

Cuadro 10.5. Medio de Kao para el cultivo de protoplastos.^a

Componente	Cantidad (mg)	Componente	Cantidad (mg)
Sales minerales			
NH ₄ NO ₃	600	KI	0.75
KNO ₃	1,900	H ₃ BO ₃	3.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	600	MnSO ₄ ·H ₂ O	10.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.00
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
KCl	300	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Secuestrene 330-Fe	28	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Azúcares			
Glucosa	68,400	Manosa	125
Sacarosa	125	Ramnosa	125
Fructosa	125	Celobiosa	125
Ribosa	125	Sorbitol	125
Xilosa	125	Manitol	125
Ácidos orgánicos^b			
Piruvato de sodio	5	Ácido málico	10
Ácido cítrico	10	Ácido fumárico	10
Vitaminas			
Inositol	100	Ácido fólico	0.2
Tiamina-HCl	10	Riboflavina	0.1
Ácido ascórbico	1	Ácido p-aminobenzoico	0.01
Nicotinamida	1	Vitamina B ₁₂	0.01
Piridoxina-HCl	1	Vitamina A	0.005
Pantotenato de calcio	0.5	Vitamina D ₂	0.005
Cloruro de colina	0.5	Biotina	0.005
Hormonas			
2,4-D	0.2	Zeatina (ZEA)	0.5
Ácido naftalenacético (ANA)	1		
Misceláneos			
Ácido casamino, libre de vitaminas	125		
Agua de coco ^c	10 ^d		
Agua destilada	1000 ^d		

a. Se ajusta su pH a 5.7 con NaOH y se esteriliza con filtro.

b. Ajustados a un pH de 5.5 con NH₄OH

c. Agua de coco obtenida de frutos maduros, calentada a 60 °C durante 30 min, y filtrada.

d. Cantidades en mililitros.

Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos. A menudo se ha encontrado que la eficiencia del cultivo se reduce en un medio solidificado con agar, en comparación con un medio líquido o solidificado con agarosa

(Binding, 1974; Lorz et al., 1983); sin embargo, algunos tipos de protoplastos presentan una mayor tasa de división cuando se cultivan en un medio sólido (Takeuchi et al., 1982).

Procedimientos para el cultivo de protoplastos

Para el cultivo de los protoplastos, al igual que para su aislamiento, todas las operaciones se deben hacer asépticamente, sea que se trabaje con medios líquidos o con medios sólidos.

Cultivo en medios líquidos. Proceda así:

- 1) Suspenda en el medio de cultivo líquido los protoplastos aislados, hasta una densidad de 10^4 a 10^5 protoplastos/ml. La densidad óptima de la población debe determinarse experimentalmente para cada tipo de protoplastos.
- 2) Con una pipeta Pasteur vierta, en cajas Petri de 60 x 15 mm, 1 ml de suspensión en forma de gotas (5 gotas de 0.2 ml por caja). Los protoplastos también se pueden cultivar en una capa delgada de medio de cultivo (2 ml de suspensión por caja Petri de 60 x 15 mm).
- 3) Selle las cajas con Parafilm e incube en la oscuridad o en luz difusa, a 25-26 °C, en recipientes plásticos que contengan papel filtro húmedo.
- 4) Después de 1 a 2 semanas de cultivo, añada cada 7 días medio fresco a los cultivos, hasta cuando las colonias en desarrollo sean transferidas a un medio diferente.

Para el cultivo de protoplastos de soya, tabaco, yuca, *Stylosanthes*, y otras especies se han utilizado varios medios de cultivo.

Cuando se haya logrado una división celular sostenida en los cultivos de protoplastos, las colonias desarrolladas se pueden transferir a un medio que favorezca la regeneración de plantas.

Cultivos en medios sólidos. El medio sólido se usa para el cultivo de protoplastos aislados cuando se desea obtener de ellos clones celulares individuales (Nagata et al., 1971). El medio sólido contiene los mismos ingredientes que el medio líquido, pero está complementado con 0.6% de agar ó 0.4% de agarosa; la agarosa se considera superior para solidificar el medio de cultivo de los protoplastos.

Para el cultivo de protoplastos en un medio sólido se procede así:

- 1) Suspendeda en un medio líquido los protoplastos purificados; mezcle esta suspensión con un volumen igual de un medio de agar derretido. Este medio debe contener 1.2% de agar o 0.8% de agarosa y conservarse a 40 °C hasta su utilización.
- 2) Vierta la mezcla en cajas Petri (60 x 15 mm ó 100 x 15 mm), formando una capa delgada que contenga de 3 a 10 ml del medio.
- 3) Selle las cajas Petri con Parafilm e incube según el procedimiento descrito anteriormente.

Desarrollo del cultivo de protoplastos

Los protoplastos aislados de suspensiones celulares regeneran más rápidamente las paredes celulares, y se dividen antes que aquellos cloroplastos aislados de tejidos diferenciados como el mesófilo; ello se debe a que, en estos tejidos, los protoplastos tienen que pasar primero por un proceso de 'desdiferenciación', mientras que en las suspensiones celulares los protoplastos están 'desdiferenciados' y tienen un metabolismo activo que conduce a divisiones precoces.

Regeneración de la pared celular. Cuando los protoplastos recién aislados se cultivan en un medio adecuado, regeneran rápidamente la pared celular. Klein et al. (1981) observaron que algunos minutos después de transferir protoplastos de soya al medio de cultivo, aparecían sobre la superficie de éstos algunas fibrillas de celulosa y de otros polímeros; esto significa que los protoplastos empiezan a sintetizar la pared celular inmediatamente después de la digestión enzimática.

La pared celular primaria se forma a partir de las microfibrillas, después de 8 a 24 horas de cultivo; esto se puede observar en un microscopio de luz ultravioleta mediante coloración con 'Calcoflour White' (Galbraith et al., 1982; Nagata et al., 1971), o con un microscopio electrónico (Burgess et al., 1974; Klein et al., 1981). La pared celular primaria está compuesta de microfibrillas de celulosa dispuestas en forma poco compacta, que posteriormente se organizan para formar una pared celular típica (Fowke et al., 1974).

El depósito de la pared celular está controlado probablemente por el sistema de microtúbulos. En los protoplastos aislados, tales microtúbulos no se pueden observar en grupos ordenados, pero éstos se establecen al sintetizarse la nueva pared celular (Lloyd et al., 1980). Los inhibidores de la síntesis de la pared celular (p.ej., el 2,6-diclorobenzonitrilo, la cumarina)

no inhiben la condensación cromosómica, pero su presencia impide la síntesis de nueva pared y, por lo tanto, la división normal; así se producen protoplastos binucleados o poliploides (Galbraith et al., 1982).

División celular. Además de sintetizar la pared celular, los protoplastos adecuadamente cultivados aumentan de tamaño, forman filamentos citoplasmáticos, y presentan mayor actividad metabólica. La síntesis de ADN se inicia paralelamente a la síntesis de la pared celular pero no depende de ésta (Galbraith et al., 1982).

Las primeras divisiones se inician después de 1 a 7 días de cultivo, según el tipo de protoplastos (Figura 10.1, C). Si después de la primera mitosis las divisiones siguen ocurriendo en forma sostenida, en 1 a 3 semanas se forman pequeñas colonias (Figura 10.1, D).

Las divisiones mitóticas de los protoplastos cultivados están controladas por los reguladores del crecimiento; las auxinas y las citocininas controlan los cambios en la expresión del gen, la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, la elongación celular, y la división misma (Cooke et al., 1981; Hasezawa et al., 1983; Meyer et al., 1981).

Evaluación de la eficiencia del cultivo

Existen varias formas de estimar la eficiencia del cultivo basadas principalmente en cálculos de la viabilidad de los protoplastos aislados y de su supervivencia, de la regeneración de células, de la frecuencia de la división celular, y de las colonias obtenidas en relación con los protoplastos sembrados.

Para evaluar la viabilidad de los protoplastos aislados, se utilizan generalmente sustancias como los reactivos de fluorescencia, por ejemplo el diacetato de fluoresceína (FDA) y el isocianato de fluoresceína. El mecanismo de coloración se basa en la segmentación de la molécula de FDA por las esterasas endógenas, con la liberación posterior de fluoresceína, la cual presenta fluorescencia con la luz ultravioleta.

Un indicador confiable de las células muertas o no viables es la fenosafranina (Widholm, 1972; Bornman et al., 1982). Para calcular la viabilidad relativa y la supervivencia de los protoplastos de las plantas se han utilizado otras técnicas tales como la corriente citoplasmática y la plasmólisis. La tasa de supervivencia (TS) se calcula así:

$$TS = \frac{\text{Protoplastos que sobreviven (no.)}}{\text{Total de protoplastos (no.)}} \times 100 \quad (1)$$

La regeneración de la pared celular es una condición para que los cultivos de protoplastos prosperen; esta pared se puede visualizar fácilmente con 'Caleofluor White' en un microscopio de luz ultravioleta (Nagata et al., 1970). El coeficiente de células regeneradas (CCR) se calcula así:

$$\text{CCR} = \frac{\text{Protoplastos con pared celular (no.)}}{\text{Total de protoplastos (no.)}} \times 100 \quad (2)$$

La frecuencia de la división, otra forma de evaluar la eficiencia del cultivo, se verifica de 7 a 10 días de iniciado éste, comparando el número de protoplastos en división con el número de protoplastos cultivados o de protoplastos que sobreviven. La frecuencia absoluta de división (FAD) es:

$$\text{FAD} = \frac{\text{Células en división (no.)}}{\text{Total de protoplastos cultivados (no.)}} \times 100 \quad (3)$$

La frecuencia relativa de división (FRD) es:

$$\text{FRD} = \frac{\text{Células en división (no.)}}{\text{Células que sobreviven (no.)}} \times 100 \quad (4)$$

Los índices anteriores expresan la efectividad del período inicial; puesto que éste es un período sumamente crítico en el cultivo, tales valores también caracterizan adecuadamente la eficiencia del cultivo (EC); éste se relaciona con el número de colonias regeneradas, en función de los protoplastos cultivados, así:

$$\text{EC} = \frac{\text{Colonias regeneradas (no./caja)}}{\text{Protoplastos sembrados (no./caja)}} \times 100 \quad (5)$$

El índice EC expresa la capacidad de los protoplastos para dividirse sostenidamente y para formar colonias.

Regeneración de las Plantas

Una vez logrado un ritmo sostenido de división celular, las colonias desarrolladas se pueden transferir a un medio que conduzca a la generación de plantas (Figuras 10.1, E y 10.1, F). Esto se logró por primera vez en tabaco (Takebe et al., 1971).

En muchas especies, la iniciación de los brotes requiere del uso de citocininas, y la regeneración de la planta se efectúa con la diferenciación separada de la raíz y del brote (Bokelman et al., 1983; Bourgin et al., 1979; Binding et al., 1981). En el Cuadro 10.6 se presentan los resultados obtenidos con el cultivo de protoplastos de varias especies vegetales.

Cuadro 10.6. Resultados obtenidos con el cultivo de protoplastos de varias especies vegetales, aislados de diferentes fuentes.

Fuente de los protoplastos	Especies ensayadas	Resultados ^a	Referencias
Mesófilo	<i>Brassica napus</i>	C/E	Kohlenbach et al., 1982
	<i>Brassica napus</i>	PI	Kartha et al., 1974
	<i>Cichorium intybus</i>	PI	Crepy et al., 1982
	<i>Fagus sylvatica</i>	D	Ahuja, 1984
	<i>Glycine max</i>	C	Gamborg et al., 1983
	<i>Lycopersicon peruvianum</i>	C	Adams et al., 1983
	<i>Lycopersicon peruvianum</i>	PI	Zapata et al., 1981
	<i>Manihot esculenta</i>	C/PI	Shahin et al., 1980
	<i>Medicago</i> spp.	C/E	Johnson et al., 1982
	<i>Nicotiana</i> spp.	PI	Bourgin et al., 1979
	<i>Nicotiana tabacum</i>	C	Nagata et al., 1970
	<i>Nicotiana debneyi</i>	PI	Scowcroft et al., 1980
	<i>Petunia inflata</i>	PI	Power et al., 1976
	<i>P. violacea</i> , <i>P. axillaris</i>	PI	Power et al., 1976
	<i>Solanum tuberosum</i>	PI	Shepard, 1982
	<i>Solanum tuberosum</i>	C	Adams et al., 1983
	<i>Stylosanthes guianensis</i>	PI	Szabados y Roca, 1986
Suspensiones celulares	<i>Beta vulgaris</i>	C	Szabados et al., 1985
	<i>Bromus inermis</i>	C	Michayluk et al., 1975
	<i>Daucus carota</i>	PI	Grambow, 1972
	<i>Digitalis lanata</i>	C	Dietrich et al., 1982
	<i>Elalis quinensis</i>	C	Boss et al., 1984
	<i>Glycine</i> spp.	C/C	Gamborg et al., 1983
	<i>Glycine max</i>	C	Michayluk et al., 1975
	<i>Lolium multiflorum</i>	C	Jones et al., 1982
	<i>Lycopersicon</i> spp.	PI	Koblitz et al., 1982
	<i>Panicum miliaceum</i>	E/PI	Heyser, 1984
	<i>Parthenocissus tricuspidata</i> (agalla de la corona)	C	Scowcroft et al., 1975
	<i>Pennisetum americanum</i>	E/PI	Vasil et al., 1980b
	<i>Saccharum</i> spp.	C	Larkin, 1982
	<i>Vicia hajastana</i>	C	Michayluk et al., 1975
<i>Zea mays</i>	C	Potrykus et al., 1979b	
Puntas de brotes	<i>Manihot esculenta</i>	C	Szabados (no publicado)
	<i>Solanum dulcamara</i> (haploide)	PI	Binding et al., 1984

(Continúa)

Cuadro 10.6. Continuación.

Fuente de los protoplastos	Especies ensayadas	Resultados ^a	Referencias
Células guardianas (estomas)	<i>Allium cepa</i>	P	Schnabl et al., 1978
	<i>Commelina communis</i>	P	Fitzsimons et al., 1983
	<i>Vicia faba</i>	C	Schnabl et al., 1978
Aleuronas de semillas	<i>Avena fatua</i>	C	Hooley, 1982
Embriones somáticos	<i>Brassica napus</i> (haploide)	Pl	Kohlenbach et al., 1982
	<i>Daucus carota</i>	E	Nomura et al., 1983
	<i>Daucus carota</i>	P	Nomura et al., 1982
	<i>Manihot esculenta</i>	C	Szabados (no publicado)
Cotiledones	<i>Pinus pinaster</i>	C	David et al., 1984
	<i>Pinus coulteri</i>	C	Patel et al., 1984
Raíces	<i>Glycine max</i>	C	Xu, 1982
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	P	Cocking, 1960
Hipocótilo	<i>Brassica</i> sp.	Pl	Glimelius, 1984
Callo embriogénico	<i>Citrus</i> sp.	Pl	Vardi et al., 1982
	<i>Coffea arabica</i>	C	Sondahl et al., 1980

a. P = Protoplastos aislados; D = división celular; C = callo; V = vástago; E = embrión; Pl = regeneración de plantas.

Si se utilizan protoplastos de cultivos celulares formadores de embriones, las células recién formadas pueden producir los embriones directamente y regenerar las plantas mediante la embriogénesis somática (Kohlenbach et al., 1982; Shekhawat et al., 1983; Zapata et al., 1981).

Para la utilización de la tecnología de protoplastos en las manipulaciones genéticas, la alta frecuencia en la regeneración de plantas es un prerrequisito (Thomas et al., 1979). Se han descrito sistemas de regeneración protoplastos-planta en varias especies, aunque generalmente la eficiencia es baja; sólo en algunas especies de los géneros *Daucus*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Datura*, *Brassica* y *Solanum* se ha desarrollado una frecuencia de regeneración de plantas alta y reproducible en otros trabajos.

La mayoría de las especies de importancia económica fracasan en la regeneración de plantas a partir de protoplastos o presentan una regeneración apenas ocasional, que a veces está restringida a ciertos genotipos o células (Vasil, 1983; Vasil et al., 1980a; Gamborg et al., 1981). La papa es la única especie importante que se ha podido obtener por cultivo de protoplastos, y en ella la eficiencia de regeneración ha alcanzado tal nivel, que

actualmente es posible aplicar esa tecnología a los programas de fitomejoramiento de la especie (Bokelman et al., 1983; Shepard, 1982; Shepard et al., 1980; Wenzel et al., 1979).

Referencias

- Adams, T. L. y Townsend, J. A. 1983. A new procedure for increasing efficiency of protoplast plating and clone selection. *Plant Cell Reports* 2:165-168.
- Ahuja, M. R. 1984. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from mature beech trees. *Silva Genetica* 33:37-39.
- Bass, A. y Hughes, W. 1984. Conditions for isolation and regeneration of viable protoplasts of oil palm (*Eleaeis guineensis*). *Plant Cell Reports* 3:169-171.
- Binding, H. 1974. Regeneration von haploiden und diploiden pflanzen aus protoplasten von *Petunia hybrida* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 74:327-356.
- ; Nehls, R.; Kock, R.; Finger, J. y Mordhorst, G. 1981. Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the *Dicotyledoneae* class. *Z. Pflanzenphysiol.* 101:119-130.
- ; Jain, S. M.; Finger, J.; Mordhorst, G.; Nehls, R. y Gressel, J. 1982. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*; 1: Clonal variation in morphology and in atrazine sensitivity. *Theor. Appl. Genet.* 63:273-277.
- y Mordhorst, G. 1984. Haploid *Solanum dulcamara* L. shoot culture and plant regeneration from isolated protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 35:77-79.
- Bokelman, G. S. y Roest, S. 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum*. cv. Bintje). *Z. Pflanzenphysiol.* 109:259-265.
- Bornman, J. F.; Bornman, C. H. y Bjorn, L. O. 1982. Effects of ultraviolet radiation on viability of isolated *Beta vulgaris* and *Hordeum vulgare* protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 105:297-306.
- Bourgin, J. P. 1978. Valine-resistant plants from in vitro selected tobacco cells. *Molec. Gen. Genet.* 161:225-230.
- ; Chupeau, Y. y Missonier, C. 1979. Plant regeneration from mesophyll protoplast of several *Nicotiana* species. *Physiol. Plant.* 45:288-292.
- Broughton, W. J.; Wooi, K. C. y Hoh, C. H. 1976. Acetylene reduction by legume root nodule protoplasts. *Nature* 262(5565):208-209.
- Burgess, J. y Fleming, E. N. 1974. Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts. *J. Cell. Sci.* 14:439-449.

- Caboche, M. 1980. Nutritional requirements of protoplasts-derived haploid tobacco cells grown at low cell densities in liquid medium. *Planta* 149:7-18.
- Cocking, E. C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187:927-929.
- Cooke, R. y Meyer, Y. 1981. Hormonal control of tobacco protoplasts nucleic acid metabolism during *in vitro* culture. *Planta* 152:1-7.
- Crepy, L.; Chupeau, M. C. y Chupeau, Y. 1982. The isolation and culture of leaf protoplast of *Cichorium intybus* and their regeneration into plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 107:123-131.
- David, H.; Jarlet, E. y David, A. 1984. Effects of nitrogen source, calcium concentration and osmotic stress on protoplasts and protoplast-derived cell cultures of *Pinus pinaster* cotyledons. *Physiol. Plant.* 61:477-482.
- Deka, P. C. y Sen, S. K. 1976. Differentiation in calli originated from isolated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.) through plating technique. *Mol. Gen. Genet.* 149:239-243.
- Dietrich, B.; Newman, D. y Lucknes, M. 1982. Clonation of protoplast-derived cells of *Digitalis lanata* suspension cultures. *Biochem. Physiol.* 177:176-183.
- dos Santos, A. V. P.; Outka, D. E.; Cocking, E. C. y Davey, M. R. 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. *Z. Pflanzenphysiol.* 99:261-270.
- Fitzsimons, P. J. y Weyers, J. D. B. 1983. Separation and purification of protoplast types from *Cammelia communis* L. leaf epidermis. *J. Exp. Bot.* 34:49-60.
- Fleck, J.; Durr, A.; Fritsch, C.; Venut, T. y Hieth, L. 1982. Osmotic-shock 'stress proteins' in protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Sci. Lett.* 26:159-165.
- Fowke, L. C.; Bech-Hansen, C. W. y Gamborg, O. L. 1974. Electron microscopy observation of cell regeneration from cultured protoplasts of *Amni visnaga*. *Protoplasma* 79:235-248.
- Galbraith, D. W. y Shields, B. A. 1982. The effects of inhibitors of cellwall synthesis on tobacco protoplast development. *Physiol. Plant* 55:25-30.
- Galun, E. 1981. Plant protoplasts as physiological tools. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32:237-266.
- . 1982. Somatic cell fusion for inducing cytoplasmic exchange: A new biological system for cytoplasmic genetics in higher plants. En: Vasil, I. K., Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). *Plant improvement and somatic cell genetics*. Academic Press. p. 205-219.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.

- y Bottino, P. J. 1981. Protoplasts in genetic modifications of plants. *Advance in Biochemical Engineering* 19:239-263.
- ; Davis, B. P. y Stalhut, R. W. 1983. Cell division and differentiation in protoplasts from cell cultures of *Glycine* species and leaf tissue of soybean. *Plant Cell Reports* 2:213-215.
- Giaja, J. 1919. Emploi des ferments dans les études de physiologie cellulaire: Le globule de levure depouillé de sa membrane. *C. R. Sc. Biol. Fil. Paris* 82:719.
- Gleba, Y. Y.; Mamot, V. P.; Cherep, N. N. y Skarzynskaya, M. V. 1982. Intergeneric hybrid cell lines of *Atropa belladonna* x *Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products. *Theor. Appl. Genet.* 62:75-79.
- Glimelius, K. 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. *Physiol. Plant.* 61:38-44.
- Grambow, H. J.; Kao, K. N.; Miller, R. A. y Gamborg, O. L. 1972. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. *Planta* 103:348-355.
- Griesbach, R. J.; Malmberg, R. L. y Carlson, P. S. 1982a. An improved technique for the isolation of higher plant chromosomes. *Plant Sci. Lett.* 24:55-60.
- ; ——— y ———. 1982b. Uptake of isolated lily chromosome by tobacco protoplasts. *J. Heredity* 73:151-152.
- Gutiérrez, M.; Kanai, R.; Huber, S. C.; Ku, S. B. y Edwards, G. E. 1974. Photosynthesis in mesophyll protoplasts of bundle sheath cells of various types of C-4 plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 72:305-319.
- Hadlaczy, Gy; Bisztray, Gy; Praznovszky, T. y Dudits, D. 1983. Mass isolation of plant chromosomes and nuclei. *Planta* 157:278-285.
- Harkins, K. R. y Galbraith, D. W. 1984. Flow sorting culture of plant protoplasts. *Physiol. Plant.* 60:43-52.
- Harms, C. T. y Potrykus, I. 1978. Fractionation of plant protoplasts types by iso-osmotic density gradient centrifugation. *Theor. Appl. Genet.* 53:57-63.
- ; Lorz, H. y Potrykus, I. 1979. Multiple-drop-array (MDA) technique for the large-scale testing of culture media variation in hanging microdrop cultures of single cell systems; 2: Response in *Nicotiana tabacum* protoplast cultures. *Plant Sci. Lett.* 14:237-244.
- Hasezawa, S. y Syono, K. 1983. Hormonal control of elongation of tobacco cells derived from protoplasts. *Plant Cell Physiol.* 24:127-132.
- Heyser, J. W. 1984. Callus and shoot regeneration from protoplasts of praso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Z. Pflanzenphysiol* 113:293-299.

- Hooley, R., 1982. Protoplasts isolated from aleurone layers of wild oat (*Avena fatua* L.) exhibit the classic response to gibberellic acid. *Planta* 154:29-40.
- Horvath, G.; Droppa, M.; Mustárdy, L. A. y Faludi-Dániel, A. 1978. Functional characteristics of intact chloroplasts isolated from mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of maize. *Planta* 141:239-244.
- Jia, S. R. 1982. Factors affecting the division frequency of pea mesophyll protoplasts. *Can. J. Bot.* 60:2192-2196.
- Johnson, L. B.; Stuteville, D. L.; Higgins, R. K. y Douglas, H. L. 1982. Pectolyase Y-23 for isolating mesophyll protoplasts from several *Medicago* species. *Plant Sci. Lett.* 26:133-137.
- Jones, M. G. K. y Dale, P. J. 1982. Reproducible regeneration of callus from suspension culture protoplasts of the grass *Lolium multiflorum*. *Z. Pflanzenphysiol.* 105:267-274.
- Kado, C. I. y Keinhofs, A. 1980. Genetic modification of plant cells through uptake of foreign DNA. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11B.
- Kao, K. N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean *Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 150:225-230.
- . 1982. Plant protoplast fusion and isolation of heterokaryocytes. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). *Plant tissue culture methods*. National Research Council of Canada, Saskatoon, Canadá. p. 49-56.
- ; Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Keller, W. A. 1971. Cell divisions in cells regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. *Nature New Biology* 232:124.
- ; ———; Michayluk, M. R.; Keller, W. A. y Miller, R. A. 1973. The effect of sugars and inorganic salts on cell regeneration and sustained cell division in plant protoplasts. En: *Protoplasts et fusion de cellules somatiques végétales*. CNRS, Paris. p. 207-213.
- y Michayluk, M. R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. *Planta* 126:105-110.
- y ———. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* 96:135-141.
- Kartha, K. K.; Michayluk, M. R.; Kao, K. N.; Gamborg, O. L. y Constabel, F. 1974. Callus formation and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of rape plantas (*Brassica napus* L. cv. Zephyr). *Plant Sci. Lett.* 3:265-271.
- Klein, A. S.; Montezinos, D. y Delmer, D. P. 1981. Cellulose and 1,3-glucan synthesis during the early stages of wall regeneration in soybean protoplasts. *Planta* 152:105-114.

- Klercker, J. 1982. Eine methode zur isolierung lebender protoplasten ofvers
vetensk. Akad. Forth: Sotkh. 49:463.
- Koblitz, H. y Koblitz, D. 1982. Experiments on tissue culture in the genus
Lycopersicon Miller: Shoot formation from protoplasts of tomato long term
cultures. Plant Cell Reports 1:147-150.
- Kohlenbach, H. W.; Wenzel, G. y Hoffmann, F. 1982: Regeneration of *Brassica
napus* plantlets in cultures of isolated protoplasts of haploid stem embryos as
compared with leaf protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 105:131-142.
- Koop, H. U.; Weber, G. y Schweiger, H. G. 1983. Individual culture of selected
single cells and protoplasts in microdroplets of defined media. Z. Pflan-
zenphysiol. 112:21-34.
- Larkin, P. J. 1982: Sugarcane tissue and protoplast culture. Plant Cell Tissue &
Organ Culture 1:149-164.
- Lin, W. 1981. Inhibition of anion transport in corn root protoplasts! Plant Physiol.
68(2):435-438.
- Lloyd, C. W.; Slabas, A. R.; Powell, A. J.; MacDonald, G.; Lowe, S. B. y Peace, G.
1980. Microtubules in higher plant cells and protoplasts. En: Ferenczy, L. y
Farkas, G. L. (eds.). Advances in protoplasts research. Akadémiai Kiadó,
Budapest. p. 469-474.
- Lorz, H.; Larkin, P. J.; Thomson, J. y Scowcroft, W. R. 1983. Improved
protoplasts culture and agarose media. Plant Cell Tissue & Organ Culture
2:217-226.
- Lu, C.; Vasil, V. y Vasil, I. K. 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum
maximum* Jack. (Guinea grass): Somatic embryogenesis and plantlet
formation. Z. Pflanzenphysiol. 104:311-318.
- Magnien, E.; Dalschaert, X. y Faraoni-Sciamanna, P. 1982. Transmission of a
cytological heterogeneity from the leaf to the protoplasts in culture. Plant
Sci. Lett. 25:291-303.
- Malmberg, R. L. y Griesbach, R. J. 1980. The isolation of mitotic and meiotic
chromosomes from plant protoplasts. Plant Sci. Lett. 17:141-147.
- Meyer, Y. y Chartier, Y. 1981. Hormonal control of mitotic development in
tobacco protoplasts. Plant Physiol. 68:1273-1278.
- Michayluk, M. R. y Kao, K. N. 1975. A comparative study of sugars and sugar
alcohols on cell regeneration and sustained cell division in plant protoplasts.
Z. Pflanzenphysiol. 75:181-185.
- Muller, J. F.; Missionier, C. y Caboche, M. 1983. Low density growth of cells
derived from *Nicotiana* and *Petunia* protoplasts: Influence of the source of
protoplasts and comparison of the growth promoting activity of various
auxins. Physiol. Plant 57:35-41.

- Murashige, T. y Skoog, G. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nagata, T. y Takebe, H. 1970. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92:301-308.
- y ———. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99:12-20.
- Negrutiu, I. 1981. Improved conditions for large scale culture, mutagenesis, and selection of haploid protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia* Viviani. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:431-442.
- Nishimura, M.; Graham, D. y Akazawa T. 1976. Isolation of intact chloroplasts and other cell organelles from spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 58:309-314.
- Nomura, K.; Nitta, T.; Fujimura, T. y Komamine, A. 1982. Isolation of protoplasts from somatic embryos of carrot. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 1:211-219.
- Nomura, K. L.; Fukuei, K. y Nitta, T. 1983. Culture of protoplasts isolated from somatic embryos of carrot. *Plant Sci. Lett.* 29:1-7.
- Ohyama, K.; Pelcher, L. E. y Horn, D. 1977. A rapid simple method for nuclei isolation from protoplasts. *Plant Physiol.* 60:179-181.
- Patel, K. R.; Shekhrawat, N. S.; Beriya, G. P. y Thorpe, T. A. 1984. Isolation and culture of protoplasts from cotyledons of *Pinus leulteri* D. Dew. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 3:85-90.
- Perlin, D. S. y Spanswick, R. M. 1980. Labelling isolation of plasma membranes from corn leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 65:1053-1057.
- Potrykus, I. 1980. The old problem of protoplast culture: Cereals. En: Ferenczy, L. y Farkas, G. L. (eds.). *Advances in protoplast research.* Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungría. p. 243-253.
- ; Harms, C. T.; Lorz, H. y Thomas, E. 1977. Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Mol. Gen. Genet.* 156:347-350.
- ; ——— y ———. 1979. Multiple-drop-array (MDA) technique for the large scale testing of culture media variations in hanging microdrop cultures of single cell systems; 1: The technique. *Plant Sci. Lett.* 14:231-235.
- ; ——— y ———. 1979b. Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 54:209-214.
- Power, J. B.; Frearson, E. M.; George, D.; Evans, P. K.; Berry, S. F. y Coeking, E. C. 1976. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*. *Plant Sci. Lett.* 7:51-55.

- Raveh, D.; Huberman, E. y Galun, E. 1973. *In vitro* culture of tobacco protoplasts: Use of feeder techniques to support division of cells plated at low densities. *In Vitro* 9:216-222.
- Ruesink, A. 1980. Protoplasts of plant cells. *Methods in Enzymology* 69:69-84.
- Schaefer, A.; Ohyama, K. y Gamburg, O. L. 1981. Detection by agarose gel electrophoresis of nucleases associated with cells and protoplasts from plant suspension cultures using *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Agric. Biol. Chem.* 45:1441-1445.
- Schnabl, H.; Boruman, Ch. y Ziegler, H. 1978. Studies on isolated starch containing (*Vicia faba*) and starch deficient (*Allium cepa*) guard cell protoplasts. *Planta* 149:280-282.
- Scowcroft, W. R.; Davey, M. R. y Power, J. B. 1975. Crown gall protoplasts isolation, culture, and ultrastructure. *Plant Sci. Lett.* 1:451-456.
- y Larkin, P. J. 1980. Isolation culture and plant regeneration from protoplasts of *Nicotiana debneyi*. *Aust. J. Plant Physiol.* 7:635-644.
- Shahin, E. y Shepard, J. F. 1980. Cassava mesophyll protoplasts: Isolation, proliferation and shoot formation. *Plant Sci. Lett.* 14:459-465.
- Shekhawat, N. S. y Galston, A. W. 1983. Isolation, culture and regeneration of moth bean, *Vigna aconitifolia*, leaf protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 32:43-51.
- Shepard, J. F. 1982. Cultivar dependent cultural refinements in potato protoplasts regeneration. *Plant Sci. Lett.* 26:127-132.
- y Totten, R. E. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato; isolation, proliferation and plant regeneration. *Plant Physiol.* 60:313-316.
- ; Bidney, D. y Shahin, E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. *Science* 208:17-24.
- Slabas, R. A.; Powell, A. J. y Lloyd, C. W. 1980. An improved procedure for the isolation and purification of protoplasts from carrot suspension culture. *Planta* 147:283-286.
- Smith, M. A. L.; Palta, J. P. y McCown, B. H. 1984. The measurement of isotonicity and maintenance of osmotic balance in plant protoplast manipulations. *Plant Sci. Lett.* 33:249-258.
- Smith, R. y Poole, R. J. 1980. Isolation of protoplasts and vacuoles from storage tissue of red beet. *Plant Physiol.* 66:25-28.
- Sondahl, M. R.; Chapman, M. S. y Sharp, W. R. 1980. Protoplast liberation, cell wall reconstitution and callus proliferation in *Coffea arabica* L. callus cultures. *Turrialba* 30:161-165.

- Szabados, L.; Hadlaczky, Gy. y Dudits, D. 1981. Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplasts. *Planta* 151:141-145.
- y Gaggero, C. 1985. Callus formation from protoplasts of a sugarbeet cell suspension culture. *Plant Cell Reports* 4:195-198.
- y Roca, W. 1986. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. *Plant Cell Reports* 5(3):174-177.
- Takebe, I.; Lalib, G. y Melchers, G. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften* 58:318-320.
- Takeuchi, Y. y Komamine, A. 1982. Effects of culture conditions on cell division and composition of regenerated cell walls in *Vinca rosea* protoplasts. *Plant & Cell Physiol.* 23:249-255.
- Tallman, G. y Reeck, G. R. 1980. Isolation of nuclei from plant protoplasts without the use of a detergent. *Plant Sci. Lett.* 18:271-275.
- Tewes, A.; Glund, K.; Walther, R. y Reinbothe, H. 1984. High yield isolation and rapid recovery of protoplasts from suspension cultures of tomato (*Lycopersicon sculentum*). *Z. Pflanzenphysiol.* 113:141-150.
- Thomas, E.; King, P. J. y Potrykus, I. 1979. Improvement of crop plants via single cells *in vitro*: An assessment. *Z. Pflanzenzuchtung* 82:1-30.
- Vardi, A.; Spiegel-Roy, P. y Galum, E. 1982. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor. Appl. Genet.* 62:171-176.
- Vasil, I. K. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. En: Lurquin, P. F. y Kleinhofs, A. (eds.). *Genetic engineering in eukaryotes*. Plenum Publishing Corporation. p. 233-252.
- y Vasil, V. 1980a. Isolation and culture of protoplasts. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11B:1-19.
- Vasil, V. y Vasil, I. K. 1980b. Isolation and culture of cereal protoplasts: Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theor. Appl. Genet.* 56:97-99.
- Wenzel, G.; Schieder, O.; Przewozny, T.; Sopory, S. K. y Melchers, G. 1979. Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. *Theor. Appl. Genet.* 55:49-55.
- Widholm, J. M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Tech.* 47:189-194.

- Xu, Z. H.; Davey, M. R. y Cocking, E. C. 1982. Callus formation from root protoplasts of *Glycine max* (soybean). Plant Sci. Lett. 24:111-115.
- Zapata, F. J. y Sink, K. C. 1981. Somatic embryogenesis from *Lycopersicon peruvianum* leaf mesophyll protoplasts. Theor. Appl. Genet. 59:265-268.