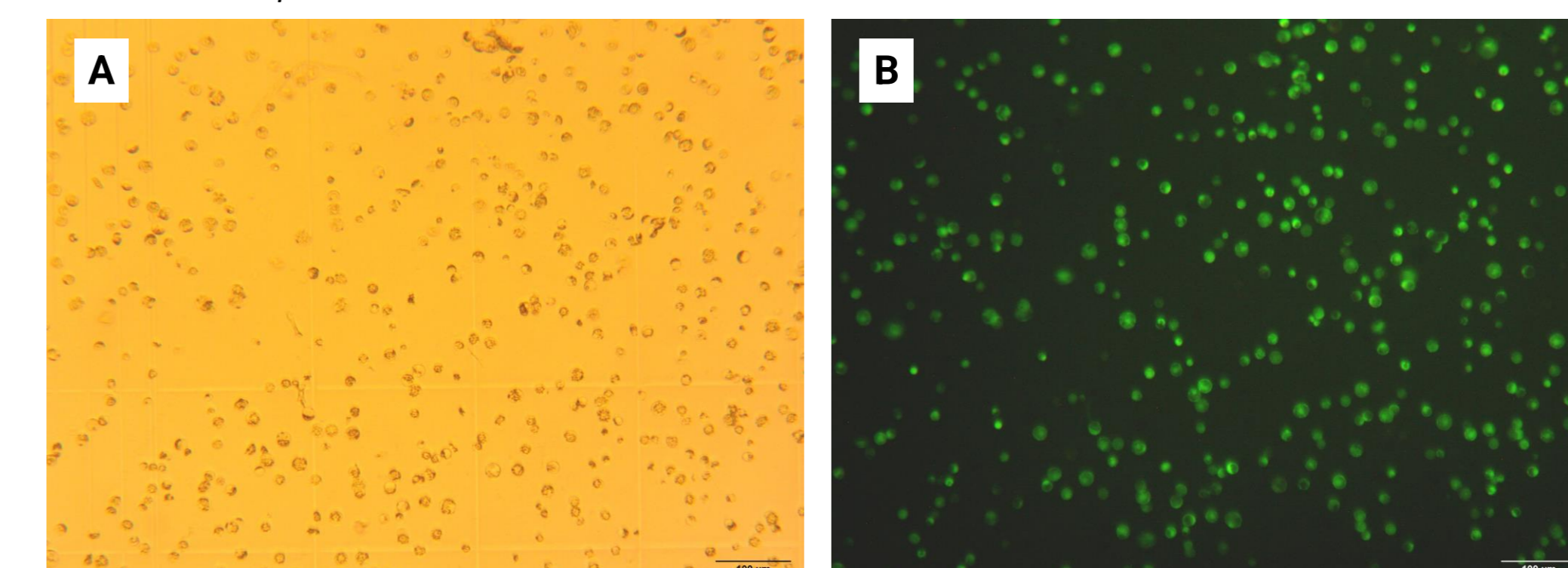


Figura 4. Viabilidad después de la cuantificación de los protoplastos cv 'Hojiblanca' (A) Observación de protoplastos en campo claro (B) Observación en luz azul (~490 nm) de protoplastos viables que emiten luz verde (tinción con fluoresceína diacetato, FDA) (escala 100 µm)

4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Actualmente se trabaja en la edición de protoplastos con ribonucleoproteínas Cas9-gRNA y en la regeneración de plantas.