


Centro Internacional de Agricultura Tropical

SE-5-85

Noviembre 21, 1985

 CIAT  
35334  
COLECCION HISTORICA

  
CENTRO DE DOCUMENTACION

CULTIVO DE PROTOPLASTOS DE YUCA Y STYLOSANTHES

László Szabados

La genética de células somáticas en plantas está basada en técnicas de protoplastos. Los protoplastos pueden ser sometidos a mutagénesis, fusión o transformación genética, seguida selección in vitro. La aplicación de las técnicas de protoplastos para el mejoramiento de los cultivos requiere de la regeneración rutinaria de plantas a partir de protoplastos aislados. Nuestro trabajo en la Unidad de Biotecnología del CIAT está concentrado en el aislamiento y cultivo de protoplastos de yuca y Stylosanthes.

Cultivo de protoplastos de yuca. Se ha dado mayor atención a los problemas de regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de la yuca. Usando una mezcla enzimática de celulasa Onozuka, hemicelulasa y Pectolyasa fue posible el aislamiento rutinario de protoplastos

5p.  
80., 5 Ref.

de hojas y ápices de vástagos cultivados in vitro y de embriones somáticos diferenciados a partir de segmentos foliares.

Los protoplastos aislados fueron purificados por filtración a través de nylon y mediante centrifugación. Poblaciones de protoplastos altamente purificados fueron obtenidas después de sedimentación y flotación en medio especial. Para la flotación de protoplastos de mesófilo foliar se usó un osmótico de sucrosa, mientras que los protoplastos meristemáticos o embriogénicos más densos flotaron solo en 25% de Percoll o 15% de Ficoll, en la presencia de manitol como osmótico.

Los protoplastos purificados se cultivaron en el medio líquido descrito por Kao. Se encontró que este medio fue superior en comparación con otros medios de cultivo, incluyendo el que fue usado por Shahin y Shepard para protoplastos de yuca.

Los protoplastos cultivados regeneraron pared celular nueva en 1-2 días de cultivo, y se dividieron en 3-4 días de cultivo. Se han observado frecuencias de división de 10-20% en cultivos de protoplastos de mesófilo foliar y de ápices. Ocasionalmente se ha alcanzado divisiones tan altas como 35%.

En cultivos originados a partir de embriones somáticos se encontraron frecuencias de divisiones menores al 5%. Los protoplastos en división formaron colonias en 3-4 semanas. Estas colonias fueron transferidas a un medio sólido basado en las sales de Murashige and Skoog, las vitaminas del medio B<sub>5</sub> (Gamborg et al, 1968) y diferentes combinaciones y

concentraciones de reguladores de crecimiento, amino ácidos y extractos orgánicos. Las colonias plaqueadas formaron callos en varios medios de cultivo. No fue posible inducir organogénesis o embriogénesis en estos callos. Ocasionalmente se observó formación de raíces o verdeamiento de los callos.

Se han aislado y cultivado protoplastos de 10 variedades de yuca. Actualmente estamos concentrados en la inducción de embriogénesis somática en las colonias de protoplastos usando diferentes tratamientos antes y después del cultivo y selección de tipos de protoplastos apropiados.

Cultivo de protoplastos de Stylosanthes. Empezamos a trabajar con protoplastos de Stylosanthes al final de 1984. Para el aislamiento de protoplastos de mesófilo foliar rutinariamente se usa una mezcla de celulasa Onozuka y Pectolyasa. El procedimiento de aislamiento y purificación es básicamente el mismo usado para los protoplastos de yuca.

Los protoplastos se cultivan en el medio de Kao o en el medio descrito por Binding. La eficiencia de cultivo de los protoplastos de Stylosanthes siempre fue baja. Parece que estos son más frágiles que los de yuca después del tratamiento enzimático, y se rompen más fácilmente durante los pasos de purificación. La estabilidad de los protoplastos de Stylosanthes fué ligeramente aumentada con niveles más altos de iones de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  en la solución enzimática y en el medio de cultivo.

Los protoplastos de *Stylosanthes* empezaron a dividirse en 5-7 días de cultivo y se formaron colonias en 4-5 semanas para luego ser transferidos a medio sólido para inducir mayor crecimiento y morfogénesis.

Las colonias adquirieron color verde y formaron puntos verdes oscuros al ser cultivadas con iluminación. Se ha observado la formación de vástagos en alta frecuencia en estos puntos verdes cuando las colonias se transfirieron al medio de regeneración. Se han regenerado plantas de dos accesiones de *S. guianensis* (No. 136 y No. 2243). Se realizan enraizamientos con otras líneas de *S. guianensis* y varias líneas de *S. capitata* y *S. macrocephala*.

Nuestras investigaciones están dirigidas hacia la aplicación de diferentes técnicas de manipulación genética celular para su utilización en el mejoramiento de estos cultivos. En poblaciones de plantas regeneradas a partir de embriones somáticos de yuca y protoplastos y callos de *Stylosanthes* puede ocurrir variación somaclonal útil. La fusión de protoplastos es ahora posible en *Stylosanthes* desde que la regeneración de plantas a partir de protoplastos está disponible. La transformación genética de yuca y *Stylosanthes*, por medio de *Agrobacterium* genéticamente modificado, es una posibilidad.

## BIBLIOGRAFIA

- K. N., Kao (1982). Plant protoplast fusion and isolation of heterokaryotes. In: Plant Tissue Culture Methods. L. R. Wetter, F. Constabel. (eds). National Research Council of Canada p 49-56
- E. A, Shahin, J. F., Shepard (1980). Cassava mesophyll protoplasts: Isolation, proliferation and shoot formation. Plant Sci. Let. 17:459-465
- T. Murashige, F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497
- O. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojuna (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50: 151-158
- H. Binding, R. Nehls (1978). Regeneration of isolated protoplasts of *Vicia faba*. Z. Pflanzenphysiol. 88: 327-332