

EFFECTO DE CONCENTRACIONES ENZIMÁTICAS Y TIEMPOS DE DIGESTIÓN EN EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE CALLOS Y CULTIVOS EN SUSPENSIÓN DE DOS CULTIVARES DE NARANJA DULCE (*Citrus sinensis* OSB)¹

Mónica Jadán², Eric Guevara³, Víctor M. Jiménez⁴

RESUMEN

Efecto de concentraciones enzimáticas y tiempos de digestión en el aislamiento de protoplastos a partir de callos y cultivos en suspensión de dos cultivares de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osb.). A partir de callos embriogénicos y cultivos en suspensión de los cultivares de naranja dulce ('Acosta 6' y 'Washington Navel'), se evaluó el efecto de tres concentraciones enzimáticas y de diferentes tiempos de digestión sobre la obtención de protoplastos intactos. Se encontró que la concentración enzimática intermedia, que contenía 1,0% celulosa, 0,2% pectoliasa y 1,0% macerozima, liberó la mayor cantidad de protoplastos intactos. Los tiempos de digestión más efectivos variaron de acuerdo con el genotipo y el tipo de explante inoculado, entre cuatro y ocho horas de incubación en la solución enzimática de concentración intermedia. En 'Acosta 6', los cultivos en suspensión liberaron más protoplastos que los callos, pero en 'Washington Navel' no se observó diferencia entre ellos. En forma general, se logró liberar mayor cantidad de protoplastos y células individuales a partir de 'Acosta 6' que de 'Washington Navel'. Adicionalmente, se incluyen algunas características de la estructura de la célula como la cantidad obtenida de protoplastos intactos, así como, peso fresco y seco, el tamaño y la densidad en los materiales vegetales evaluados.

Palabras clave: técnicas de aislamiento, análisis enzimático, análisis de tejidos, absorción digestiva, *Citrus sinensis*, estructura celular, cultivo *in vitro*, protoplastos.

ABSTRACT

Effect of several enzyme concentrations and digesting times on the isolation of callus and suspension culture protoplasts from two sweet orange (*Citrus sinensis* Osb.) cultivars. The effect of three enzyme concentrations and different digesting times over intact-protoplasts recovery from embryogenic callus and cell suspension cultures of sweet orange (*Citrus sinensis* Osb.) cultivars 'Acosta 6' and 'Washington Navel' was evaluated. It was found, that the intermediate enzyme concentration (1.0% cellulose, 0.2% pectolyase and 1.0% macerozyme) produced the highest amount of intact protoplasts. The most effective digestion interval varied according to the genotype and the culture type, oscillating between four and eight hours in the already mentioned enzyme concentration. While the cell suspension cultures released more protoplasts than the callus cultures in cv. 'Acosta 6', no difference was found among culture types in 'Washington Navel'. Generally, more protoplasts and individual cells were obtained from 'Acosta 6' than from 'Washington Navel'. Additionally, fresh and dry weight, as well as cell size and density were determined in the different culture types employed for isolation.

Key words: isolation techniques, enzymatic analysis, tissue analysis, digestive absorption, *Citrus sinensis*, cell structure, *in vitro* culture, protoplasts.

¹ Parte del Trabajo Final de Graduación de la coautora, presentado al Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, para optar por el título de Magister Scientiae.

² Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Ciencias Aplicadas, Escuela Politécnica del Ejército, Avenida El Progreso s/n, Sangolquí, Santa Clara, Ecuador, A.S.

³ Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica

⁴ Correo electrónico: vjimenez@cariari.ucr.ac.cr.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista de su aplicación práctica, el aislamiento y el cultivo de protoplastos (células desprovistas de la pared celular) permiten la hibridación somática y el uso de una serie de técnicas para la transformación genética de plantas con importancia económica. Para el mejoramiento genético de plantas leñosas, en particular, este sistema ofrece muchas ventajas con relación a la hibridación convencional, ya que estas plantas normalmente poseen ciclos reproductivos muy prolongados, muchas veces en los períodos juveniles y en ocasiones con problemas de incompatibilidad genética que limitan su cruzamiento sexual efectivo (Hidaka y Kajijura 1988, Jiménez 1996).

La fusión de protoplastos en cítricos puede tener aplicaciones hortícolas de gran importancia para el mejoramiento genético de patrones y de injertos. Con relación a los primeros, se conocen más de 20 características importantes, tanto hortícolas como de resistencia/tolerancia a organismos patógenos, que son controladas o determinadas por los patrones de cítricos. En ese sentido existen dos aplicaciones principales para la fusión de protoplastos: la producción de híbridos alotetraploides entre cultivares que posean características deseables complementarias y la formación de estos mismos híbridos, pero entre miembros del género *Citrus* y de otros géneros emparentados, sexualmente incompatibles, que aporten alguna característica de interés. Por su parte, el mejoramiento de injertos se ha orientado principalmente hacia la producción de triploides sin semilla, con calidad de fruto similar al de las variedades actuales, lo cual podría estimular el crecimiento del mercado de fruta fresca (Grosser y Gmitter 1990).

En cítricos se ha logrado el aislamiento y cultivo exitoso de protoplastos a partir de varios tejidos, incluyendo hojas, callos no embriogénicos, tétradas florales (para la obtención de protoplastos haploides), callos embriogénicos y cultivos embriogénicos en suspensión (Grosser y Chandler 1987, Grosser y Gmitter 1990), siendo las dos últimas las fuentes

más adecuadas para obtener protoplastos con capacidad embriogénica. Vardi *et al.* (1975) fueron los primeros en lograr en forma exitosa el aislamiento de protoplastos totipotentes en cítricos, y posteriormente este mismo grupo consiguió obtener las primeras plantas de protoplastos aislados de varias especies del género (Vardi 1981, Vardi *et al.* 1982). A partir de ese momento, la cantidad de especies de *Citrus* y de géneros emparentados, a partir de los cuales se ha logrado aislar y cultivar protoplastos con éxito, ha aumentado rápidamente (Jiménez, 1996). Esto ha permitido un rápido avance en la obtención de híbridos somáticos, con el registro de, al menos, 200 combinaciones hasta el año 2000 (Grosser *et al.* 2000).

Si bien el aislamiento, la fusión y el cultivo de protoplastos en cítricos han tenido un gran desarrollo en unos pocos laboratorios alrededor del mundo, hay que tomar en cuenta que el comportamiento *in vitro* de prácticamente cualquier material vegetal se ve afectado por una serie de factores internos y externos, dentro de los cuales se pueden citar: la edad de la planta y del tejido, su estado fisiológico, así como condiciones propias del laboratorio donde se realizan los experimentos (como agua, fuentes y marcas comerciales de compuestos minerales, sacarosa, agar, etc.) (Debergh 1983, Drew y Smith 1986, Pierik 1987, Poonsapaya *et al.* 1989, Auer *et al.* 1992). Un factor especialmente crítico al respecto lo constituyen las enzimas utilizadas para la digestión de la pared celular. Estas enzimas son extractos crudos purificados y originados de diferentes organismos, principalmente hongos (Ishii 1989), por lo cual sus características pueden variar de un lote a otro, y por lo tanto, hay que adaptar de manera constante, ciertas condiciones de aislamiento, principalmente los tiempos de digestión y su concentración (Vardi y Galun, 1988 y 1989). Con relación a esto último, diversas investigaciones señalan que el proceso de incubación (concentración de la solución enzimática y el tiempo de digestión) es crítico y requiere de mayor estudio para cada genotipo individual (Niedz 1993, Grosser 1994, Jiménez 1995, Aoyagi *et al.* 1999). Además, si bien los callos y los cultivos, ambos embriogénicos en

suspensión se utilizan prácticamente de manera indistinta, hasta donde se conoce, no se ha realizado ninguna evaluación sistemática que permita comparar ambas fuentes de material en cuanto a sus características y eficiencia para el aislamiento de protoplastos embriogénicos en cítricos.

En vista de lo mencionado anteriormente, en este trabajo se pretende evaluar el efecto de concentraciones enzimáticas y tiempos de incubación sobre la obtención de protoplastos de naranja dulce (cv. 'Acosta 6' y cv. 'Washington Navel'), a partir de callos y suspensiones celulares embriogénicas. Adicionalmente se decidió evaluar y comparar diversas características de los callos y cultivos en suspensión que podrían ser relevantes para el aislamiento de protoplastos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron callos nucelares friables y suspensiones celulares de los cultivares de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osb.) 'Washington Navel' y 'Acosta 6' cultivados durante seis años en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, en un medio desprovisto de reguladores de crecimiento. Subcultivos periódicos se realizaron cada cuatro semanas en el caso de los callos y cada dos semanas en el de las suspensiones celulares (Jiménez y Guevara 1995).

Aislamiento de protoplastos a partir de callo

Se utilizó el procedimiento descrito por Grosser y Gmitter (1990), que se modificó con la finalidad de evaluar el efecto de la utilización de tres concentraciones enzimáticas y de diferentes tiempos de digestión sobre la obtención de protoplastos. El procedimiento consistió en agregar 1 g de peso fresco (PF) de callo, 15 días después del subcultivo,

a 1 ml de medio BH3 0,7 M (pH 5,7), esterilizado mediante filtración y contenido en frascos erlenmeyer estériles de 50 ml de capacidad. Enseguida se agregó 1,5 ml del mismo medio y luego, gota a gota, se añadió 1,5 ml de solución enzimática, compuesta por las sales minerales del medio CPW (Frearson *et al.* 1973, citados por Grosser y Gmitter 1990), 0,7 M manitol, 12 mM CaCl₂, 6 mM ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico, 1,4 mM NaH₂PO₄, así como una de las concentraciones enzimáticas detalladas en el Cuadro 1, de acuerdo con el tratamiento a evaluar (con el pH ajustado a 5,6) y se agitó ligeramente.

Posteriormente se colocaron en agitación moderada, a 50 rpm en un agitador orbital horizontal (en oscuridad y a una temperatura de 26 a 28°C).

Aislamiento de protoplastos a partir de suspensiones celulares

En este caso se colocaron 2 ml de suspensión celular, 7-9 días, después del subcultivo, en frascos erlenmeyer estériles de 50 ml de capacidad. En seguida se agregaron 2 ml de medio BH3 0,6 M y luego, gota a gota, se añadieron 2 ml de solución enzimática, con la composición que se detalló anteriormente (Cuadro 1) y se agitó ligeramente. El contenido se colocó en las mismas condiciones descritas anteriormente para el aislamiento de protoplastos a partir de callo.

Cuadro 1. Composición de las soluciones enzimáticas evaluadas para el aislamiento de protoplastos en cítricos.

Compuestos	Tratamientos		
	Bajo	Intermedio	Alto
Celulasa RS (Karlán Research)	0,5%	1,0%	1,5%
Pectoliasa Y-23 (Karlán Research)	0,1%	0,2%	0,3%
Macerozima R-10 (Karlán Research)	0,5%	1,0%	1,5%

Evaluación del proceso de digestión y determinación del número de protoplastos

Cada 2 horas, hasta las 14 horas, se tomaron muestras, con ayuda de pipetas Pasteur, para evaluar el efecto del tiempo de incubación sobre la degradación de la pared, mediante la realización de observaciones en un microscopio invertido (250X). La densidad de protoplastos intactos por g (PF) de tejido inoculado se determinó en un hemocitómetro (10X) de acuerdo con la técnica descrita por French y Hebert (1982). Las evaluaciones se realizaron por triplicado y en cada repetición se realizaron dos conteos en diferentes puntos de la muestra para determinar la reproducibilidad de la metodología. Los resultados se analizaron con el programa STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA). Se aplicó la 'prueba de Tukey para muestras con diferente número de repeticiones' ($\alpha = 0,05$) para la separación de promedios.

Evaluación de pesos fresco y seco

Se colocó 1 g (PF) de callo en una estufa a 70°C por 24 horas, después de lo cual se determinó el peso seco (PS). Para las suspensiones celulares, se tomaron 2 ml de cada suspensión, se filtraron con ayuda de vacío y se determinó el PF. Luego, se secaron como se detalló anteriormente y se les determinó el PS. Cada determinación se hizo por triplicado.

Determinación del número y tamaño de las células de callos y suspensiones celulares

Para determinar, tanto en callos como cultivos en suspensión, el número de células por g de PF y su tamaño, se procedió a tratarlas durante 14 horas de la misma forma que se hizo para el aislamiento de protoplastos, pero utilizando como única enzima la pectoliasa (0,3%), con el fin de separar las células sin degradar la pared celular. Las observaciones

y el conteo de las células se hicieron con la ayuda de un microscopio y un hemocitómetro, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para el conteo de protoplastos.

RESULTADOS

Proceso de digestión

Observaciones de los callos y los cultivos en suspensión realizadas al microscopio durante las primeras dos horas de digestión enzimática, mostraron la acción progresiva de las enzimas sobre la pared celular de la siguiente manera: inicialmente ocurrió la digestión de la lámina media, lo cual causó una separación de los agregados celulares, liberando células individuales o grupos pequeños compuestos por muy pocas células. Posteriormente, se inició la degradación de las paredes celulares expuestas, las cuales, al inicio se fueron separando de la membrana plasmática y luego se fragmentaron, para dejar libres los protoplastos. Una vez degradada la pared, los protoplastos adoptaron una forma completamente esférica (Fig. 1).

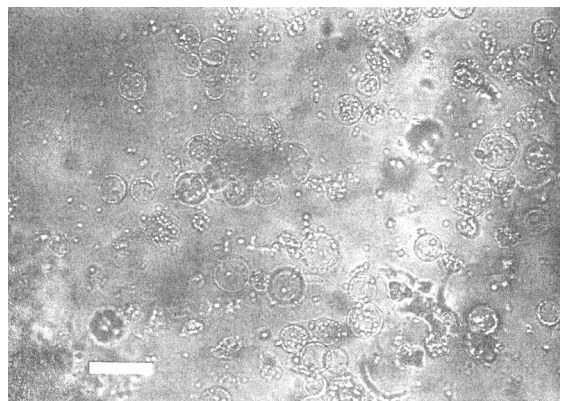


Figura 1. Protoplastos aislados a partir de callo del cv. 'Acosta 6' utilizando 1,0% celulasa, 0,2% pectoliasa y 1,0% macerozima. Barra = 40 μ m.

Efecto de la concentración enzimática y el tiempo de digestión

Tanto la concentración enzimática, como el tiempo de digestión, fueron aspectos críticos en la mayoría de los experimentos realizados. En general, en callos y en cultivos en suspensión, la concentración enzimática intermedia (1,0% celulasa, 0,2% pectoliasa y 1,0% macerozima) produjo mayor liberación de protoplastos intactos, aunque el ámbito de digestión óptimo fue diferente para cada uno de los tipos de materiales y cultivares evaluados. Períodos más cortos o más prolongados resultaron en una menor obtención de protoplastos intactos después del proceso de purificación (Fig. 2 y 3).

Al utilizar callos del cv. 'Acosta 6', la mayor liberación de protoplastos intactos ocurrió al utilizar la solución compuesta por 1,0% celulasa, 0,2% pectoliasa y 1,0% macerozima, al cabo de 6 y 8 horas de digestión, llegando a alcanzar una concentración de aproximadamente $5,9 \times 10^6$ protoplastos/g PF (Fig. 2). También fue evidente que tiempos mayores y menores de digestión liberaron menor cantidad de protoplastos. El uso de una concentración enzimática mayor (1,5% celulasa, 0,3% pectoliasa y 1,5% macerozima) liberó aproximadamente la mitad de protoplastos intactos que la de mayor respuesta, encontrándose los valores más altos al cabo de 4-8 horas. La solución enzimática menos concentrada (0,5% celulasa, 0,1% pectoliasa y 0,5% macerozima) tuvo una eficiencia muy baja, y no se observó ninguna diferencia entre los diferentes tiempos de digestión evaluados. En todos los tratamientos valorados, tiempos de digestión superiores a las 10 horas, mostraron en todos los casos rendimientos muy bajos en cuanto a la recuperación de protoplastos intactos.

En el caso de los cultivos en suspensión del cv. 'Acosta 6', la mayor eficiencia para la obtención de protoplastos intactos se obtuvo con seis horas de digestión, de nuevo con la concentración enzimática intermedia (1,0% celulasa, 0,2% pectoliasa y 1,0% macerozima), liberando aproximadamente $1,1 \times 10^7$ protoplastos/g PF (Fig. 2). Nuevamente, tiempos mayores y menores de digestión produjeron una

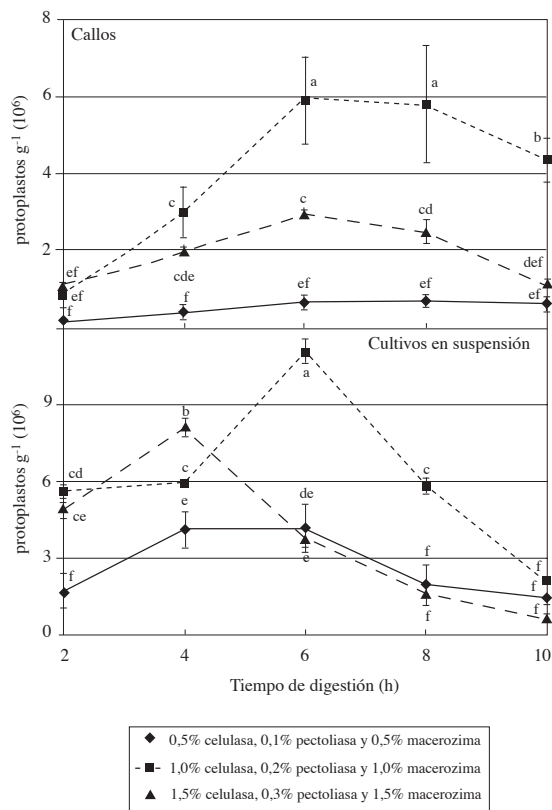


Figura 2. Efecto del tiempo de digestión y de la concentración enzimática sobre la recuperación de protoplastos a partir de callos y cultivos en suspensión de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osb) cv. 'Acosta 6' (diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre promedios se indican con letras distintas).

disminución en el rendimiento. En el caso de los cultivos en suspensión, la concentración enzimática mayor (1,5% celulasa, 0,3% pectoliasa y 1,5% macerozima) liberó al cabo de 4 horas de digestión una cantidad considerable de protoplastos, incluso superior a la obtenida para ese mismo tiempo con la concentración enzimática intermedia. Sin embargo, conforme avanzó el proceso de digestión, los rendimientos disminuyeron abruptamente, situándose rápidamente en los mismos niveles obtenidos al utilizar la concentración enzimática menor (0,5% celulasa, 0,1% pectoliasa y 0,5% macerozima). Al comparar los dos tipos de material vegetal del cv.

‘Acosta 6’ utilizados para el aislamiento de protoplastos (callos y cultivos en suspensión), se obtuvo, en los tratamientos más eficientes en cada caso, aproximadamente dos veces más protoplastos en los cultivos en suspensión que en los callos. No obstante, cabe hacer notar que el ámbito de tiempo para la digestión eficiente de cultivos en suspensión fue más restringido (limitándose a un tiempo de 6 horas), en comparación con el de los callos, en los cuales es posible utilizar, en forma eficiente, períodos de digestión de hasta 8 horas.

Al evaluar en callos del cv. ‘Washington Navel’ los mismos tratamientos descritos anteriormente, se observó que las concentraciones intermedia y mayor de solución enzimática (1,0% celulasa, 0,2% pectoliasa y 1,0% macerozima y 1,5% celulasa, 0,3% pectoliasa y 1,5% macerozima, respectivamente) fueron las más eficientes para la recuperación de protoplastos intactos (aproximadamente $4,0 - 4,7 \times 10^6$ protoplastos/g PF), sin que hubiera diferencias significativas entre ellas en los tiempos de 4 a 10 horas de digestión (Fig. 3). Digestión con esas concentraciones enzimáticas por dos horas produjo una menor recuperación de protoplastos, con niveles similares a los encontrados al utilizar la menor concentración de solución enzimática.

En relación con la recuperación de protoplastos a partir de cultivos en suspensión de este cultivar, la mejor respuesta se obtuvo, al igual que para el cv. ‘Acosta 6’, con el uso de la combinación de 1,0% celulasa, 0,2% pectoliasa y 1,0% macerozima ($2,3 - 4,3 \times 10^6$ protoplastos/g PF). Pero, a diferencia de lo encontrado en ‘Acosta 6’ no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de digestión evaluados (Fig. 3). Las otras dos concentraciones enzimáticas liberaron cantidades menores de protoplastos intactos, apreciándose poca diferencia entre ellas.

En el caso del cv. ‘Washington Navel’, a diferencia de lo observado al comparar ambos tipos de material vegetal en el cv. ‘Acosta 6’, los cultivos en suspensión liberaron cantidades similares de protoplastos en los tratamientos más eficientes (Fig. 3). Además, tanto en callos como en suspensiones

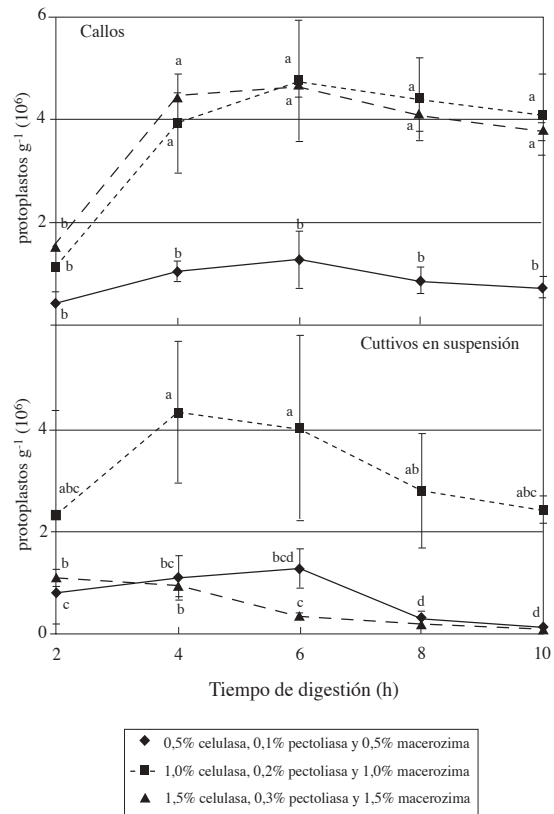


Figura 3. Efecto del tiempo de digestión y de la concentración enzimática sobre la recuperación de protoplastos a partir de callos y cultivos en suspensión de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osb) cv. ‘Washington Navel’ (diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre promedios se indican con letras distintas).

celulares, ‘Acosta 6’ tuvo rendimientos mayores en cuanto a la liberación de protoplastos intactos, utilizando la concentración intermedia de enzimas. Sin embargo, en el caso de ‘Acosta 6’, la concentración alta liberó mayor cantidad de protoplastos intactos en callos de ‘Washington Navel’ que en los de ‘Acosta 6’ (Fig. 2 y 3).

Como se puede observar en las Figuras 2 y 3, los tiempos de digestión más efectivos, determinados por la densidad de protoplastos intactos obtenidos, variaron de acuerdo con el genotipo y el tipo

de explante inoculado. Estos tiempos variaron entre cuatro y ocho horas de incubación en la solución enzimática de concentración intermedia.

Características de los callos y los cultivos en suspensión

En vista de las diferencias observadas entre callos y cultivos en suspensión, así como entre cultivares, se decidió evaluar la cantidad de tejido (en forma de PF y PS) utilizada como unidad de aislamiento de protoplastos (1,0 g y 2 ml para callos y suspensiones, respectivamente), para determinar si los resultados presentados anteriormente están relacionados con las características del material inoculado. Como se observa en el Cuadro 2, la cantidad de tejido utilizada (en PF) para el aislamiento de protoplastos es tres veces mayor en callos que en la alícuota usada para el aislamiento de protoplastos de cultivos en suspensión. Sin embargo, al determinar los PS, si bien son mayores en los callos que en los cultivos en suspensión, esa diferencia se reduce considerablemente. Se observó además, que el PF de los cultivos en suspensión fue ligeramente mayor en ‘Acosta 6’ que en ‘Washington Navel’. Adicionalmente, se puede notar que los PS de los callos de ambos cultivares fueron muy similares entre sí, mientras que los de los cultivos en suspensión de ‘Acosta 6’ son, de nuevo, mayores que los de ‘Washington Navel’ (Cuadro 2).

No se observaron diferencias de tamaño entre las células de callo y de cultivos en suspensión de ‘Acosta 6’ (Cuadro 2). Sin embargo, las células de cultivos en suspensión de ‘Washington Navel’ resultaron ser más grandes que las del callo del mismo cultivar. En general, las células de este último cultivar fueron de mayor tamaño que las de ‘Acosta 6’.

La densidad de células individuales, liberadas tras la digestión con pectoliasa de callos y cultivos en suspensión, fue mayor en los cultivos en suspensión que en los callos de cada genotipo (Cuadro 2). Se observó, además, un mayor número de células por unidad de masa de tejido en ‘Acosta 6’ que en ‘Washington Navel’.

DISCUSIÓN

Proceso de digestión de la pared

Las soluciones enzimáticas evaluadas en este trabajo (Cuadro 1) se derivan de la preparación recomendada para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas y cultivos embrionarios de cítricos (Grosser y Chandler, 1987; Grosser y Gmitter, 1990), y están compuestas por dos pectinasas, derivadas de diferentes microorganismos (macerozima R-10 y pectoliasa Y-23), y por una celulasa (celulasa RS). La combinación de enzimas utilizada propicia que el aislamiento de protoplastos ocurra de

Cuadro 2. Peso fresco y seco, así como tamaño y densidad de células en callos y cultivos en suspensión de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osb), cvs. ‘Acosta 6’ y ‘Washington Navel’, a partir de 1 g de callo y 2 ml de cultivo en suspensión.

Cultivares	‘Acosta 6’		‘Washington Navel’	
	Callos	Suspensiones	Callos	Suspensiones
Peso fresco (g)	1,0±0,0	0,3472 ±0,08123	1,0±0,0	0,3273 ±0,0879
Peso seco (g)	0,0887 ±0,00029	0,0796 ±0,00963	0,0879 ±0,00003	0,0747 ±0,00173
Tamaño (µm)	15	15	20	30
Ámbito (µm)	10-20	10-20	15-25	15-45
Densidad (células/g PF)	6,4x106	2,4x107	4,8x106	1,6x107

una manera gradual, tal y como se describió anteriormente en el presente trabajo, ocurriendo primero una liberación de células individuales, por efecto de las pectinasas, seguida de la degradación subsecuente de las paredes celulares, como consecuencia de la acción de la celulasa (Ishii 1989).

Efecto de la concentración enzimática y el tiempo de digestión en relación con el genotipo y el tipo de explante

Es probable que concentraciones enzimáticas bajas, así como períodos cortos de digestión, causaran una digestión incompleta y poco eficiente de la pectina en la lámina media (lamela) y de la celulosa en la pared celular, lo cual tuvo como consecuencia la recuperación de menor cantidad de protoplastos (Fig. 2 y 3) y la observación de la presencia de pequeños grupos de células intactas (con pared) tras la digestión (datos no presentados). Resultados similares fueron obtenidos por Burger y Hackett (1982), quienes al evaluar diferentes concentraciones enzimáticas para la obtención de protoplastos a partir de cotiledones de cítricos, encontraron que concentraciones enzimáticas bajas no liberaban cantidades adecuadas de protoplastos.

Por otro lado, la baja cantidad de protoplastos obtenida con concentraciones altas y tiempos prolongados de exposición se puede deber a una sobre-digestión de los protoplastos. Si bien las enzimas utilizadas tienen un alto grado de pureza, son extractos crudos, que tienen cierta cantidad de contaminantes (especialmente problemáticos son los contaminantes enzimáticos, que no se pueden eliminar fácilmente durante la purificación, como es el caso de nucleasas, proteasas, lipasas y peroxidasas) que pueden dañar la integridad de la membrana plasmática. Concentraciones altas y tiempos prolongados de exposición a la mezcla enzimática pueden acentuar ese efecto (Ishii 1989, Grosser 1994).

Al comparar las concentraciones y tiempos de digestión más efectivos para el aislamiento de protoplastos de los materiales evaluados en el presente

trabajo, se observaron variaciones de acuerdo con el genotipo y el tipo de material inoculado (callos o cultivos en suspensión). En trabajos previos ya se habían observado diferencias en los rendimientos en la obtención de protoplastos de acuerdo con el genotipo y la condición del callo empleado. Así, Hidaka y Kajiura (1988) encontraron rendimientos que variaron entre 2×10^6 y 8×10^6 protoplastos/g de tejido, al evaluar tres especies de cítricos y un ámbito todavía mayor (10^5 - 10^6 protoplastos/g PF de callo) fue descrito por Hidaka y Omura (1989) en 11 cultivares, dependiendo de la línea y condición del callo. Más reciente, Latado *et al.* (1999) encontraron rendimientos dos veces más altos en la recuperación de protoplastos a partir de suspensiones celulares de *C. reshni*, que de *C. limonia*, utilizando el mismo protocolo experimental. Diferencias estructurales y en composición de la pared celular se conocen en plantas pertenecientes a grupos taxonómicos muy distintos (ej. monocotiledóneas y dicotiledóneas) (Ishii 1989). Hasta donde se sabe, diferencias menores, a nivel de especies o cultivares dentro de un mismo grupo taxonómico no han sido caracterizadas. Sin embargo, es probable que diferencias estructurales menores en las paredes celulares primarias (grosor, composición de las fibrillas, etc.) entre los cultivares, sea un factor que afecte la digestión de la pared celular y la liberación de los protoplastos. Grosser *et al.* (1988), utilizando la misma composición enzimática que dio el mejor resultado en la presente investigación, lograron el aislamiento de protoplastos de cultivos embrionarios de *Severinia disticha* (un género emparentado a *Citrus*) en 2-4 horas, mientras que para cultivos similares de naranja dulce necesitaron 10-14 horas. Es posible que las ligeras divergencias en la composición y/o estructura de la lámina media o de la pared celular se vean acentuadas por las condiciones de cultivo empleadas en cada caso y por el estado fisiológico de los cultivos al momento del aislamiento. Al respecto, Latado *et al.* (1999) indican que las suspensiones celulares permiten el aislamiento de un mayor número de protoplastos que a partir de callos, pero sin aportar evidencia experimental al respecto. Las diferencias en los rendimientos de acuerdo con el tipo de tejido inoculado en la solución enzimática en este trabajo (Fig. 2 y 3), pueden

estar relacionadas con las condiciones de cultivo a las que estuvieron sujetos (cultivo sobre medio sólido o cultivo en suspensión en medio líquido), lo cual podría incidir en las características de la pared celular.

Los mayores rendimientos, obtenidos en este trabajo con cultivos en suspensión de 'Acosta 6' ($1,1 \times 10^7$ protoplastos/g PF), concuerdan en gran medida con los rendimientos descritos en varios trabajos previos (Ling *et al.* 1989, 1990; Niedz 1993, Jumin y Nito 1995, 1996a, 1996b; Latado *et al.* 1999), los cuales se encuentran alrededor de $1,0 - 2,5 \times 10^7$ protoplastos/g PF, en callos o suspensiones celulares de un total de 13 genotipos distintos, pertenecientes al género *Citrus* y otros emparentados. Hay otros trabajos en los cuales se ha informado de rendimientos menores (Vardi *et al.* 1975, Hidaka y Kajiura 1988, Hidaka y Omura 1989, Kunitake *et al.* 1991, Jumin y Nito 1996c) con un ámbito comprendido entre 10^5 y 2×10^6 , los cuales coinciden con los rendimientos más bajos, obtenidos en este trabajo con los callos de 'Acosta 6' y 'Washington Navel' (Fig. 2 y 3).

Vardi y Galun (1988) y Grosser (1994) recomiendan, para el aislamiento de protoplastos en cítricos, evaluar en forma empírica, antes de trabajar con materiales nuevos, diferentes fuentes y concentraciones de enzima, así como tiempos de digestión (6 a 12 horas). Vardi y Galun (1988) incluso indican que enzimas de una misma marca comercial y fuente pueden variar de acuerdo con el lote, por lo que hay que hacer evaluaciones periódicas o cuando se adquieran lotes nuevos de producto.

Fue posible aislar mayor cantidad de protoplastos en 'Acosta 6' que de 'Washington Navel' (Fig. 2 y 3). Esto se podría explicar, aparte del efecto de posibles características propias de la lámina media o de la pared celular, por la cantidad de células presente en cada evento de digestión. Había mayor cantidad de células de 'Acosta 6', y de menor tamaño, que de 'Washington Navel' en cada evento de digestión (Cuadro 2).

Características de los callos y cultivos en suspensión

Pesos frescos mayores en callos que en cultivos en suspensión en ambos genotipos no parecen ser un indicativo directo de la cantidad de células que tienen, ya que diferencias muy grandes en peso fresco no se reflejan en los correspondientes valores de densidad celular (Cuadro 2). La evidencia parece indicar, entonces, que son las diferencias en la cantidad de agua en los tejidos, las responsables de las diferencias en peso fresco.

No se conocen trabajos previos en los cuales se haya determinado el diámetro de células de cítricos (con su pared celular) aisladas con ayuda de pectinasas. En todos los trabajos conocidos, se determinó esa característica pero para protoplastos aislados con la intervención de pectinasas y celulasas (digestión total de la pared celular) (Hidaka y Kajiura 1988, Sim *et al.* 1988, Ling *et al.* 1989, Kunitake *et al.* 1991, Jumin y Nito 1995, 1996a, 1996b, 1996c). En estos trabajos, el ámbito de tamaño va desde los 10 a los $70 \mu\text{m}$. En algunos de estos trabajos se observaron diferencias en los tamaños de los protoplastos de acuerdo con el genotipo (Hidaka y Kajiura 1988).

Los resultados de este trabajo evidencian que es posible aislar protoplastos de los materiales evaluados utilizando períodos de digestión de 6-8 horas, lo que hace factible realizar los demás procesos de fusión y cultivo de los fusionantes en un solo día. Esto constituye una ventaja en comparación con períodos largos de digestión, descritos en muchos otros trabajos (Hidaka y Kajiura 1988, Sim *et al.* 1988, Ling *et al.* 1989), en donde es necesario dejar los protoplastos aislados en refrigeración hasta su posterior fusión y cultivo, lo cual podría afectar su calidad, viabilidad, capacidad de fusión y regeneración. Adicionalmente, estos resultados apoyan investigaciones previas, que indican la importancia de analizar cada cultivar y tipo de explante de forma independiente con relación a los requerimientos para el aislamiento de protoplastos.

Agradecimiento

Se agradece al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por la beca de posgrado otorgada a la coautora de este artículo.

LITERATURA CITADA

- AOYAGI, H.; TAKAYANAGI, T.; JITSUFUCHI, T.; TANAKA, H. 1999. Development of an apparatus for monitoring protoplast isolation from plant tissues based on both dielectric and optical methods. *J. Ferm. Bioeng.* 87:762-768.
- AUER, C.A.; COHEN, J.D.; LALOUE, M.; COOKE, T.J. 1992. Comparison of benzyl adenine metabolism in two *Petunia hybrida* lines differing in shoot organogenesis. *Plant Physiol.* 98:1035-1041.
- BURGER, D.W.; HACKETT, W.P. 1982. The isolation, culture and division of protoplasts from *Citrus* cotyledons. *Physiol. Plant.* 56:324-328.
- DEBERGH, P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59:270-276.
- DREW, R.A.; SMITH, N.G. 1986. Growth of apical and lateral buds of papaya (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. *J. Hort. Sci.* 61:535-543.
- FRENCH, E.R.; HEBERT, T.T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 11: 168-186.
- GROSSER, J.W. 1994. Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion and culture. *HortScience* 29:1241-1243.
- _____; CHANDLER, J.L. 1987. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus x Poncirus* hybrids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. *Sci. Hort.* 31:253-257.
- _____; GMITTER, JR., F.G. 1990. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. *Plant Breeding Rev.* 8:339-374.
- _____; _____; CHANDLER, J.L. 1988. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theor. Appl. Genet.* 75:397-401.
- _____; OLLITRAULT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. 2000. Somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 36:434-449.
- HIDAKA, T.; KAJIURA, I. 1988. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryo. *Sci. Hort.* 34:85-92.
- _____; OMURA, M. 1989. Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture: Regeneration from protoplasts and attempts to callus bank. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. B* 16:1-17.
- ISHII, S. 1989. Enzymes for the isolation of protoplasts. *In: Plant Protoplasts and Genetic Engineering I.* Ed by Y.P.S. Bajaj. Berlin, Springer-Verlag. 8: 23-33.
- JIMÉNEZ, V.M. 1995. Desarrollo de metodologías para el establecimiento de callos friables y suspensiones celulares, y la obtención de protoplastos de *Citrus sinensis* (cv. 'Washington Navel' y cv. 'Acosta 6') y *C. aurantium*. Tesis Magister Scientiae. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. Sistema de Estudios de Posgrado. 81 p.
- _____; 1996. El cultivo de protoplastos en cítricos y su potencial para el mejoramiento genético. *Agron. Costarric. (C.R.)* 20:187-204.
- _____; GUEVARA, E. 1995. Regeneración *in vitro* mediante embriogénesis somática de variedades de cítricos. I. Obtención de callo friable y suspensiones celulares de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y

- naranja agria (*Citrus aurantium*) cultivadas en Costa Rica. *Agron. Costarric. (C.R.)* 19:7-18.
- JUMIN, H.B.; NITO, N. 1995. Embryogenic protoplast cultures of orange jessamine (*Murraya paniculata*) and their regeneration into plants flowering *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 71:277-279.
- _____; _____. 1996a. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six plant species related to *Citrus*. *Plant Cell Rep.* 15:332-336.
- _____; _____. 1996b. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of Uganda cherry orange (*Citropsis schweinfurthii*). *Plant Cell Rep.* 15:754-757.
- _____; _____. 1996c. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Eremocitrus glauca* (Lindl.) Swing. *Phytomorphology* 46:197-206.
- KUNITAKE, H.; KAGAMI, H.; MII, M. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Sci. Hort.* 47:27-33.
- LATADO, R.R.; VAZ, F.B.D.; NETO, A.T. 1999. Obtenção de plantas de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e tangerina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort.) a partir do cultivo de protoplastos de suspensão celular. *Sci. Agr.* 56:421-428.
- LING, J.-T.; NITO, N.; IWAMASA, M. 1989. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). *Sci. Hort.* 40:235-333.
- _____; _____. 1990. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of 'Satsuma'. *HortScience* 25:970-972.
- NIEDZ, R.P. 1993. Culturing embryogenic protoplasts of 'Hamlin' sweet orange in calcium alginate beads. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34:19-25.
- PIERIK, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Holanda, Martinus Nijhoff. 344 p.
- POONSAPAYA, P.; NABORS, M.W.; WRIGHT, K.; VAJRABHAYA, M. 1989. A comparison of methods for callus culture and plant regeneration of RD25 rice (*Oryza sativa* L.) in two laboratories. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 16:175-186.
- SIM, G.E.; LOH, C.S.; GOH, C.J. 1988. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Citrus mitis* Blanco. *Plant Cell Rep.* 7:418-420.
- VARDI, A. 1981. Protoplast derived plants from different *Citrus* species and cultivars. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1:149-152.
- _____; GALUN, E. 1988. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. *Sci. Hort.* 37:217-230.
- _____; _____. 1989. Isolation and culture of *Citrus* protoplasts. *In: Plant Protoplasts and Genetic Engineering I.* Ed by Y.P.S. Bajaj. Berlin, Springer-Verlag. v. 8, p. 147-159.
- _____; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. 1975. *Citrus* cell culture: isolation of protoplasts, planting densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Sci. Lett.* 4:231-236.
- _____; _____. 1982. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor. Appl. Genet.* 62:171-176.