

Protoplast Culture and Regeneration in *Coffea* Species

J. SPIRAL, V. PÉTIARD

Francereco-Nestlé, 101, avenue Gustave Eiffel, 37390 Notre Dame D'Oé, France

SUMMARY

Plant regeneration is still a necessary step for the obtention of transgenic plants. Hereafter we describe the regeneration of plantlets from protoplasts of different Coffee species. Protoplasts of *Coffea arabica*, *Coffea canephora* and the interspecific hybrid "arabusta" are isolated from embryogenic cell suspensions derived from leaf callus. A standard enzyme mixture of cellulase, macerozyme and pectolyase is used for isolation; and protoplasts are cultivated in modified Blaydes medium with 2,4 dichlorophenoxy acetic acid, kinetin and naphthalene acetic acid. Cultures are diluted by half, monthly, with the same basal medium containing benzyl amino purine (BAP). Six or seven months later, calli are subcultured onto Yasuda solid medium with BAP. After two subcultures, embryos are detectable and transferred to solidified Murashige and Skoog medium for germination. Two-leaf stage plantlets are then transferred to the greenhouse for acclimatization.

RÉSUMÉ

La régénération des plantes est encore une étape nécessaire à l'obtention de plantes transgéniques. Nous décrivons, ci-dessous, la régénération de plantules à partir de protoplastes de différentes espèces de caféier. Les protoplastes de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* et de l'hybride interspécifique "arabusta", sont isolés à partir de suspensions embryogènes dérivées de cals de feuilles. Une solution enzymatique standard de cellulase, macerozyme et de pectolyase est utilisée Pour l'isolement; puis les protoplastes sont cultivés dans un milieu modifié de Blaydes contenant de l'acide 2,4 dichlorophenoxyacétique, de la kinétine et de l'acide naphthalène acétique. Chaque mois, les cultures sont diluées de moitié avec le même milieu de base contenant de la benzyl amino purine (BAP). Six ou sept mois plus tard, les cals sont repiqués sur du milieu solide Yasuda avec de la BAP. Après deux repiquages, des embryons sont détectables et transférés sur du milieu solide de Murashige et Skoog pour la germination. Au stade deux feuilles, les plantules sont transférées à la serre pour acclimatation.