

Protocolo para el aislamiento de cloroplastos intactos de hojas de plantas de *Musa* spp. obtenidas por cultivo *in vitro* y evaluación de la actividad fotosintética

Michel Leiva-Mora*, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Cynthia Sánchez-García, Berkis Roque. *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830 e-mail: michel@ibp.co.cu

RESUMEN

Los cloroplastos son los orgánulos de las células vegetales donde se realiza la fotosíntesis, al convertir la energía lumínica en energía química (ATP) y generar poder reductor (NADPH). El aislamiento de cloroplastos y la evaluación de la actividad fotosintética en condiciones *in vitro*, ha sido una tarea difícil debido a las alteraciones estructurales y funcionales que sufren los cloroplastos y a la presencia de fracciones celulares contaminantes. En el presente trabajo se propone un protocolo para el aislamiento de cloroplastos de hojas de bananos, así como un procedimiento para la evaluación de la actividad fotosintética de dicha suspensión. En él se resumen los principales reactivos, soluciones, materiales biológicos, equipos, y condiciones necesarias para reproducirlo en condiciones de laboratorio. Finalmente, se sugieren diversas aplicaciones que puede tener el presente protocolo en el campo de la enseñanza e investigación científica relacionada con la biotecnología vegetal.

Palabras clave: 2,6-diclorofenolindofenol, equivalentes reductivos, fotosíntesis, reactivo de Hill

ABSTRACT

Chloroplasts are organelles of plant cells where photosynthesis takes place by converting light energy into chemical energy (ATP) and generating reducing power (NADPH). Isolation of chloroplasts and evaluation of photosynthetic activity *in vitro* has been a difficult task due to structural and functional changes suffered by chloroplasts during their isolation and the presence of contaminating cell fractions. In this paper we propose a protocol for the isolation of chloroplasts from banana leaves and a procedure for the evaluation of the photosynthetic activity of chloroplast suspension. The main reagents, solutions, biological materials, equipment, and conditions necessary to reproduce it in laboratory conditions are summarized. Finally, several applications of this protocol are suggested to be used in teaching and scientific research related to plant biotechnology.

Key words: 2,6-dichlorophenol-indophenol, Hill reaction, photosynthesis, reductive equivalents

INTRODUCCIÓN

Los cloroplastos, son orgánulos subcelulares (plastidios) verdes, con un diámetro que puede variar desde 5 a 10 μm . Están presentes en las células mesoflicas de las hojas o en cualquier otro tejido vegetal con capacidad fotosintética. Las angiospermas pueden contener de 15 a 20 cloroplastos por célula fotosintética. Hasta el 50% de la proteína foliar puede estar contenida en los cloroplastos. Su forma y tamaño varía en dependencia de la especie vegetal. Los cloroplastos se originaron como organismos endosimbóticos en la célula eucariota primitiva y poseen una autonomía genética parcial, al contener ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido

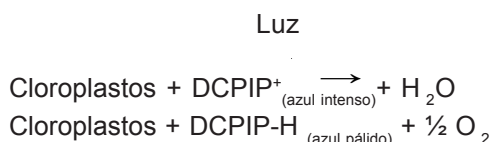
ribonucleico (ARN) y toda la maquinaria enzimática de replicación, transcripción y traducción (Barceló *et al.*, 2007).

Una suspensión de cloroplastos aislados puede desprender O_2 en presencia de luz, si se suministra un compuesto oxidado capaz de aceptar electrones procedentes de la fotólisis del agua. De esta forma, el proceso de desprendimiento de O_2 en la fotosíntesis puede ser separado del de la fijación de CO_2 (Kozuleva e Ivanov, 2010).

En la hoja intacta, los principales aceptores naturales de electrones son la ferredoxina y el NADP, pero se inactivan durante el proceso de

aislamiento de los cloroplastos. En varios de los experimentos *in vitro*, estos aceptores naturales pueden sustituirse por 2,6 diclorofenolindofenol (DCPIP) (Sauer y Park, 1965, Goltsev *et al.*, 2008).

Este compuesto es azul intenso en su forma oxidada (quinona) pero se decolora lentamente cuando adquiere su forma reducida (fenol). La reacción que tiene lugar es la siguiente:



La evaluación de la actividad fotosintética en condiciones *in vitro*, ha sido una tarea difícil debido a las alteraciones estructurales y funcionales que sufren los cloroplastos y a la presencia de fracciones celulares contaminantes durante el proceso de aislamiento.

El objetivo del presente trabajo, se dirigió a describir un protocolo para el aislamiento de cloroplastos intactos de hojas de bananos y para la evaluación de la actividad fotosintética. Este protocolo es una modificación del referido por Bussogoro *et al.* (2004).

MATERIALES

Reactivos, soluciones y materiales biológicos

- Tampón de extracción (para la preparación de un litro): 330mM de D-sorbitol (Fluka, número de catálogo 85532), 0.4mM de cloruro de potasio (Fluka, número de catálogo 60128), 2mM de Hepes (Fluka, número de catálogo 5445), 0.5 mM de Cloruro de calcio (Spectrum, número de catálogo C1086). Ajustar el pH de la solución a 5.6.
- Solución de *Percoll*[®] (Amersham Biosciences, número de catálogo 195369). o *Ficoll*[®] 400 (Sigma, número de catálogo F4375) al 35% (m/v).
- Material biológico: plantas de *Musa* spp. propagadas *in vitro* vía organogénesis (Orellana, 1994) o mediante embriogénesis somática (Kosky *et al.*, 2001). Posteriormente, se aclimatizan en casa de cultivo durante 12 a 14 semanas. Se sugiere utilizar como sustrato una formulación compuesta por 50% de humus

de lombriz, 30% de compost y 20% de zeolita en una razón de 5:3:2 (v/v). Se emplearán las hojas más jóvenes expandidas (primera y segunda).

Equipos, materiales y condiciones

- Agua desionizada estéril (seis litros)
- Balanza analítica
- Bandejas pequeñas (2)
- Batidora (Waring)
- Vaso de precipitado (*Beaker*) de 500 ml de capacidad
- Bomba de vacío
- Cámara frigorífica de -20°C
- Centrífuga refrigerada de rotor flexible que pueda alcanzar hasta 2 000 g (Beckman, modelo J2-21)
- Contador de colonias manual
- Embudo de vidrio (2) y embudo plástico (1)
- Espectrofotómetro
- Gasa estéril o *cheesecloth* (Moorland, número de catálogo 0036)
- Gradilla para tubos de centrifugación
- Habitación oscura o recipiente opaco donde se pueda colocar la suspensión de cloroplastos y protegerla de la luz
- Hematócmetro (Neubauer)
- Hielo (no menos de 10 recipientes de 500 ml)
- Micropipetas de 200 μ l, 1 000 μ l y 5 000 μ l
- Recipiente para almacenar hielo y conservar las muestras
- Tampón de extracción estéril (un litro)
- Temporizador (*timer*)
- Tijera
- Tubos (Falcon) de 50 ml de capacidad (20 tubos).
- Parafilm[®]

PROCEDIMIENTO

I. Obtención de la suspensión de cloroplastos

1. Cortar con una tijera las primeras dos hojas expandidas de las plantas de bananos.
2. Lavar dos veces con agua desionizada, en una bandeja.
3. Secar las hojas con papel de filtro estéril.
4. Las hojas enrolladas se cortan, en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 cm de ancho.
5. Añadir 200 ml del tampón de extracción frío a un vaso de precipitado de 500 ml, previamente enfriado y mezclar con los fragmentos de hojas.

6. Homogenizar los fragmentos de hojas en una batidora (Waring).
Nota: Preenfriar el vaso de la batidora durante cinco minutos.
 7. Filtrar el homogenizado con tres capas de gasa estéril o *cheesecloth*
Nota: Para facilitar dicha operación se puede utilizar un embudo Kitasato (preenfriado) acoplado a un erlenmeyer (preenfriado). El erlenmeyer debe estar conectado a una bomba de vacío.
 8. Colectar el filtrado en tubos (Falcon 50 ml) preenfriados.
 9. Equilibrar la masa de cada tubo en una balanza analítica.
 10. Centrifugar a 49 g durante 10 minutos.
Nota: la centrifuga refrigerada debe ser preenfriada y para ello se centrifugará al vacío durante 30 minutos.
 11. Colectar el sobrenadante y desechar el precipitado.
 12. Equilibrar en una balanza analítica, la masa de los nuevos tubos donde se colectaron los sobrenadantes.
 13. Centrifugar a 2 000 g durante 10 minutos.
 14. Eliminar el sobrenadante.
 15. Resuspender el precipitado en 10 ml del tampón de extracción.
 16. Añadir 20 ml de la suspensión de cloroplasto obtenida (dos tubos) a un nuevo tubo que contenga 20 ml de una solución de Percoll o Ficoll al 35% (m/v).
 17. Centrifugar a 250 g.
 18. Recuperar cuidadosamente la fase de color verde oscuro y desechar el resto.
Nota: es preferible en esta etapa utilizar una micropipeta de 5 000 ml para tomar en una sola carga dicha fase.
 19. Añadir a un nuevo tubo preenfriado, el contenido de la fase de color verde oscuro y equilibrar la masa de los tubos.
 20. Centrifugar a 2 000 g durante 10 minutos.
 21. Eliminar el sobrenadante.
 22. Resuspender el precipitado en 5 ml del tampón de extracción.
 23. Determinar la concentración de cloroplastos mediante un hematocímetro (Neubauer) y ajustar a un valor aproximado de 10^6 cloroplastos ml^{-1}
 24. Mantener la solución de cloroplastos en oscuridad total y a 4°C no más de 48 h.
1. Seleccionar cubetas desechables y etiquetarlas con un marcador de punta fina acorde con el objetivo de su experimento.
 2. Añadir 990 μ l de una suspensión de cloroplastos con una concentración en el orden de 10^6 cloroplastos ml^{-1}
 3. Añadir 200 μ l de una solución del tampón de extracción en una cubeta.
 4. Adicionar 110 μ l de una solución 1 mM de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) a las cubetas que serán utilizadas.
 5. Colocar un fragmento de Parafilm® sobre el extremo de la cubeta y homogenizar el contenido de esta, mediante dos inversiones sucesivas.
 6. Realizar la primera medición de absorbancia a 595 nm. Anotar el resultado.
 7. Mantener una cubeta en oscuridad (control negativo del poder reductor) y otra bajo la iluminación de una fuente de luz incandescente de 60 W durante cinco minutos.
 8. Medir la absorbancia de ambas muestras y al cabo de los cinco minutos repetir las lecturas de absorbancia. Anotar los resultados.

Resultados esperados

La reducción de la absorbancia de la cubeta iluminada se deberá a la reducción del DCPIP y esto a su vez estará directamente relacionado con la tasa fotosintética de la suspensión de cloroplastos. El transporte de electrones y los equivalentes reductivos en los fotosistemas de los cloroplastos, provocan que el DCPIP oxidado (azul intenso) al aceptar electrones procedentes de la fotólisis del agua, se convierta en DCPIP reducido (azul claro). A menudo el DCPIP, se utiliza en las mediciones de la cadena de transporte de electrones en los cloroplastos debido a su mayor afinidad por los electrones que la ferredoxina. Mediante la medición de la absorbancia a 595 nm se puede calcular la tasa de transporte electrónico en términos de μ mol DCPIP reducido/mg clorofila/h y utilizarse como un índice de vitalidad cloroplástica.

POSIBLES APLICACIONES

Este protocolo puede utilizarse en diferentes actividades docentes y de investigación entre las cuales se pueden citar:

1. Prácticas de laboratorio de las asignaturas Bioquímica vegetal y Fisiología vegetal.
2. Determinación del efecto de la intensidad luminosa, calidad de la luz, el pH, la

II. Evaluación de la actividad fotosintética

Una vez obtenida la suspensión de cloroplastos intactos, se procederá a evaluar su capacidad reductiva.

temperatura, sobre la actividad fotosintética de cloroplastos de *Musa* spp. en condiciones *in vitro* y *ex vitro*.

3. Determinar, en condiciones de laboratorio, el efecto de herbicidas inhibidores del transporte electrónico en cloroplastos, así como en la búsqueda de candidatos más eficientes.
4. Evaluación y selección de líneas modificadas genéticamente con resistencia a herbicidas cuyo sitio de acción se localice a nivel de cloroplastos.
5. Determinar la actividad fitotóxica de algunos compuestos alelopáticos desacoplantes de la cadena de transporte electrónico en cloroplastos.
6. Cálculo de la tasa de transporte electrónico en términos de $\mu\text{mol DCPIP reducido/mg clorofila/h}$ y su utilización como un índice de vitalidad cloroplástica.
7. Determinar la actividad fisiológica de toxinas cloroplastos-específicas de diversos agentes fitopatógenos, así como diferenciar la agresividad entre diferentes cepas en base a la producción de toxinas.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación ha sido posible gracias al apoyo financiero de la Fundación Internacional para la ciencia (International Foundation for Science, IFS) en particular al proyecto de investigación NO.C/4296-1 (Research Grant Agreement).

REFERENCIAS

Barcelo, CJ, Sabater GB, Nicolás RG, Sánchez TR (2007) Cloroplastos. En: Barceló Coll J (Ed) Fisiología vegetal, pp. 155-156. Pirámide. Madrid

Busogoro, JP, Etame JJ, Harelimana G, Lognay G, Messiaen J, Lepoivre P, Van Cutsem P (2004) Experimental evidence for the action of *M. fijiensis* toxins on banana photosynthetic apparatus. En: Mohan SJ y Swennen R (Eds) Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations, pp.161-170. Enfield. Science Publishers

Goltsev, V, Tsimilli-Michael M, Chernov P, Zaharieva I, Kouzmanova M, Strasser JR (2008) Electromagnetic frequency spectra of samples placed in a coil that senses the electromagnetic background field: Application for leaves, chloroplasts and molecules useful in photosynthesis. En: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B (Eds) Photosynthesis. Energy from the Sun, 14th International Congress on Photosynthesis, pp. 591-595. Springer. Dordrecht

Kosky, RG, Del Sol L, Reyes VM, Freire-Seijó M, Posada-Pérez L, Herrera I, Escalant JV (2001) Embriogénesis somática en bananos y plátanos partiendo de flores masculinas inmaduras. Biotecnología vegetal 1(1): 29-35

Kozuleva, AM, Ivanov NB (2010) Evaluation of the participation of ferredoxin in oxygen reduction in the photosynthetic electron transport chain of isolated pea thylakoids. Photosynthetic research 105: 51-61

Mehler HA (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. Archives of Biochemistry and Biophysics 33(1): 65-77

Orellana P (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* ssp. Tesis para aspirar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara. 120p

Sauer, K, Park BR (1965) The Hill Reaction of Chloroplasts. Action Spectra and Quantum Requirements Biochemistry 4(12): 2791-2798