

P. Andreu, A. Arbeloa, N. Terrén, J.A. Marín

**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS DEL PATRÓN CIRUELO
'MARIANA 2624' (*PRUNUS CERASIFERA* EHRH X *P. MUNSONIANA* W. WIGHT
& HEDRICK)**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **104** N.º 4 (482-492), 2008

Aislamiento y cultivo de protoplastos del patrón ciruelo 'Mariana 2624' (*Prunus cerasifera* Ehrh x *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick)

P. Andreu, A. Arbeloa, N. Terrén, J.A. Marín

Estación Experimental de Aula Dei (CSIC). Avda Montañana 1005, 50059 Zaragoza

Correspondencia: andreu@eead.csic.es

Resumen

La utilización del cultivo de protoplastos en especies frutales está limitada entre otras razones, por la falta de reproducibilidad de los resultados obtenidos previamente. En este trabajo se concluye la importancia de definir con precisión, no solo las condiciones de aislamiento y cultivo de los protoplastos, sino del estado fisiológico del material vegetal, que ha mostrado una gran influencia. La inclusión de pectoliasa entre las enzimas para la digestión de la pared celular en tejidos foliares fue decisiva para el éxito, obteniendo mejores resultados con la combinación de celulasa Onozuka R-10, pectoliasa y macerozima. El número de protoplastos aislados obtenidos aumentó tras someter a los brotes a un periodo de oscuridad de 7 días. Con brotes etiolados, la utilización de la solución M38 para la prepasmólisis y la digestión enzimática aumentó notablemente, tanto el rendimiento, como la viabilidad, que fueron máximas cuando, además, los brotes fueron cultivados en un medio con zeatina. La cefotaxima, aunque no tuvo un efecto en el aislamiento de los protoplastos, sí que influyó positivamente en el cultivo de protoplastos permitiendo la división celular y formar grupos celulares de hasta 10 células.

Palabras clave: especies frutales; pectoliasa; oscuridad; cefotaxima.

Summary

Isolation and culture of protoplasts from the plum rootstock 'Marianna 2624' (*Prunus cerasifera* Ehrh x *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick)

Protoplast culture in fruit tree species is limited, among other reasons, by the lack of reproducibility of previous results. In this work, we show that a precise definition, of the protoplast isolation and culture conditions, as well as the characterization of the physiological state of plant material are particularly important, since they greatly affected both yield and viability. The inclusion of pectolyase among the enzymes for cell wall digestion was critical. We got best results with a combination of Onozuka R-10, pectolyase and macerozyme. Yield increased during protoplast isolation when donor shoots were previously cultured in darkness for 7 days. When etiolated shoots were used, both yield and viability increased significantly when M38 solution was used both for pre-plasmolysis and enzyme digestion. In addition, maximum yield and viability were achieved when shoots were cultured in a medium with zeatin. Cefotaxime did not affected protoplast isolation but had a positive effect in protoplast culture, allowing cell division and cell aggregates of up to 10 cells.

Key words: fruit-tree species; pectolyase; darkness; cefotaxime.

Introducción

A pesar de que el aislamiento de protoplastos y la regeneración posterior de plantas ha sido posible en numerosas especies (Power y Davey, 1990), posibilitando el uso de la técnica para aplicaciones biotecnológicas como la fusión de protoplastos de diferentes individuos y la obtención de híbridos somáticos y de cíbridos (híbridos que comparten sólo el citoplasma) (Henn et al., 1998; Gilmour et al., 1989; Olivares-Fuster et al., 2005), se trata de una tecnología difícil de reproducir y de aplicar en plantas de interés agronómico (Teasdale y Rugini, 1983; Ochatt y Power, 1991) y sobretodo en especies leñosas, como los frutales (Marino, 1991; Matsuta, 1992; Mills et al., 1994; Ferreira et al., 2001; Ortín-Parraga y Burgos, 2003).

Diferentes trabajos han descrito la obtención de protoplastos y la regeneración de plantas tras su cultivo (Ochatt, 1993; Ochatt et al., 1995; Huancaruna y Schieder, 1993; Witjaksono et al., 1998) pero las dificultades de reproducción de estos resultados ha ocasionado un abandono de la técnica que se ha visto reflejado en la ausencia de publicaciones recientes sobre el cultivo de protoplastos de frutales. Esto impide la aplicación de esta técnica en este grupo de especies de gran interés agronómico.

En este trabajo determinaremos algunos de los factores que influyen en el aislamiento eficaz de protoplastos de hoja del patrón frutal 'Mariana 2624' muy utilizado como portainjertos, que pertenece al grupo ciruelo y que es de origen híbrido (*Prunus cerasifera* Ehrh x *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick) y del que no se encuentran trabajos previos relacionados. Así, mostraremos el importante papel de las enzimas pectoliasa y macerozima en la obtención de protoplastos de hoja. Igualmente, veremos que el cambio de estado fisiológico de los brotes, bien tras un periodo de oscuridad, bien por el tipo de citoquinina en el

medio de cultivo, tuvo un gran efecto en la obtención de protoplastos. Finalmente describimos el papel beneficioso del antibiótico cefotaxima en el cultivo posterior de los protoplastos, mediante la inhibición del crecimiento de bacterias endógenas, comunes en árboles de especie propagadas clonalmente.

Material y métodos

Mantenimiento de los cultivos

Los cultivos de brotes del patrón ciruelo Mariana 2624, mantenidos in vitro durante más de un año, se subcultivaron cada 4 semanas en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado según se ha descrito previamente (Andreu y Marín, 2005). El medio MS se suplementó con IBA y BAP en concentraciones de 0,5 y 4,4 μM respectivamente y con sacarosa al 3%. Los cultivos se mantuvieron con un fotoperiodo de 16 horas de luz y la intensidad de la iluminación fue de 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Estos brotes se utilizaron para la obtención de protoplastos de hoja, pero para obtener brotes etiolados, se mantuvieron cultivos de brotes en oscuridad total durante 6 semanas en el mismo medio de cultivo.

Pretratamientos

Los brotes fueron tratados, previamente a la digestión de las hojas con la solución enzimática, con diferentes tratamientos para estudiar su efecto en el rendimiento y en la viabilidad de los protoplastos.

Oscuridad

Los cultivos se mantuvieron en oscuridad durante periodos crecientes (de 2 a 7 días y 18 días de oscuridad) inmediatamente antes de su utilización.

Citoquininas en el medio de cultivo

Se comparó el efecto de la sustitución de la bencilaminopurina (BAP) por la citoquinina natural zeatina (Z), ambas a 4.5 μM , durante el subcultivo anterior a su utilización.

Efecto del antibiótico cefotaxima en el medio de cultivo

Se estudió el efecto de la inclusión de cefotaxima a 0,1 g/l en el medio de cultivo del último subcultivo en el rendimiento y viabilidad de los protoplastos obtenidos. La cefotaxima inhibe el crecimiento bacteriano durante la fase de cultivo de los protoplastos.

Aislamiento de protoplastos

El protocolo del aislamiento de protoplastos utilizado está basado en el descrito por Power y Davey (1990) y consistió en la inmersión de los tejidos vegetales en una solución estabilizadora con manitol y/o sorbitol durante una hora. Se utilizaron dos

soluciones con composición diferente: CPW 13M (Power y Davey, 1990) y M38 (Matsuta et al., 1986). Tras la preplasmólisis, se pasaron a la misma solución base a la que se añadieron las enzimas para la digestión de las paredes celulares. Las mezclas de enzimas utilizadas se muestran en la tabla 1 para hojas y en la tabla 4 para brotes etiolados. La digestión enzimática actuó toda la noche en agitación (40 rpm) y oscuridad y al día siguiente se filtró y se eliminaron las enzimas con sucesivos lavados con la solución base. Se centrifugó la solución 10 minutos a 1200 rpm sobre la solución base con un 20% de sacarosa y se recogieron los protoplastos con una pipeta en la interfase formada (figura 1). Los protoplastos se contaron con la ayuda de un hemocitómetro y se pusieron en el medio de cultivo con una densidad adecuada que osciló entre 5×10^4 y 1×10^6 protoplastos/ml (Ochatt, 1994). El rendimiento se expresó como el número de protoplastos obtenidos por gramo de peso fresco de tejido. La viabilidad se expresó como porcentaje de protoplastos vivos sobre el total, y se determinó con el colorante vital

Tabla 1. Composición de las distintas soluciones enzimáticas (% peso/volumen) y rendimiento (número de protoplastos $\times 10^6/\text{g}$) y viabilidad (%) de los protoplastos obtenidos
Table 1. Composition of the different enzymatic solutions used (% w/v) and yield (protoplast number $\times 10^6/\text{g}$) and viability (%) of achieved protoplasts

	1	2	3	4	5	6	7
Onozuka-R10	0	1	1	1	1	1	1
Driselasa	1	0	0,1	0	0	0	0
Hemicelulasa	0	1	1	0	1	0	0
Pectoliasa	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1
Macerozima	0	0,1	0	0	0,1	1	0,5
Pectinasa	1	0	0	0	0	0	0
MES	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
PVP	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Glicina	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
protx $10^6/\text{g}$	0	0	0	8	11,9	11,5	17,3
Viabil %	0	0	0	35	20,3	21,6	80,8

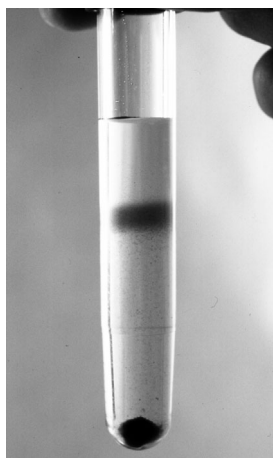


Figura 1. Aislamiento de protoplastos de la interfase tras la centrifugación
Figure 1. Protoplast isolation from the interface following centrifugation

FDA (Wildholm, 1972) que tiñe los protoplastos vivos de color verde intenso al ser observados con un microscopio de fluorescencia (Olympus IMT2).

Protoplastos de hoja

Para el aislamiento de protoplastos de hoja, se utilizaron hojas totalmente desarrolladas de la parte superior de los brotes. Una vez pesadas, se cortaron en trozos pequeños para aumentar la superficie de contacto con la solución enzimática. La solución base utilizada fue la CPW13M con un 13% de manitol (Power y Davey, 1990) tanto en la preplasmólisis como en la digestión enzimática. Se estudió la eficacia de diferentes combinaciones y concentraciones de enzimas celulasas, hemicelulasas y pectinasas que se pueden ver en la tabla 1. A la solución enzimática se le añadió glicina, PVP-10 como antioxidante y MES como tampón para estabilizar el pH durante la digestión (Ochatt et al., 1995).

Protoplastos de brotes etiolados

Se utilizaron cultivos de brotes de Mariana 2624 que permanecieron 6 semanas en oscuridad. Los brotes se pesaron y se cortaron en trozos pequeños para aumentar la eficacia de las enzimas. Se utilizaron tanto en la preplasmólisis como en la digestión enzimática las soluciones base M38 o CPW13M y se determinó la eficacia de diferentes mezclas enzimáticas descritas en la tabla 4. Igualmente, se estudió el efecto del tipo de citoquinina utilizada (BAP o zeatina) en el último subcultivo de brotes (ver tabla 5). El rendimiento de protoplastos y la viabilidad se determinaron como se ha descrito anteriormente.

Cultivo de protoplastos

Para el cultivo de protoplastos, independientemente del origen, se utilizó el medio puesto a punto por Pascual y Marín (2005) para la regeneración adventicia de Mariana 2624, basado en el medio de Quoirin y Lepoivre (1977), con los macronutrientes a mitad de concentración y sin ácido nicotínico ni piridoxina. Se añadió a todos los medios el antibiótico cefotaxima (0,1 g/l). Al medio se le añadió hidrolizado de caseína (0,1 g/l), sacarosa (2 g/l) y manitol (90 g/l). Además, se añadieron los reguladores de crecimiento NAA (ácido naftalenacético) (2,6 μ M) y BAP (3,5 μ M). El cultivo de protoplastos se llevó a cabo en gotas de medio líquido con los protoplastos sobre el mismo medio solidificado con agarosa al 2,4% al que se añadió 2,4 D (0,5 μ M), zeatina (0,1 μ M) y sorbitol (10g/l) y se disminuyó el manitol a 50 g/l. Los cultivos se realizaron en placas de Petri, en oscuridad, a 25 °C.

Los experimentos se repitieron al menos 3 veces y se muestran los valores promedio.

Resultados

Protoplastos de hoja

Dos tipos de protoplastos fueron obtenidos a partir de hoja. La mayor parte fueron protoplastos con cloroplastos y con un tamaño medio de 20 μm de diámetro. Estos protoplastos proceden del mesófilo de la hoja. Una pequeña proporción estuvo formada por protoplastos sin cloroplastos y ligeramente más pequeños y su procedencia fue la epidermis.

Comparación de diferentes soluciones enzimáticas

Se compararon 7 combinaciones diferentes de soluciones enzimáticas. Los mejores resultados con mayor viabilidad y rendimiento son los obtenidos con una solución enzimática (número 7, tabla 1), que combina una celulasa, Onozuka R-10, y dos pectinasas: pectoliasa y macerozima. Los valores de viabilidad obtenidos son del 80% y el rendimiento, número de protoplastos por gramo de material, es 17×10^6 . Esta solución enzimática es la que se utilizó en los experimentos posteriores. Los resultados obtenidos utilizando diferentes composiciones enzimáticas se pueden ver en la tabla 1. Podemos observar que la inclusión de la pectoliasa (combinaciones 4 a 7) hace posible la obtención de protoplastos, que en las demás combinaciones fue negativa. Cuando la pectoliasa se combina con una concentración intermedia de macerozima (0.5%) el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos obtenidos es máxima.

Efecto de un periodo de oscuridad

El periodo de oscuridad previo a la digestión enzimática tuvo un efecto positivo en la obtención de protoplastos que fue máximo a los 7 días (figura 2). Se observó que el rendimiento tuvo un pico a los 7 días de oscuridad, alcanzando un rendimiento de 12×10^6 proto-

plastos/g y la viabilidad se mantuvo en unos valores parecidos, siendo de un 61% a los 7 días. Este periodo de oscuridad se fijó para los siguientes experimentos con aplicación de oscuridad previa.

La comparación de la aplicación o no de un periodo de oscuridad de 7 días, previo a la digestión enzimática, resultó en un notable aumento, tanto del rendimiento, como de la viabilidad de los protoplastos (tabla 2).

Efecto del antibiótico cefotaxima

La inclusión de cefotaxima en el medio de cultivo, a pesar de que bajó el rendimiento en la obtención de protoplastos (tabla 3), inhibió el crecimiento de bacterias de origen endógeno, proporcionando cultivos que podían mantenerse en el tiempo, permitiendo la división celular. La viabilidad de los protoplastos no mostró cambios respecto a los cultivos sin cefotaxima.

Protoplastos a partir de brotes etiolados

La obtención de protoplastos a partir de brotes etiolados fue influida por la composición de la solución enzimática de digestión. Al igual que en hoja, la pectoliasa se mostró eficaz (combinación 2, tabla 4), aunque no fue así cuando se aumentó la concentración de la celulasa Onozuka R-10. Sin embargo, la combinación de driselasa y pectinasa dió mejores rendimientos, aunque con menor viabilidad (combinación 4, tabla 4) y es la que se utilizó en el resto de experimentos con brotes etiolados.

Efecto del tipo de citoquinina en el medio de cultivo de brotes y de la composición de la solución base en preplasmólisis y en la digestión enzimática

Tanto el rendimiento como la viabilidad de los protoplastos fue influido de forma notable por la combinación del tipo de citoqui-

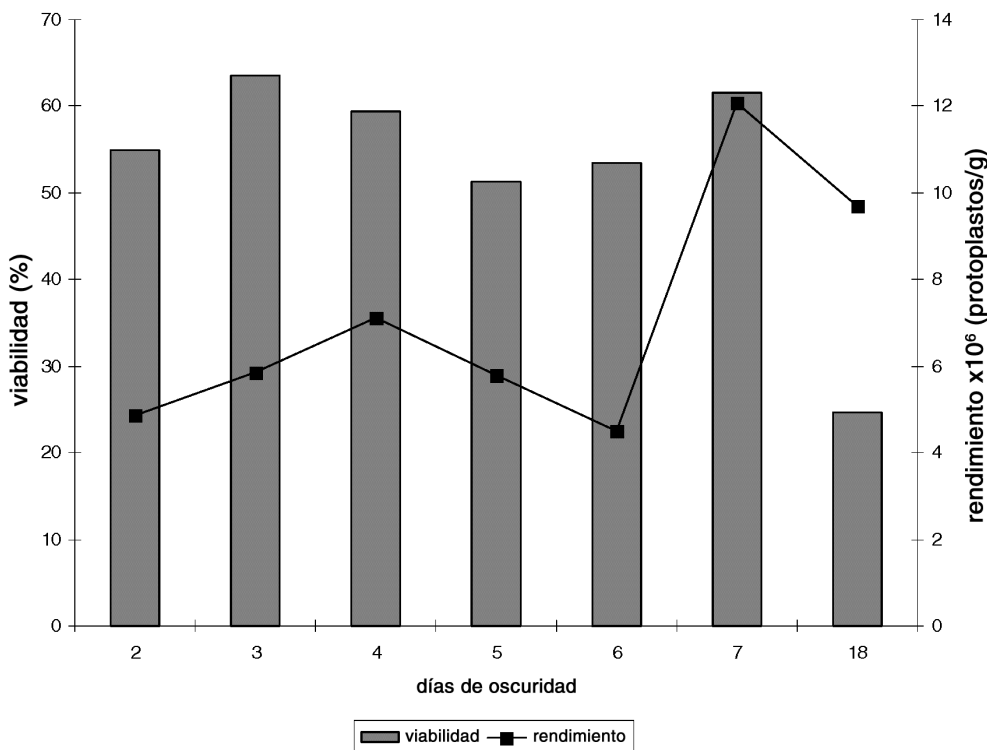


Figura 2. Rendimiento (número de protoplastos $\times 10^6/\text{g}$) y viabilidad (%) de los protoplastos obtenidos con diferentes periodos de oscuridad
 Figure 2. Yield (protoplasts $\times 10^6/\text{g}$) and viability (%) of protoplasts after different periods of darkness

Tabla 2. Valores medios de rendimiento y viabilidad de protoplastos obtenidos en los experimentos con y sin aplicación de un periodo de 7 días de oscuridad previa
 Table 2. Mean values of yield and viability of protoplasts obtained after the application (or not) of a previous darkness period of 7 days

	Rendimiento (protoplastos $\times 10^6/\text{g}$)	Viabilidad (%)
Con oscuridad previa	17,3	80,8
Sin oscuridad previa	7,7	20,6

nina (BAP o zeatina) y de solución base (CPW 13M o M38) y los resultados se muestran en la tabla 5. El rendimiento y la viabilidad mejoraron cuando se sustituyó la solución base CPW 13M (combinación 1),

generalmente utilizada para protoplastos de hoja, por la M38, bien durante la digestión enzimática (combinación 2) o también durante la preplasmólisis (combinación 3). Una mejora adicional fue obtenida al susti-

Tabla 3. Valores medios de rendimiento y viabilidad de protoplastos obtenidos con o sin la inclusión del antibiótico cefotaxima (0.1 g/l) en el medio de cultivo de brotes

Table 3. Average values of yield and viability of protoplasts obtained from shoots cultured in a culture medium with or without cefotaxime (0.1 g/l)

	Rendimiento (protoplastos x10 ⁶ /g)	Viabilidad (%)
Con cefotaxima	5,5	53,3
Sin cefotaxima	9,1	55

Tabla 4. Composición de las distintas soluciones enzimáticas (% peso/volumen en la solución M38) utilizadas en la obtención de protoplastos de brotes etiolados

Table 4. Composition of enzymatic solutions (% w/v) in M38 basal solution used with etiolated shoots

Nº	OnozR10	Driselasa	Pectoliasa	Pectinasa	protx10 ⁶ /g	Viabil %
1	2	1	0,1	0	0	
2	1	1	0,1	0	2	97
3	1	0,5	0	1	0,11	13
4	0	1	0	1	7,2	75,75

Tabla 5. Efecto de la solución base y del tipo de citoquinina en el rendimiento y viabilidad de los protoplastos obtenidos a partir de brotes etiolados (BAP: bencilaminopurina; Z: zeatina)

Table 5. Effect of basal solution and type of cytokinin in protoplast yield and viability obtained from etiolated shoots (BAP: benzylaminopurine; Z: zeatin)

Combinación	Citoquinina	Sol. base enzimática	Sol. base Preplasmólisis	Rendimiento (protoplastos/g)	Viabilidad (%)
1	BAP	CPW 13M	CPW 13M	1.6 x 10 ⁶	74,75
2	BAP	M38	CPW 13M	1.6 x 10 ⁶	90
3	BAP	M38	M38	6.4 x 10 ⁶	96,91
4	Z	M38	M38	8.6 x 10 ⁶	100

tuir la citoquinina (BAP) utilizada en el medio de cultivo de brotes por zeatina combinada con la solución M38 (combinación 4) alcanzando un rendimiento de 8.6 x 10⁶ protoplastos/g y una viabilidad del 100%.

Cultivo de protoplastos

Los protoplastos comenzaron a dividirse a los 3-4 días de su puesta en cultivo y a los 6 días se encontró un porcentaje de entre un

43 y un 70% de protoplastos en división. A los 14 días la mayoría de los protoplastos había formado grupos de 3 células (figura 3), pero a partir de ese momento, las divisiones se detuvieron. Sin embargo, se obtuvie-



Figura 3. División celular durante el cultivo de protoplastos
 Figure 3. Cell division during protoplast culture

ron algunos grupos de hasta 10 células (figura 4) en cultivos de protoplastos obtenidos a partir de brotes cultivados con el antibiótico cefotaxima, pero las divisiones cesaron sin llegar a formar microcallos.

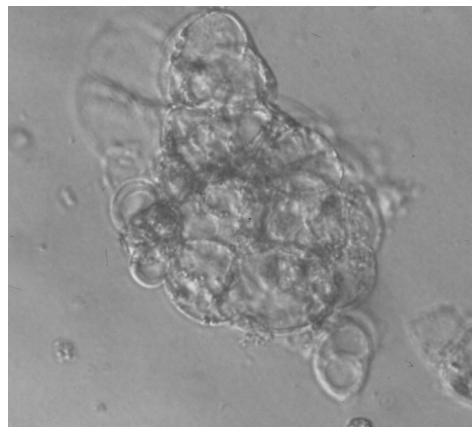


Figura 4. Grupo de 10 células durante el cultivo de protoplastos
 Figure 4. Cell aggregate (10-cell size) during protoplast culture

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo nos muestran la importancia que tiene una combinación de enzimas adecuada, así como de su concentración, en el aislamiento de protoplastos a partir de tejidos vegetales. En nuestro caso, junto a la celulasa Onozuka R-10, la presencia de la pectoliasa entre las enzimas utilizadas, ha sido decisiva para la obtención de protoplastos de hoja de 'Mariana 2624', ya que sólo las combinaciones de enzimas que la incluían dieron resultados positivos. Además, la presencia de macerozima en una concentración intermedia aumentó considerablemente tanto el rendimiento como la viabilidad de los protoplastos. Encontrar una combinación adecuada ha sido determinante, bien por ser

capaz de digerir los variados materiales específicos de la pared celular, bien porque las concentraciones de las diferentes enzimas guarden un equilibrio que las haga funcionales, o bien por tener suficiente actividad sin llegar a tener un efecto tóxico.

Sin embargo, junto a la combinación y concentración de las enzimas concurren otros aspectos que también condicionan el resultado final. Entre éstos, hemos puesto de relieve el papel que tiene el estado fisiológico tras un periodo de oscuridad, y cómo el alargamiento de este periodo hasta 7 días mejoró el número de protoplastos obtenidos en el aislamiento. Los cambios producidos tras ese periodo de oscuridad pueden tener un papel importante en facilitar la digestión de la pared o en la estabilidad posterior del protoplasto, una

vez aislado. A pesar de que en las condiciones de cultivo in vitro la actividad fotosintética está muy limitada por la baja intensidad de luz y por la presencia de sacarosa en alta concentración (Langford y Wainright, 1988), otras actividades metabólicas pueden ser reguladas por la luz. El efecto beneficioso descrito aquí está de acuerdo con el descrito previamente en *Malus* y *Prunus* (Diekmann et al., 1998). Este efecto del estado fisiológico, difícil de definir con precisión con los conocimientos actuales, puede ser uno de los factores que más influyan en la poca reproducibilidad de los resultados y su importancia ha sido observada anteriormente. El estado fisiológico del material de partida fue un factor importante y produjo gran variabilidad en los resultados obtenidos por Algarate y Andreu (1999) en albaricoquero. La obtención de protoplastos a partir de hojas ha proporcionado dos tipos de células. Los protoplastos de hoja, con clorofila, tuvieron problemas para dividirse, a diferencia de los protoplastos de epidermis de hoja que dividieron y regeneraron nuevas plantas (Raquel y Oliveira, 1996). En nuestro trabajo hemos visto la necesidad de estudiar en trabajos futuros la puesta a punto de la técnica para trabajar con protoplastos de epidermis de hoja, que presentan más dificultad en la fase de purificación.

Además de la variabilidad encontrada según el estado fisiológico del material vegetal, se ha visto que la regeneración a partir de otros tejidos puede dar lugar a resultados diferentes. Oliveira y Pais (1991) obtuvieron mejores resultados utilizando peciolo o raíz de kiwi.

En nuestro trabajo, hemos utilizado, además de hojas, brotes etiolados que han presentado un comportamiento diferente. Con el material etiolado la solución más eficaz, utilizada para disolver las enzimas fue la M38, utilizada por Matsuta (1992) con suspensiones celulares de melocotonero, en lugar de la habitual CPW 13M descrita por Power y Davey (1990). Aunque ambas soluciones tie-

nen la misma cantidad de cloruro cálcico, la M38 tiene mayor cantidad de fosfato potásico y además de manitol lleva sorbitol a partes iguales. Esta solución ha proporcionado, en nuestro trabajo, mayores rendimientos y viabilidad en la obtención de protoplastos de brotes etiolados cuando fue aplicada tanto en la preplasmólisis, como en la digestión enzimática, y resaltar este hecho supone una gran ventaja para el uso de la técnica.

Otro factor que ha influido en el estado fisiológico ha sido la utilización con ventaja de zeatina, una citoquinina natural, en lugar de BAP, una citoquinina de síntesis, lo que aumentó tanto el rendimiento como preservó la viabilidad de todos los protoplastos obtenidos (100%). En trabajos anteriores se observó que en patrones híbridos de almendro x melocotonero, la zeatina en lugar de BAP, mejoró el rendimiento (Farre y Andreu, 1997).

Además de optimizar los resultados obtenidos en el proceso de aislamiento de protoplastos, la fase final de cultivo es imprescindible para poder aplicar la técnica mediante la regeneración de plantas. Pero no siempre hay correspondencia entre los resultados en la fase de obtención con la división continuada y regeneración en la fase de cultivo. En este trabajo hemos estudiado el efecto beneficioso de la inclusión de un antibiótico en el medio de cultivo. Uno de los problemas frecuentes en el cultivo de protoplastos utilizando especies frutales de multiplicación clonal, y que son cultivados en campo, es la presencia de bacterias endógenas que suele pasar desapercibida mientras el material se mantiene en cultivo in vitro, pero que se pone de manifiesto cuando los protoplastos son aislados y se ponen en cultivo. Entonces el crecimiento bacteriano imposibilita la división celular y la formación de microcallos. Siguiendo la sugerencia del equipo del Dr. Moreno (García-Sogo et al., 1991) se añadió cefotaxima en el último subcultivo para inhibir el crecimiento bacteriano, lo que posibilitó una mayor divi-

sión celular. De los antibióticos disponibles, la cefotaxima presenta la ventaja adicional de inducir la división celular en leñosas (Utra Vaz et al., 1993). El resultado obtenido fue positivo y permitió la obtención de grupos de hasta 10 células, tras sucesivas divisiones celulares.

Los resultados obtenidos muestran la importancia de definir con precisión en los trabajos futuros, no solo la composición de la solución enzimática, sino del estado fisiológico del material vegetal donante, así como de proporcionar unas condiciones adecuadas para la división celular y la regeneración de nuevas plantas.

Bibliografía

- Algarate A, Andreu P, 1999. Factores que afectan al aislamiento y cultivo de protoplastos de *Prunus armeniaca*. Revista Academia de Ciencias. Zaragoza 54: 47-62.
- Andreu P, Marin JA, 2005. In vitro culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock Adesoto 101 (P. insitita) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. Scientia Horticulturae, 106: 258-267.
- Diekmann M, Hanke V, Huancaruna-Perales E, Schieder O, 1998. Advances in protoplast techniques for Malus and Prunus. Acta Horticulturae 484: 571-576
- Farre A, Andreu P, 1997. Variabilidad en la obtención de protoplastos de Adafuel, (Híbrido de melocotonero x almendro). II Congr. Iber. Cienc. Hortic. Vilamoura Libro Resúmenes pag. 116.
- Ferreira H, Peixe A, Druart P, Kondakova V, Potes A, 2001. Isolamento e cultura de protoplastos do mesófilo da folha em ameixeira europeia (*Prunus domestica*) cv Rainha claudia verde. Melhoramento 37: 221-26.
- García-Sogo B, Dabauza M, Bordas M, Roig LA, Moreno V, 1991. Cultivo en medio líquido de células derivadas de protoplastos de pepino cv Wisconsin 2843 y regeneración de plantas via embriogénesis somática. Actas de Horticultura 8: 133-147.
- Gilmour M, Davey M, Cocking E, 1989. Induction of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* M. borealis. Plant Cell Rep., 8: 29-32
- Henn H, Wingender R, Schnabl H, 1998. Regeneration of fertile interspecific hybrids from protoplast fusions between *Helianthus annuus* L. and wild *Helianthus* species. Plant Cell Rep., 18: 220-224.
- Huancaruna E, Schieder O, 1993. Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. Plant Cell, Tissue & Organ Culture, 34: 71-76.
- Langford PJ, Wainright H, 1988. Influence of sucrose concentration on the photosynthetic ability of in vitro grown rose shoots. Acta Horticulturae 227: 305-310.
- Marino G, 1991. Isolation and culture of apricot (*Prunus armeniaca* L.) protoplasts: initial results. Acta Horticulturae 293: 391-294.
- Matsuta N, 1992. Factors affecting protoplast isolation and culture from suspension cells of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). Bull. Fruit Tree Res. Stn. 22: 59-66.
- Matsuta N, Hirabayashi T, Akihama T, Kozaki I, 1986. Callus formation from protoplasts of peach cell suspension culture. Scientia Horticulturae 28: 59-64.
- Mills D, Hammerschlag F, 1994. Isolation of cells and protoplasts from leaves of in vitro propagated peach (*Prunus persica*) plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 99-105.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Ochatt S, 1991. Strategies for plant regeneration from mesophyll protoplasts of the recalcitrant fruit and farmwoodland species *Prunus avium* L. (sweet wild cherry), Rosaceae. Physiologia Plantarum 82 (1):88.

- Ochatt S, 1993. Woody plant protoplasts technology revisited. *Acta Horticulturae* 336: 285-295.
- Ochatt S, 1994. Tecnología de protoplastos: Una nueva herramienta para la mejora genética de las especies leñosas. *Itea* 15: 157-174.
- Ochatt S, Patat-Ochatt E, 1995. Protoplast technology for the breeding of top-fruit trees (*Prunus*, *Pyrus*, *Malus*, *Rubus*) and woody ornamentals. *Euphytica* 85: 287-294.
- Ochatt S, Power J, 1991. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. *Comprehensive Biotechnology*, Suppl 2 Cap 7: 99-127. Eds Moo-Young, Warren and Fowler. Pergamon Press.
- Olivares-Fuster O, Duran-Vila N, Navarro L, 2005. Electrochemical protoplast fusion in citrus *Plant Cell Reports* 24 (2) 112-119
- Oliveira M, Pais S, 1991. Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayword (kiwifruit). *Plant Cell Reports* 9: 643-649.
- Ortín-Párraga F, Burgos L, 2003. Isolation and culture of mesophyll protoplast from apricot. *Jour. Hort. Sci. & Biotech.* 78 (5): 624-628
- Pascual L, Marin J, 2005. A liquid 2,4-D pulse increased shoot and root regeneration from leaf explants of adult *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae* 106 (4): 582-592
- Power JB, Davey MR, 1990. Protoplasts of higher and lower plants: isolation, culture and fusion. 237-259. *Methods in Molecular Biology*, 6. Plant Cell and Tissue Culture. New Jersey. Ed Pollard and Walker. Humana Press.
- Quoirin M, Lepoivre P, 1977. Étude de milieux adaptés aux cultures in vitro de *Prunus*. *Acta Horticulturae* 78: 437-442.
- Raquel MH, Oliveira MM, 1996. Kiwifruit leaf protoplasts competent for plant regeneration and Direct Dna Transfer. *Plant Science* 121 (1): 107-114.
- Teasdale R, Rugini E, 1983. Preparation of viable protoplasts from suspension-cultured loblolly pine (*Pinus taeda*) cells and subsequent regeneration to callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2: 253-261
- Utra Vaz FB, Santos AVP, Manders G, Cocking EC, Davey MR, Power JB, 1993. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv *flavicarpa* Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. *Plant Cell Reports* 12: 220-225.
- Widholm JM, 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology* 47: 189-194.
- Witjaksono R, Litz E, Grosser J, 1998. Isolation, culture and regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.) protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 18: 235-242.

(Aceptado para publicación el 10 de junio de 2008)