

31690



# **Técnicas para el Aislamiento y Cultivo de Protoplastos de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz)**

L. Szabados, Ph.D.  
J. Narváez, Ing. Agr.  
W. M. Roca, Ph.D.

**Unidad de Investigación en Biotecnología, CIAT, Cali, Colombia.**

**1987**

## C O N T E N I D O

### Página

I. INTRODUCCION	1
II. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS DE HOJAS	2
1. El Material de Origen	2
2. Aislamiento de protoplastos	2
3. Purificación de los protoplastos aislados	4
4. El cultivo de protoplastos	6
III. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS DE EMBRIONES SOMATICOS Y APICES DE TALLO	10
1. Aislamiento de protoplastos	10
2. Purificación de protoplastos	11
3. Cultivo de protoplastos	11
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	20
1. Referencias seleccionadas	20
2. Información general sobre cultivo de protoplastos	20
V. ANEXO	
1. Información para Pedidos	21

## I. INTRODUCCION

El término "protoplasto" se refiere a la materia viva de la célula vegetal, que está encerrada por la pared celular; es decir, la célula desnuda de la planta, que corresponde a la membrana celular y el citoplasma con organelos.

Los protoplastos pueden aislarse a partir de células o tejidos vegetales mediante la utilización de enzimas degradadoras de la pared celular. Los protoplastos aislados son suspensiones de células carentes de pared celular y rodeadas sólo por la membrana plasmática. La ausencia de una pared celular rígida los hace muy apropiados para la realización de estudios fisiológicos y bioquímicos y de diferentes manipulaciones genéticas.

Los protoplastos tienen la capacidad de regenerar la pared celular, de dividirse y formar colonias celulares, cuando se cultivan adecuadamente. Igualmente, un gran número de especies de plantas tienen la capacidad de regenerar plantas fértiles a partir de colonias celulares derivadas de protoplastos. La alta frecuencia de regeneración de las plantas constituye un requisito importante cuando se trata de utilizar los protoplastos aislados para estudios genéticos.

Existen reglas generales, pero no métodos estandarizados, para el aislamiento y cultivo de protoplastos de plantas. Cada especie de planta y cada tipo de tejido tiene un requerimiento específico para los procedimientos de aislamiento y cultivo de sus protoplastos. Cuando una persona empieza a trabajar con protoplastos, es necesario optimizar el sistema mediante ajustes empíricos de los procedimientos de aislamiento y cultivo.

Este corto manual examina algunos aspectos del aislamiento y cultivo de los protoplastos de yuca, basado en los resultados de un programa de investigación desarrollado en la Unidad de Investigación en Biotecnología del CIAT, en el período 1984-1986.

## II. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS DE HOJAS

Hay varias etapas en el aislamiento y cultivo de protoplastos. Las más importantes son las siguientes:

1. El material de origen
2. La técnica de aislamiento
3. La purificación de los protoplastos aislados
4. El cultivo de los protoplastos.

Cada una de esta etapas está determinada por un número de factores complejos, en interacción, que pueden influir en el éxito del cultivo de protoplastos.

### 1. El material de Origen

El tipo y estado fisiológico de la fuente de protoplastos son factores críticos que pueden influir de sobremanera en el éxito del procedimiento de aislamiento y cultivo de protoplastos. Para el aislamiento de protoplastos, es necesario utilizar células de tejidos en crecimiento activo. Las condiciones de cultivo del material de origen deberán ser estandarizadas para poder obtener repetitivamente, altos rendimientos de protoplastos viables. El material propagado in vitro de plantas estériles, generalmente se considera superior, al compararse con plantas cultivadas en el campo o en invernadero.

Se encontró que las hojas bien desarrolladas y los ápices de plantas de yuca propagadas in vitro constituyen buenas fuentes de protoplastos (CIAT 1986). Las hojas de plantas de yuca cultivadas en invernadero también se han utilizado con éxito, para el aislamiento de protoplastos (Shahin y Shepard 1982). En nuestro laboratorio también se han utilizado embriones somáticos primarios y secundarios para el aislamiento de protoplastos (ver sección III).

Cuando se utilizan plantas de yuca propagadas in vitro, las plántulas se cultivan en tubos de ensayo de 25 mm de diámetro, en un medio de cultivo

solidificado con agar (cuadro 1) y se propagan por medio de estacas de tallo, cada 6-8 semanas. Las plantas se incuban en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas, bajo una iluminación de 3.000 lux, y una temperatura de 27°C. Anteriormente se ha descrito en forma detallada, el procedimiento de cultivo in vitro de plantas de yuca (Roca 1984).

Los protoplastos se aislan de hojas jóvenes pero totalmente extendidas, o de ápices de tallos con hojas inmaduras de 5-10 mm en tamaño. Se encontró que, las plántulas de 4-8 semanas de edad producen los mejores resultados en relación con el rendimiento de protoplastos y su viabilidad.

## 2. Aislamiento de Protoplastos

El siguiente procedimiento se ha utilizado de manera rutinaria, en nuestro laboratorio, para aislar protoplastos del mesófilo de hojas de plantas de yuca propagadas in vitro (Figura 1).

### 2.1. Pretratamiento

El material de origen del protoplasto debe tratarse de alguna forma para asegurar una adecuada digestión enzimática. Las hojas totalmente extendidas pero jóvenes de plántulas de 4-8 semanas de edad, se recogen en un frasco Erlenmeyer de 125 ml con un poco de agua destilada estéril (Figura 1.1). Debido a lo difícil que resulta remover la epidermis inferior mediante el procedimiento de pelado, se escogió el método de cortar la hoja en pequeños pedazos con un bisturí (maceración mecánica).

Generalmente, las hojas flotan en la superficie del agua (u otra solución acuosa), debido aparentemente a la presencia de una capa de cera hidrófoba de la epidermis foliar. La penetración enzimática en el tejido foliar se mejora mediante el pretratamiento del material foliar recolectado con 30% de alcohol (5-10 seg.) y unas 3-4 lavadas con agua destilada estéril antes de la maceración mecánica. Luego, las hojas se trasladan a cajas de Petri con unos pocos ml de una solución de lavado osmóticamente estabilizada (solución de lavado No. 1, Cuadro 2).

## 2.2. Maceración Mecánica

Las hojas se cortan en pequeños pedazos de 3-5 mm aproximadamente, con un bisturí estéril. En este paso también se puede utilizar vacío débil para facilitar la infiltración. La solución de lavado se revuelve con una pipeta Pasteur y se añade luego la solución enzimática (Figura 1.2).

## 2.3 Digestión Enzimática

Generalmente, los protoplastos se aíslan por medio de una mezcla de diferentes enzimas hidrolíticas, capaces de degradar la pared celular. Muchas enzimas comercialmente disponibles pueden degradar diferentes componentes de la pared celular, pero para lograr un aislamiento exitoso de protoplastos se requiere una mezcla de celulasa, hemicelulasa y pectinasa. No existen soluciones enzimáticas estandar, por tanto, se deben ensayar mezclas diferentes hasta encontrar la combinación que dé mejores resultados, en un sistema dado.

Para el aislamiento de protoplastos de mesófilo de hojas de yuca, se utilizó una mezcla enzimática (E-1) de celulasa Onozuka R 10, hemicelulasa y pectoliasa Y-23 (Cuadro 3), mezclada 1:1 con medio líquido de cultivo de protoplastos (el medio de Kao o B5, Cuadro 4). Los pedazos de hojas se mezclan con 8-10 ml de esta solución enzimática, en una caja Petri de 100 x 15mm (Figura 1.3). Las cajas se sellan con parafilm, se envuelven en papel de aluminio para protegerlos contra la luz y se incuban a 26°C durante 12-18 horas (toda la noche) con agitación continua (40 rpm).

## 3. Purificación de los Protoplastos Aislados

Después de una noche de incubación de los pedazos foliares en la solución enzimática, se puede observar un gran número de protoplastos flotando libremente entre los restos de tejido foliar no digerido y desperdicios celulares. Los protoplastos deberán purificarse de los desperdicios y la mezcla enzimática deberá reemplazarse por un medio de cultivo. Generalmente se emplean varios pasos diferentes de filtración y centrifugación para obtener una suspensión de protoplastos pura y libre de enzimas.

### 3.1 Filtración

La mezcla de protoplastos, con tejido sin digerir, células y desperdicios

celulares, se resuspende con una pipeta Pasteur y se filtra a través de un tamiz de acero inoxidable con malla de 60-100 Mm o un filtro de nylon para remover inicialmente el tejido no digerido (Figura 1.4).

### 3.2 Centrifugación

3.2.1. Sedimentación I. La suspensión filtrada de protoplastos se traslada a un tubo de ensayo de 15 ml (preferiblemente con tapa rosca) y se centrifuga a 800 rpm (alrededor de 100g), durante 3-4 minutos (Figura 1.5).

3.2.2. Flotación. La solución enzimática se extrae con una pipeta de Pasteur. Los protoplastos precipitados (pellet), se vuelven a suspender en 10ml de la solución de lavado No. 2 (Cuadro 2), que tiene 0.4M de sacarosa como osmótico. Luego, utilizando una pipeta Pasteur, se coloca cuidadosamente un ml de la solución de lavado No. 1, evitando que se mezcle con la solución de sacarosa (más densa), formándose una capa translúcida flotante bien definida. Posteriormente, los protoplastos se centrifugan a 1.000 rpm durante 6-8 minutos. Después de este paso de centrifugación, se puede observar una banda verde de protoplastos puros e intactos, en la interfase de las soluciones de lavado No. 1 y 2 (Figura 1.6). La solución de lavado No. 2 puede suplementarse con 10% de Percoll o 6% de Ficoll, cuando estén disponibles (solución de lavado No. 3, Cuadro 2); con miras a mejorar la eficiencia de la flotación de protoplastos. La banda de protoplastos de color verde debe extraerse con cuidado, utilizando la pipeta Pasteur y se traslada luego a otro tubo de centrifugación, en donde se diluye 10 veces con la solución de lavado No. 1.

3.2.3. Sedimentación II. Nuevamente se sedimentan los protoplastos por medio de centrifugación a 800 rpm durante 3-4 minutos (Figura 1.7). El sobrenadante se extrae y el pellet de los protoplastos purificados nuevamente se vuelve a resuspender, pero esta vez con un medio de cultivo (Figura/3A).

#### 4. El cultivo de Protoplastos

Un número de condiciones de cultivo tienen que investigarse y ajustarse cuidadosamente a las necesidades específicas de los protoplastos, con el fin de inducirlos a regenerar su pared celular, dividirse y a continuar creciendo.

##### 4.1 Medio de Cultivo

Generalmente los medios de cultivo de protoplastos son similares a los utilizados para el cultivo de células y tejidos in vitro. Sin embargo, los protoplastos recién aislados requieren una estabilización osmótica que se logra mediante la adición de altas concentraciones de glucosa o manitol, en el medio de cultivo (por ej. 0.35M de glucosa en el caso de protoplastos de yuca). Los protoplastos parecen beneficiarse de mayores concentraciones de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio (600-900 mg/l  $\text{CaCl}_2$ ), que ayudan en la estabilización de la membrana celular. Además de estas modificaciones, el medio de cultivo de protoplastos generalmente se enriquece suplementando algunas vitaminas adicionales, ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, hidrolizado de caseína o agua de coco. Para el cultivo de protoplastos de yuca, resultaron más adecuados, tanto el medio complejo de Kao (Kao 1982), como el medio más simple B5-p modificado del medio de cultivo estandar B5 de Gamborg y col. (1968) (ver Cuadro 4). Los protoplastos pueden cultivarse en medio líquido o semi-sólido que se solidifica con agarosa.

##### 4.2 Concentración de Protoplastos

La concentración inicial óptima de protoplastos cultivados es un factor de importancia. Una concentración demasiado alta o baja de protoplastos puede condicionar inadecuadamente el medio o incluso volverlo tóxico. Cuente los protoplastos en una cámara de conteo de células (por ej. la cámara de conteo de Levi) y añada medio de cultivo para obtener la concentración óptima de protoplastos. La concentración óptima de cultivo de los protoplastos de mesófilo de yuca fué de  $3-5 \times 10^4$  prot/ml. Aunque los medios de Kao y B5-p produjeron la misma concentración óptima de cultivo, el medio de Kao permitió una división de los protoplastos a concentraciones menores que el medio B5p (Figura 2). Esta diferencia probablemente se debe a la composición más compleja del medio de Kao.



### 4.3 Cultivo de protoplastos en medio líquido

Cuando se utiliza un medio líquido, los protoplastos de yuca pueden cultivarse en gotas de 100-200 ml en cajas de Petri de plástico de 50-100 x 15 mm (1 ml de medio/caja Petri, Figura 1.8a). Los protoplastos también pueden cultivarse en una capa delgada de medio de cultivo (2-3 ml de medio/caja Petri). Es necesario añadir medio fresco directamente a la suspensión de protoplastos a intervalos de 6-8 días. El medio líquido puede ser más conveniente que el semisólido, ya que los protoplastos y las colonias celulares en desarrollo son fáciles de transferir y el medio puede ser diluido o modificado durante el período de cultivo. Sin embargo, en muchos casos (como en la yuca), los protoplastos cultivados se amontonan y la obtención de clones de células aisladas se convierte en un problema.

### 4.4 Cultivo de protoplastos en medio semisólido

El medio de cultivo se puede solidificar mediante la adición de 0.6% de agarosa de baja fusión (por ej. la Sigma tipo VII) y los protoplastos pueden cultivarse fijos dentro de este medio semisólido. Los protoplastos se mezclan con el medio tibio (aproximadamente a 40°C), que contiene agarosa y la mezcla se traslada inmediatamente a las cajas de Petri (3 ml de medio/caja Petri de 50 x 15 ml). Al utilizar este método los protoplastos se mantienen en una posición fija y así se evita el amontonamiento y se puede obtener la separación de clones (Figura 1.8b).

### 4.5 Incubación

Una amplia gama de temperaturas y condiciones de iluminación se han reportado en el cultivo de protoplastos. En nuestro laboratorio, los protoplastos de yuca se mantienen en la oscuridad, a 27°C, en las primeras 3-4 semanas de cultivo. Luego, las colonias en desarrollo se trasladan a diferentes condiciones de luz: fotoperíodo de 12 horas o luz continua de aproximadamente 3.000 lux. Generalmente las cajas Petri se sellan con parafilm y se colocan dentro de cajas plásticas con papel filtro humedecido, con el fin de evitar la evaporación del medio de cultivo.

#### 4.6 Observación de los protoplastos cultivados

El microscopio invertido es de gran utilidad para la observación de los protoplastos cultivados, sin tener que abrir las cajas Petri u otros recipientes de cultivo. Si no se cuenta con un microscopio invertido, se pueden tomar pequeñas alicuotas y el examen se realiza en un porta-objeto.

Los protoplastos de la yuca forman paredes celulares en 2-3 días de incubación y empiezan a dividirse 3-5 días después del cultivo (Figura 3B). Una división sostenida lleva a la formación de colonias celulares en 2-3 semanas (Figura 3C). Aproximadamente a las 4 semanas después del cultivo inicial de protoplastos de yuca, las colonias son bien visibles a simple vista.

La eficiencia del cultivo de un sistema de protoplastos puede medirse fácilmente mediante la determinación de la frecuencia de protoplastos capaces de dividirse y formar colonias, así:

$$4.6.1 \text{ Frecuencia de División: } \frac{\text{No. de protoplastos en división} \times 100}{\text{No. de protoplastos cultivados}}$$

Un mínimo de 1.000 protoplastos deberán contarse en cada muestra, 7-10 días después de la incubación, mediante la utilización de un microscopio invertido.

$$4.6.2 \text{ Eficiencia de la Siembra: } \frac{\text{No. de colonias en crecimiento/plato Petri} \times 100}{\text{No. de Protoplastos sembrados/Plato Petri}}$$

El número de colonias visibles en crecimiento, deberá contarse después de trasladar las colonias al medio con agar.

#### 4.7 Adición de Medio Fresco, o Subcultivo:

Se aconseja agregar medio de cultivo fresco a los cultivos de protoplastos a intervalos semanales. Primero se añade el medio de cultivo de protoplastos para diluir, en unas dos veces, la suspensión de protoplastos. Las colonias celulares derivadas de protoplastos no requieren más la presencia de un esta-

bilizador osmótico. Posteriormente, cuando se añade el medio de cultivo fresco, gradualmente se deben bajar los niveles osmóticos mediante la utilización de un medio con osmótico bajo. La tasa de disminución global del nivel osmótico deberá ser de unos 0.1M/semana.

Las colonias celulares derivadas de protoplastos pueden trasladarse a un medio estandar para el cultivo de células o callos, después de 4-5 semanas de incubación.

Cuando se cultivan en un medio líquido, las colonias en crecimiento pueden suspenderse fácilmente y transferirse por medio de una Pipeta Pasteur. Las colonias celulares, en un medio solidificado con agarosa, pueden tomarse individualmente, o los pedazos enteros del medio sólido con las colonias celulares, pueden transferirse al medio fresco (Figura 3D).

### III. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS DE EMBRIONES SOMATICOS Y APICES DE TALLO

Se encontró que los cotiledones, los ejes embrionarios, los ápices de tallos y las hojas jóvenes inmaduras poseían una alta capacidad morfogénica y que plantas maduras podían regenerarse de los anteriores mediante la embriogénesis somática (Stamp y Henshaw 1982, Stamp 1984, Szabados y col. 1987). Los embriones somáticos secundarios en proliferación, pueden ser una fuente promisoría para el aislamiento de protoplastos, porque una cantidad relativamente grande de embriones puede producirse en un corto período de tiempo (unas pocas semanas) y éstos tienen una alta capacidad para la regeneración de plantas.

En nuestro laboratorio, se llevó a cabo una serie de experimentos para aislar y cultivar protoplastos a partir de estos tejidos con capacidad embriogénica. Ya que la yuca es principalmente un cultivo de propagación vegetativa, nos concentramos en el aislamiento de protoplastos a partir de tejidos vegetativos, especialmente ápices de tallos y embriones somáticos.

#### 1. Aislamiento de Protoplastos

El aislamiento de protoplastos y el procedimiento de cultivo es similar al descrito para los tejidos mesófilo-foliareos (ver sección II, numeral 2). Se recogen ápices de 5-8 mm y hojas inmaduras de plantas de yuca de 4-8 semanas, se someten al mismo pretratamiento descrito anteriormente y se transfieren a la solución de lavado No. 1. Los embriones secundarios de rápida proliferación se recolectan y transfieren a la misma solución de lavado. Posteriormente, los ápices de tallos y los embriones somáticos se cortan con un bisturí en pequeños trozos dentro de una caja Petri. La solución de lavado se reemplaza luego por una solución enzimática, elaborada a partir de la mezcla enzimática E-2 (Cuadro 3) y un medio de cultivo (Kao o B5-p), en una relación 1:1 (8-20 ml de solución enzimática en una caja Petri de 100 x 15 mm, o una solución de 3 ml en una caja petri de 50 x 15 mm). Sellar e incubar las cajas Petri como se indicó anteriormente. Los protoplastos aislados a partir de estos órganos, generalmente son más pequeños y compactos, al compararse con los protoplastos mesófilo-foliareos. Algunas veces, los protoplastos derivados

de ápices de tallos contienen cloroplastos de color verde, pero con mayor frecuencia son incoloros. Los protoplastos derivados de embriones somáticos siempre son incoloros.

## 2. Purificación de Protoplastos

Los protoplastos aislados se purifican y cultivan de la forma descrita para los protoplastos mesófilo-foliare. Generalmente, estos protoplastos se sedimentan en la solución de lavado No. 1 debido a su mayor densidad. La flotación se logró cuando la solución de lavado No. 2 se suplementó con 20% de Percoll, y así se aumentó la densidad de flotabilidad de la solución de lavado hasta el nivel deseado (solución de lavado No. 3, Cuadro 2).

## 3. Cultivo de Protoplastos

El sistema de cultivo de los protoplastos derivados de ápices de tallos o de embriones, esencialmente es el mismo realizado para los protoplastos mesófilo-foliare. Estos protoplastos tienen capacidad de dividirse y formar colonias en el medio Kao y B5-p, ya sea en forma líquida o solidificada. La concentración preferida de los protoplastos fué de 60-80.000 protoplastos /ml. Las concentraciones mayores de 2,4-D en el medio de cultivo, al parecer favorecen la actividad de división de estos protoplastos. Los protoplastos derivados de ápices de tallos se dividen adecuadamente en un medio que contiene una concentración de 2,4-D tan alta como 10 mg/1, en presencia de 0.5 mg/1 de zeatina. Los protoplastos aislados de embriones somáticos pueden cultivarse de la misma forma, aunque la frecuencia de división y la posterior formación de colonias generalmente es baja.

Cuadro 1. Composición del Medio de Cultivo Utilizado para la Micropropagación In Vitro de Plantas de Yuca.

Sales Minerales: Medio MS (Murashige y Sook 1962)

Macronutrientes (mg/l)	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1650
	$\text{KNO}_3$	1900
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	170
Micronutrientes (mg/l)	KI	0.83
	$\text{H}_3 \text{BO}_3$	6.2
	$\text{MnSO}_4$	22.3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{Mn}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Vitaminas (mg/l)	Tiamina-HCl	1
	M-inositol	100
Sucrosa (g/l)		20
Hormonas del Crecimiento (mg/l)		
	NAA	0.02
	BAP	0.05
	$\text{GA}_3$	0.05
Solidificante (g/l)	Difco agar	7
pH (con 1N KOH)		5.6

Esterilice por medio del autoclave 15 lbs/pulgadas <sub>2</sub> durante 15 minutos.

Cuadro 2. Soluciones de lavado para el aislamiento de protoplastos de yuca.

<u>Constituyentes</u>	<u>Solución de lavado No.</u>		
	<u>(1)</u>	<u>(2)</u>	<u>(3)</u>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	50 mg	50 mg	50 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mg	10 mg	10 mg
Manitol (0.4M)	7.3 g		
Sucrosa (0.4M)		13.7 mg	13.7 g
pH (con 1N KOH)	5.6 g	5.6 g	5.6 g
Percoll (estéril)			20 ml
Volumen Final	100 ml	100 ml	100 ml
Esterilice por filtración			

Cuadro 3. Soluciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos de yuca.

<u>Constituyentes</u>	<u>Solución enzimática</u>	
	<u>E-1</u>	<u>E-2</u>
Cl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	100 mg	100 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mg	10 mg
MES (2-ácido etanosulfónico-N-morfolino)	58.5 mg	58.5 mg
Manitol (0.4M)	7.3 g	7.3 g
Celulosa Onozuka R-10	1 g	1 g
Hemicelulasa (Sigma)	0.3 g	0.3 g
Pectoliasa Y-23	0.1 g	0.1 g
Driselasa		0.5 g
pH (con 1 N KOH)	5.6	5.6
Volumen Final	100 ml	100 ml

Después de disolver todos los componentes, centrifuge la solución enzimática a 10.000 rpm durante 5 minutos, para sedimentar el material insoluble. Esterilice por filtración el sobrenadante.

Cuadro 4. Medios de Cultivo para Protoplastos de yuca

<u>Constituyentes</u>		<u>Kao (en 1 litro)</u>	<u>B5-P (en 1 litro)</u>
Macronutrientes (mg)	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	600	
	$\text{KNO}_3$	1900	2500
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	600	900
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300	250
	$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	170	
	KCl	300	
	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$		134
	$\text{NaH}_2 \text{PO}_4$		150
Micronutrientes (mg)	KI	0.76	0.75
	$\text{H}_3 \text{BO}_3$	3.0	3.0
	$\text{MnSO}_4$	10.0	10
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0	2.0
	$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
	$\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3	37.3
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8
Vitaminas (mg)	Inositol	100	100
	tiamina-HCl	10	10
	ácido ascórbico	1	
	nicotinamida	1	1
	piridoxina-HCl	1	1
	pantotenato de Ca	0.5	
	cloruro de colina	0.5	
	ácido fólico	0.2	
riboflavina	0.1		



Cont. Cuadro 4.

Constituyentes

Kao (en 1 litro)

B5-p (en 1 litro)

ácido p-aminobenzoico

0.01

Vitamina B<sub>12</sub>

0.01

Vitamina A

0.005

Vitamina D<sub>3</sub>

0.005

Biotina

0.005

Acidos orgánicos (mg) (ajustado a un pH de 5.5 con NH<sub>4</sub> OH)

Piruvato de sodio 5

ácido cítrico 10

ácido málico 10

ácido fumárico 10

Azúcares (mg)

sucrosa 125

fructosa 125

ribosa 125

xilosa 125

manosa 125

ramnosa 125

celobiosa 125

sorbitol 125

manitol 125

Osmótico (g)

glucosa 63

63

Hormonas del Crecimiento (mg) NAA

1

1

2,4-D

0.2

0.2

Zeatina

0.5

0.5

Varios

ácido casamino libre de  
vitaminas (mg)

125

250

Agua de coco\* (ml)

10

pH (con 1N KOH)

5.6

5.6

Volumen Final

11

11

Esterilice por filtración

\*El agua de coco se obtiene de frutos maduros, se calienta a 60°C durante 30 minutos y se filtra.

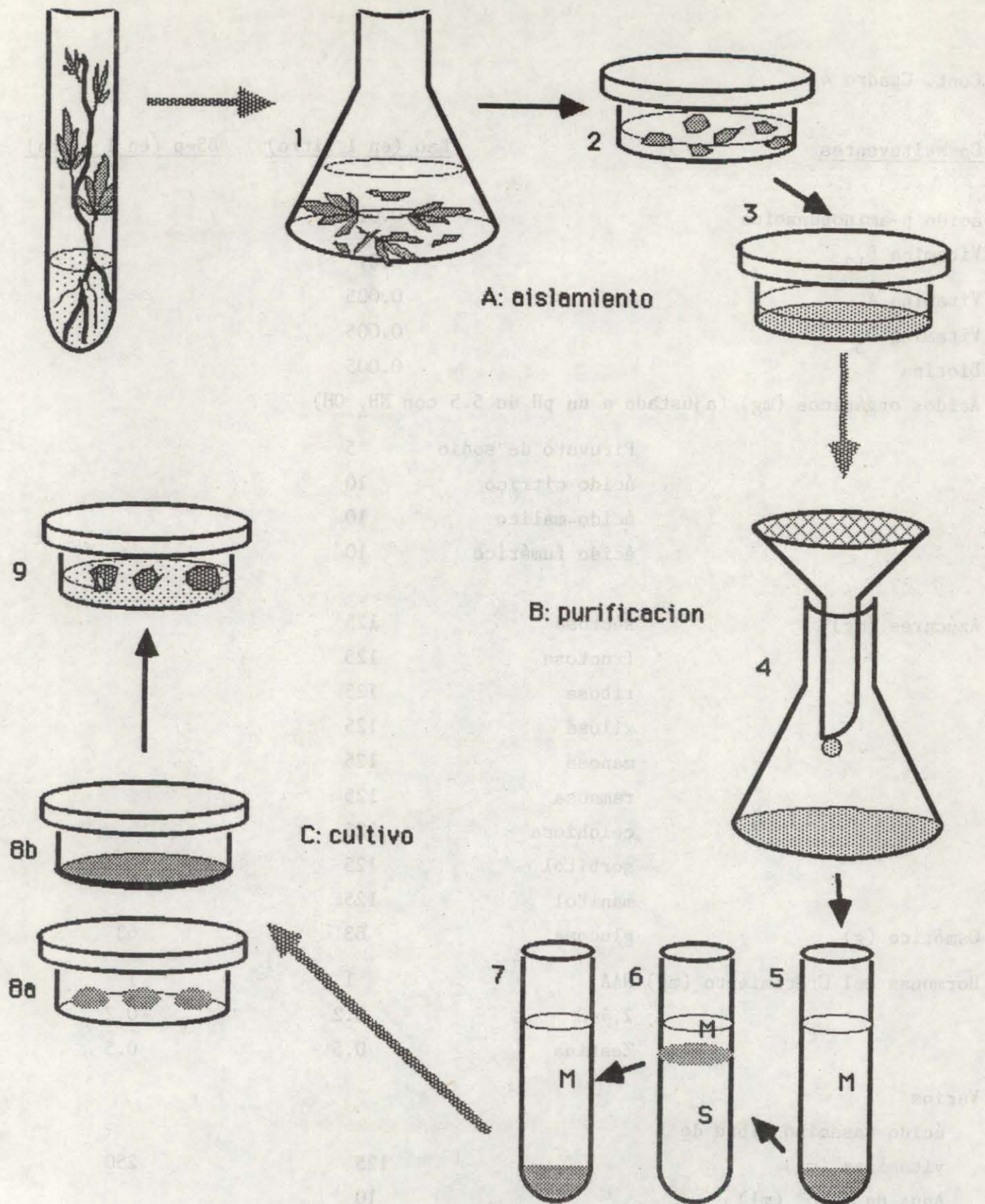


Figura 1. Aislamiento y cultivo de protoplastos de yuca: 1. pretratamiento con 30% alcohol; 2. fragmentación de hojas; 3. digestión enzimática; 4. filtración; 5. sedimentación I (M= 0.4M manitol); 6. flotación (S=0.4 M sucrosa); 7. sedimentación II; 8a. cultivo en medio líquido; 8b. cultivo en medio sólido; 9. sub-cultivo de callos.

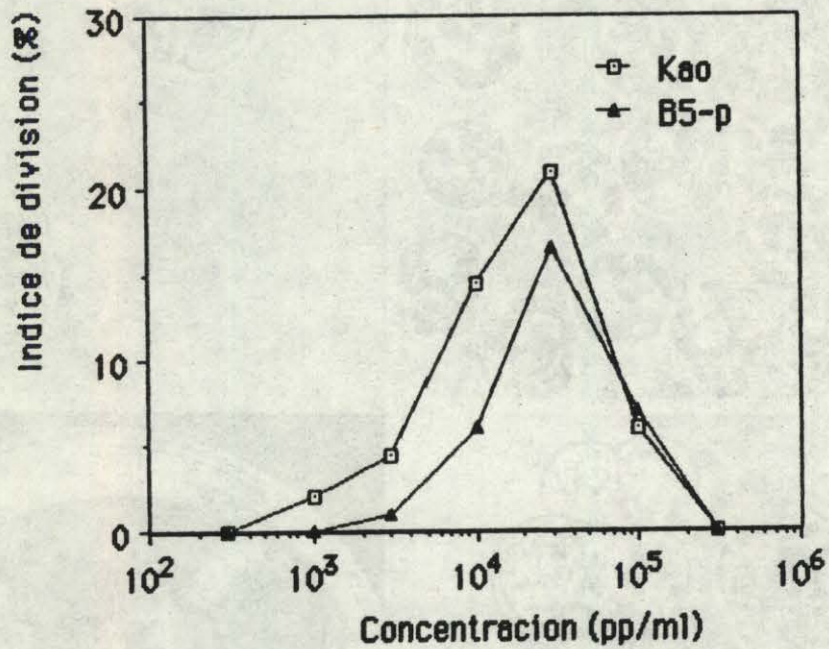


Figura 2. Efecto de la concentración de protoplastos en la frecuencia de división de los protoplastos aislados de yuca.

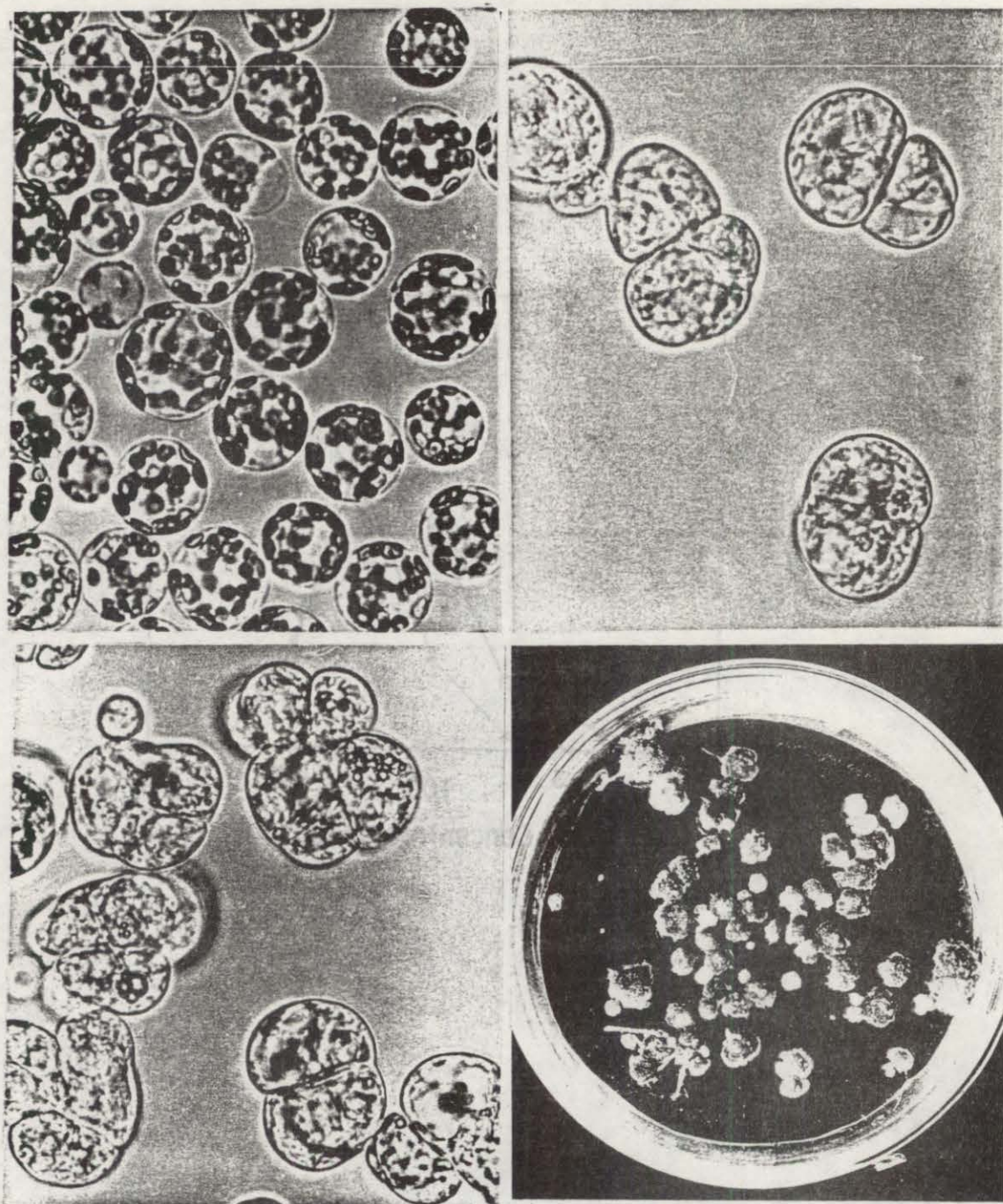


Figura 3. Cultivo de protoplastos aislados del mesófilo de hojas:  
 (A) Protoplastos recién aislados; (B) Primeras divisiones  
 celulares; (C) Colonias celulares derivadas de protoplas-  
 tos; (D) Crecimiento de callos a partir de colonias cul-  
 tivadas en medio sólido.

#### IV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

##### 1. Referencias Seleccionadas

- CIAT 1986. Biotechnology Research Unit, Annual Report 1985, pags. 21- 31.
- GAMBORG, D.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. 1968. Nutrient Requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- KAO, K.N. 1982. Plant Protoplast Fusion and Isolation of Heterokaryocytes. In: *Plant Tissue Culture Methods*. Eds. L.R. Wetter and F. Constabel. National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Saskatchewan, Canada pp 49-56.
- MURASHIGE, T. y SOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- ROCA, W.M. 1984. Cassava. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, volume 2. Eds. W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato and Y. Yamada. Macmillan Publishing Corporation, New York, pp 269-302.
- SHAHIN, E.A. and SHEPARD, J.E. 1980. Cassava mesophyll protoplasts: Isolation, proliferation and shoot formation. *Plant Sci. Lett.* 17: 459-465.
- STAMP, J.A. and HENSHAW, G.G. 1982. Somatic embryogenesis in cassava. *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 183-187.
- STAMP, J.A. 1984. Ph.D. Thesis University of Birmingham, UK.
- SZABADOS, L., HOYOS, R., ROCA, W. 1987. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Rep.* (in press).

##### 2. Información general sobre cultivo de protoplastos

- CONSTABEL, F. 1982. Isolation and culture of plant protoplasts. In: *Plant tissue and culture methods*. Eds. L.R. Wetter and F. Constabel. National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatchewan, Canada. pp. 38-46.
- EVANS, D.A., BRAVO, J.E. 1983. Protoplast isolation and culture. In: *Handbook of plant cell culture*. Volume 1. Eds. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. and Y. Yamada. Macmillan Publishing Co. New York. pp. 124-176.

- FOWKE, L.C. and GAMBORG, O. 1980. Application of protoplasts to the study of plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 68: 9-51.
- GAMBORG, O.F., SHYLUK, J.P., SHAHIN, E.A. 1981. Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. In: *Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture*. Ed. T.A. Thorpe, Academic Press, New York. pp. 115-153.
- PITTER, M.S., and KRIKORIAN, A.D. 1983. *Plant Protoplasts. Some guidelines for their preparation and manipulation in culture.* Calbiochem-Behring.

V. ANEXO

1. Información para pedidos

1.1. Enzimas para aislamiento de protoplastos:

Celulasa Onozuka R 10

Kinki yakult MFG. CO. Ltd.  
8-21 Shingikan-Cho  
Nishinomiya  
Japan

Driselasa

Kyowa Hakko Kogyo CO. Ltd.  
Tokio  
Japan

Hemicelulasa

Sigma Chemical CO  
P.O. Box 14506  
St. Louis  
MO 63178  
USA

1.2. Sales minerales, vitaminas, hormonas del crecimiento, etc:

Sigma Chemical CO.  
P.O. Box 14508  
St. Louis  
MO 63178  
USA





**Techniques for Isolation and Culture of  
Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Protoplasts**

L. Szabados, Ph.D.  
J. Narváez, Ing. Agr.  
W. M. Roca, Ph.D.

Biotechnology Research Unit, CIAT, Cali, Colombia.

1987



## C O N T E N T S

	<u>Page</u>
I. INTRODUCTION	1
II. ISOLATION AND CULTURE OF LEAF PROTOPLASTS	2
1. Source material	2
2. Protoplast Isolation	3
3. Purification of the isolated protoplast	4
4. Protoplast culture	5
III. ISOLATION AND CULTURE OF SHOOT-TIP AND SOMATIC EMBRYO DERIVED PROTOPLASTS.	9
1. Protoplast Isolation	9
2. Protoplast purification	10
3. Protoplast culture	10
IV. REFERENCES	19
1. Selected references	19
2. General information on protoplast culture	19
V. APPENDIX	21
1. Ordering information	21



I. INTRODUCTION

The term protoplast refers to the living matter of the plant cell, which is enclosed by the plant cell wall, i.e, the naked plant cell, corresponding to the cell membrane and the cytoplasm with the organelles.

Protoplasts can be isolated from the plant cells by enzymatic methods, using cell wall degrading enzymes. Isolated protoplast are suspensions of single cells, without cell wall, surrounded only by the plasma membrane. The lack of rigid cell wall makes them amenable for a number of physiological and biochemical studies and different genetical manipulations.

Protoplasts are able to regenerate cell wall, divide and form cell colonies when properly cultured. A great number of plant species are able also to regenerate fertile plants from the protoplast-derived cell colonies. High frequency plant regeneration is an important requirement, when someone tries to use the isolated protoplasts for genetical studies.

There are general rules, but no standard methods for the isolation and culture of plant protoplasts. Each plant species and each types of tissue has its own special requirements for the isolation and culture procedures of their protoplasts. When someone becomes involved in protoplast work, it is necessary to optimize the system through empirically adjusting the isolation and culture procedures.

The short manual discusses some aspects of the isolation and culture of cassava protoplasts, based on the results of a research program performed in the Biotechnology Research Unit of CIAT in the period of 1984-1986.

## II. ISOLATION AND CULTURE OF LEAF PROTOPLASTS

There are several phases of the protoplast isolation and culture procedure. The most important ones are the followings:

1. Source material
2. Protoplast isolation
3. Purification of the isolated protoplasts
4. Protoplast culture.

Each of these phases are determined by a number of complex, interacting factors, which can influence the success of the protoplast culture.

### 1. Source material

The type and the physiological state of the protoplast source are critical factors, which can influence greatly the success of the protoplast isolation and culture procedure. Cells of actively growing tissues are necessary for protoplast isolation. To be able to get repetitively high yields of viable protoplasts, the culture conditions of the source material should be carefully standardized. In vitro propagated, sterile plant material is usually considered as superior, when compared to greenhouse or field grown plants.

It was found, that fully grown leaves and shoot tips of in vitro propagated cassava plants are good protoplast sources (CIAT 1986). Leaves of greenhouse grown cassava plants have also been used for protoplast isolation with success (Shahin and Shepard 1982). Primary and secondary somatic embryos of cassava have also been used for protoplast isolation in our laboratory (see section III).

When in vitro propagated cassava plants were used, plantlets were grown in 25mm diameter test tubes on agar-solidified culture medium (Table 1), and were propagated by stem cuttings every 6-8 weeks. Plants were incubated in growth chamber with 12 hrs. photoperiod, under 3000 lux illumination

during the light period, at 27°C temperature. Detailed in vitro culture procedure of cassava plants have been described before (Roca 1984).

Protoplasts were isolated from young but fully extended leaves, or from shoot tips with immature leaves of 5-10 mm in size. We found, that 4-8 weeks old plantlets gave best results with respect to protoplast yield and viability.

## 2. Protoplast isolation

The following procedure have been routinely used in our laboratory to isolate mesophyll protoplasts from the leaves of in vitro propagated cassava plants (Figure 1).

### 2.1 Pre-treatment

In order to ensure the proper enzyme digestion, the protoplast source must be treated in some way. Fully extended but young leaves of 4-8 weeks-old plantlets were collected in a 125 ml Erlenmeyer flask, containing a few ml of sterile distilled water (Figure 1.1.). We had difficulties in removing the lower epidermis by peeling, so we chosen to cut the leaf into small pieces with a sharp blade.

Leaves usually floated on the surface of the water (or other aqueous solution) and submergence were apparently prevented by a hydrophobic wax layer of the leaf epidermis. In order to improve the enzyme penetration into the leaf tissue, we routinely pre-treated the collected leaf material with 30% alcohol (5-10 sec) and washed them with sterile distilled water 3-4 times, before the mechanical maceration. Leaves were transferred then to Petri dishes and distilled water was replaced by an osmotically stabilised washing solution No. 1 (Table 2).

### 2.2 Mechanical maceration

Leaves were cut into small, size pieces approximately 3-5mm with a sharp sterile surgical blade. In this step a weak vacuum may also be used to help infiltration. Washing solution were removed by pasteur pippete and the enzyme solution was added (Figure 1.2).

### 2.3 Ezymatic digestion

Protoplast are usually isolated by a mixture of different hidrolytic enzymes,

capable of degrading the cell wall. Many commercially available enzymes can degrade different components of the cell wall, but for the successful protoplast isolation, a mixture of cellulase, hemicellulase and pectinase activity is necessary. There are no standard enzyme solutions, a number of different mixtures must be tried to find the combination that works best in a given system.

For the isolation of cassava leaf mesophyll protoplasts, we used an enzyme mixture (E-1) of Onozuka R 10 cellulase, Hemicellulase and Pectolyase Y 23 (Table 3), mixed 1: 1 with liquid protoplast culture medium (Kao-medium or B5-P medium, Table 4). Leaf pieces were mixed with 8-10 ml of this enzyme solution in a 100 x 15 mm Petri dish (Figure 1.3). The dishes were sealed by parafilm, wrapped in aluminium foil to protect from the light and incubated for 12-18 hrs (overnight) at 26°C, with continuous shaking (40 rpm).

### 3. Purification of the isolated protoplast

After an overnight incubation of the leaf pieces in the enzyme solution, a large number of free-floating protoplasts can be seen amidst the remaining undigested leaf tissue and cell debris. The protoplasts must be purified from the debris and the enzyme mixture replaced by a culture medium. Several different filtration and centrifugation steps are usually employed in order to get a pure, enzyme-free protoplast suspension.

#### 3.1 Filtration

The mixture of protoplasts, undigested tissue pieces, cells and cell debris in the enzyme solution is resuspended with Pasteur pipette and filtered through a 60-100 um mesh stainless sieve or nylon filter, to remove undigested tissue (Figure 1.4).

#### 3.2 Centrifugation

3.2.1 Sedimentation I: The filtered protoplast suspension is transferred to a 15 ml test tube (preferably with screw caps), and centrifuged at 800 rpm (about 100g) for 3-4 min. (Figure 1.5).

3.2.2. Flotation. The enzyme solution is removed with Pasteur pipette, and the protoplast pellet is resuspended in 10 ml of the washing solution No. 2 (Table 2), which has 0.4M sucrose as osmotic. 1 ml of the washing solution No. 1 is overlaid gently by a pipette, and the protoplasts are centrifuged at 1000 rpm for 6-8 min. After this centrifugation step, a



green band of pure intact protoplasts can be observed at the interphase of the washing solutions No. 1 and 2 (Figure 1.6). When available, the washing solution No. 2 can be supplemented with 10% Percoll or 8% Ficoll in order to improve the efficiency of the protoplast flotation (washing solution No. 3, Table 2). The green band should be removed gently by Pasteur pipette, transferred to an other centrifuge tube and diluted 10 times with the washing solution No. 1.

3.2.3. Sedimentation II. The protoplasts are sedimented again by centrifugation at 800 rpm 3-4 min. (Figure 1.7). The supernatant is removed and the pellet of the purified protoplasts is resuspended in culture medium (Figure 3A).

#### 4. Protoplast culture

In order to induce the isolated protoplast to regenerate their cell wall, divide and continue to grow, a number of culture conditions have to be investigated and carefully adjusted to the specific needs of the given protoplasts.

##### 4.1 Culture medium:

Protoplast culture media are usually similar to those used for cell and tissue cultures in vitro. However, freshly isolated protoplasts need osmotic stabilization, which is achieved by adding high concentrations of glucose or mannitol in the culture medium (e.g. 0.35M glucose in the case of cassava protoplasts). Protoplasts seem to benefit from higher concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in the medium (600-900 mg/l  $\text{CaCl}_2$ ), which help the stabilization of the cell membrane. Besides these modifications, protoplast culture media are usually enriched by adding some extra vitamins, organic acids, sugars, amino acids, casein hydrolysate or coconut water. For culturing isolated cassava protoplasts, we found suitable both the complex Kao medium (Kao 1982), or the more simple B5-p medium modified from the standard B5 culture medium of Gamborg et al (1968) (Table 2). Protoplasts can be cultured in in a liquid or semi-solid medium solidified by agarose.

##### 4.2 Protoplast concentration

The optimum initial concentration of cultured protoplasts is an important factor. Too high or too low protoplast concentration may improperly condition

the medium or even toxify it. Count the protoplasts in a counting chamber (e.g. Levi counting chamber) and add culture medium to get the optimal protoplast concentration. Cassava mesophyll protoplasts were usually adjusted to  $3-5 \times 10^4$  protoplasts per ml. Although both media (Kao and B5-p) gave the same optimal culture concentration, the Kao medium allowed the protoplasts to divide at lower concentrations than the B5-p medium (Figure 2). This difference is probably due to the more complex composition of the Kao medium.

#### 4.3 Plating of isolated protoplasts in liquid medium

When liquid medium is employed, cassava protoplasts can be cultured in 100-200  $\mu$ l drops of culture medium in 50 x 15 mm plastic Petri dishes (1 ml medium/Petri dish (Figure 1.8a)). Protoplasts can also be cultured in a thin layer of culture medium (2-3 ml medium/Petri dish). Fresh media is added directly to the protoplast suspension at 6-8 day intervals.

Liquid medium is convenient, as protoplasts and the developing cell colonies are easy to transfer, and the medium can be diluted or modified during the culture period. In many cases however (such as in cassava), the cultured protoplasts clump together and the obtention of single-cell clones is problematic.

#### 4.4 Plating of isolated protoplasts in solid medium.

Culture media can be solidified by 0.6% of low melting agarose (e.g. Sigma type VII), and the protoplasts can be cultured embedded in this solid medium. Protoplasts are mixed with warm (approx  $40^{\circ}\text{C}$ ) agarose-containing medium and the mixture is transferred immediately into Petri dishes (3ml medium/50 x 15 ml Petri dish). Using this method, protoplasts remain in a fixed position so protoplast clumping is avoided and separate clones can be obtained (Figure 1.8b).

#### 4.5 Physical conditions

A variety temperatures and light conditions have reportedly been used in the culturing of protoplasts. In our laboratory, cassava protoplasts were kept in darkness and  $27^{\circ}\text{C}$  in the first 3-4 weeks of the culture. Then the

developing colonies were transferred to different light conditions: 12 hours photoperiod or continuous light of approximately 3000 lux. Petri dishes usually were sealed with parafilm and incubated in plastic containers humidified with moistened filter paper, in order to prevent the evaporation of the culture medium.

#### 4.6 Observation of the cultured protoplasts.

The use of inverted microscope is advantageous, because it allows the visual observation of the cultured protoplasts, without opening the closed Petri dishes or other culture vessels. If no inverted microscope is available, small aliquots can be taken and microscopic examination can be performed on a slide.

Cassava protoplasts regenerate cell wall in 2-3 days of incubation and they start dividing after 3-5 days of culture (Figure 3B). Sustained division leads to the formation of cell colonies in 2-3 weeks (Figure 3C). About 4 weeks after the initial culture of the cassava protoplasts the cell clusters are already visible by eye.

The culture efficiency of a protoplast system can easily be measured by determining the frequency of the protoplasts able to divide and form colonies:

$$4.6.1 \text{ Division frequency: } \frac{\text{No. of dividing protoplasts} \times 100}{\text{No. of protoplasts cultured}}$$

At least 1000 protoplast should be counted in each sample after 7-10 days of incubation, using an inverted microscope.

$$4.6.2 \text{ Plating efficiency: } \frac{\text{No. of growing colonies/Petri dish} \times 100}{\text{No. of plated protoplasts/Petri dish}}$$

Number of visible, growing colonies should be counted after transferring the colonies onto the agar medium.

#### 4.7 Adding of fresh medium, subculture:

It is advisable to add fresh culture medium to the protoplast culture at weekly intervals. First, protoplast culture medium is added to dilute approximately twice the protoplast suspension. Protoplast derived cell colonies does not require any more the presence of osmotic stabilizer. When fresh culture medium is added later, osmotic levels should be gradually lowered

by the use of low osmotic medium. The rate of overall decrease of the osmotic level should be around 0.1M/week.

Protoplasts-derived cell colonies can be transferred into standard cell or callus culture media after 4-5 weeks of incubation. When cultured in liquid medium, the suspension of growing colonies can easily be suspended and transferred by Pasteur pipette. Cell colonies on agarose solidified medium can be picked up individually or whole pieces of the solid medium with the cell colonies can be transferred onto fresh medium (Figure 3D).

A.6.1. Division frequency: No. of dividing protoplasts X 100  
No. of protoplasts cultured

A.6.2. Plating efficiency: No. of growing colonies / Petri dish X 100  
No. of protoplasts / Petri dish

A.7. Adding of fresh medium, subculturing

It is advisable to add fresh culture medium to the protoplast culture in weekly intervals. Thus, protoplast culture medium is added to divide approximately twice the protoplast suspension. Protoplast derived cell colonies does not require any more the presence of osmotic stabilizer. When fresh culture medium is added later, osmotic levels should be gradually lowered.

### III. ISOLATION AND CULTURE OF SHOOT-TIP AND SOMATIC EMBRYO DERIVED PROTOPLASTS

Cotyledons, embryogenic axes, shoot tips and young immature leaves were found to have morphogenic capacity and that mature plants can be regenerated from them through somatic embryogenesis (Stamp and Henshaw 1982, Stamp 1984, Szabados et. al. 1987). Proliferating secondary somatic embryos can be promising source for protoplast isolation, because relatively big amount can be produced in short time (few weeks), and they have high capacity of plant regeneration.

A series of experiments were carried out in our laboratory to isolate and culture protoplasts from these tissues with embryogenic capacity. As cassava is mainly a vegetatively propagated crop, we concentrated on the isolation of protoplasts from vegetative tissues, namely shoot tips and somatic embryos.

#### 1. Protoplast isolation

Protoplast isolation and culture procedure was similar to that described for leaf mesophyll tissues (see section II, No. 2). 5-8mm sized tips and immature leaves of 4-8 weeks old shoot cultures were collected, pretreated as described before and transferred to the washing solution No. 1 (Table 2). Primary somatic embryos or rapidly proliferation secondary embryos were collected and transferred to the same washing solution. Shoot tips and somatic embryos were then chopped with sharp surgical blades in a Petri dish. Washing solution was replaced by an enzyme solution made up from an E-2 enzyme mixture (Table 3) and a culture medium (Kao or B5-p, Table 4) in a 1:1 ratio (8-10 ml enzyme solution in a 100 x 15 mm dish, or 3 ml solution in a 50 x 15 mm dish). Sealing and incubation the petri dishes was carried out as described before.

Isolated protoplasts from these organs were usually smaller and more compact when compared to leaf mesophyll protoplasts. A shoot tip-derived protoplasts sometimes contained chloroplasts, but they were frequently colorless. Somatic embryo-derived protoplasts did never have chloroplasts.

## 2. Protoplast purification

Isolated protoplasts were purified and cultured as described for the leaf mesophyll protoplasts. Due to their higher density, these protoplast usually sedimented in the washing solution No. 1. Flotation was achieved when the washing solution No. 2 was supplemented with 20% Percoll, thus increasing buoyant density of this washing solution to a desired level (washing solution No. 3, Table 2).

## 3. Protoplast culture

Culture of the isolated shoot-tip or embryo derived protoplasts was essentially the same as of the leaf mesophyll protoplasts. They were able to divide and form colonies in Kao and B5-p medium, either in liquid or in solidified form as well. The preferred protoplast concentration was 60-80.000 protoplast/ml. It seemed that higher 2,4-D concentrations on the culture medium were beneficial for the division activity of these protoplasts. Shoot-tip derived protoplasts divided well in a medium containing a concentration as high as 10 mg/l 2,4-D with 0.5 m/l Zeatin. Protoplasts isolated from somatic embryos could be cultured in the same way, although the division frequency and subsequent colony formation was usually poor.

Table 1. Composition of culture media and solutions used for in vitro propagation of cassava plants.

Mineral salts: MS medium (Murashige and Skoog 1962)

Macronutrients (mg/l)	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1950
	$\text{KNO}_3$	1900
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	170
Micronutrients (mg/l)	KI	0.83
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
	$\text{MnSO}_4$	22.3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Vitamins (mg/l)	Thiamin-HCl	1
	m-inositol	100
Sucrose (g/l)		20

Table 1. Composition of culture media and solutions used for *in vitro*

Growth hormones (mg/l)		NAA	0.02
		BAP	0.05
		GA <sub>3</sub>	0.05
Solidifier (g/l)		Difco agar	7
pH (with 1N KOH)			5.6

Sterilize by autoclaving at 121°C for 15 min.

Micronutrients (mg/l)			
4.0	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O		
2.0	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		
1.0	KCl		
0.3	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		
0.2	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O		
0.2	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		
0.2	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O		
0.02	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O		
0.02	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O		
37.3	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O		
27.8	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		
1	Thiamin-HCl		
100	m-inositol		
20	Sucrose (g/l)		



Table 2. Washing solutions for cassava protoplasts isolation.

<u>Elements</u>	<u>Washing solution No.</u>		
	<u>(1)</u>	<u>(2)</u>	<u>(3)</u>
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	50 mg	50 mg	50 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mg	10 mg	10 mg
Mannitol (0.4M)	7.3 g		
Sucrose (0.4M)		13.7 g	13.7g
pH (with 1N KOH)	5.6	5.6	5.6
Percoll (steril)			20 ml
Final volume	100 ml	100 ml	100 ml
Filter sterilize			

Table 3. Enzyme solutions for cassava protoplast isolation

<u>Elements</u>	<u>Enzyme solution</u>	
	<u>E-1</u>	<u>E-2</u>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	100 mg	100 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mg	10 mg
MES (2-N-morpholino - ethanesulfonic acid)	58.5 mg	58.5 mg
Mannitol (0.4M)	7.3 g	7.3 g
Onozuka R 10 cellulase	1 g	1 g
Hemicellulase (Sigma)	0.3 g	0.3 g
Pectolyase Y 23	0.1 g	0.1 g
Driselase		0.5 g
pH (with 1N KOH)	5.6	5.6
Final volume	100 ml	100 ml

After the components were all dissolved, centrifuge the enzyme solution at 10.000 rpm for 5 min. to sediment insoluble material. Filter sterilize the supernatant.

Table 4. Culture media for cassava protoplasts.

Elements		Kao (in 1 liter)	B5-P (in 1 liter)
Macronutrients (mg)	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	600	
	$\text{KNO}_3$	1900	2500
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	600	900
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	300	250
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	
	KCl	300	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		134
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$		150
Micronutrients (mg)	KI	0.75	0.75
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	3.0	3.0
	$\text{MnSO}_4$	10.0	10
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0	2.0
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3	37.3
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8
Vitamins (mg)	inositol	100	100
	thiamine-HCl	10	10
	ascorbic acid	1	
	nicotinamide	1	1
	pyridoxine-HCl	1	1
	Ca-pantothenate	0.5	
	choline chloride	0.5	
	folic acid	0.2	
	riboflavin	0.1	

<u>Elements</u>		<u>Kao (in 1 liter)</u>	<u>B5-P(in 1 liter)</u>
Vitamins (mg)	p-aminobenzoic acid	0.01	
	vitamin B <sub>12</sub>	0.01	
	vitamin A	0.005	
	vitamin D <sub>3</sub>	0.005	
	biotin	0.005	
Organic acids (mg)	(adjusted to pH 5.5 with NH <sub>4</sub> OH)		
	sodium pyruvate	5	
	citric acid	10	
	malic acid	10	
	fumaric acid	10	
Sugars (mg)	sucrose	125	
	fructose	125	
	ribose	125	
	xylose	125	
	mannose	125	
	rhamnose	125	
	cellobiose	125	
	sorbitol	125	
	mannitol	125	
Osmotics (g)	glucose	63	63
Growth hormones (mg)	NAA	1	1
	2,4-D	0.2	0.2
	Zeatin	0.5	0.5
Miscellaneous	vitamin-free casamino acid (mg)	125	250
	coconut water* (ml)	10	
pH (with 1N KOH)		5.6	5.6
Final volume		1 liter	1 liter
Filter sterilize			

\*Coconut water is obtained from mature fruits, heated to 60°C for 30 min. and filtered.

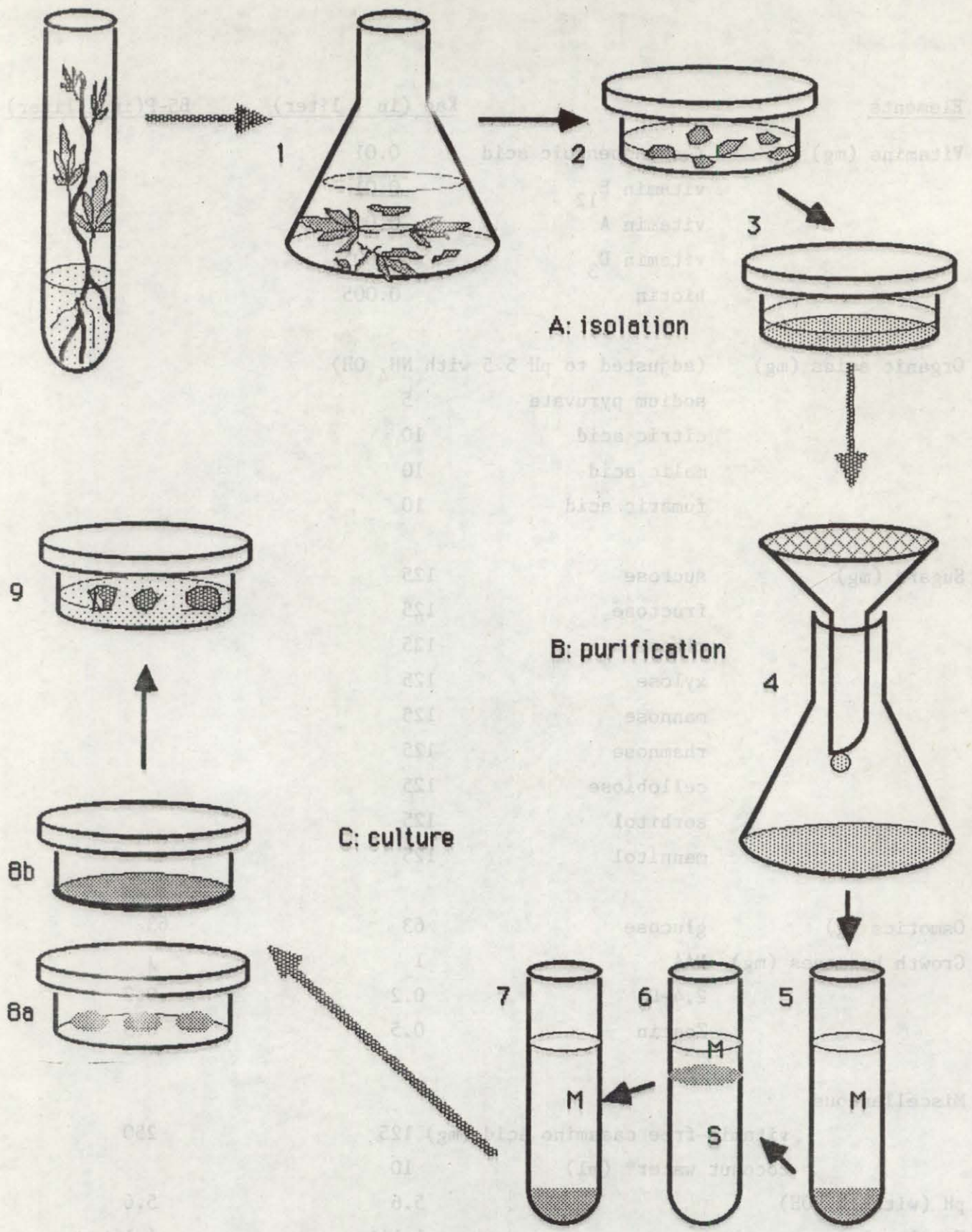


Figure 1. Isolation and culture of cassava protoplasts: 1. pre-treatment with 30% alcohol; 2. fragmentation of leaf tissue; 3. enzymatic digestion; 4. filtration; 5. sedimentation I (M=0.4 M mannitol); 6. flotation (S=0.4 M sucrose); 7. sedimentation II; 8a. culture in liquid medium; 8b. culture in solid medium; 9. sub-culture of callus.

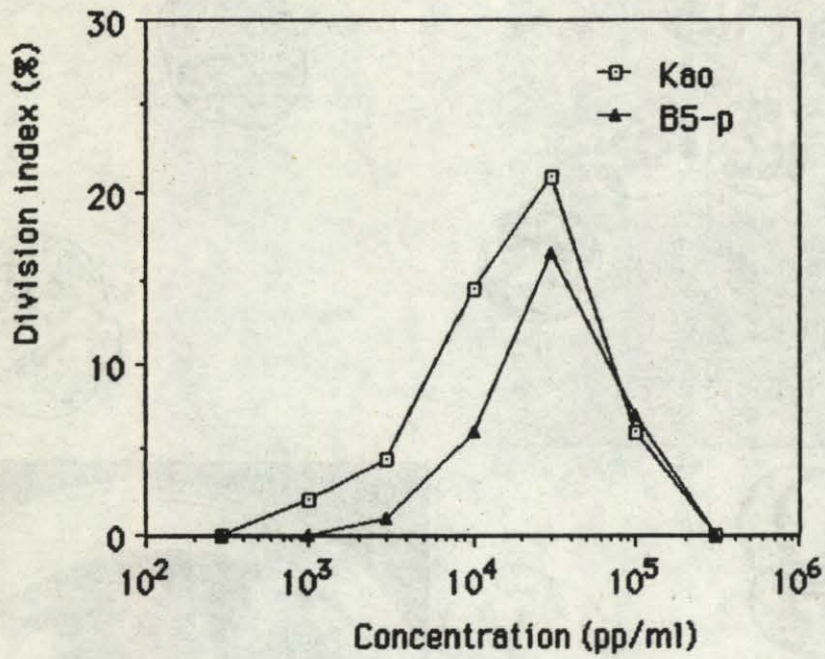


Figure 2. Effect of protoplast concentration on the division frequency of the isolated cassava protoplasts.

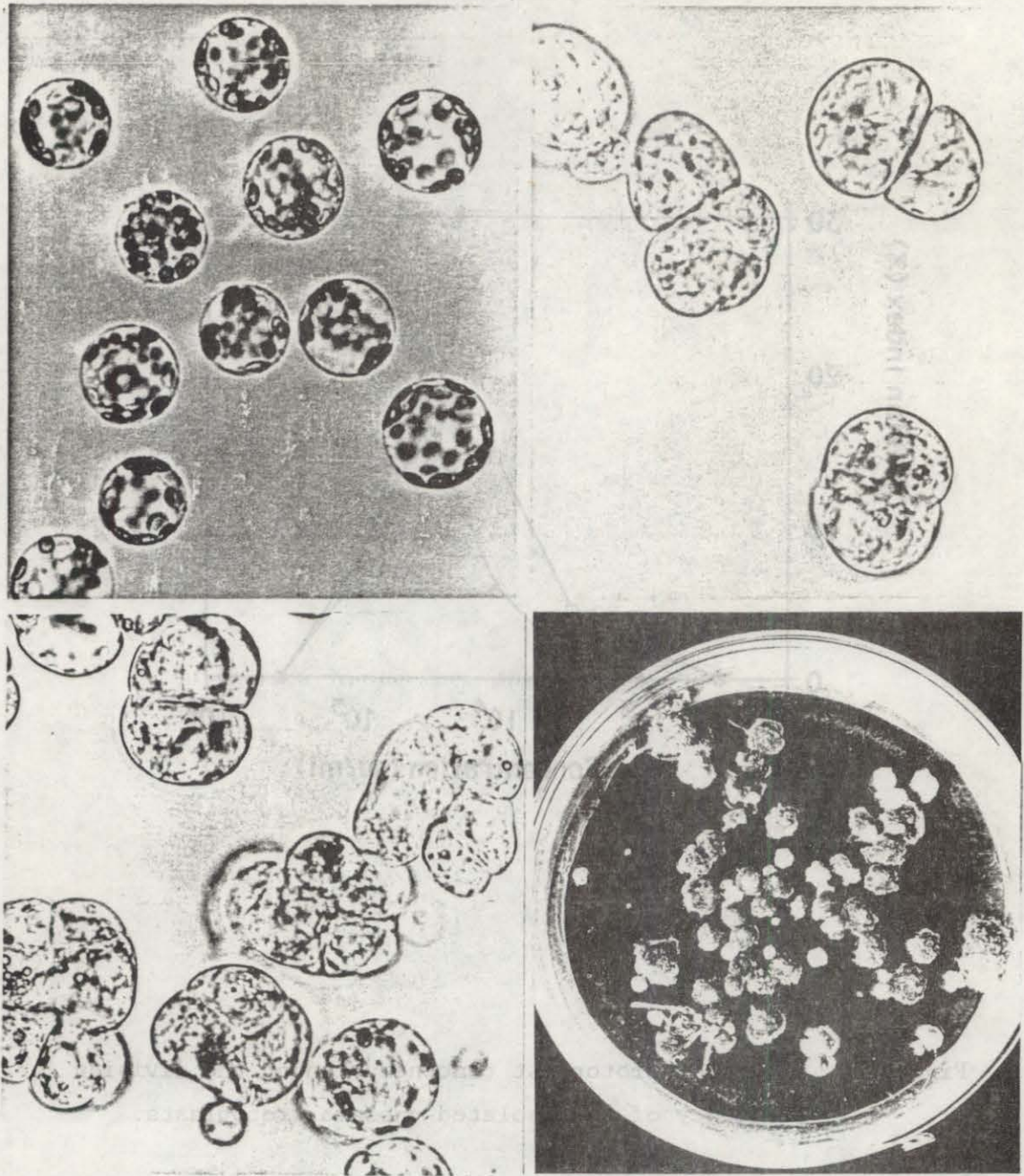


Figure 3. Culture of leaf mesophyll protoplasts: (A) Isolated protoplasts; (B) First mitotic divisions; (C) Cell colonies derived from isolated protoplasts; (D) Callus growth from protoplast derived colonies.

#### IV. REFERENCES

##### 1. Selected References

- CIAT (1986). Biotechnology research Unit. Annual Report 1985, pp 21-31.
- 
- GAMBORG, D.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- KAO, K.N. 1982. Plant protoplast fusion and isolation of heterokaryocytes. In: *Plant Tissue Culture Methods*. Eds: L.R. Wetter and F. Constabel. National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Saskatchewan, Canada pp. 49-56.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- ROCA, W.M. 1984. Cassava. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, volume 2. Eds. W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato and Y. Yamada. Macmillan Publishing Corporation, New York, pp. 269-302.
- SHAHIN, E.A. and SHEPARD, J.F. 1980. Cassava mesophyll protoplasts: Isolation, proliferation and shoot formation. *Plant Sci. Lett.* 17: 459-465.
- STAMP, J.A. and HENSHAW, G.G. 1982. Somatic embryogenesis in cassava. *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 183-187.
- STAMP, J.A. 1984. Ph.D. Thesis University of Birmingham, UK.
- SZABADOS, L., HOYOS, R., ROCA, W. 1987. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Rep.* (in press).

##### 2. General information on protoplast culture

- CONSTABEL, F. 1982. Isolation and culture of plant protoplasts. In: *Plant Tissue Culture Methods*. Eds. L.R. Wetter and F. Constabel. National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. pp. 38-46.
- EVANS, D.A., BRAVO, J.E. 1983. Protoplast isolation and culture. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, Volume 1. Eds: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, and Y. Yamada. Macmillan Publishing Company, New York, pp. 124-176.
- FOKE, L.C. and GAMBORG, O.L. 1980. Application of protoplasts to the study of plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 68: 9-51.

IV. REFERENCES

- GAMBORG, O.F., SHYLIK, J.P., SHAHIN, E.A. 1981. Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. In: Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture. Ed: T.A. Thorpe. Academic Press, New York. pp. 115-153.
- PITTER, M.S. and KRIKORIAN, A.D. 1983. Plant protoplasts. Some guidelines for their preparation and manipulation in culture. Calbiochem-Behring.

2. General information on protoplast culture

- CONSTANTIN, F. 1982. Isolation and culture of plant protoplasts. In: Plant Tissue Culture Methods. Eds. L.R. Wester and F. Constantin. National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. pp. 35-45.
- EVANS, D.A., IBAVO, J.E. 1983. Protoplast isolation and culture. In: Handbook of Plant Cell Culture. Volume 1. Eds. D.A. Evans, W.F. Sherr, E.V. Amstutz and Y. Yamada. Macmillan Publishing Company, New York. pp. 124-176.
- JURE, L.C. and GAMBORG, O.F. 1980. Application of protoplasts to the study of plant cells. Int. Rev. of. 68: 9-21.



V. APPENDIX

1. Ordering information.

1.1. Enzymes:

Onozuka R 10 cellulase

Kinki Yakult MFG. CO. LTD.  
8-21 Shigikan-Cho  
Nishinomiya  
Japan.

Driselase

Kyowa Hakko Kogyo CO. LTD.  
Tokyo  
Japan.

Pectolyase Y 23

Seishin Pharmaceutical CO. LTD.  
4-13 Koamicho  
Ninhonbashi  
Tokyo  
Japan

Hemicellulase

Sigma Chemical CO..  
P.O. Box 14508  
St. Louis  
MO 63178  
USA.

1.2 Mineral salts, vitamins, growth hormones, etc:

Sigma Chemical CO.  
P.O. Box 14508  
St. Louis  
MO 63178  
USA.