

## AISLAMIENTO ENZIMÁTICO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE MESÓFILO DE *Dioscorea alata* CULTIVAR “Pico de Botella”

## PROTOPLAST ENZYMATIC ISOLATION FROM MESOPHYLL OF *Dioscorea alata* CULTIVARE “Bottle Peak”

Jorge A. Osorio<sup>\*1</sup>, Elvis E. Bustamante<sup>2</sup>, Mayerlis M. Macareno<sup>2</sup>, Eduardo J. Hernandez<sup>2</sup>,  
Javier D. Beltrán<sup>2</sup>

Recibido para evaluación: Octubre 29 de 2009 - Aceptado para publicación: Junio 8 de 2010

### RESUMEN

Un protoplasto vegetal es una célula que carece de pared celular, se encuentra rodeada por su membrana plasmática y es potencialmente capaz de regenerar la pared celular, crecer y dividirse. El objetivo del trabajo fue evaluar diferentes concentraciones de enzimas comerciales y tiempos de acción en el aislamiento de protoplastos de *Dioscorea alata* cultivar “Pico de Botella”. Los protoplastos fueron aislados del mesófilo de vitroplantas combinando concentraciones de las enzimas Celulasa Onozuka R10<sup>®</sup> (0,0 a 1,5% p/v) y Macerozima R10<sup>®</sup> (0,0 a 0,5% p/v), a tiempos de acción de 6 a 18h y pH de 5,6; exponiendo aproximadamente 0,015g de hoja en medio de aislamiento de protoplastos de ñame a 27±2 °C, 40 rpm, seguido de lavado en medio de aislamiento sin enzimas, purificación en sacarosa al 24%, resuspensión en medio de cultivo de protoplastos de ñame y conteo en cámara de Neubauer. La mayor cantidad de protoplastos se obtuvo con Celulasa al 1% y Macerozima al 0,5% en 18h de acción, con un promedio de 18,6 x10<sup>6</sup> protoplastos g<sup>-1</sup> de tejido fresco. Los análisis de regresión (R<sup>2</sup> = 0,84) de los datos obtenidos arrojaron, que las condiciones óptimas para obtener la mayor cantidad de protoplastos aislados corresponden a una combinación de 0,96% de Celulasa y 0,36% de Macerozima, a 13,99 h de acción, estimando un valor de 15,3x10<sup>6</sup> protoplastos g<sup>-1</sup> de tejido. El método enzimático permite aislar protoplastos de ñame, recomendándose evaluar su viabilidad para regeneración su pared celular, crecer, dividirse y formar microcolonias y microcallos.

**Palabras clave:** ñame, celulasa, macerozima, protoplasto.

### ABSTRACT

A plant protoplast cell lacking a cell wall is surrounded by its plasma membrane and is potentially able to regenerate the cell wall, grow and divide. The aim of this study was to evaluate different commercial enzyme concentrations and times of action in the isolation of protoplasts of *D. alata* cultivar “Bottle Peak”. The protoplasts were isolated from mesophyll of vitroplants combining concentrations of the enzymes Cellulase Onozuka R10<sup>®</sup> (0,0 to 1,5% w/v) and Macerozyme R10<sup>®</sup> (0,0 to 0,5% w/v), to action times of 6 to 18h and pH

<sup>\*1</sup>Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería de Alimentos. Km 12 vía a Ciénaga de Oro. Tel: 301 253 14 00. Email: josmartbio@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidad de Sucre, Departamento de Biología. Cra 28 No. 5-267. Teléfono: 282 1240 Ext. 219, Sincelejo (Sucre).

of 5,6, giving approximately 0,015g of leaf protoplast isolation medium yam at  $27 \pm 2$  °C, 40 rpm, followed by washing in isolation medium without enzymes, purification in 24% sucrose, resuspension in protoplast culture medium yam and counting in Neubauer camera. Most protoplasts were obtained with 1% Cellulase and 0,5% macerozyme in 18h of action, with an average of  $18,6 \times 10^6$  protoplasts  $g^{-1}$  fresh tissue. Regression analysis ( $R^2 = 0,84$ ) yielded the data obtained, optimum conditions for the most isolated protoplasts correspond to a combination of 0,96% Cellulase and 0,36% macerozyme to 13,99 h action, with an value estimated of  $15,3 \times 10^6$  protoplasts  $g^{-1}$  tissue. The enzymatic method to isolate protoplasts yam, recommended assessing their feasibility for cell wall regeneration, growing, dividing and forming microcolonies and microcallus.

**Key words:** yam, cellulase, macerozyme, protoplast.

## INTRODUCCIÓN

El ñame pertenece al género *Dioscorea*, se incluye dentro de las monocotiledóneas, y comprende alrededor de 650 especies de considerable importancia económica; sus tubérculos son utilizados como fuente de carbohidratos en la dieta de millones de personas en el Oeste de África, Sur de Asia, Islas del Pacífico y Región Caribe de América Latina (Twyford y Mantell 1996; Cogne 2002; Pérez et al. 2005). La familia *Dioscoreaceae* es reconocida también por la presencia de diferentes metabolitos como las saponinas esteroidales, saponinas y esteroides relacionados, alcaloides y diterpenoides, útiles para la industria farmacéutica (Cogne 2002).

En Colombia se pueden encontrar varias especies de ñame, considerándose *D. alata* y *D. rotundata* las de mayor importancia tanto por el área sembrada como por la demanda del tubérculo. Las otras especies figuran como simples curiosidades o de usos muy específicos en la alimentación y por la época del año (Álvarez 2000). En la Costa Atlántica Colombiana (zona de mayor producción de ñame), se cultivan alrededor de 26.502 ha, un rendimiento promedio de  $11,7 \text{ Ton ha}^{-1}$  y una producción anual de 310.205 Ton (MADR

2004). En 2008 Colombia exportó 4.800 toneladas de ñame, siendo los principales destinos Estados Unidos, Puerto Rico y las islas del Caribe. De este producto se sostienen al menos 20 mil familias de los departamentos de Sucre, Córdoba y Bolívar (ICA 2009; Pérez 2010).

El cultivo de ñame se ha visto afectado por una gran cantidad de enfermedades que han disminuido el rendimiento, producción y calidad de este tubérculo (Perea 2000). La superficie cultivada en ñame en Colombia se redujo dramáticamente en un 77,6 % (de 20100 a 4500 ha) en la segunda mitad de la década del ochenta, debido principalmente a la antracnosis, enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Esta enfermedad registra un alto índice de daño agroeconómico, encontrándose en las estadísticas pérdidas hasta de un 100 % en la producción (Agudelo et al. 1995). Gran parte de este problema es derivado de la forma tradicional de propagación del cultivo, que ayuda a la diseminación de la enfermedad; lo que ha incrementado los costos de producción principalmente por el empleo de agroquímicos y pesticidas que influyen en la alteración del agroecosistema (Álvarez 2000).

Para minimizar tales efectos, la atención se ha centrado actualmente en el empleo de los sistemas *in vitro* para obtener semillas libres de patógenos y suplir la demanda generada por la escasez de semillas sanas. Sin embargo, estas semillas al llegar al campo, son susceptibles al ataque de estos agentes patógenos. Una alternativa de solución a este problema, es la aplicación de sistemas de mejoramiento genético con el fin de obtener nuevas cultivares resistentes o tolerantes a fitopatógenos y condiciones ambientales adversas. Sin embargo, las técnicas convencionales para el mejoramiento genético del ñame ha sido difícil de realizar, debido al poco acervo genético existente, puesto que todas las variedades cultivadas son propagadas vegetativamente y han perdido su capacidad de floración (Tor et al. 1998).

Las técnicas de mejoramiento *in vitro* como la hibridación somática y técnicas de inserción de genes, abren un nuevo camino para la manipulación genética y la transformación con genes aislados, que confieran características agronómicas deseables (Shillito et al. 1989). Un protoplasto es la parte viva de una célula vegetal, conteniendo citoplasma y núcleo. Si estas células son cultivadas en un medio nutritivo adecuado pueden ser inducidas a reformar la pared celular y dividirse (Azpíroz, 1994; Gutiérrez et al. 2003). La mayoría de las tecnologías aplicadas al mejoramiento genético de plantas requieren el aislamiento y el cultivo preliminar de protoplastos y a partir de ellos generar microcolonias y microcallos para la posterior regeneración de plantas somáticas. Además, los protoplastos se emplean en estudios de Biología Celular tales como procesos de transporte y división

celular, morfogénesis, mutagénesis y selección de variantes somaclonales; sin embargo, la mayor aplicación es la hibridación somática y la introducción de genes para procesos de transformación genética (Alves et al. 1999; Cohen et al. 2004; Díaz et al. 2004).

Sauer y Walter (1987), obtuvieron una pequeña cantidad de protoplastos aislados y cultivados de *Dioscorea opposita* (*Dioscorea batatas*); pero no reportan con éxito la formación de microcallos o microcolonias. Mantell (1994) realizó fusión de mezclas de protoplastos entre clones resistentes y sensibles a enfermedades de *Dioscorea alata* en pruebas para desarrollar híbridos somáticos con una tolerancia incrementada a antracnosis. El trabajo realizado por Tor et al. (1998) determinó la capacidad de las enzimas degradadoras de la pared celular para liberar protoplastos viables de ñame a partir de hojas de cultivos *in vitro* de tres importantes especies de ñame comestibles (*D. alata*, *D. cayenensis-rotundata* y *D. bulbifera*); también optimizaron las condiciones del cultivo para el cultivo de protoplastos de ñame y evaluaron la transformación genética de ñame por mediación directa de polietilenglicol (PEG) con plásmidos. Así mismo, se han reportado estudios de aislamiento, proliferación y regeneración de plantas a partir de protoplastos en otras especies vegetales como la papa, donde Shepard y Totten (1977), empleando las enzimas celulasa R10® y Macerozima R10®. Sutiojono et al. (1998) evaluaron algunas de las variables que afectan la división de los protoplastos en *Cucumis melo* cultivar "Green Delica" y "Fastoso", que incluía la fuente del explante, el método del cultivo, el efecto de un pretratamiento en la oscuridad, concentración hormonal y adición de azúcares. Babaogiu

(2000), trabajó en la determinación óptima del tamaño del explante y las condiciones de aislamiento de protoplastos en *Lupinus mutabilis sweet*, tomando diferentes explantes del cultivo in vitro de semillas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes concentraciones de enzimas comerciales y tiempos de acción en el aislamiento de protoplastos de *Dioscorea alata* cultivar "Pico de Botella" a partir de mesófilo de vitro plantas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización geográfica

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja, Sincelejo-Sucre, ubicada geográficamente a 9° 58' 23.8" latitud Norte y 74° 58' 58.4" longitud Oeste de Greenwich, con una temperatura de 27±3 °C y una humedad relativa de 45–60 %.

### Material vegetal

Se utilizaron hojas jóvenes de vitroplantas de la especie *Dioscorea alata* cultivar "Pico de Botella" de diferente madurez correlacionada con la longitud de las hojas y la coloración de las mismas, mantenidas en cultivo de segmentos nodales en medio MS suplementado con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalen-acético (ANA) y 4 mg L<sup>-1</sup> de 6-Bencil-aminopurina (BAP) (Rodríguez y Beltrán 2002), mantenidos a 27°C con una intensidad lumínica 50±5 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, humedad relativa entre 45–60 % y un fotoperíodo de 12 h luz.

### Aislamiento de protoplastos

El aislamiento enzimático de los protoplastos de ñame fue realizado utilizando diferentes

concentraciones de Celulasa Onozuka R10® (0,0, 0,5, 1,0, 1,5 % p/v) combinado con concentraciones de Macerozima R10® (0,0, 0,2, 0,4, 0,5 % p/v) e incubados por 6, 10, 14 y 18 horas, para evaluar un total de 64 tratamientos con 6 repeticiones cada uno. Aproximadamente 0,015 g de material vegetal fueron colocados en tubos eppendorf de 1,5 mL con 1 mL de medio de aislamiento de protoplastos de ñame (MAPÑ) compuesto por manitol a 0,4 M, CaCl<sub>2</sub> a 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,8 mM y las diferentes combinaciones enzimáticas ajustado el pH a 5,6 con NaOH 0,1 M y sin utilizar ningún búfer fosfato en especial. El tejido vegetal se trató previamente de diferentes formas, muestras donde las hojas se maceraron suavemente, hojas picadas, remoción de la cutícula con pinzas y tejido entero (control). Las muestras se incubaron en oscuridad a 27 °C con agitación constante de 40 rpm en un agitador rotatorio por el tiempo establecido para cada tratamiento.

### Lavado y purificación de los protoplastos aislados

Una vez terminado el período de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos, seguidamente se realizaron dos lavados al pellet en MAPÑ sin enzimas y luego éste fue resuspendido en solución de sacarosa al 24 % y centrifugando a 1000 rpm por 1 minuto para la purificación de los protoplastos. Posteriormente, se realizaron dos lavados en MAPÑ sin enzimas y resuspensión en Medio de Cultivo de Protoplastos de Ñame (MCPÑ) propuesto por Tor et al. (1998) y modificado en este estudio.

### Conteo de los protoplastos

Para determinar el número de los protoplastos

aislados, se tomó una muestra de 100 µL de suspensión de protoplastos y se realizó conteo en un microscopio de luz Binocular Primo Star Zeiss, utilizando una Cámara de Neubauer (Levitus et al. 2005). Los resultados fueron expresados como número total de protoplastos aislados por mililitro de medio.

### Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los tratamientos en la obtención de protoplastos, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial con tres factores (concentración de celulasa, concentración de macerozima y tiempo de exposición). Los datos obtenidos fueron

analizados con un análisis de varianza y la separación de medias por prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para medir la influencia de los niveles de cada factor.

Para determinar cuál es la combinación de los niveles de cada factor (Celulasa Onozuka R10®, Macerozima R10® y Tiempo de incubación), que produce la mayor cantidad de protoplastos aislados y cual la mayor cantidad de protoplastos viables, se realizó un análisis de regresión donde las variables fueron transformadas a través de logaritmo natural; obteniéndose para el aislamiento el siguiente modelo ajustado:

$$\ln(\text{número protoplastos}) = -22,388 + 14,4881 * X_1 + 114,901 * X_2 + 1,20156 * X_3 - 5,39774 * (X_1)^2 + 2,71245 * X_1 * X_2 - 0,359176 * X_1 * X_3 - 170,01 * (X_2)^2 + 0,555125 * X_2 * X_3 - 0,0378054 * (X_3)^2$$

Donde:  $X_1$  = concentración Celulasa;  $X_2$  = concentración Macerozima y  $X_3$  = Tiempo de incubación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

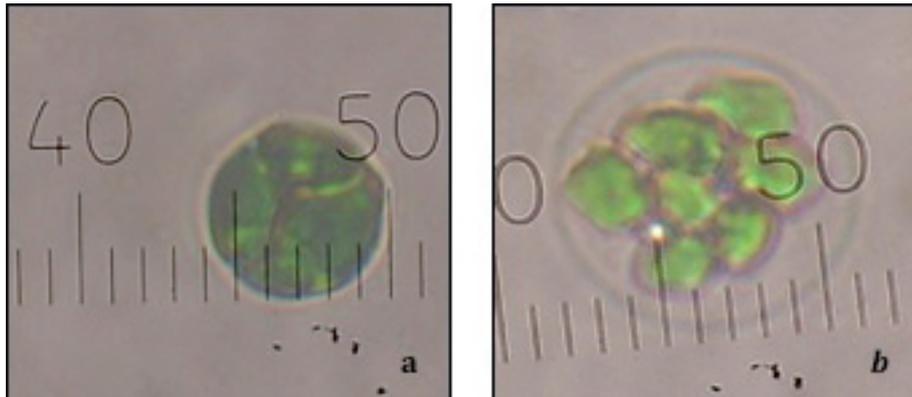
La eficiencia del aislamiento enzimático depende de varios factores entre los que se tiene la edad del material vegetal, el tipo y concentración de enzimas utilizadas, la temperatura y el tiempo de acción (Guangyu et al. 1997; Assani et al. 2001; Pindel 2007; Geerts et al. 2008) y la eliminación de la cutícula. La mayor cantidad de protoplastos se obtuvo al realizar maceración suave previa del tejido ( $>5 \times 10^4$  protoplastos mL<sup>-1</sup>) y agitación durante la incubación con las enzimas. Probablemente, estos resultados se deben a que en este procedimiento se presenta una mayor área de exposición del tejido a las enzimas, y la penetración de éstas es facilitada por la agitación durante la incubación.

El tamaño de los protoplastos de *Dioscorea alata* cultivar "Pico de Botella" fue variable, encontrándose diámetros en un rango de 60 a 100 µm (Figura 1), esta diferencia en diámetro puede ser atribuida a la variación en tamaño de las células y particularmente al grado de vacuolación de las mismas (Uchimiya y Murashige 1974; Lin 1983; Kanchanapoom et al. 2001), por lo que, protoplastos aislados de hojas pequeñas presentaban menor tamaño y contenido citoplasmático denso, y los provenientes de hojas grandes mostraban un mayor tamaño. Estos resultados fueron similares a los reportados por Tor et al. (1998) en *Dioscorea alata* cultivar Oriental Lisbon.

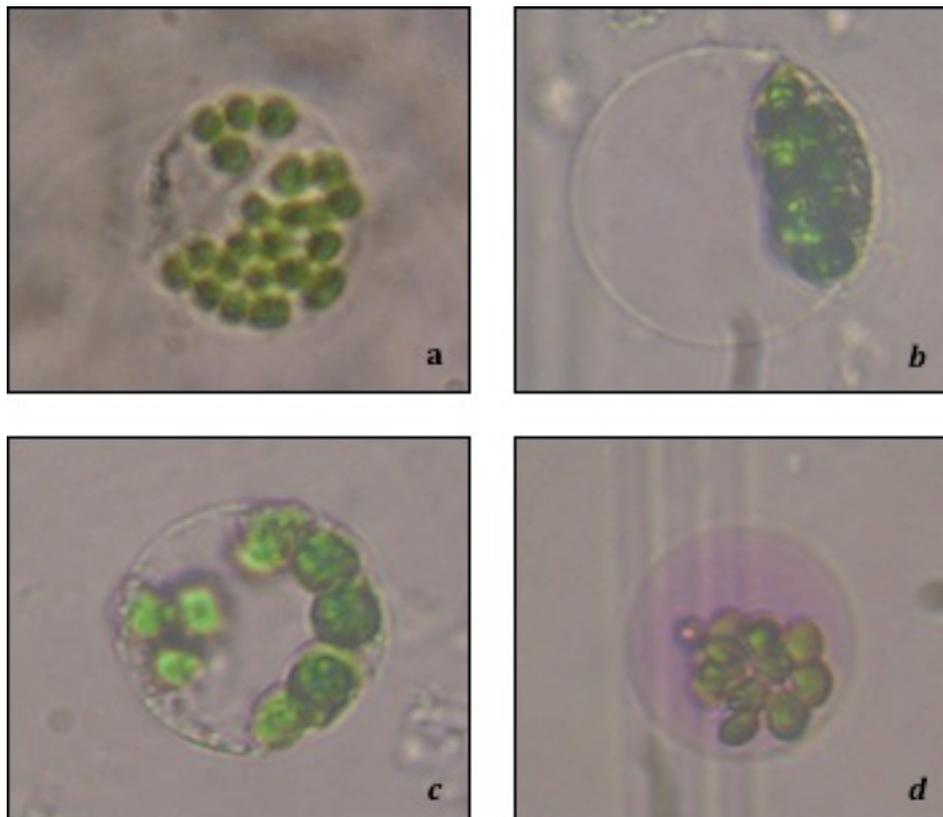
Los protoplastos aislados reflejaron las propiedades morfológicas y fisiológicas

de las células de las cuales se derivaron, observándose cloroplastos en el contenido citoplasmático. Al igual que lo reportado por Kanchanapoom et al. (2001) los cloroplastos se encontraban distribuidos en el citoplasma,

ya sea arreglados al azar, agregados en un solo sitio o distribuidos en forma periférica (Figura 2). Además, algunos protoplastos presentaron un color púrpura después del aislamiento, lo cual esta correlacionado según Narayanaswamy



**Figura 1.** Diferencia en el tamaño de protoplastos ( $\mu\text{m}$ ) aislados de hoja de *Dioscorea alata* c.v “pico de Botella”. a) Protoplastos de hojas pequeñas y b) Protoplastos de hojas grandes



**Figura 2.** Distribución de los cloroplastos en el citoplasma. a) Distribuidos en todo el citoplasma, b) agregados en un solo sitio, c) distribución periférica y d) protoplastos púrpuras

(1994) con la edad del material vegetal y la coloración producida por las antocianinas en cultivares de *Dioscorea alata*.

Los tipos de enzimas y sus concentraciones influyeron notablemente en la cantidad de protoplastos. La máxima cantidad de protoplastos se obtuvo utilizando la combinación de 1 % de Celulasa con 0,5 % de Macerozima en un período de incubación de 18 horas, seguido de los tratamientos con la combinación de 0,5 % de Celulasa con 0,2 % de Macerozima y 1,5 % de Celulasa con 0,2 % de Macerozima, con tiempo de incubación de 14 horas; con resultados equivalentes a  $18,6 \times 10^6$ ,  $13,2 \times 10^6$  y  $10,8 \times 10^6$  protoplastos  $g^{-1}$  de tejido fresco, respectivamente (Tabla 1).

Resultados similares fueron reportados por Tor et al. (1998), quienes obtuvieron  $12,9 \times 10^6$  protoplastos  $g^{-1}$  de tejido fresco en *Dioscorea alata* cultivar Oriental Lisbón, utilizando 1 % de celulasa combinado con 0,2 % de Macerozima en un período de incubación de 15 a 18 h.

Los resultados de la tabla 1 muestran además, que al utilizar la celulasa Onozuka R10® en ausencia de Macerozima R10®, en los distintos tiempos de incubación, no se logró aislar protoplastos. Estos resultados son iguales a los reportados para el aislamiento de protoplastos a partir de *Hypericum perforatum* L, donde la celulasa por sí sola no logró aislar protoplastos (Saker et al. 1999). De igual forma, Uchimiya y

**Tabla 1.** Número promedio de Protoplastos aislados en cada combinación enzimática y tiempo de incubación

Combinación enzimática		Número promedio de protoplastos			
		Tiempo incubación (h)			
%p/v Celulasa R10®	%p/v Macerozima R10®	6	10	14	18
1,5	0	0	0	0	0
1,5	0,2	25583	119194	163111	5389
1,5	0,4	2778	24028	46111	54722
1,5	0,5	9306	60417	53750	7778
1	0	0	0	0	0
1	0,2	20111	34584	22723	12556
1	0,4	12778	11639	69416	13306
1	0,5	49942	122111	125945	280000
0,5	0	0	0	0	0
0,5	0,2	69723	99000	199000	140972
0,5	0,4	8472	23472	25228	76806
0,5	0,5	41945	27945	30139	7500
0	0	0	0	0	0
0	0,2	0	3584	0	1667
0	0,4	3195	58167	6167	23639
0	0,5	0	6334	17417	1750

Murashige (1974), observaron que la celulasa por sí sola es completamente ineficiente para la liberación de protoplastos a partir de células en suspensión de *Nicotiana tabacum* L. cultivar "Bright yellow"; por lo cual, ellos sugieren que algunas celulasas comercialmente disponibles están contaminadas con hemicelulasa y/o pectinasa, y que estos contaminantes pueden ser la razón del por qué alguna preparación de celulasa es efectiva cuando se usa sola. Por el contrario, al realizar ensayos con Macerozima R10® sin celulasa, se logró aislar protoplastos, obteniéndose una cantidad relativamente alta cuando se emplea Macerozima al 0,4 % por 10 h (58167 protoplastos mL<sup>-1</sup>, equivalente a 3,8 x10<sup>6</sup> protoplastos g<sup>-1</sup>). Así mismo, Divakaran et al. (2008) reportan el aislamiento de protoplastos a partir de especies de *Vanilla* empleando solamente Macerozima R10. Esto se debe a que la Macerozima R10® es un preparado comercial compuesto de pectinasa, celulasa y hemicelulasa, lo que le permite a ésta enzima aislar protoplastos cuando se utiliza sola. Por otra parte, resultados reportados para vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash) muestran que el uso adicional de pectinasa permite obtener un aumento en el rendimiento de obtención de protoplasto (Prasertsongsun 2004).

El análisis de varianza realizado mostró diferencia altamente significativa en cuanto al número de protoplastos aislados para cada uno de los niveles de cada factor y la interacción entre ellos ( $p < 0.01$ ). En la prueba de separación de medias de Tukey a nivel del 5 %, se presentó que para la Macerozima R10® los mayores valores de protoplastos se obtuvieron en los niveles 0,2 y 0,5 % (con 57309 y 52640 protoplastos mL<sup>-1</sup>, respectivamente), los cuales no presentaron diferencia estadística significativa entre sí, pero si la presentan con respecto a los niveles 0 y 0,4 % (Tabla 2).

Para la Celulasa Onozuka R10® los mayores promedios de protoplastos se obtuvieron en los niveles de 1 y 0,5 %, con 48443 y 47703 protoplastos mL<sup>-1</sup> sin que exista diferencia estadística significativa entre estos, pero si difieren significativamente de los niveles 0 y 1,5 %. En el análisis del tiempo los mayores promedios de protoplastos se obtuvieron con los niveles 14 y 18, con 48253 y 39115 respectivamente, y no presentan diferencia estadística entre sí, pero si con los niveles 6 y 10 horas (Tabla 2). El análisis estadístico muestra que la Macerozima R10® ejerce una mayor influencia en cuanto a la producción de protoplastos, donde en ausencia de ésta no es posible aislar protoplastos con ninguna de las

**Tabla 2.** Prueba de comparación de medias de Tukey al 5% para los factores principales

Factor celulasa	Protoplastos <sup>1</sup>	Factor macerozima	Protoplastos <sup>1</sup>	Factor tiempo	Protoplastos <sup>1</sup>
0,0	7619,8 c	0,0	0,0 c	6	15237,8 c
0,5	47703,1 a	0,2	57309,0 a	10	36904,5 b
1,0	48442,7 a	0,4	29560,8 b	14	48253,5 a
1,5	35744,8 b	0,5	52640,6 a	18	39114,6 a

Nota: Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales

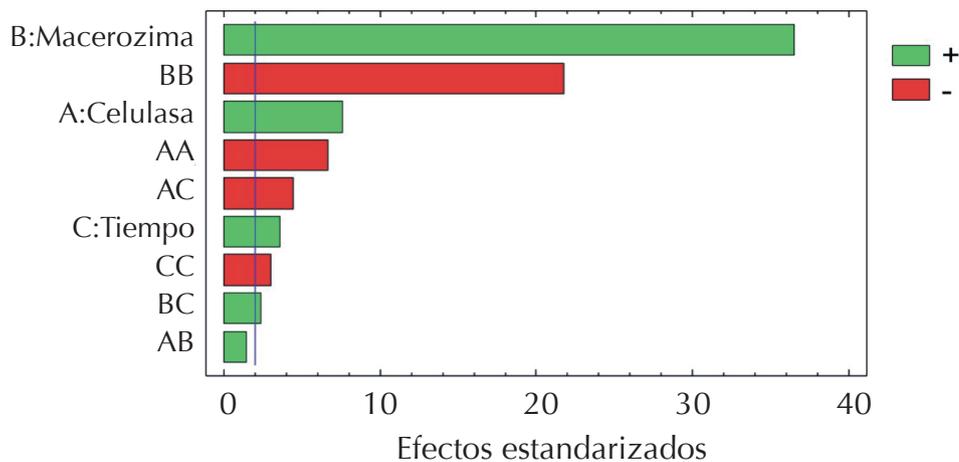
concentraciones de celulasa utilizadas y en los diferentes tiempos de incubación. Sin embargo, la celulasa y el tiempo también influyen en el aislamiento, pero su efecto es menor que el de la macerozima, lo cual fue corroborado con el gráfico de efectos estandarizados de Pareto, donde se mide la influencia positiva y negativa de cada factor y sus interacciones en el aislamiento de protoplastos (Figura 3).

La mejor combinación enzimática para el aislamiento de protoplasto fue la de 1% de Celulasa con 0,5 % de Macerozima, seguido de 0,5 % de Celulasa con 0,2 % de Macerozima, las cuales no presentan diferencia estadística significativa entre ellas, pero si con las demás combinaciones (Tabla 2).

Las interacciones macerozima\*tiempo y macerozima\*celulasa, muestran un efecto positivo en la obtención de protoplastos, sin embargo, éste efecto no es superior al obtenido con la macerozima (Figura 3), lo que se debe probablemente a que se necesita que ésta actúe para que posteriormente actúe la celulasa lo que implica un sinergismo entre las enzimas

utilizadas en el proceso de aislamiento.

Por el contrario, la interacción celulasa por tiempo ejerce un efecto negativo sobre la producción de protoplastos (Figura 3), lo que explica la disminución drástica de la cantidad de protoplastos aislados a medida que aumenta el tiempo y las concentraciones de celulasa (Tabla 1), hecho que es soportado por los daños que puede sufrir la membrana celular a causa de la enzima cuando se utilizan tiempos prolongados de incubación, provocando la liberación de enzimas proteolíticas, sustancias fenólicas y cristales de calcio como los rafidios, que pueden dañar y romper los protoplastos y por tanto afectar su viabilidad (Babaogiu 2000; Kanchanapoom et al. 2001; Polci y Friedrich 2004). Albersheim y Darvill (1985), observaron que los fragmentos de pared celular obtenidos por hidrólisis acida parcial, pueden inducir necrosis a los protoplastos, sugiriendo que la muerte de las células vegetales por enzimas degradadoras de la pared celular puede ser mediada por fragmentos de pared celular solubilizadas por estas enzimas.



**Figura 3.** Efectos Estandarizados de Pareto para la Influencia de los factores y sus interacciones en el aislamiento de protoplastos. Influencia positiva (+), Influencia negativa (-)

Al reemplazar los valores de los factores en la ecuación logarítmica, el mayor valor estimado para el número de protoplastos fue de 230556 protoplastos mL<sup>-1</sup> (equivalente a 15,3 x10<sup>6</sup> protoplastos g<sup>-1</sup> de tejido) con una combinación de 0,96 % de Celulasa Onozuka R10 y 0,36 % de Macerozima R10, a un tiempo de incubación de 13,99 horas, siendo ésta la condición óptima para el aislamiento de protoplastos arrojada por el análisis de regresión. El modelo de regresión presentó un R<sup>2</sup> del 0,84, lo que indica que los factores evaluados y sus combinaciones explican en un 84 % la variabilidad de la cantidad de protoplastos aislados y viables.

## CONCLUSIONES

El método enzimático nos permite aislar grandes cantidades de protoplastos a partir de mesófilo de *Dioscorea alata* cultivar "Pico de Botella"; en este proceso influye la edad tejido, el área de exposición del material vegetal a las enzimas, las condiciones de incubación enzimática y medios de aislamiento y cultivo de protoplastos. Es así, por ejemplo, el tamaño de los protoplastos aislados de hojas de vitroplantas depende del tamaño y la edad del material vegetal utilizado. Es importante corroborar la capacidad de regenerativa de los protoplastos por técnicas que nos permita dilucidar la viabilidad de los mismos de restablecer su pared celular, crecer, dividirse y formar microcolonias y microcallos.

## REFERENCIAS

- Agudelo, L.; Pedrosa, M.R., Carranza, J., Cardozo, P. F., Torres, M. y Acevedo, F. 1995.** Estudio base para la identificación de líneas de acción del trabajo en Biotecnología con pequeños y medianos productores agropecuarios en la Costa Atlántica. Programa de Biotecnología, Gobierno de Holanda. CORPOICA. Programa Nacional de Estudios Socioeconómicos. Centro de Investigación Turipaná, Regional 2 de Corpoica, p51.
- Albersheim, P. and Darvill, A. 1985.** Oligosaccharins. En: Ishii, S. 1988. Factors Influencing Protoplast Viability of Suspensión-Cultured Rice Cells during Isolation Process. Plant Physiology 88: 26-29.
- Álvarez, A. 2000.** Prácticas agronómicas para el cultivo de ñame. En: Guzmán, M. y Buitrago, G. Ñame: Producción de semillas por biotecnología. Editorial Unibiblos, Bogotá, p33-39.
- Alves, C., Quecini, V. and Viera, M. 1999.** Plant transformation: Advances and Perspectives. Scientia Agricola 56 (1): 1-8.
- Assani, A., Haicour, R., Wenzel, G., Côte, F., Bakry, F., Foroughi-Wehr, B., Ducreux, G., Aguillar, M.-E. and Grapin, A. 2001.** Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (Musa spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic

embryogenesis. Plant Cell Rep. 20: 482-488.

**Azpíroz, S. 1994.** La biotecnia y el sector agropecuario. Agronomía mesoamericana 5: 140-158.

**Babaogiu, M. 2000.** Protoplast Isolation in lupin (*Lupinus mutabilis* sweet): Determination of optimum Explant sources and Isolation conditions. Turkish Journal of Botany 24: 177-185.

**Cogne, A. 2002.** Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: *Dioscorea sylvatica* (Dioscoreaceae), *Urginea altissima* (Liliaceae), *Jamesbrittenia fodina* and *Jamesbrittenia elegantissima* (Scrophulariaceae). Thèse de doctorat Pharmacognosie et Phytochimie, Universidad de Lausanne (Suiza), Lausanne.

**Cohen A., Lipsky A., Arazi T., Ion A., Stav R., Sandler-Ziv D., Pintea C., Barg R., Salts Y., Shabtai S., Gaba V., Gera A., 2004.** Efficient genetic transformation of *Lilium longifolium* and *Ornithogalum dubium* by particle acceleration followed by prolonged selection in liquid medium. Acta Horticulturae 651: 131-138.

**Díaz, M.; Zappacosta, D.; Franzone, P.; Ríos, R. 2004.** Transformación genética. En: Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Ed). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA, Buenos Aires, p109-123.

**Divakaran, M., Pillai, G., Nirmal, K. and Peter, K. 2008.** Isolation and fusion of protoplasts in Vanilla species. Current Science, 94 (1): 115-120.

**Geerts, P., Druart, P., Ochatt, S. and Baudoin, J. 2008.** Protoplast fusion technology for somatic hybridisation in Phaseolus. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement 12 (1): 41-46.

**Guangyu, CH., Conner, A., Christey, M., Fautrier, A. and Field, R. 1997.** Protoplast isolation from shoots of asparagus cultures. International Journal of Plant Sciences 158 (5): 537-542.

**Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J., y Rodríguez, B. 2003.** Mejoramiento genético vegetal in vitro. e-Gnosis 1: 1-19.

**ICA, 2009.** Exportadores de ñame de la mano del ICA. [www.ica.gov.co/Noticias/Agrícola/2009/Exportadores-name-de-la-mano-del-ICA.aspx](http://www.ica.gov.co/Noticias/Agrícola/2009/Exportadores-name-de-la-mano-del-ICA.aspx)

**Kanchanapoom, K., Jantaro, S. and Rakchad, D. 2001.** Isolation and Fusion of Protoplasts from Mesophyll Cells of *Dendrobium Pompadour*. Science Asia 27: 29-34.

**Levitus, G., Rivero, M., Segretin, M., Morgenfeld, M., Zelada, A., Martinez, C., Gudesblat, G., Modena, N. y Mencacci, N. 2005.** Agrobiotecnología: Guía de trabajos prácticos. Departamento de Fisiología,

Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, p76.

**Lin, W. 1983.** Isolation of Mesophyll Protoplasts from Mature Leaves of Soybeans. *Plant Physiology* 73: 1067-1069

**Mantell, S. 1994.** Summary of the Final report of EU Contract TS2-A-117: Development of anthracnose disease resistant *Dioscorea* yams using somatic fusion techniques. En: Tor, M., Twyfor, T., Funes, I., Baccon, J., Ainswoth, C. and Mantell, S. 1998. Isolation and Culture of Protoplasts from Immature leaves and embryogenic Cell Suspensions of *Dioscorea* yams: tools for transient gene expression studies. *Plant cell Tissue and Organ Culture* 53:113-125.

**Minagricultura: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2004.** Anuario estadístico del sector agropecuario. Dirección de Política Sectorial – Grupo Sistemas de Información. Editorial Bochica Ltda, Bogotá, p272.

**Narayanaswamy, P. 1994.** Development of In vitro plant regeneration and RAPD genetic fingerprinting of food yams (*Dioscorea alata* L). Ph.D. thesis, Wye College, University of London (UK), London.

**Prasertsongskun, S. 2004.** Isolation and culture of suspension protoplasts of vetiver. *Journal of Science and Technology* 26 (3): 411-416

**Perea, M. 2000.** Utilización de los sistemas In vitro para la obtención de plantas de ñame (*Dioscorea* spp) libre de patógenos. En: Guzmán, M y Buitrago, G. Ñame: Producción de semillas por biotecnología, Unibiblos, Bogotá, p41– 53.

**Pérez, A. 2010.** Ñameros se preparan con el ICA para exportar en grande. Cartagena de Indias. El Universal. URL: <http://www.eluniversal.com.co/v2/sincelejo/economica/nameros-se-preparan-con-el-ica-para-exportar-en-grande> [07 Abril 2010]

**Pérez, J., Albert, D., Rosete, S., Sotolongo, L., Fernández, M., Delprete, P. y Raz, L. 2005.** Consideraciones etnobotánicas sobre el género *Dioscorea* (*Dioscoreaceae*) en Cuba. *Ecosistemas* 14 (2): 142-149.

**Pindel, A. 2007.** Optimization of isolation conditions of *Cymbidium* protoplasts. *Folia Horticulturae* 19 (2): 79-88

**Polci, P. y Friedrich, P. 2004.** Hibridación Somática. En: Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Ed). *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA, Buenos Aires, p97-108.

**Rodriguez, C. y Beltrán, J. 2002.** Cultivo In vitro de ñame (*Dioscorea alata*) c.v “Pico de Botella” a partir de segmentos nodales. Tesis de Biología con énfasis en Biotecnología, Universidad de Sucre. Sincelejo.

- Saker, S., Neuman, K. H., Badawy, E. M., EL-Bahr, M. K. and Taha, H. S. 1999.** Isolation and Culturing of Protoplasts from *Hypericum perforatum* L. Arab Journal of Biotechnology 2(2): 227-234.
- Sauer, A. and Walther, F. 1987.** Protoplast Culture of *Dioscorea opposita* Thumb (*Dioscorea batatas* Decne). En: Tor, M., Twyfor, T., Funes, I., Baccon, J., Ainswoth, C. and Mantell, S. 1998. Isolation and Culture of Protoplasts from Immature leaves and Embryogenic Cell Suspensions of *Dioscorea* yams: tools for transient gene expression studies. Plant cell, Tissue and Organ Culture 53:113-125.
- Shepard, J. and Totten, R. 1977.** Mesophyll cell protoplast of potato; Isolation, proliferation and plant regeneration. Plant physiol 60: 313-316.
- Shillito, R., Caeswell, G., Johnson, C., Dimalo, J. and Harms, C. 1989.** Regeneration of Fertile Plants from Protoplast of elite inbred Maize. Research papers, Bio/Technology 7: 581-587.
- Sutiojono, E., Nonhebel, H. and Kantharajah, A. 1998.** Factor Affecting Protoplast Culture of Cucumis melo "Green Delica". Annals of Botany 81: 775-777.
- Tor, M., Twyfor, T., Funes, I., Baccon, J., Ainswoth, C. and Mantell, S. 1998.** Isolation and Culture of Protoplasts from Immature leaves and embryogenic Cell Suspensions of *Dioscorea* yams: tools for transient gene expression studies. Plant cell, Tissue and Organ Culture 53: 113-125.
- Twyford, C. and Mantell, S., 1996.** Production of somatic embryos and plantlets from root cells of the greater yam. Plant cell, Tissue and organ culture 46 (1): 17-26.
- Uchimiya, H. and Murashige, T. 1974.** Evaluation of Parameters in the Isolation of Viable Protoplasts from Cultured Tobacco Cells. Plant Physiology 54: p936-944.