

Aislamiento enzimático de protoplastos a partir del mesófilo de vitroplantas de *Gynerium sagittatum* Aubl. Beauv. cv. “Criolla”

Enzymatic isolation of protoplasts from the mesophylus of vitroplants Gynerium sagittatum Aubl. Beauv. cv. “Criolla”

Luis Ramiro Ricardo-Navarro* Javier Darío Beltrán Herrera ** María José Baquero Garrido***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v25n1.104551

RESUMEN

Gynerium sagittatum es una gramínea ampliamente utilizada en la costa Caribe colombiana como fuente de fibra natural para la elaboración de artesanías, particularmente por la comunidad Zenú. En la presente investigación se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de enzimas: celulasa y macerozima a diferentes tiempos de incubación y sus interacciones en el aislamiento de protoplastos. Los protoplastos se obtuvieron del mesófilo foliar de vitroplantas de *G. sagittatum* expuesto a combinaciones enzimáticas de celulasa (1.5 y 2.0%), con macerozima (0.3, 0.6 y 0.9%), durante 3, 6 y 9 horas de incubación, para un total de 18 tratamientos con 5 réplicas cada uno. Los mayores números de protoplastos aislados correspondieron a T18 (2.0% celulasa, 0.9% macerozima), T12 (2.0% de celulasa, 0.3% macerozima), T3 (1.5% de celulasa, 0.3% de macerozima) y T6 (1.5% de celulasa, 0.6% de macerozima) por 9 horas de incubación cada uno, con valores de 88.625, 83.000, 75.000 y 53.375 protoplastos/mL respectivamente. El tiempo de incubación fue significativo en el aislamiento de los protoplastos ($p < 0.05$). Las predicciones entre factores mostraron que una interacción de 2.0% de celulasa y 0.9% de macerozima permite obtener 44.302 protoplastos/mL, mientras que las interacciones tiempo de incubación-celulasa y tiempo de incubación-macerozima mostraron que es posible obtener 72.073 y 71.212 protoplastos/mL con 2.0% de celulasa y 0.9% macerozima por 9 horas de incubación cada una respectivamente. Los resultados indican que la aplicación de estas enzimas permite obtener cantidades considerables de protoplastos de *G. sagittatum* a partir de explantes cultivados *in vitro*.

Palabras claves: aislamiento, caña flecha, celulasa, enzimas, macerozima, protoplastos, tiempo de incubación.

ABSTRACT

Gynerium sagittatum is a graminaceous plant widely used in the Caribbean coast of Colombia as a natural fiber source for the elaboration of handicrafts, particularly by the Zenú community. In the present investigation, the effect of different concentrations of cellulase and macerozyme enzymes at different incubation times and their interaction in the

* Biólogo. Universidad de Sucre, Colombia. Facultad de Educación y Ciencias Sede Puerta Roja. Sincelejo, Sucre Colombia. Estudiante de Maestría en Ciencias Ambientales Sue-Caribe. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0943-1993>, luisramiro.ricardo@gmail.com. Correspondencia del autor: Luis Ramiro Ricardo-Navarro. Barrio Puerta Roja, Sincelejo, Sucre, Colombia. Grupo de Investigación en Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Email: luisramiro.ricardo@gmail.com

** Biólogo; Universidad de Sucre. Magíster en Biología Molecular, Universidad de Bruselas, Bélgica. Doctor en Fitopatología, Universidad de Ohio, USA. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2366-9335>. javier.beltran@unisucra.edu.co

*** Bióloga, Universidad de Sucre. Magíster en Biología, Universidad de Sucre, Colombia. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6013-1737>. majobaga@yahoo.com

isolation of protoplasts was evaluated. Protoplasts were obtained from leaf mesophyll of *G. sagittatum* vitroplants exposed to enzymatic combinations of cellulase (1.5 and 2.0%), with macerozyme (0.3, 0.6 and 0.9%), for 3, 6 and 9 hours of incubation, for a total of 18 treatments with 5 replicates each. The highest numbers of isolated protoplasts corresponded to T18 (2.0% cellulase, 0.9% macerozyme), T12 (2.0% cellulase, 0.3% macerozyme), T3 (1.5% cellulase, 0.3% macerozyme) and T6 (1.5% cellulase, 0.6% macerozyme); at 9 hours incubation. The protoplast number for these treatments were: 88.625, 83.000, 75.000 and 53.375 protoplasts/mL respectively. Incubation time was significant in the isolation of protoplasts ($p < 0.05$). The predictions between the factors showed that with an interaction of 2.0% cellulase and 0.9% macerozyme it is possible to obtain 44.302 protoplasts/mL, likewise, the incubation time-cellulase and incubation time-macerozyme interactions showed that it is possible to obtain 72.073 and 71.212 protoplasts/mL with 2.0% cellulase and 0.9% macerozyme for 9 hours of incubation respectively. The results indicate that the use of these enzymes and time, allows the isolation of of protoplasts from *G. sagittatum in vitro* plants.

Keywords: isolation, arrow cane, cellulase, enzymes, macerozyme, protoplasts, incubation time.

Recibido: noviembre 30 de 2022

Aprobado: junio 10 de 2023

INTRODUCCIÓN

La caña flecha (*Gynerium sagittatum* AUBL. BEAUV) es una planta perteneciente a las gramíneas que posee tallos o cañas con longitud aproximada a los 10 metros, diámetro de 2-8 cm y se caracteriza por habitar sitios húmedos y cercanos a fuentes hídricas (Suarez *et al.*, 2017). Esta especie está ampliamente distribuida en América, desde México hasta Paraguay y en gran parte de las islas del Caribe (Hernández *et al.*, 2018). La caña flecha, se encuentra en gran parte del territorio colombiano, incluyendo los departamentos de Sucre y Córdoba donde es utilizada por la comunidad indígena Zenú como materia prima para la elaboración de artesanías de gran valor económico y cultural (Casas 2010), entre las cuales se destaca el sombrero "vueltaio", símbolo de identidad cultural colombiana (Rivera *et al.*, 2008). Se estima que existen alrededor de 18.000 personas y 5.000 familias que dependen económicamente del trabajo artesanal de la caña flecha (López *et al.*, 2021; DANE 2005).

Por otra parte, *G. sagittatum* es una especie con propiedades antiinflamatorias y fitorremediadora, ya que ha mostrado la reducción de la hiperplasia prostática benigna en roedores y la acumulación de metales pesados como el mercurio en raíces, tallos y hojas de la planta respectivamente (Domínguez *et al.*, 2020; Ortega *et al.*, 2011).

G. sagittatum es atacada fuertemente por plagas como el gusano barrenador o talador del tallo perteneciente al género *Diatraea* (Sehuanes y Flórez, 2004), hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Mucor* y *Curvularia* (Hernández y Santos, 2010) y por condiciones medioambientales, como periodos intensos de verano (Araméndiz *et al.*, 2005; Sehuanes y Flórez, 2004), al igual que la preferencia de los artesanos por el cultivar "Criolla" el cual se caracteriza por tener una fibra suave que facilita la labor artesanal (Araméndiz *et al.*,

2005, Rivera *et al.*, 2008) lo que ha ocasionado que las poblaciones naturales de este hayan tenido una disminución superior al 50%, afectando no solo a los artesanos al aumentar los costos de la fibra y reducir las ganancias por la venta de productos, sino que también tiene un impacto significativo en los ecosistemas de humedales asociados con la caña flecha (Gonzalez 1997; Araméndiz *et al.*, 2009; López y Suárez, 2018).

Los protoplastos son células vegetales que han perdido la pared celular (Avila y Yeon, 2020). Estos son obtenidos a partir de métodos mecánicos en los cuales el tejido vegetal se mantiene en una solución ligeramente hipertónica produciendo plasmólisis y luego son liberados mediante cortes realizados sobre el tejido, mientras que los métodos enzimáticos consisten en la incubación del tejido vegetal en una solución compuesta por enzimas degradadoras de pared celular, reguladores osmóticos, estabilizadores de membrana y soluciones buffer que mantienen las condiciones adecuadas de las células aisladas (Mastuti y Rosyidah, 2018). Las enzimas que generalmente son utilizadas para el aislamiento de protoplastos son de origen fúngico con actividades de celulasa, hemicelulasa y pectinasa (Echeverri *et al.*, 2019).

Los protoplastos se han convertido en sistemas exclusivos para distintos procedimientos experimentales (Park *et al.*, 2013), como, por ejemplo, la hibridación somática (Tomiczak *et al.*, 2017), transformación genética (Lin *et al.*, 2018), sistemas de expresión génica (Xu *et al.*, 2021), aislamiento de cloroplastos intactos (Lung *et al.*, 2015), gracias a la ausencia de su pared celular.

Frente a estas problemáticas, y a las ventajas de obtener protoplastos, surge la necesidad de desarrollar métodos enzimáticos de aislamiento de protoplastos evaluando el efecto de las enzimas celulasa, macerozima y tiempo de incubación que contribuyen con el concimiento para la

conservación y el mejoramiento de *G. Sagittatum* variedad Criolla frente a agentes fitosanitarios y ambientales que afectan la planta en la región Caribe colombiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja, ubicado en el municipio de Sincelejo Sucre; con posición geográfica en Colombia de 9° 18' de latitud norte y 75° 23' de longitud oeste del meridiano de Greenwich (Díaz y Carmona, 2015).

Material vegetal para el aislamiento de los protoplastos

El tejido utilizado para el aislamiento de los protoplastos consistió en hojas jóvenes provenientes de vitroplantas de caña flecha, variedad criolla, con edades entre los 45 y 55 días de cultivo, mantenidas en medio Murashige y Skoog-MS (1962) (Osorio *et al.*, 2010), con 0.1g/L de Myo-inositol, 30 g/L de Sacarosa, Tiamina 1 mg/L, y 6 g/L de Agar.

Aislamiento de los protoplastos

Para llevar a cabo el aislamiento de los protoplastos se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de celulasa (1.5% y 2.0% p/v), macerozima (0.3%, 0.6% y 0.9% p/v), en distintos tiempos de incubación (3, 6 y 9 horas) Tabla 1. La escogencia de los factores y sus niveles se debió a la revisión científica de aislamiento de protoplastos en gramíneas, familia a la que pertenece la caña flecha.

Los protoplastos fueron obtenidos a partir de hojas jóvenes de vitroplantas de *G. sagittatum*. El material vegetal fue cortado en pequeños fragmentos de 1 mm² con cuchillas estériles, hasta obtener 50 mg⁻¹ del tejido vegetal, los cuales fueron depositados en tubos eppendorf de 1.5 mL⁻¹ que contenían medio de aislamiento de protoplastos, compuesto por: Manitol 0.4 M, CaCl₂ 5 mM, KH₂PO₄ 0.8 Mm y las diferentes combinaciones enzimáticas a evaluar. El medio se ajustó a un pH de 5.5 con solución de NaOH 1N. Los tubos fueron puestos en agitación orbital a 100 rpm en oscuridad durante los distintos tiempos de incubación.

Una vez finalizado cada periodo de incubación del material vegetal en las soluciones enzimáticas, se filtraron con la ayuda de mayas de nylon de 60 µm de diámetros (Mota *et al.*, 2018), luego se centrifugaron las muestras a 2.500 rpm por 5 minutos en una microcentrifuga de mesa con control de temperatura (Micro CL 2112). El pellet obtenido fue lavado dos veces con una solución compuesta de: Manitol 0.4 M, CaCl₂ 0.5 mM, KH₂PO₄ 0.7 mM (Parihar *et al.*, 2015) y pH ajustado a 5.5 con NaOH 1N.

Finalmente, el pellet resultante se resuspendió en un medio líquido de Sales MS (1962), Manitol 0.4 M, y pH 5.5 ajustado con NaOH 1N.

Los protoplastos aislados se contaron en una cámara de Neubauer (Boeco Germany), realizándose observaciones y conteos en un microscopio Leika- DM 500.

El número de protoplastos aislados en cada unidad experimental fue calculado mediante la siguiente ecuación, descrita por Escalante (2014).

$$\text{Densidad celular} = \frac{N^{\circ} \text{ de células contadas (protoplastos)} \times 10.000}{N^{\circ} \text{ de cuadros utilizados.}}$$

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño empleado en este estudio fue un Diseño Completamente al Azar (DCA), con arreglo factorial, en el cual se evaluaron 18 tratamientos con 5 repeticiones cada uno para un total de 90 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistió de un tubo eppendorf con medio de aislamiento de protoplastos y material vegetal de *G. sagittatum*. Los resultados obtenidos, se analizaron mediante pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis, ya que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, y fueron aceptadas las diferencias estadísticas significativas cuando (p<0.05). Los análisis se realizaron con el software gratuito Infostat versión 17. Las predicciones para la obtención del mayor número de protoplastos entre las interacciones de los factores fueron realizados con el software estadístico Minitab 19 Versión gratuita.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El aislamiento de protoplastos en la especie *G. sagittatum* mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos enzimáticos con respecto al número de protoplastos aislados (p<0.05). Los mayores números de protoplastos se obtuvieron con los tratamientos enzimáticos T18, T12, T3 y T6 Tabla 1, sin diferencias significativas entre sí entre estos tratamientos. Resultados similares en cuanto al número de protoplastos obtenidos fueron reportados por Prasertsongskun (2004), quien obtuvo 8.4×10⁴ protoplastos/mL en *Vetiveria zizanioides* (Nash) utilizando una combinación enzimática de 2.0% celulasa Onozuka R10, 2.0% de macerozima R-10, con una enzima adicional (pectinasa 0.5%) por 10 horas de incubación.

Según Ren *et al.* (2020), durante el proceso de obtención de estas células existen factores determinantes que afectan el número y la calidad de las mismas, por ejemplo, el tipo de enzima, la concentración del osmótico, el tiempo

de incubación, el explante y su edad, entre otros; razón por la cual es difícil obtener constantemente altos rendimientos en la obtención de este tipo de células (Partovi *et al.*, 2017; Aqeel *et al.*, 2016; Assani *et al.*, 2001).

Por otro lado, el tamaño de los protoplastos aislados fue variable, encontrándose células entre los 12.0 y 27.6 μm de diámetro Figura 1. Fernando *et al.* (1997), encontraron tamaños de protoplastos cercanos a los de esta investigación, entre 17.0 y 20.0 μm diámetro en *Oryza sativa* L. Silva *et al.* (2012), mencionan que el tamaño de los protoplastos en monocotiledóneas es menor a 30.0 μm de diámetro y que su tamaño depende la especie, el tejido analizado y el grado de vacuolización.

Efecto de la celulasa sobre el número de protoplastos aislados

Al evaluar los niveles del factor celulasa, se encontró que no hubo diferencias estadísticas significativas entre las diferentes concentraciones utilizadas ($p > 0.05$) Figura 2A. En otras especies como *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L. y *Oriza sativa* L. pertenecientes a las gramíneas, concentraciones de celulasa iguales y por encima a 1.5% son ideales a la hora de aislar altas cantidades de protoplastos (Sung *et al.*, 2013). Al momento de aislar protoplastos en esta familia es importante disponer de una solución enzimática con altas concentraciones de celulasas, ya que los polisacáridos presentes en la pared celular de estas plantas presentan un alto grado de esterificación y al ser tratados con concentraciones bajas de

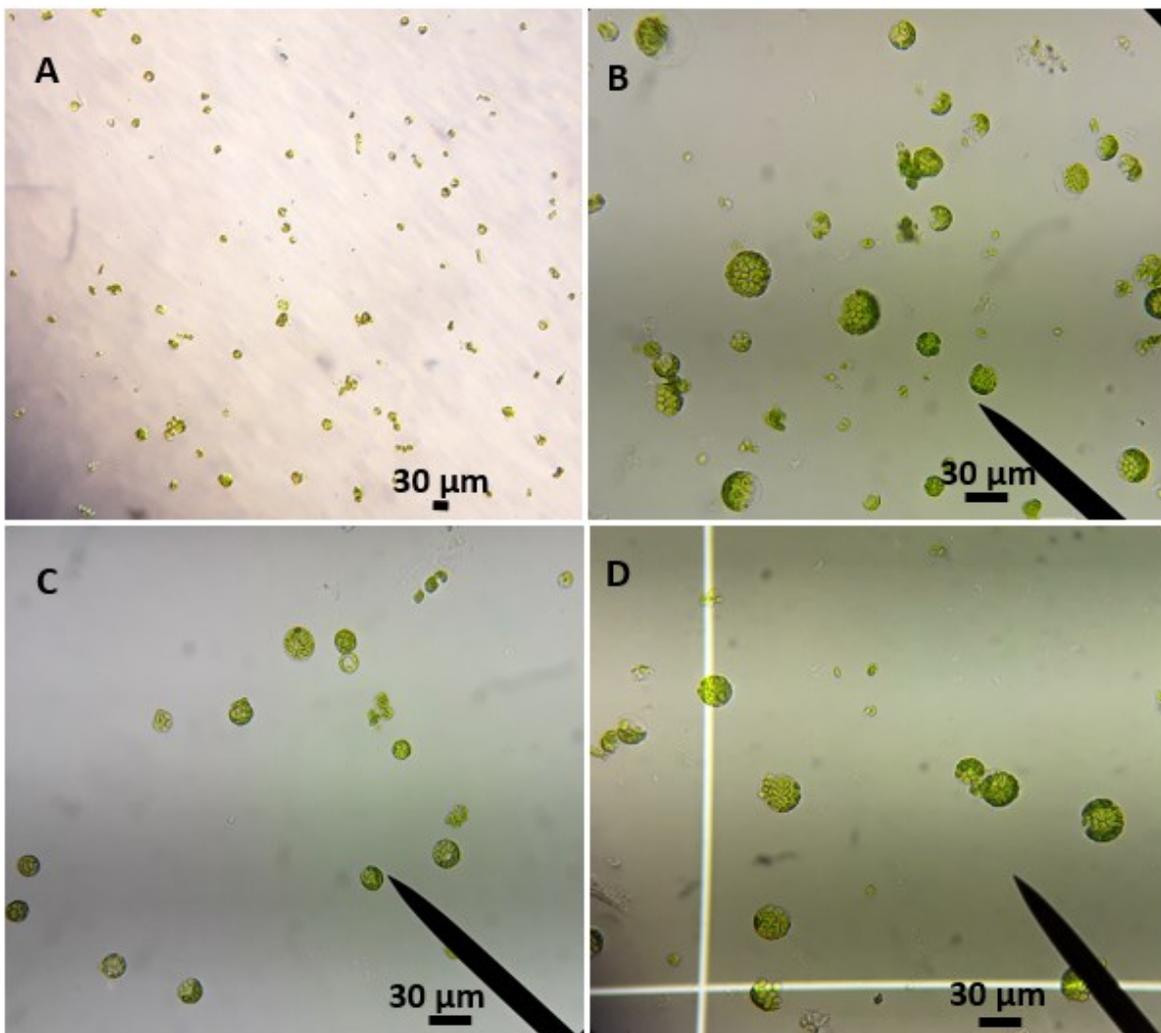


Figura 1. Protoplastos aislados a partir del mesófilo de caña fleca. (A) aislados mediante el tratamiento T18, (B) T12, (C) T3 y (D) T6.

Tabla 1. Efectos de los tratamientos enzimáticos sobre el aislamiento de protoplastos en *G. sagittatum*.

Tratamientos	Celulasa % (p/v)	Macerozima % (p/v)	Tiempo (Horas)	Protoplastos/mL ± S.E	
T1	1.5	0.3	3	5 000 ± 280	a
T2	1.5	0.3	6	17 250 ± 508	abcdef
T3	1.5	0.3	9	75 000 ± 523	ijk
T4	1.5	0.6	3	9 625 ± 319	abc
T5	1.5	0.6	6	21 375 ± 606	bcdefg
T6	1.5	0.6	9	53 375 ± 580	hijk
T7	1.5	0.9	3	16 500 ± 545	abcde
T8	1.5	0.9	6	31 375 ± 538	defghij
T9	1.5	0.9	9	40 750 ± 459	fghijk
T10	2.0	0.3	3	6 750 ± 364	ab
T11	2.0	0.3	6	21 875 ± 442	cdefgh
T12	2.0	0.3	9	83 000 ± 750	jk
T13	2.0	0.6	3	13 125 ± 395	abcd
T14	2.0	0.6	6	30 250 ± 424	defghi
T15	2.0	0.6	9	45 750 ± 637	ghijk
T16	2.0	0.9	3	12 875 ± 508	abcd
T17	2.0	0.9	6	35 875 ± 424	efghijk
T18	2.0	0.9	9	88 625 ± 538	k

Los valores representan la media±S.E (Error estándar). Diferencias estadísticas significativas cuando las medias no comparten letras en común. (Kruskal Wallis, $p < 0.05$).

estas enzimas es poco probable una actividad enzimática eficiente (Ishi y Mogi, 1983), sin embargo aumentos significativos pueden reducir la viabilidad celular, como lo reportado por Sivanandhan *et al.* (2021), quienes obtuvieron menor viabilidad en los protoplastos al aumentar la concentración de 1.5% de celulasa a 2.0% en *Brassica rapa* ssp. Pekinensis.

La hidrólisis de la celulosa se basa en la degradación de un complejo enzimático compuesto por: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas o β -glucosidasa hidrolasas; donde las primeras cortan al azar el interior de la celulosa amorfa, generando oligosacáridos de varias longitudes y, en consecuencia, nuevos extremos de cadena, mientras las exoglucanasas actúan de una manera progresiva en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas) y por último las β -glucosidasas hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Efecto de la macerozima en el número de protoplastos aislados

Los niveles de macerozima R10 evaluados con respecto al número de protoplastos aislados no fueron significativos ($p > 0.05$) Figura 2B. La macerozima es la enzima encargada de la digestión de la pectina, que es un componente principal en la laminilla media de la pared celular de los vegetales (Chawla 2002; Yamada *et al.*, 1972).

En trabajos realizados en otras monocotiledóneas como *Dioscorea alata* L., se obtuvo que la concentración de 0.2% de macerozima permitió obtener mayor número de protoplastos 57.309 protoplastos/mL (Osorio *et al.*, 2010), valor que se encuentra por encima a los reportados en este estudio en cada una de las concentraciones de macerozima evaluada. Sin embargo, se destaca la concentración de 0.3% de macerozima como óptima a la hora de aislar los protoplastos en *G. sagittatum*, ya que se logran obtener resultados similares a las concentraciones más altas evaluadas con menor cantidad de reactivo, generando reducción de costos al momento de proceso de aislamiento.

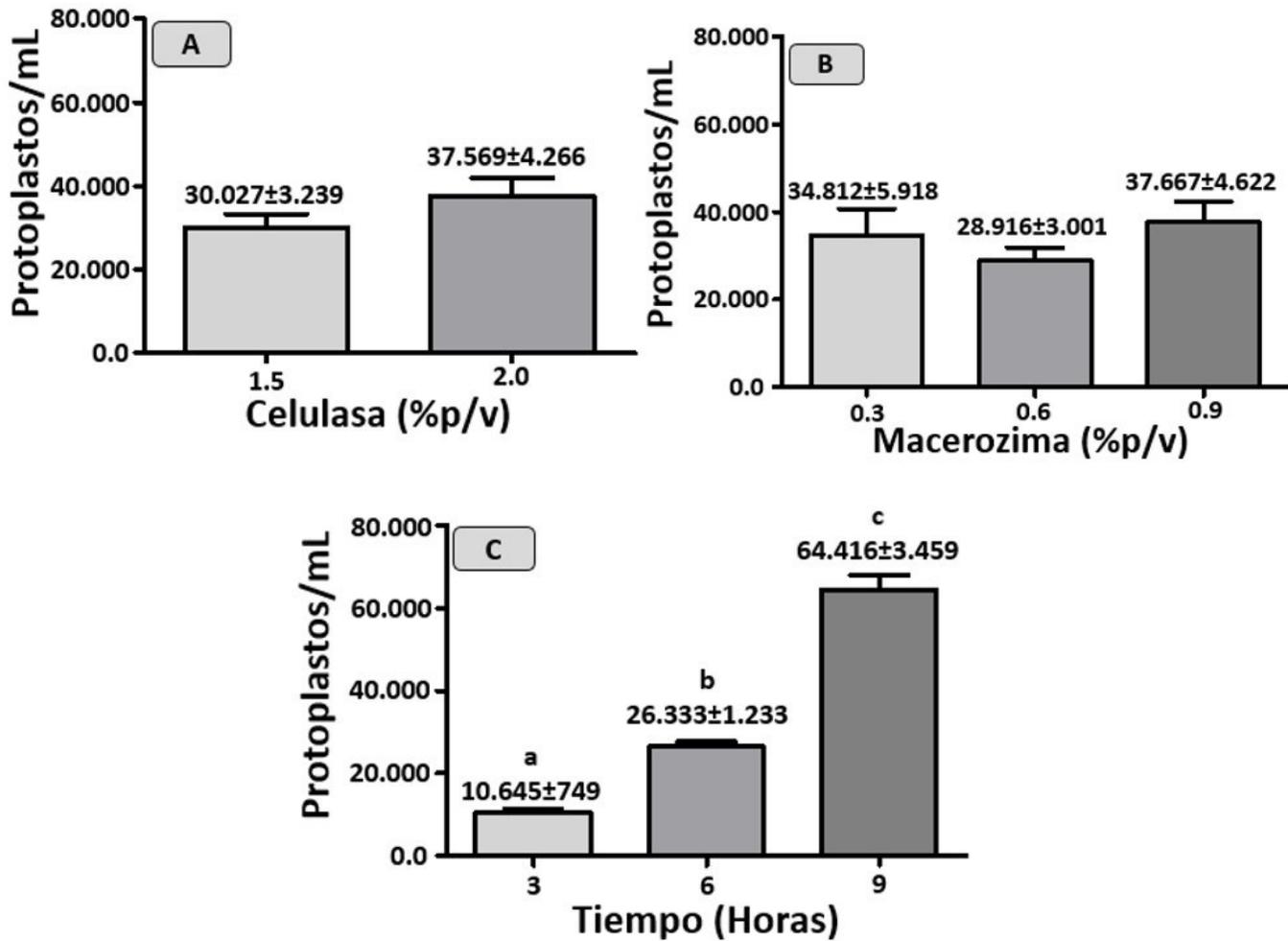


Figura 2. (A) Efecto de la celulasa, (B) macerozima y (C) tiempo de incubación sobre el número de protoplastos aislados en *G. sagittatum*. Los valores representan la media ± S.E. Diferencias estadísticas significativas cuando las medias no comparten letras en común. (Kruskal Wallis, $p < 0.05$).

Efecto del tiempo de incubación sobre el número de protoplastos

El tiempo de incubación fue significativo sobre el número de protoplastos aislados en *G. sagittatum* ($p < 0.05$) Figura 2C. El mayor número de protoplastos 64.416 protoplastos/mL se obtuvo a las 9 horas de incubación, este tiempo mostró diferencias con las 3 y 6 horas de incubación donde se aislaron 10.645 y 26.333 protoplastos/mL respectivamente. En la Figura 2C, se observa que a medida que aumenta el tiempo de incubación aumenta el número de protoplastos aislados a partir del mesófilo de caña flecha.

El tiempo de acción de la solución enzimática sobre el tejido de la planta requerido para aislar protoplastos varía entre especies vegetales, así como también la concentración de enzimas y la composición de la solución de aisla-

miento (Tee *et al.*, 2010; Adedeji *et al.*, 2020). Por ejemplo, Nassour y Dorion (2002), mencionan que una concentración de enzima baja requiere un tiempo de incubación más prolongado para comportarse como el tiempo óptimo de incubación, aunque tiempos prolongados de exposición resultan ser dañinos sobre la membrana celular de los protoplastos (Kang *et al.*, 2020).

Los resultados encontrados en este estudio con respecto al tiempo de incubación se relacionan con los encontrados en la gramínea *Vetiveria zizanioides* L., donde se aisló la mayor cantidad de protoplastos en un tiempo de 10 horas de incubación del material vegetal en la solución enzimática compuesta por 2.0% celulasa Onozuka R10, 2.0% de macerozima R-10 y 0.5% de pectinasa (Prasertsongskun 2004). En otras especies como *Echinacea angustifolia* DC., también se logró obtener los mejores rendimientos 50.0×10^4 protoplastos/g de tejido fresco durante un periodo

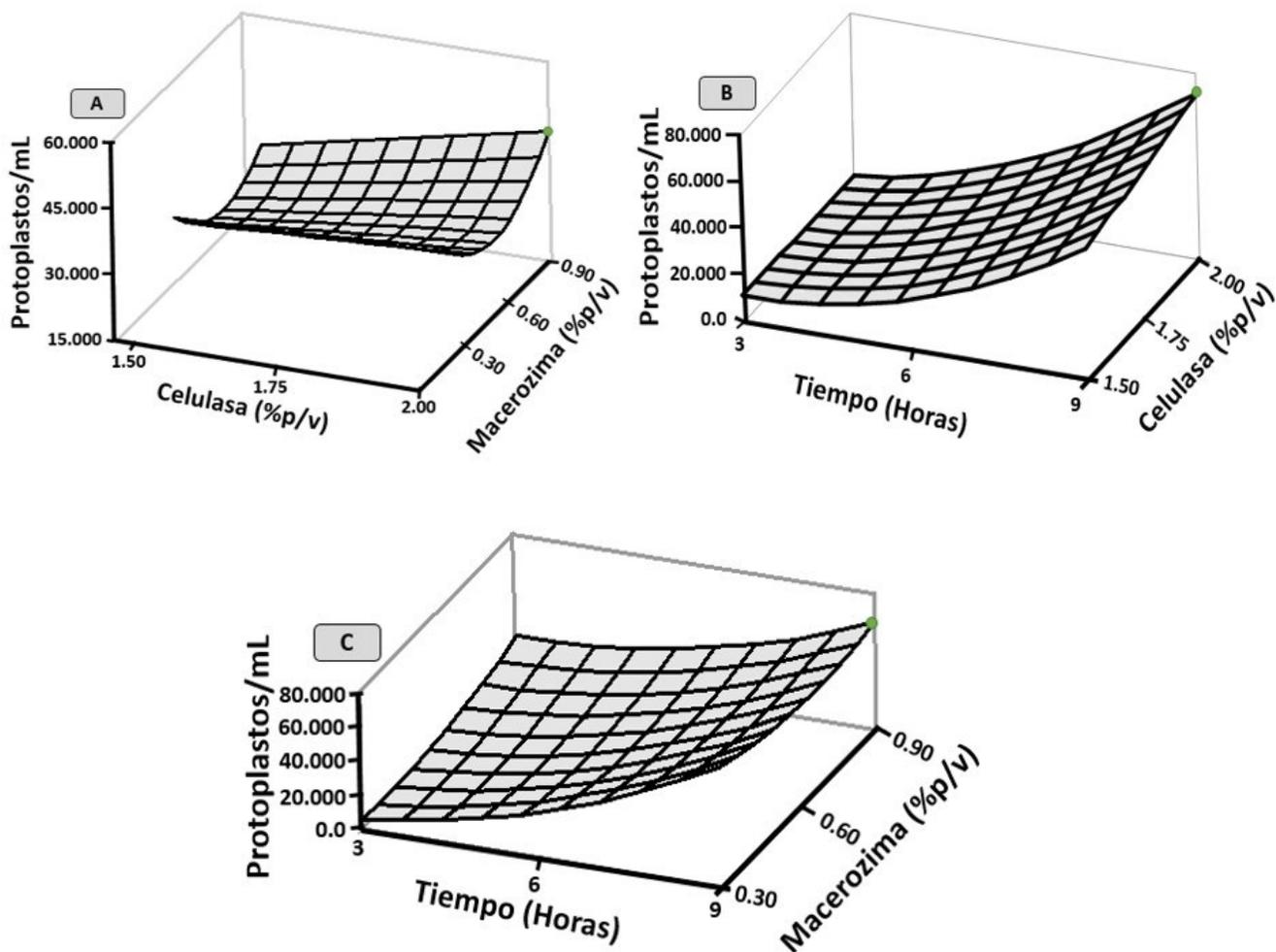


Figura 3. Aislamiento de protoplastos en *G. sagittatum* mediante la interacción celulasa-macerozima (A), tiempo-celulasa (B) y tiempo-macerozima (C).

de 8 horas de incubación del material vegetal en la solución enzimática (Liqing *et al.*, 2005).

Interacciones entre los factores sobre el número de protoplastos aislados

Las interacciones entre los factores enzimáticos mostraron que una combinación de 2.0% de celulasa y 0.9% de macerozima permite obtener un número aproximado de 44.302 protoplastos/mL Figura 3A. Estos resultados sugieren que utilizando estas concentraciones y combinaciones de enzimas es posible una alta tasa de degradación de los componentes de la pared celular por parte de las enzimas y concentraciones empleadas. Algunos autores como Mukhtar *et al.* (2012), sugieren que tanto las concentraciones de enzimas como las combinaciones dependen de factores como la edad, el genotipo y la etapa de diferenciación del tejido del cual se aislarán los protoplas-

tos. Por esta razón, se debe optimizar el tipo de explante fuente de los protoplastos y las condiciones enzimáticas para el aislamiento, ya que según Piwowarczyk y Pindel (2015), el establecimiento de una mezcla enzimática específica no solo influye en el número de protoplastos obtenidos, sino también en sus reacciones morfogénicas durante las etapas del cultivo. Además, es importante destacar que la celulasa, macerozima y/o pectinasa comercialmente disponibles son utilizadas habitualmente en conjunto para el aislamiento de protoplastos en plantas superiores (Gupta y Reddy, 2018).

Por otra parte, las interacciones entre los factores celulasa y tiempo de incubación mostraron que el mayor número de protoplastos que se puede obtener es 72.073 protoplastos/mL, con la utilización de 2.0% de celulasa por 9 horas de incubación Figura 3B. Estos resultados

muestran que a medida que transcurre el tiempo de incubación y a una concentración de 2.0% de celulasa hay probablemente una mayor eficiencia de la enzima sobre el sustrato, aunque periodos extensos del material vegetal en la solución enzimática puede acarrear daños sobre los protoplastos (Mota *et al.*, 2018).

Las interacciones entre los factores macerozima y tiempo de incubación muestran que es posible obtener un máximo de 71.212 protoplastos/mL utilizando una combinación de 0.9% de macerozima por 9 horas de incubación del tejido vegetal en la solución enzimática Figura 3C. Estos resultados evidencian que, al aumentar los tiempos de incubación del material vegetal en las soluciones enzimáticas, independientemente de la concentración de la enzima, se genera un efecto positivo del factor tiempo sobre el número de protoplastos aislados en caña flecha, aunque se debe evaluar la viabilidad de estos protoplastos con el fin de conocer su estado de funcionalidad, ya que cuando se somete el material vegetal a periodos extensos de actividad enzimática las células aisladas pueden presentar daños en su membrana celular a causa de lisis, que posteriormente traerá la liberación de enzimas hidrolíticas y compuestos oxidantes que pueden dañar al resto de los protoplastos presentes en la suspensión (Polci y Friedrich, 2004).

CONCLUSIONES

El aislamiento de los protoplastos en *G. sagittatum* es posible, empleando mezclas de enzimas comerciales como celulasa y macerozima a diferentes tiempos de incubación. Un periodo de incubación de 9 horas es ideal para la obtención de 64.416 protoplastos/mL, además resultó ser un factor crítico a la hora de obtener protoplastos en *G. sagittatum*. Los valores de predicción establecen que una combinación de 2.0% de celulasa y 0.9% de macerozima permite obtener 44.302 protoplastos/mL, mientras que con un tiempo de 9 horas de incubación combinado con 2.0% de celulasa y 0.9% de macerozima se pueden obtener 72.073 y 71.212 protoplastos/mL respectivamente. Es importante evaluar la viabilidad de los protoplastos obtenidos mediante este método, ya que esta condición es indispensable para seguir las etapas de cultivo, transformación, hibridación y regeneración de nuevas plantas de caña flecha. Adicionalmente, esta investigación contribuye a iniciar los estudios de mejoramiento genético de la caña flecha a través del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre por el apoyo logísti-

co durante la fase de experimentación, en especial a los asistentes del laboratorio Hernán José Maya Durán y Erika Arroyo Martínez, así como también a las biólogas Luisa Martínez y Kelly Mercado Leguía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aramendiz, H., Espitia, M., Robles, J. (2005). Colección, conservación, caracterización morfoagronómica y producción de semillas de caña flecha *Gynerium sagittatum* (Aubl.) del Caribe Colombiano. Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.
- Araméndiz, H., Espitia, M., Cardona, C. (2009). Valoración de los recursos filogenéticos de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) en el caribe colombiano. Produccion, Bogotá, 108p.
- Adedeji, O.S., Naing, A.H. Kim, C.K. (2020). Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derived calli of *Chrysanthemum* Cv. White ND. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 141, 571-581. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01816-3>
- Assani, A., Haicour, R., Wenzel, G., Cote, F., Bakry, F., Foroughi-Wehr. (2001). Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa spp.*, Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep*, 20(6), 482-488.
- Aqeel, R., Zehra, M., Kazmi, S.K., Khan, S. (2016). A study on the isolation of protoplasts from mesophyll cells of *Dendrobium* Queen PINK. *Pak. J. Bot*, 48(2), 693-697. [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/48\(2\)/36.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/48(2)/36.pdf)
- Arias, L., Castro, L. (2016). Formulación y evaluación del proyecto de fabricación y distribución de Sombreros Vueltiaos. Bogotá D.C. Colombia. Universidad Nueva Granada. [https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/15494/AriasGuti% c 3 % a 9 rez Laura Gissel 2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/15494/AriasGuti%c3%a9rezLauraGissel2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Avila, J., Yeon, B. (2020). Protoplast Production from *Sphacelaria fusca* (Sphacelariales, Phaeophyceae) Using Commercial Enzymes. *Journal of Marine Bioscience and Biotechnology*, 12 (1), 50-58. <https://doi.org/10.15433/ksmb.2020.12.1.050>
- Casas, L. (2010). Cartilla para la producción sostenible de artesanías en caña de flecha. Bogotá D.C: Artesanías de Colombia. <https://repositorio.artesaniadescolombia.com.co/handle/001/3805>
- Chawla, H. (2002). Introduction to plant biotechnology. Enfield, New Hampshire, Science Publishers, Inc. p 87. https://books.google.com.co/books?id=RgQLISN8zT8C&printsec=frontcover&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2005). Censo general 2005. http://www.dane.gov.co/centso/files/libroCenso2005_nacional.pdf

- Díaz, L.C., Carmona, O.E. (2015). Optimización de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea spp.* por crecimiento mínimo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17 (1), 32-39. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50842>
- Domínguez, L.R. (2020). Efecto beneficioso del extracto metanólico de *Gynerium sagittatum* (caña brava) en la hiperplasia prostática benigna inducida por testosterona en ratas en comparación con finasteride. *Lima Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, p 34. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11662/Dominguez_hl.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Echeverri, D., Romo, J., Giraldo, N., Atehortúa, J. (2019). Microalgae protoplasts isolation and fusion for biotechnology research. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21 (1), 71-82. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.80248>
- Escalante, R. (2014). Embriogénesis somática y cultivo de protoplastos para la micropropagación de *Handroanthus billbergii*, *Myroxylon peruiferum* y *Centrolobium ochroxylum*, especies nativas del bosque seco del Litoral Ecuatoriano. *Guayaquil*, Ecuador. Universidad de Guayaquil, p 34.
- Fernando, S., Power, J., Davey, M. (1997). Elite Rice Breeding Lines, IR 65597-134-2 and IR 65598-112-2. *Tropical Agricultural Research*, 1997 (9), 15-25. <http://dl.nsf.gov.lk/bitstream/handle/1/12254/PGIATAR915.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Gonzalez, O. (1997). Situación de dos métodos de siembra por estacas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) de la variedad "Martinera" en la región de *Montelibano*, Córdoba. Universidad de Córdoba, *Montería*. P 98.
- Gutiérrez, I., Moreno, N., Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación del hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2015 (1), 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Gupta V, Reddy, C.R.K. (2018). A simple protocol for a rapid and consistent production of a large number of viable protoplasts from the Ulvophyceae species. In: Charrier B, Wichard T, Reddy CRK (eds) *Protocols for macroalgae research*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/b21460-7>
- Hernández, J. L., Jarma, A., Humanes, A., Durango, E. (2018). Estabilidad de rendimientos de 5 genotipos de *Gynerium sagittatum* AUBL., bajo dos niveles de fertilización en diez localidades del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 10 (1), 15-26. <https://doi.org/10.22490/21456453.2212>
- Hernández, D., Santos, M. (2010). Identificación morfológica de hongos Fitopatógenos presentes en caña flecha *Gynerium sagittatum* y su relación con lesiones en el tejido de la planta. *Sincelejo*, Sucre. Colombia: Universidad de Sucre.
- Ishii, S., Mogi, Y. (1983). Identification of Enzymes That Are Effective for Isolating Protoplasts from Grass Leaves. *Plant Physiology*, 72 (3), 641-644. <https://doi.org/10.1104/pp.72.3.641>
- Kang, H. H., Naing, A. H., Kim C. K. (2020). Protoplast isolation and shoot regeneration from protoplast-derive callus of *Petunia hybrida* CV. Mirage Rose. *Biología*, 9 (8), 1-13. <https://doi.org/10.3390/biology9080228>
- Lin, H. Y; Chen, J. C; Fang, S. C. (2018). A Protoplast Transient Expression System to Enable Molecular, Cellular, and Functional Studies in *Phalaenopsis* orchids. *Frontiers in Plant Science*, 9 (843), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00843>
- Liqing, Z., Bochu, W., Jing, Z., Lingxi, C., Chuanyun, D., Chuanren, D. (2005). Protoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 44 (1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.05.002>
- López, C., Suárez, I. (2018). Multiplicación *in vitro* de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) en medio de doble fase. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 3 (2), 5-13.
- Lung, S. C., Smith, M. D., Chuong, S. D. (2015). Isolation of Chloroplasts from Plant Protoplasts. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015 (10), 895-200. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot074559>
- Mastuti, R., Rosyidah, M. (2018). *In vitro* enzymatic isolation of protoplasts from tissues of the medicinal plant *Physalis angulata* L. AIP Conference Proceedings. 2019, 020002 (2018). <https://doi.org/10.1063/1.5061838>
- Mota, L., Herrera, G., Ayora, T., Santana, N., López, G. (2018). Isolation and regeneration of protoplast from leaf explants *Rhyncholealia digbyana*. *African Journal of Biotechnology*, 17 (35), 1082-1089. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16540>
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Mukhtar, I., Bajwa, R., Nasimi, G. (2012). Isolation of Mesophyll Protoplasts from Leaves of *Dalbergia sissoo* Roxb. *Journal of applied sciences and Environment management*, 16 (1), 11-15. <https://www.ajol.info/index.php/ajol>
- Nassour, M., Dorion, N. (2002). Plant regeneration from protoplasts of micropropagated *Pelargonium x hortorum* 'Alain': effect of some environmental and medium factors on protoplast system efficiency. *Plant*

- Science*, 163:169–176. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00093-6)
- Osorio, J., Bustamante, E., Macareno, M., Hernández, E., Beltrán, J. (2010). Aislamiento Enzimático de Protoplastos a Partir de Mesófilo de *Dioscorea alata* Cultivar “Pico de Botella”. *Temas Agrarios*, 15 (1), 58-70. <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/temasagrarios/article/view/812>
- Ortega, R. (2011). Acumulación de mercurio (Hg) por caña flecha (*Cyperium sagittatum*) (Aubl) Beauv. *In vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3 (1), 33-41. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77621348005>
- Park, J., Park, S., Craven, J. (2013). Protoplasts isolation and fusion. Texas, USA, Elsevier, *Plant Tissue Culture*. 147-154. <https://biot202.files.wordpress.com/2015/09/plant-tissue-culture-third-edition-techniques-and-experiments-by-roberta-h-smith.pdf>
- Parihar A., Pachchigar K., Mariya S. (2015). Protoplast isolation and fusion in cultivated *Cajanus cajan* (L.) Millsp. and wild species of Pigeonpea. *Research Journal of Biotechnology*, 10 (3). https://www.researchgate.net/profile/Karen-Pachchigar/publication/283471947_Protoplast_isolation_and_fusion_in_cultivated_Cajanus_cajan_L_Millsp_and_wild_species_of_Pigeonpea/links/57da2df708ae0c0081efc606/Protoplast-isolation-and-fusion-in-cultivated-Cajanus-cajan-L-Millsp-and-wild-species-of-Pigeonpea.pdf
- Partovi, R., Farahani, F., Sheidai, M., Nejad, T. (2017). Isolation of Protoplasts Banana (*Musa acuminata* Colla) cvs. Dwarf Cavendish and Valery and Research Morphological and Cytogenetic Their Plantlets Regenerated. *Cytologia*, 82 (4), 395–401. <https://doi.org/10.1508/cytologia.82.395>
- Polci P, Friedrich P (2004). Micropropagación. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginsk L. (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Buenos Aires, Argentina, INTA: 353-362.
- Piwowarczyk, B., Pindel, A. (2015). Determination of an optimal isolation and culture conditions of grass pea protoplasts. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 96 (2), 192-202. <https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-711d9249-ae18-49ee-a672-34c020f01f2c>
- Prasertsongsun, S. (2004) Isolation and culture of suspension protoplasts of *Vetiver*. Songklanakarin. *Journal of Science and Technology*, 26 (3), 411-416. <https://www.thaiscience.info/journals/Article/SONG/10462440.pdf>
- Ren, R., Gao, J., Lu, C., Wei, Y., Jin, J., Wong, S.M., Zhu, G., Yang, F. (2020). Highly Efficient Protoplast Isolation and Transient Expression System for Functional Characterization of Flowering Related Genes in *Cymbidium* Orchids. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020 (1), 2-18. <https://doi.org/10.3390/ijms21072264>
- Rivera, H., Vallejo, F., Suarez, I. (2008). Caracterización molecular de introducciones colombianas de caña flecha utilizando la técnica AFLP. *Acta Agronómica*, 57 (4), 227-231.
- Rolland, N., Droux, M., Douce, R. (1992). Subcellular Distribution of O-Acetylserine(thiol)lyase in Cauliflower (*Brassica oleracea* L.) Inflorescence. *Plant Physiol*, (1992) 98, 927-935.
- Sehuanes, I., Flórez, H. (2004). Micropropagación *in vitro* de la caña flecha *Cyperium sagittatum* (Aubl) Beauv.cv. Criolla mediante el uso de segmentos nodales. Universidad de Sucre, *Sincelejo* Sucre.
- Sivanandhan, G., Bae, S., Sung, C., Choi, S. R., Lee, G. J., Lim Y. P. (2021). Optimization of Protoplast Isolation from Leaf Mesophylls of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) and Subsequent Transfection with a Binary Vector. *Plants*.10(12), 26-36. <https://doi.org/10.3390/plants10122636>
- Silva, J., Paiva, R., Campos, A., Rodrigues, M., Carvalho, M., Otoni, W. (2012). Protoplast production and isolation from *Etilingera elatior*. *Acta Scientiarum Agronomy*, 34 (1), 45-50. <https://www.scielo.br/j/asagr/a/8QyR9TcCJfYKJTnKZTwrh5f/?lang=en&format=pdf>
- Suarez, I., Órtiz, O., López, C. (2017). Formación *in vitro* de rizomas en caña flecha (*Cyperium sagittatum* Aubl.) y recuperación de plantas. *Temas Agrarios*, 22 (1), 9-18. <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/temasagrarios/article/view/911>
- Tee, C., Lee, P., Kiong, A., Mahmood, M. (2010). Optimization of protoplast isolation protocols using *in vitro* leaves of *Dendrobium crumenatum* (pigeon orchid). *African Journal of Agricultural Research*, 5 (19), 2685–2693. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.917.8852&rep=rep1&type=pdf>
- Tomiczak, K., Sliwiska, E., Rybczyński, J. J. (2017). Protoplast fusion in the genus *Gentiana*: genomic composition and genetic stability of somatic hybrids between *Gentiana kurroo* Royle and *G. cruciata* L. *Plant cell tissue organ culture*, 131 (2017), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1256-x>
- Xu, M., Du, Q., Tian, C., Wang, Y., Jiao, Y. (2021). Stochastic gene expression drives mesophyll protoplast regeneration. *Sciences Advances*, 11 (7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg8466>
- Yamada, Y., Kiso, K., Sekiya, J., Yasuda, T. (1972). Examination of the Conditions for Protoplast Isolation from Tobacco Cells Cultured *in vitro*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36 (6), 1055-1059. <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00021369.1972.10860365>