

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE HOJAS EN CITRUS AURANTIUM

Esther Diosdado Salces
Dpto. de Genética y Evolución
Facultad de Biología

Peter Ruzicska
Instituto de Investigaciones Biológicas de la
Academia de Ciencias de Hungría (Szeged)

RESUMEN

En este trabajo se reporta un método para la obtención de protoplastos a partir de hojas en *Citrus aurantium*, el cual por su importancia pensamos que abre nuevas perspectivas de trabajo en los programas de mejoramiento y resistencia a enfermedades.

Este trabajo se realizó con hojas y no caulis como plantean los autores consultados, por eso pensamos que es importante haber obtenido resultados satisfactorios.

Después de numerosos ensayos, se determinó variar algunos parámetros como fueron: el tiempo de infiltración al vacío, concentración de sulfato dextran de potasio (SDP), la forma de uso de las enzimas y la agitación e incubación

previa a 37°C antes de añadir la mezcla enzimática.

ABSTRACT

In this paper we report a method to obtain protoplasts from leaves of *Citrus aurantium* because of its importance in plant breeding and disease-resistance programs of study in our country.

This work was done with leaves and not with callus, that's why we think it has been very important to obtain satisfactory results.

After several assays, we made variations to some of the parameters: vacuum infiltration, concentration of PDS, ways of use of the enzymes, stirring and previous incubation at 37 C before adding the enzymatic mixture.

INTRODUCCIÓN

La obtención de protoplastos vegetales durante la última década ha sido y es una técnica muy utilizada con diferentes fines, en los programas de mejoramiento (Cocking, 1973).

Además como plantearon algunos autores (Vardi et al., 1975) en sus estudios en protoplastos de *Citrus sinensis*, en este caso esta técnica reviste aún mayor importancia por las características que presentan los cítricos, que hacen difícil los estudios genéticos, como son: la fase juvenil, los diferentes fenómenos de esterilidad, además de la embrionía nucelar.

También debe tenerse en cuenta lo planteado por diferentes autores con respecto a los protoplastos, como son: la capacidad de los mismos

de regenerar la pared celular, dividirse, crecer en medio de cultivo, regenerar plantas enteras, (Takebe et, al, 1971; Nitsch y Ohyama, 1971), fusionarse e incorporar macromoléculas, virus y pequeñas partículas (Cocking, 1975; Carlson, 1973; Wagner et al, op cit).

Por consiguiente los protoplastos se han convertido en objeto de interés para los fisiólogos, genetistas vegetales y mejoradores.

Según otros investigadores (Melchers y Labib, 1973), los protoplastos son de gran importancia para los programas de mejoramiento y para la genética, así como para la resistencia a enfermedades (Cocking, 1973), por el hecho de que mediante los mismos se pueden multiplicar a voluntad genotipos particulares, es posible hacer inducción y selección de mutantes aplicando métodos microbiológicos (Chalef y Carlson, 1975, la incorporación de organelos y de material genético extraño (Wagner et al. op cit.) se podrían hacer estudios de herencia extracromosómica (Cocking, 1975 y por otra parte en la producción de híbridos inter-específicos e intergenéricos, que tienen gran importancia desde el punto de vista de la resistencia a enfermedades (Cocking, 1973).

Todas estas razones fueron las que nos llevaron a plantear los objetivos de nuestro trabajo, que fue la de buscar un método de obtención de protoplastos en cítricos a partir de hojas, que aprendimos en el Instituto de Investigaciones Biológicas de la Academia de Ciencias de Hungría (Szeged), y la cual tuvo que ser modificada por nosotros, ya que las técnicas que se plantean en la literatura (Harms y Potrykus, 1980)

y Vardi et al, 1975; Vardi y Raveh, 1976), aislan los protoplastos a partir de callus y no a partir de hojas de cítricos.

MATERIALES Y METODOS

Se aislaron los protoplastos a partir de hojas de las ramas jóvenes de *Citrus aurantium*.

Como el objetivo no era el conteo de los mismos para medir los rendimientos, sino verificar esta técnica, así como realizar su montaje, no se pesaron las hojas sino que se tomó una muestra de 4-5 hojas.

La técnica de la preparación del tejido está reflejada en la Fig. 1, así como el proceso a seguir en la Fig. 2 en las cuales se refleja toda esta metodología, sólo debemos añadir que la solución N° 1 mencionada en dichos esquemas contiene) 0,14 M sacarosa + 0,28 M manitol + 0,28 M sorbitol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la obtención de protoplastos conocemos que hay que tener en cuenta toda una serie de requerimientos para poder obtener resultados satisfactorios.

Por este motivo se realizaron numerosos experimentos para encontrar los parámetros óptimos con respecto a la concentración y forma de preparación de las enzimas a utilizar, el tipo de hoja a seleccionar, la temperatura y el tiempo de incubación así como la agitación adecuada. Con respecto al tipo de hoja, diseñamos un nuevo método, ya que hasta el momento por la literatura consultada, la obtención de protoplas-

tos en cítricos se ha realizado a partir de callus y no de hojas; por tal motivo decidimos es coger las hojas de las ramas más jóvenes pensando que el tejido era más adecuado para este tipo de experimento.

Los parámetros que variamos a diferencia de lo planteado para callus (Vardi, et al, 1975), fueron la concentración de SDP, la forma de uso de las enzimas, la agitación que fue diferente y además que usamos la incubación previa del tejido a 37° C antes de añadirle la mezcla enzimática. Como se puede observar en las Figuras 3,4,5 y 6, se obtienen diferentes etapas del proceso de lavado, seguido en este método para aislar a los protoplastos de los demás restos celulares.

En la Figura 6, ya se observan los protoplas^otos completamente aislados y listos para su posterior plaqueo y propagación.

Loa parámetros que variamos consideramos hayan sido producto de que se parte de diferente material vegetal y ello necesariamente altera las condiciones del experimento. Si el estabilizador osmótico utilizado por algunos autores (Vardi, et al. 1975), fue el mejor para nosotros también.

Pensamos que a pesar de que no se efectuó el conteo de los protoplastos, obtuvimos una cantidad adecuada a pesar de que fue una muestra representativa para hacer este estudio preliminar.

Por último la única dificultad presentada fue el tiempo de infiltración al vacío del te-

jido, ya que pensamos que en el caso de los cítricos, a diferencia del tabaco (Santiesteban et al, 1980), la infiltración tiene que ser mayor porque los aceites esenciales dificultan la misma.

CONCLUSIONES

En este trabajo se reporta un método de obtención de protoplastos a partir de hojas en *Citrus aurantium* que hasta el momento por la literatura consultada no se había reportado. Por este motivo consideramos que es importante contar con un nuevo método que no necesita de la formación de callus para su obtención, sino que a partir directamente de una parte de la planta, en este caso las hojas, es posible obtenerlos.

Este estudio, aunque preliminar, abre nuevas vías en los programas de mejoramiento y resistencia a enfermedades en los cítricos.

BIBLIOGRAFÍA

Carlson P.S.:

1973. The use of protoplasts for genetic research. *Proc. Nat. Acad. Sei.* 70(2): 598-602.

Chalef, R.S. and P.S. Carlson.:

1975. *In vitro* selection for mutants of higher plants. Genetic manipulation with plant material. New York, Ed. Plenum Press. p. 351-363.

Cocking, E.C.:

1973. Isolation, fusion and developments

of protoplasts of higher plants. Yeast, mould and plant protoplasts. *Proc. III Int. Symp. on Yeast protoplasts*. p. 309-317.

Cocking, E.C.:

1975. Plant protoplasts as genetic systems: Genetic manipulations with plant material. New York, Ed. Plenum Press. p. 311-327.

Harms, C. and I. Potrykus.:

1980. Hormone - Inhibition of *Citrus* protoplasts released by co-culturing with *Nicotiana tabacum* protoplasts. Its significance for somatic hybrid selection. *Plant Science Letters* 19: 295-301.

Melchers, G. and G. Labib.:

1973. Plant from protoplasts, Significance for genetics and breeding. Colloq. *Int. CNRS* 212:368-372.

Nitsch, J:P: and K. Ohyama.:

1971. Obtention des plantes a'partir de protoplastes haploides cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 273, Serie D.P. 801-804.

Santiesteban, J.; S. Quintero; J. del Sol y H. García.:

1980. Los protoplastos y sus respectivas en el mejoramiento genético del tabaco. *CIENC. TEC. AGRIC. Tabaco*, Vol.3, Nº 2, p. 61-79.

Takebe, I.; G. Labib and G. Melchers.:

1971. Regeneration of whole plants from

isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften* 58:318-320.

Vardi, A. and D. Raveh.:

1976. Cross-Feeder Experiments between Tobacco and Orange Protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 78.5. 350-359.

Vardi, A.; P. Spiegel-Roy and E. Galun.:

1975. *Citrus* cell culture. Isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Science Letters*, 4: 231-236.

Wagner, G.; H.C. Butcher and H.W. Siegelman.:

1978. The plant protoplasts: A useful tool for plant research and student instruction. *Bio. Science* 28(2);95-101.

Recibido: 17 de febrero de 1983.

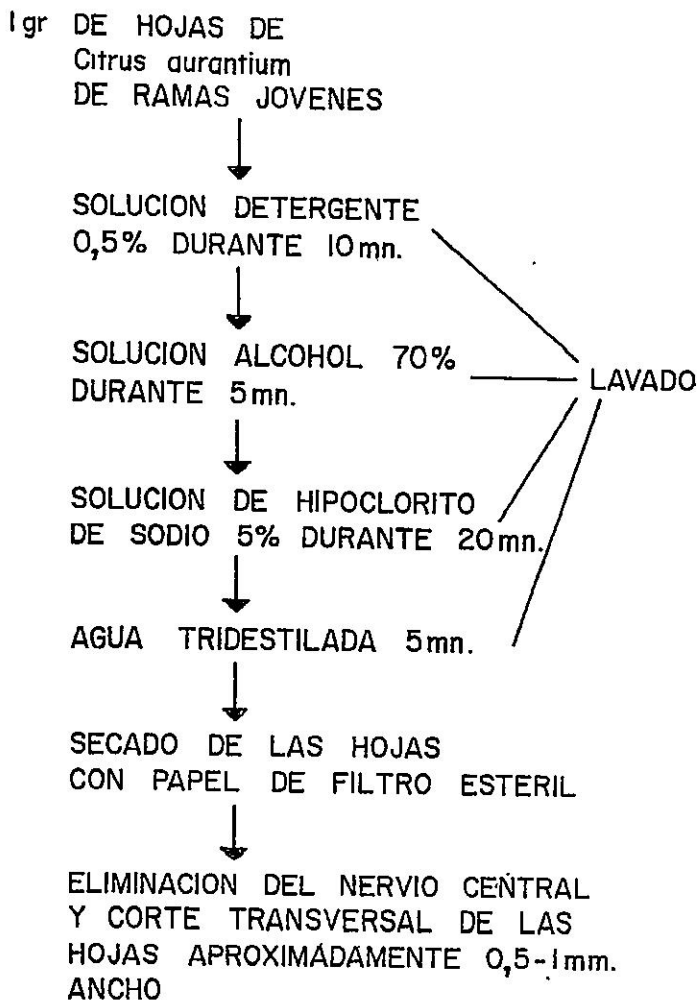


Fig. 1. Preparación del tejido.

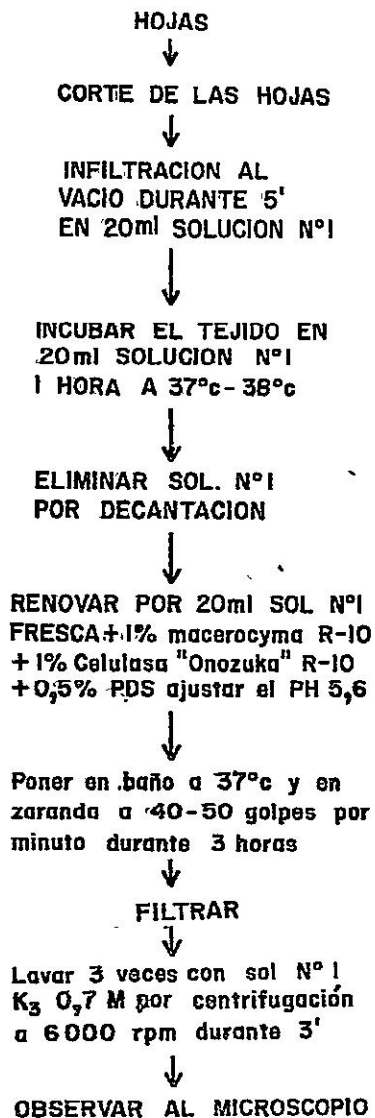


Fig. 2. Esquema del proceso seguido para la obtención de protoplastos.



Fig. 3. Agrupación de protoplastos obtenidos en *Citrus aurantium*.

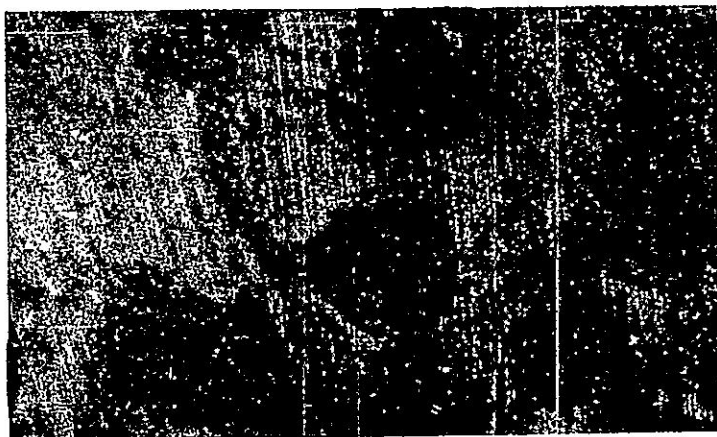


Fig. 4. Protoplastos resultantes después del primer lavado.



Fig. 5. Protoplastos obtenidos después de realizado el segundo lavado.

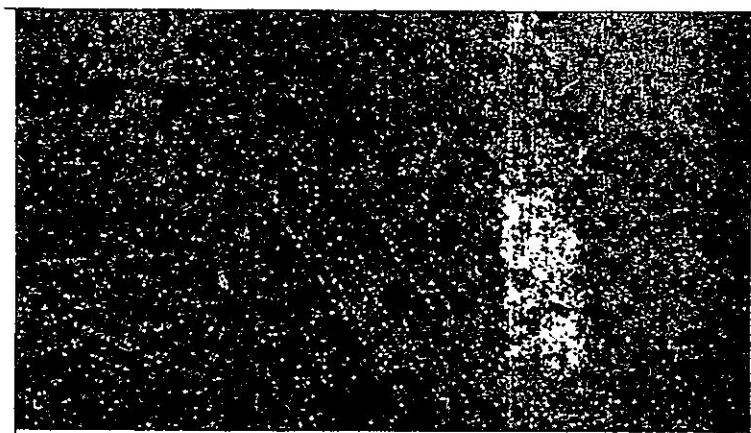


Fig. 6. Protoplastos obtenidos al final del proceso de lavado.