

ASLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE HOJAS DE CAFE

Francisco Javier Orozco-Castaño*
Otto Schieder**

RESUMEN

Se estableció un método rápido para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de café. Fue posible liberar abundante cantidad de protoplastos en un periodo de incubación de cuatro horas en celulasa R-10 (3^o/o) pectoliasa Y-23 (0,5^o/o) y manitol (0,6M) a pH 5,8, en hojas jóvenes, con menos de un mes de edad, de plantas de *Coffea arabica*, *C. canephora* y de algunos híbridos entre estas dos especies. Tanto de plantas cultivadas "in vitro" como de invernadero. El mejor medio fue el A-43, modificado (sin KCl o con NH₄Cl) en donde se obtuvo división y proliferación de células hasta formar colonias celulares; posteriormente estos pequeños callos murieron. Las divisiones ocurrieron en protoplastos cultivados en la oscuridad a 25 °C y en concentración de aproximadamente 10⁴ células por mililitro. Hubo respuesta diferencial de los genotipos de café ensayados, al cultivo "in vitro" de sus protoplastos. Se obtuvieron divisiones y formación de colonias celulares únicamente en la variedad Caturra de *C. arabica* y en uno de los cinco clones de *C. canephora*, el Cenicafé 161 Ugandae T-3518.

SUMMARY

OROZCO C., F. J. and SCHIEDER, O. Isolation and cultivation of protoplasts from coffee leaves. Cenicafé (Colombia) 33(4):129-136, 1982.

A rapid method was established for the isolation of protoplasts from coffee leaves. It was possible to free an abundant quantity of protoplasts in an incubation period of 4 hours in cellulase R-10 (3^o/o); pectoliasa Y-23 (0.5^o/o) and mannitol (0.6M) at PH 5.8, in young leaves, less than one month old, of the *Coffea arabica*, *C. canephora* and some hybrids among these two species. Both from cultivated plants "in vitro" and plants grown in greenhouses. The best medium was A-43, modified (without KCl or with NH₄Cl) where division and proliferation of cells was obtained to the point of forming cellular colonies; later, these small pieces died. The divisions occurred in protoplasts cultivated in darkness at 25 °C and in concentration of approximately 10⁴ cells per milliliter. There was a differential reaction among the coffee genotypes tested, in cultivating "in vitro" their protoplasts. Divisions and formation of cellular colonies were obtained only in the variety Caturra de *C. arabica* and in one of the 5 clones of *C. canephora*, Cenicafé 161 Ugandae T-3518.

Additional Key Words: *Coffea* spp. Tissue culture.

INTRODUCCION

Es conocido el potencial del cultivo de protoplastos en el mejoramiento de plantas (9,12). Este tipo de células vegetales, sin la pared celular, facilitan el intercambio intercelular de material genético de diverso origen, bien sea en forma directa o por intermedio de vectores o aún de unidades completas como otros protoplastos, a través de la fusión de los mismos.

* Asistente de la Sección de Fitomejoramiento del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia.

** Jefe del Grupo de Investigación de Protoplastos y Cultivo de Tejidos. Max Planck. Institut 5000 Koeln 30.

En el género *Coffea* existe una serie de barreras que obstaculizan la incorporación de los caracteres deseables de las especies diploides en las tetraploides. Por lo tanto, las técnicas que permitan sobreponer estas barreras entre especies son un excelente complemento de los programas convencionales de mejoramiento y un recurso para ampliar la base genética de las variedades de *Coffea arabica*.

Hasta el presente, solo se han hecho algunos pocos intentos en café, para aislar y cultivar protoplastos. Sondahl et al (10), reportan la liberación y la formación de callos a partir de protoplastos provenientes a su vez de células de tejido calloso. En una comunicación resumida, Sondahl y Martins (11), se refieren al aislamiento de protoplastos provenientes del mesófilo, después de 16 horas de tratamiento con enzimas. No se conoce registro alguno sobre cultivo exitoso de protoplastos provenientes del mesófilo, ni ha sido posible hasta ahora la regeneración de plantas a partir de protoplastos de café.

Se reconoce la importancia de encontrar métodos que permitan el aislamiento de gran número de protoplastos, en períodos cortos de incubación en enzimas, y el cultivo de los mismos, como pasos esenciales para la posible regeneración de plantas y para posteriores trabajos genéticos (7).

Los protoplastos a partir de hojas tienen, en general, la ventaja de poseer un número más estable de cromosomas en comparación con los protoplastos derivados de callos o células en suspensión. Esto hace que dichos protoplastos sean más útiles en los experimentos de manipulación genética y de hibridación somática (9).

El presente artículo describe el método para liberar suficiente número de protoplastos de hojas de café, en un período corto de tiempo, y el sistema de cultivo de los mismos para obtener división y proliferación de células.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en los laboratorios del Instituto Max-Planck de Colonia, Alemania Federal. Se utilizaron hojas de varias líneas y variedades de *Coffea canephora* y *C. arabica*, así como de plantas híbridas provenientes de Cenicafé (Colombia) y de Francia (Gerdatt, Montpellier).

Se utilizaron hojas de plantas que crecían "in vitro", provenientes de cultivo de brotes que crecieron en medio MS (6) suplementado con 40 g/l de sacarosa y 1 mg/l de 6-Benzil amino purina (BAP); y hojas de plantas que crecían en macetas en invernadero.

Antes de usar las hojas de las plantas de invernadero, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (7^o/o) durante 10 minutos para desinfectarlas y luego se lavaron tres veces con agua esterilizada.

Se tomaron hojas de diferentes edades, desde muy pequeñas hasta completamente desarrolladas, y se cortaron en trozos de dos a tres milímetros cuadrados, en presencia de manitol 0,3 mol y L-cisteína HCl (50 mg/l). Luego se transfirieron a las distintas soluciones enzimáticas. Se probaron las siguientes enzimas disueltas en manitol 0,6 mol (cerca a 730 m Osmol) a pH 5,8 y en diferentes concentraciones: Celulasa "Onozuka" R-10 y macerozima R-10 (Kinki Yakult, Japón), celulasa 2230 A (Roehm, Alemania Federal), pectoliasa Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co, Japón), driselasa (Kyowa Hakko Kogy, Japón) y lisozima (Whorthington Biochem, Corp. U.S.A.) (Tabla 1).

TABLA 1 LIBERACION DE PROTOPLASTOS EN HOJAS DE CAFE TRATADAS CON VARIAS COMBINACIONES DE ENZIMAS.

	Hojas maduras	Hojas nuevas
Driselasa (2,5 ^o /o) Macerozima R-10 (2 ^o /o)	—	—
Lisozima (2 ^o /o) Macerozima R-10 (1 ^o /o)	—	—
Celulasa R-10 (3 ^o /o) Macerozima R-10 (1 ^o /o)	—	+
Celulasa 2230 A (3 ^o /o) Macerozima R-10 (1 ^o /o)	—	+
Driselasa (2,5 ^o /o) Pectoliasa Y-23 (0,3 ^o /o)	—	—
Lisozima (2 ^o /o) Pectoliasa Y-23 (0,3 ^o /o)	—	—
Celulasa R-10 (3 ^o /o) Pectoliasa Y-23 (0,5 ^o /o)	—	+++
Celulasa 2230 A (3 ^o /o) Pectoliasa Y-23 (0,5 ^o /o)	—	+++

+ Pocos protoplastos después de cinco horas de tratamiento.

+ + + Abundante liberación después de cuatro horas.

La incubación en la solución de enzimas se efectuó desde 4 hasta 24 horas, en un tambor giratorio (Roller) a 2 r.p.m. y a 25 °C. Después de la incubación, la suspensión de protoplastos se filtró en mallas finas, de 150 y 50 micras, para remover el material de hojas no digerido. Luego se lavaron dos veces en agua de mar (cerca a 730 m Osmol) por centrifugación.

Después de lavados los protoplastos se resuspendieron en sacarosa y percol, a varias concentraciones; este último, disuelto en manitol 0,6 mol, y se centrifugaron durante 5 a 10 minutos. Los protoplastos contenidos en el supernadante fueron diluidos en agua de mar y de nuevo centrifugados para remover el percol.

El precipitado de protoplastos fue finalmente suspendido en tres medios de regeneración y cultivo: V-47 (1); Gamborg (4) y A-43 (8) y en algunas modificaciones de este último (Tabla 2). En cajas plásticas de 6 centímetros de diámetro, estériles, se colocaron 2 ml de medio que contenían los protoplastos en suspensión, en varias concentraciones, desde menos de 10^3 protoplastos por ml, hasta más de 10^5 protoplastos por ml. Las cajitas se colocaron en cuarto de incubación y crecimiento a 25 °C, en la oscuridad y con luz. En los casos en los cuales se comprobó que había regeneración de la pared celular e iniciación de división de los protoplastos, se adicionó medio líquido fresco o medio semisólido, de composición similar a la inicial.

TABLA 2.- COMPOSICION DEL MEDIO A-43 ORIGINAL mg/l (8).

KNO ₃	2.000	FeSO ₄ 7H ₂ O	13,9
KCl	1.500	Na ₂ EDTA	18,6
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.300	Mio-inositol	100
NH ₄ NO ₃	800	Acido nicotínico	5
MgSO ₄ 7H ₂ O	400	Piridoxina HCl	0,5
KH ₂ PO ₄	200	Tiamina HCl	0,5
MnSO ₄ 4H ₂ O	50	Acido fólico	0,5
H ₃ BO ₃	20	Biotina	0,5
ZnSO ₄ 4H ₂ O	20	2-4 ácido dicloro fenoxiacético (2,4D)	1,0
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,5	Benziladenina (BA)	0,5
D-manitol	0,7M		
Sacarosa	0,6M		

Modificaciones: a - sin el KCl

b - sin el KCl, más NH₄Cl 800 mg/l

RESULTADOS Y DISCUSION

Las combinaciones y las concentraciones de enzimas probadas para el aislamiento de los protoplastos de café se presentan en la Tabla 1.

No se obtuvo liberación de protoplastos en hojas maduras o viejas, aún con 24 horas de tratamiento, en ninguna de las combinaciones enzimáticas. Sin embargo, en hojas jóvenes, con menos de un mes de edad y con cinco horas de tratamiento con celulosa R-10 o celulosa 2230 (30/0) en combinación con macerozima R-10 (10/0), se obtuvieron algunos protoplastos. Los períodos prolongados de tratamiento no aumentaron el número de protoplastos liberados.

Se obtuvo alto número de protoplastos en todas las líneas y variedades probadas, con hojas jóvenes, tratadas durante 4 horas con celulosa R-10 o celulosa 2230 (30/0) en combinación con pectoliasa Y-23 (0,50/0). Períodos cortos (25 minutos) de tratamiento con estas mezclas de enzimas no tuvieron éxito, como ha sido el caso por ejemplo para *Nicotiana* (7), *Datura* y *Petunia*^{1/}

Después del filtrado y lavado de los protoplastos, la suspensión contiene partes inertes de protoplastos rotos, células no digeridas y otros residuos. Para separar estas impurezas, el precipitado se resuspende en soluciones con alta densidad, como la sacarosa 0,6 mol. Sin embargo, los protoplastos de café no flotan en la sacarosa como ocurre con los protoplastos de la mayoría de especies (2). Se obtuvieron mejores resultados con soluciones de percol (60-700/0) en manitol 0,6 mol.

Los protoplastos de café, aunque relativamente pequeños, parecen ser más densos que los protoplastos de otras especies, lo cual hace necesario resuspenderlos en soluciones con alta densidad.

En los diferentes medios de cultivo ensayados, el comportamiento de los protoplastos de café fue diferente. En el medio de Gamborg sobrevivieron algunos días y luego murieron. En el medio V-47 permanecieron durante mayor tiempo (20-25 días). Sólomente en el medio A-43 utilizado originalmente para el cultivo de protoplastos de *Antirrhinum majus* (8), permanecieron vivos por más de un mes e iniciaron algunas divisiones. Se ensayaron variaciones del medio A-43, (Tabla 2), así: se reemplazó el KCl por NH₄Cl (800 mg/l) de acuerdo con recomendación de los mismos autores (8), los cuales observaron que al adicionar NH₄Cl se aumentaba significativamente el número de divisiones. También se ensayó el medio sin KCl.

1/ Shieder, O. Datos sin publicar.

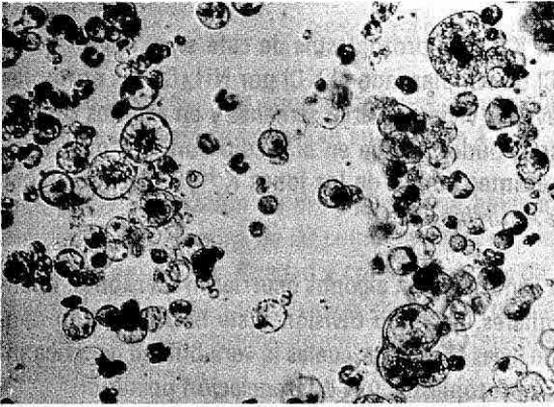
En el medio A-43 original, es decir con KCl, los protoplastos de café se oxidaron y murieron rápidamente; en el medio sin KCl o reemplazando el KCl por NH_4Cl , los protoplastos de todos los materiales de café ensayados vivieron varias semanas y en algunos casos se dividieron y formaron colonias celulares; pudo ser que en el medio con KCl ocurrieron variaciones en el pH, ocasionadas por el intercambio de los iones K^+ y H^+ , que afectaron los protoplastos de café y no los de *Antirrhinum*.

Se observó respuesta diferencial de los genotipos; en algunos ocurrieron divisiones, mientras que en otros, bajo condiciones similares, no hubo división. Este hecho ha sido confirmado en otras especies como las gramíneas (5), en las cuales la variabilidad genética influye la iniciación de la división de sus protoplastos y la diferenciación posterior.

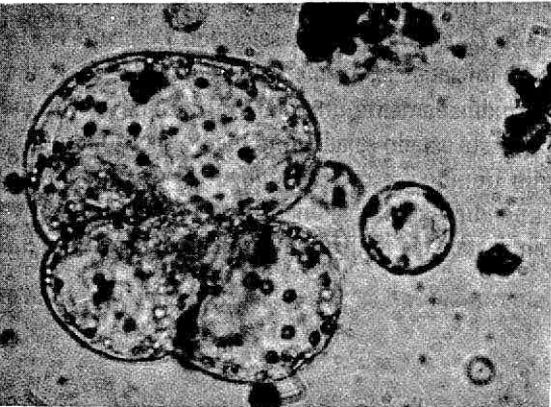
En los medios modificados se obtuvieron divisiones numerosas, después de 12-14 días, en protoplastos de la variedad Caturra de *C. arabica* y en la selección Cenicafé 161 de *C. canephora*-Ugandae T3518. Después de iniciadas las primeras divisiones, éstas se sucedieron más o menos aceleradamente (aproximadamente una por día); después de un mes se tenían colonias celulares (Figura 1). En este estado se adicionó medio semisólido (Agar al 4^o/o) de composición similar, o medio líquido fresco. En todos los casos, después de formados los pequeños callos, éstos suspendieron su crecimiento, se tornaron oscuros y murieron. Es probable que se produzcan sustancias tóxicas que inhiban el desarrollo posterior de los callos.

En este estudio y en el trabajo de Sondahl (11) se presentó el problema de la detención del crecimiento y muerte de los callos, a pesar de tratarse de material de distinto origen y haber utilizado sistemas de aislamiento y medios de cultivo diferentes. Estos resultados indican que existe la posibilidad de cultivar protoplastos de café, de diferente origen, pero que todavía subsisten problemas, que se deben estudiar detalladamente para poder obtener regeneración de plantas. Esta no parece ser una dificultad insalvable ya que a partir de callos, de origen diferente a los protoplastos, se han podido regenerar plantas, en una forma relativamente fácil (3, 10).

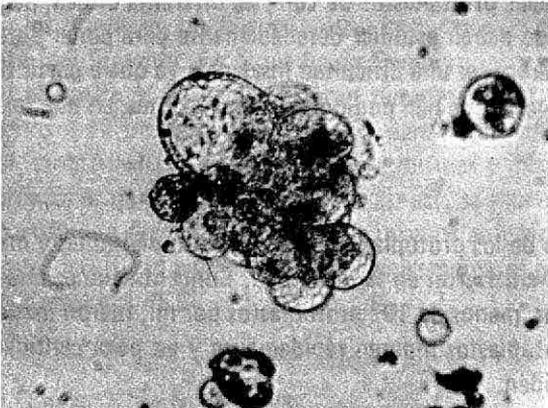
En cuanto a las condiciones de cultivo de los protoplastos, se obtuvieron divisiones y mayor supervivencia de éstos, cuando se cultivaron en la oscuridad. Concentraciones altas, mas de 10^5 células por cultivo, y bajas, menos de 10^3 protoplastos por ml, fueron inadecuadas. En alta concentración los protoplastos mueren rápidamente y en poca cantidad sobreviven largo tiempo pero no se dividen.



a



b



c

FIGURA 1.- Diferentes estados en la división celular de protoplastos de hojas de *Coffea*:

- a. Cultivo de protoplastos en los primeros estados de división.
- b. Detalle de un protoplasto en la segunda división.
- c. Colonia de células a partir de un protoplasto.

BIBLIOGRAFIA

1. BINDING, H. Regeneration von haploiden und diploiden pflanzen aus protoplasten von *Petunia hybrida* L. Z. Pflanzenphysiol. 74:327-356. 1974.
2. DAVEY, M. R., BUSH, E. and POWER, J. B. Cultural studies of a dividing legume leaf protoplast system. Plant Science Letters. 3:127-133. 1974.
3. DUBLIN, P. Multiplication vegetative "in vitro" de L'Arabusta. Café Cacao Thé (France) 24(4): 281-290. 1980.
4. GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A. and OJIMA K. Nutrient requirements of soybean root all. Experimental Cell Research 50:151-158. 1968.
5. GREEN, CH. E. In vitro plant regeneration in cereals and grasses. In: Thorpe, T. A., ed. Frontiers of plant tissue culture 1978. International Association for Plant Tissue Culture, 1978. pp. 411-418.
6. MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497. 1962.
7. NAGATA, T. and ISHII, S. A rapid method for isolation of mesophyll protoplasts. Canadian Journal of Botany 57(17):1820-1823. 1979.
8. POIRIER-H, S., RAO, P. S. and HARADA, H. Culture of mesophyll protoplasts and stem segments of *Antirrhinum majus* (Snapdragon): Growth and organization of embryoids. Journal of Experimental Botany 25(87):752-760. 1974.
9. SCHIEDER, O. Somatic hybridization: a new method for plant improvement. In: Vasil, I. K., Scowcroft, W. R. and Frey, K. J., eds. Plant Improvement and Somatic Cell Genetics. U. S., Academic Press 1982. pp. 239-253.
10. SONDAHL, M. R.; CHAPMAN, M. S., and SHARP, W. R. Protoplast liberation cell wall reconstruction, and callus proliferation in *Coffea arabica* L. callus tissues. Turrialba 30(2): 161-165. 1980.
11. SONDAHL, M. R. e MARTINS, I. S. Isolamento e cultura de protoplastos de folhas de *Coffea arabica* e *Nicotiana tabacum*. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 8º. Campos do Jordao, Brasil, Nov. 25-28 de 1980. Resumos. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1980. p. 220.
12. VASIL, I. K. and VASIL, V. Isolation and culture of protoplast. In: Bourne, G. and Danielli, J., eds. International Review of Citology. Supplement IIB. U. S., Academic Press, 1980. pp. 1-19.