



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL
AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE HOJAS DE *Kalanchoe*
spp.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los
requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniera
en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autora

Gissela Dalith Torres Navarro

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación y optimización de variables significativas en el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *Kalanchoe* spp., a través de reuniones periódicas con la estudiante Gissela Dalith Torres Navarro, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster Universitario en Biotecnología Celular y Molecular
de Plantas

C.I. 171809270-1

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación y optimización de variables significativas en el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *Kalanchoe* spp., de las estudiantes Gissela Dalith Torres Navarro, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Wilson David Tapia López

Máster en Gestión y Planificación Ambiental

C.I. 171420528-1

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Gissela Dalith Torres Navarro

C.I. 172376948-3

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por permitirme un futuro mejor, por el esfuerzo que hacen día a día, por todo su cariño y comprensión.

A Fernando Rivas por su apoyo y guía a lo largo del desarrollo de este trabajo y a Wilson Tapia por toda su colaboración.

A la Universidad de las Américas por fomentar mi conocimiento y brindarme los recursos necesarios para hacer ciencia.

A mis amigos que me han alentado en los momentos más difíciles.

DEDICATORIA

A las personas más importantes de mi vida, que a lo largo de esta etapa he sentido su constante apoyo, y a pesar de la distancia su cariño es palpable día a día.

A mi familia, por todo el sacrificio, por educarme e inculcarme valores que me han convertido en lo que ahora soy, es un orgullo ser su hija.

Todo mi esfuerzo es por ustedes, les amo mucho.

RESUMEN

Uno de los componentes de la célula vegetal es la pared celular, esta estructura puede ser removida mediante métodos tanto mecánicos, como enzimáticos, dejando expuesta a la membrana celular; a estas células se las denomina protoplastos y pueden ser extraídos a partir de diferentes tipos de tejidos vegetales. Los protoplastos son empleados favorablemente en la inducción de variación somaclonal y en la micropropagación de plantas, aumentando la probabilidad de cultivos con diferencias genéticas positivas. El aislamiento de protoplastos es un tema de interés en el campo de la biotecnología vegetal, debido a sus diferentes aplicaciones investigativas. Actualmente, los protoplastos son la base de una extensa investigación científica sobre fisiología, morfología, bioquímica y genética de plantas, de ahí la importancia de aislar protoplastos de una manera óptima. Mediante el desarrollo de este trabajo, se identificó la influencia de las variables responsables de la degradación de la pared vegetal, empleando un diseño estadístico de Plackett-Burman, obteniendo como resultados la celulasa y el manitol como variables significativas. Para la optimización, se empleó un diseño central compuesto de dos factores. Como resultados se obtuvieron que la mejor concentración de celulasa es de 1,3% y manitol a 0,5 M con un promedio total de $5,6 \times 10^4$ protoplastos por mL de medio de aislamiento durante 3 h de incubación a 28°C. Sin embargo, al reducir el tiempo de incubación a 1 hora manteniendo las mismas condiciones, se logró observar una mejora considerable de los resultados. Finalmente, se estableció un protocolo de aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *Kalanchoe* spp., logrando mejores resultados, tanto en el conteo de protoplastos como en la viabilidad de los mismos, obteniendo un total de $6,05 \times 10^4$ p.mL⁻¹ de medio inicial y hasta un 74,38% de protoplastos viables.

ABSTRACT

One of the components of the plant cell is the cell wall, this structure can be removed by both mechanical and enzymatic methods, leaving exposed to the cell membrane, and these cells are called protoplasts and can be extracted from different types of plant tissues. Protoplasts are favorably used in the induction of somaclonal variation and in the micropropagation of plants, increasing the probability of cultures with positive genetic differences. The isolation of protoplasts is a topic of interest in the field of plant biotechnology, due to its different investigative applications. Currently, protoplasts are the basis of extensive scientific research on physiology, morphology, biochemistry and plant genetics, hence the importance of isolating protoplasts in an optimal way. Through the development of this work, the influence of the variables responsible for the degradation of the plant wall was identified, using a statistical design of Plackett-Burman, obtaining as results the cellulase and the mannitol as significant variables. For optimization, a central design composed of two factors was used. As results, it was obtained that the best cellulase concentration is 1.3% and 0.5 M mannitol with a total average of 5.6×10^4 protoplasts per mL of isolation medium during 3 hours of incubation at 28 °C. However, by reducing the incubation time to 1 hour while maintaining the same conditions, a considerable improvement of the results was observed. Finally, a protoplast isolation protocol was established from leaves of *Kalanchoe* spp., achieving better results, both in the protoplast count and in their viability, obtaining a total of 6.05×10^4 p.mL⁻¹ of initial medium and up to 74.38% of viable protoplasts.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Antecedentes | 1 |
| 1.2 Planteamiento del problema | 4 |
| 1.3 Objetivos..... | 5 |
| 1.3.1 General | 5 |
| 1.3.2 Específicos | 5 |
| 1.4 Justificación | 5 |
| 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO..... | 6 |
| 2.1 Aspectos generales sobre protoplastos..... | 6 |
| 2.2 Aplicaciones..... | 9 |
| 2.2.1 Estudios relevantes sobre aislamiento de protoplastos | 11 |
| 2.3 Consideración de variables implicadas en el aislamiento de protoplastos | 15 |
| 2.3.1 Factores enzimáticos | 16 |
| 2.3.2 Factores osmóticos..... | 17 |
| 2.3.3 Factores externos | 18 |
| 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DE PLAN EXPERIMENTAL..... | 20 |
| 3.1 Diagrama experimental..... | 20 |
| 3.2 Diseños experimentales aplicados..... | 21 |
| 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS | 21 |
| 4.1 Muestra | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos | 22 |
| 4.2.1 Preparación de explantes | 22 |
| 4.2.2 Corte de explantes..... | 22 |
| 4.2.3 Digestión enzimática | 23 |
| 4.3 Diseño experimental | 24 |
| 4.3.1 Fase I: Identificación de variables significativas | 24 |
| 4.3.2 Fase II: Optimización | 26 |
| 4.4 Variables de respuesta | 28 |
| 4.4.1 Conteo de protoplastos..... | 28 |
| 4.4.2 Pruebas de viabilidad..... | 30 |
| 4.5 Evaluación estadística de los resultados..... | 30 |
| 5. CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 30 |
| 5.1 Determinación de variables significativas..... | 30 |
| 5.2 Análisis de las variables obtenidas | 37 |
| 5.2.1 Planteamiento del Diseño Central Compuesto a partir de los resultados obtenidos del Plackett- Burman..... | 37 |
| 5.2.2 Optimización mediante el diseño central compuesto | 39 |
| 5.3 Protocolo final de ejecución de acuerdo al mejor tratamiento | 43 |
| 5.4 Maximización de los resultados obtenidos..... | 48 |
| 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 49 |
| 6.1 Conclusiones | 49 |
| 6.2 Recomendaciones | 49 |
| REFERENCIAS | 51 |

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Con el avance de la biotecnología, específicamente en el campo vegetal, se han logrado desarrollar técnicas que nos permiten multiplicar masivamente plantas de interés agronómico. El cultivo de tejidos vegetales ha ocupado un rol esencial en la multiplicación de plantas clónicas con alguna característica, reemplazando en gran medida a las técnicas convencionales basadas en semillas (Abdelnou & Vincent, 1996). Existen todo tipo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, que utilizan tanto órganos con células especializadas, como las meristemáticas, hasta otras que parten de cualquier otro tejido, inclusive aquellas tan radicales que parten de células individualizadas para regenerar órganos y plantas completas. Entre estas técnicas avanzadas se han popularizado el aislamiento y cultivo de protoplastos (Hernández, Rodríguez, Gómez, & Chong, 2017).

Los protoplastos hacen referencia a las células vegetales que carecen de pared celular y su desprendimiento se realiza mediante métodos mecánicos o físicos (Johri, 1982; Lung et al., 2015; Zhai, Jung, & Vatamaniuk, 2009).

El enfoque hacia el término protoplasto, tuvo lugar al determinar que la agregación celular era posible al eliminar la pared de la célula vegetal, dando paso a la fusión, tanto de material genético nuclear, como citoplasmático. Este principio se denominó principio de la hibridación somática (Ponmurugan & Kumar, 2015).

El empleo de protoplastos con el fin de micropropagar plantas, resulta favorable para la inducción de variación somaclonal y aumentar la probabilidad de cultivos con diferencias genéticas, que son transmitidas en características deseadas. Por ejemplo, un estudio realizado en alfalfa demostró la obtención de cultivares que presentan tolerancia a suelos salinos; por otro lado, a pesar de ser considerado un evento de azar, la inducción de variación mediante protoplastos, ha sido una opción factible en plantas recalcitrantes (Gutiérrez, Santacruz, Cabrera, & Rodríguez, 2003).

Las primeras investigaciones realizadas sobre métodos de aislamiento de protoplastos, comenzaron empleando métodos mecánicos; al ser la única metodología disponible, tenían resultados aceptables. El primer reporte de aislamiento de protoplastos vegetales vivos, fue presentado por Klercker en 1892 mediante un método mecánico utilizando explantes de cebolla. El procedimiento consistió en emplear un choque osmótico generando plasmólisis en las células, las cuales posteriormente se liberan en forma de protoplastos restableciendo a su vez el medio isotónico (Johri, 1982; Lung et al., 2015; Roca & Mroginski, 1991). Sin embargo, este método presentó bajos rendimientos en el número de protoplastos obtenidos (Hofman & Anné, 2008; Lung et al., 2015).

Es así que, en 1919 se emplea un nuevo método, el cual revolucionó totalmente el ámbito de la biología vegetal, siendo este la base fundamental de los métodos actuales. Utilizando un medio enzimático extraído de los jugos gástricos de un caracol denominado *Helix pomatia*, Giaja y colaboradores degradaron la pared celular, con la consiguiente liberación de los protoplastos al medio. Cabe recalcar que la esencia misma de la degradación de la pared celular, era desconocida hasta entonces (Giaja, 1919; Rangel & Duran, 2015; Roca & Mroginski, 1991; Rosiles, Durán, & Rodríguez, 2015).

Los resultados de este método fueron prometedores, debido a la gran cantidad de protoplastos obtenidos en comparación con el método descrito por Klercker. Sin embargo, no es hasta 1960 que se empleó el método enzimático descrito por Cocking. El medio utilizado fue un degradante específico de pared celular que consistió en una preparación de celulasa, misma que fue extraída del hongo *Myrothecium verrucaria*, logrando de esta manera protoplastos de tejidos radiculares de *Solanum lycopersicum* (Brady, 1976; Cocking, 1960; Lung et al., 2015; Roca & Mroginski, 1991).

En la actualidad, el método enzimático para la obtención de protoplastos se basa en la incubación de un tejido vegetal determinado, en una solución que contiene enzimas especializadas en la degradación de la pared celular. Esta mezcla enzimática se compone generalmente de celulasa, pectinasa y hemicelulasa, las cuales son obtenidas comercialmente (Rangel & Duran,

2015; Rosiles et al., 2015; Szabados, 1991a). Para el empleo de este método deben considerarse ciertos factores, entre los cuales están: los diferentes tipos de enzimas empleadas, el medio de cultivo y demás componentes para lograr una estabilidad osmótica; además, el origen del tejido a partir del cual se quiere obtener protoplastos, así como las condiciones específicas de cultivo (Yeung, Stasolla, Sumner, & Huang, 2015).

Con el método enzimático, en la actualidad se han realizado numerosas investigaciones y desarrollo de protocolos a partir de diferentes tipos de tejidos y especies vegetales (Lung et al., 2015). Uno de los ejemplos de aislamiento de protoplastos se describe en un estudio liderado por Zhiyang Zhai, en la Universidad de Cornell, Estados Unidos, en el cual se empleó tejido de la especie *Arabidopsis thaliana*. En esta investigación se comparó el rendimiento en función del tiempo de aislamiento mediante el cultivo de semillas, con un período de 35 a 36 días y el empleo de hojas maduras de aproximadamente 15 días, obteniendo diferencias significativas en el aislamiento de protoplastos de hojas (Zhai et al., 2009).

Del mismo modo, se han utilizado otras especies vegetales para el desarrollo de protocolos, los cuales abarcan tanto el aislamiento como el cultivo y, en algunos casos la fusión de protoplastos. Entre ellas están: la avena, col, tomate, y otro tipo de cultivos de interés comercial como la papa, tabaco, uva, entre otros (Lung et al., 2015).

Un estudio reciente realizado en China reporta el aislamiento efectivo de protoplastos de un cultivo *in vitro* de yuca, mediante el empleo de sustancias como albúmina de suero bovino, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, tampón MES, manitol, celulasa y macerozima durante 16 horas de digestión enzimática (Wu et al., 2017). En otro estudio realizado en *Magnolia*, publicado en el mismo año y país, los medios utilizados al igual que en el estudio sobre la yuca, no evidencian una diferencia considerable. Sin embargo, fueron añadidos reactivos como B-mercaptoetanol y sorbitol para comprobar el mayor rendimiento de protoplastos, partiendo de hojas jóvenes (Shen, Meng, McGrouther, Zhang, & Cheng, 2017).

En la Universidad de Mohaghegh Ardabili, en Irán se realizó una investigación de aislamiento de protoplastos, partiendo de la callificación de una especie de tipo ornamental, nativa del lugar denominada *Fritillaria imperialis*, tomando en cuenta factores como el peso fresco de los callos utilizados, así como también la concentración de enzimas, destacando la celulasa con una concentración de 2% y resaltando la importancia del manitol, siendo el 9% la concentración que muestra los mejores resultados (Chamani & Tahami, 2016).

1.2 Planteamiento del problema

Por una parte, el método mecánico cumple su función, no obstante presenta varias complicaciones, como un nivel muy bajo de rendimiento; además, el procedimiento es largo, complicado y su aplicación es limitada en cuanto al tipo de tejido, como por ejemplo: en epidermis de hojas, bulbos y frutos (Brady, 1976). Por otro lado, si bien el método enzimático es el más empleado en las investigaciones recientes, carece de una optimización en la mayoría de los casos. A pesar que ha transcurrido más de un siglo desde el descubrimiento del aislamiento de protoplastos y tomando en cuenta la cantidad de estudios realizados sobre este tema, la obtención de células vegetales desprovistas de pared celular para uso biotecnológico sigue siendo un procedimiento bastante complejo y de sumo cuidado.

El desarrollo de protocolos enfocados en la etapa de aislamiento de protoplastos, además de su complejidad presenta varias complicaciones, por ejemplo: los procedimientos generalmente suelen diferir según la especie vegetal utilizada; el tipo de explante empleado (hojas, tallos, ápices, etc.), la composición de la pared celular, entre otras más (Lung et al., 2015).

La dificultad del procedimiento radica esencialmente en el alto número de factores que intervienen en los protocolos de aislamiento.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Evaluar y optimizar las variables significativas en el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *Kalanchoe* spp.

1.3.2 Específicos

- ❖ Identificar la influencia de las variables responsables de degradar la pared celular de las células vegetales.
- ❖ Analizar la viabilidad de los protoplastos obtenidos, en función de la optimización de las variables significativas en el aislamiento.

1.4 Justificación

De manera general, los estudios disponibles sobre optimización de la etapa de aislamiento de protoplastos, son escasos. Al existir tantas variables implicadas en el proceso de aislamiento, se hace más complicada la ejecución.

Una investigación que emplea modelos estadísticos para la optimización de reactivos y factores claves, asegura la eficiencia y rendimiento de un protocolo establecido por medio de experimentación previa. Se han reportado estudios que demuestran resultados positivos mediante la optimización de procesos. La micropropagación de plátano mediante un sistema de inmersión temporal es uno de ellos. En esta investigación determinaron el tipo de citoquinina y su concentración adecuada; además, de la tasa de multiplicación de brotes dependiendo del tiempo y la frecuencia de inmersión que fue utilizada (Roels et al., 2005).

Entre las ventajas de la optimización están la factibilidad que brinda el protocolo al reducir el tiempo tanto del operador, como del procedimiento en sí, al conocer la interacción entre las variables y su descarte en caso de no ser necesarias. En Bulgaria, un grupo de investigadores demostró que la optimización del protocolo de cultivo *in vitro* de bayas, como las fresas y

frambuesas, es factible debido a la obtención de mayor número de brotes, en menos tiempo, comparado al tiempo de desarrollo normal, teniendo resultados positivos a la tercera semana de cultivados los explantes (Georgieva, Tsvetkov, Georgieva, & Kondakova, 2016).

Con respecto al material vegetal empleado, *Kalanchoe* se distingue por ser una planta crasulácea, que a pesar de ser de tipo ornamental en países asiáticos como China varias especies han demostrado algunas funciones medicinales como: antiinflamatorias, antiúlceras, así como también, de actividad antimicrobiana (Yadav & Dixit, 2003). Sin embargo, los estudios realizados en este tipo de planta son muy pocos, más aún en referencia a biotecnología vegetal.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Aspectos generales sobre protoplastos

El término protoplasto fue introducido en 1880 por el alemán Johannes Hanstein, un microbiólogo botánico que dio inicio al enfoque de la bioingeniería con el estudio de la embriología en plantas; en la literatura, también se hace referencia a los protoplastos como células vegetales “desnudas” al no presentar la pared celular (Abdelnou & Vincent, 1996). Los protoplastos en términos generales, son células que carecen de pared celular, siendo esta removida por métodos mecánicos o enzimáticos (Poot & Hernández, 2013).

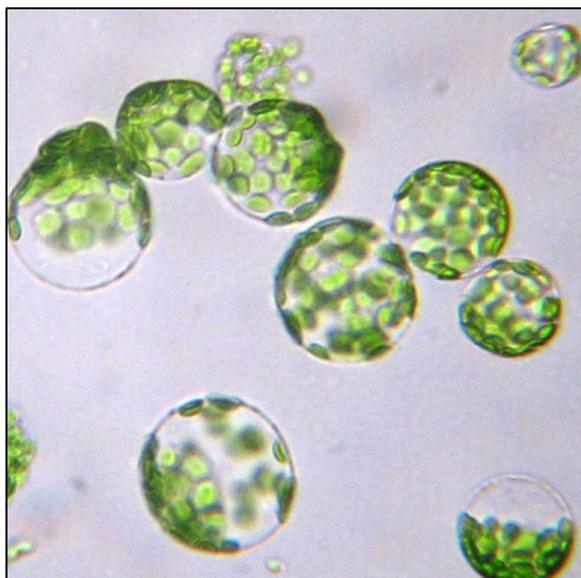


Figura 1. Protoplastos de Arabidopsis thaliana.

Tomado de (Yoo, Cho, & Sheen, 2007).

A diferencia de las células animales que solo poseen la membrana celular, la célula vegetal presenta una cubierta que le proporciona su característica forma rectangular; dicha cubierta se denomina pared celular (Sánchez & Trejo, 2003). Los compuestos que forman la pared celular o matriz extracelular, varían en porcentajes de lignina, celulosa y pectina; éstos componentes impiden el movimiento de las células vegetales (Poot & Hernández, 2013). La celulosa, es el componente más importante de la pared celular, abarcando casi la mitad de polisacáridos que la conforman (Sandoval & Rojas, 2005). La pared celular o matriz extracelular es originada en la citocinesis, producto de la fusión entre las vesículas de Golgi, por lo que las células vegetales se encuentran unidas compartiendo la pared (Sánchez & Trejo, 2003).

La composición de la pared celular se detalla en la Tabla 1.

Tabla.1

Componentes de la pared celular en células vegetales

| Componentes | Pared primaria (%) | Pared secundaria (%) |
|--------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | | |

| | | |
|---------------|----|-------|
| Polisacáridos | 90 | 65-85 |
| Celulosa | 30 | 50-85 |
| Hemicelulosa | 30 | 5-30 |
| Pectina | 30 | - |
| Proteína | 10 | - |
| Lignina | - | 15-35 |

Tomado de (Poot & Hernández, 2013).

Su forma es esférica. En su interior se puede observar el núcleo, y estructuras como cloroplastos y vacuola (Poot & Hernández, 2013). Su estructura se divide en dos partes:

- Membrana celular: que delimita y encierra la composición de la célula vegetal, como se observa en la Figura 2.
- Protoplasma: que se encuentra constituido por hialoplasma (hasta un 95% de agua y compuestos como lípidos, carbohidratos, elementos proteicos, ácidos nucleicos y otros), organelos y el núcleo (Figura 2) (González, 2016).

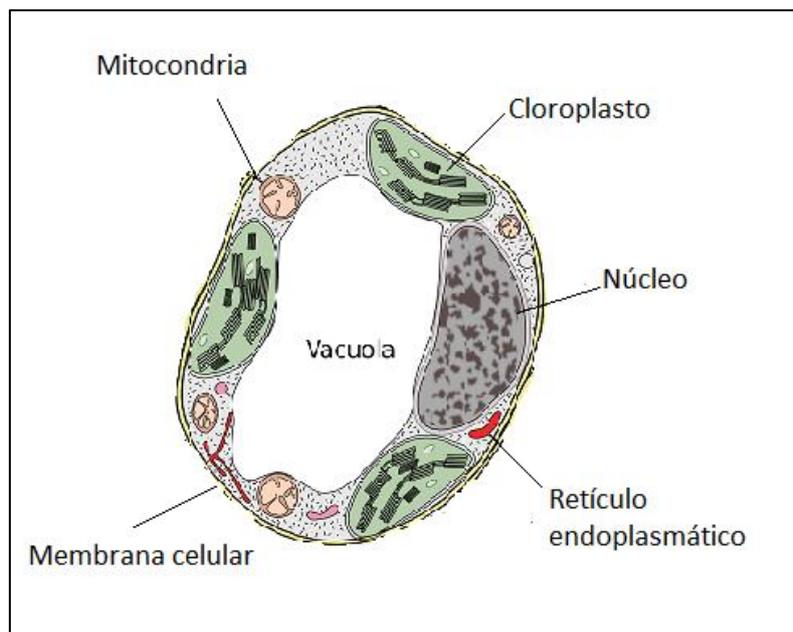


Figura 2. Estructura del protoplasto.

La obtención de protoplastos puede variar dependiendo del tipo de tejido empleado. Pueden ser extraídos de cualquier planta y órgano o tejido de la misma, así como del polen para la regeneración de plantas haploides (Morcillo, Cortes, & García, 2013; Poot & Hernández, 2013). Una de las fuentes más usadas para el aislamiento de protoplastos es a partir del mesófilo foliar de las hojas, además de callos y/o suspensiones celulares que figuran como cultivo *in vitro*. No obstante, debe considerarse el tipo de experimentación que se lleve a cabo, debido a que puede emplearse tejido especializado o no diferenciado (Abdelnou & Vincent, 1996).

La afectación del aislamiento y obtención de protoplastos viables con alto rendimiento puede estar determinado por el estado de la fisiología del tejido vegetal, como los porcentajes en los que se encuentra compuesta la pared celular (Poot & Hernández, 2013).

2.2 Aplicaciones

Los protoplastos vegetales son una alternativa eficaz de investigación, ya que constituyen un sistema que facilita el estudio de los organelos celulares vegetales, en aspectos relacionados con su estructura, función y bioquímica. Al

no existir la pared celular, se han ejecutado varias investigaciones que se centran en el estudio de la membrana citoplasmática vegetal y al protoplasma para el estudio de mecanismos de movimiento intra y extracelular (Smith, Park, Park, & Craven, 2013).

También se hace énfasis en elementos del citoesqueleto, como los microtúbulos y su relación con la hipótesis de orientar la disposición de microfibrillas en la formación de la pared celular (Fowke & Constabel, 1989).

La experimentación con protoplastos, sometiéndolos a fusión, demostró la resistencia extrema a deformaciones; además, se observó que las membranas particularmente se pueden unir entre sí; dando paso a la hibridación somática (Fowke & Constabel, 1989; Gutiérrez et al., 2003).

Los protoplastos son empleados en estudios de genética, y fitomejoramiento; también en la regeneración de plantas que va relacionada con la clonación vegetal y la mejora genética mediante modificaciones específicas. La regeneración vegetal hace referencia a la generación de un nuevo individuo mediante la reposición de la pared celular, la división celular y posterior diferenciación. Entre estos estudios, los protoplastos han sido empleados también en el estudio de morfología, división y transporte celular. Además, el estudio de mutaciones vegetales con ayuda de vectores, selección celular, transformación genética mediante la fusión de células somáticas, entre otros (Fowke & Constabel, 1989; Gutiérrez et al., 2003; Morcillo et al., 2013; Poot & Hernández, 2013; Yeung et al., 2015).

Entre las ventajas del uso de protoplastos para investigaciones biotecnológicas se encuentran: la facilidad de lisado, empleando un cierto tipo de técnicas como la adición de detergentes suaves, dependiendo de la experimentación o policonaciones, los cuales son considerados para el uso de shock osmótico como un proceso menos agresivo; también existe mayor disposición para aislar organelos celulares a partir de protoplastos, sin necesidad del uso de métodos agresivos usados para el rompimiento celular. Otras de las ventajas del empleo de protoplastos es para determinar dominios moleculares que han sido conservados, así como de mecanismos reguladores, que permiten controlar

niveles de expresión de genes y su traducción a proteínas (Yoo et al., 2007), como por ejemplo los protoplastos de las células protectoras, los cuales son de gran utilidad en el desarrollo de plantas; también los protoplastos favorecen en el estudio de vías de transducción de señales, debido a su respuesta autónoma hacia diferentes estímulos (Yao et al., 2018). Adicionalmente como ventaja es que permite el acceso a la membrana plasmática y al citoplasma celular que normalmente se encuentra restringido por la pared celular; tienen la capacidad de regenerar una célula nueva de manera rápida y también la capacidad de captar moléculas como proteínas y ácidos nucleicos. Son empleados con éxito en plantas que tienen problemas de incompatibilidad sexual durante la polinización (Fowke & Constabel, 1989).

Por otro lado, si bien los protoplastos representan varias ventajas y aplicaciones en la biotecnología vegetal, también tienen algunas desventajas como la fragilidad que presentan, debido a que no poseen la pared celular, por lo que su manipulación debe ser cuidadosa. También poseen mayor sensibilidad a ciertos factores como temperatura o agitación.

Además, la mayoría de reportes sobre protoplastos son a partir de resultados en base a experimentación, por lo que existe carencia de información sobre factores determinantes que permitan conocer a ciencia cierta la actividad y funciones de las estructuras internas como los organelos (Fowke & Constabel, 1989; Gutiérrez et al., 2003; Lung et al., 2015; Szabados, 1991b).

2.2.1 Estudios relevantes sobre aislamiento de protoplastos

En la actualidad existe un considerable número de estudios relacionados con el aislamiento de protoplastos, con diferentes aplicaciones en el campo de la investigación en especies vegetales. Uno de estos ejemplos es *Arabidopsis thaliana*, utilizada por los investigadores como modelo de experimentación. Los métodos empleados en *Arabidopsis* en general presentan buenos resultados. En el 2007, investigadores de la Universidad de Harvard en Estados Unidos, utilizaron el mesófilo de hojas de esta planta como material vegetal para la obtención de protoplastos que, mediante electroporación, expresan señales transitorias con la introducción de macromoléculas como ADN. El medio de

incubación que usaron contiene aproximadamente 1,5% de celulasa R10 y macerozima a 0,4% como componentes principales, junto con 0,4 M de manitol, 20 mM de cloruro de potasio, seguido de un calentamiento de la solución a 55°C por 10 minutos. Luego, se añadieron compuestos como cloruro de calcio 10 mM, 2-mercaptoetanol entre 1 y 5 mM y finalmente 0,1% de BSA. Se empleó el mesófilo de hoja de aproximadamente 3 a 4 semanas de cultivadas, cortadas en tiras de 0,5 a 1 mm. La duración de la incubación fue de alrededor de 3 horas en oscuridad a temperatura ambiente. No reportan resultados específicos del número de protoplastos obtenidos, no obstante los resultados obtenidos proporcionan de un 60 a un 90% de éxito en la transfección de DNA exógeno a los protoplastos, que era el objetivo general (Yoo et al., 2007).

Un grupo de investigación realizó un estudio en diversos tejidos de *Phaseolus vulgaris*, con el fin de determinar un método de transformación eficiente a partir de protoplastos de hojas, para caracterización genética funcional. Para el aislamiento de protoplastos, emplearon los pétalos de las flores y hojas del fréjol, cortándolas en tiras de 0,5 a 1 mm de ancho cada una. El tejido de la hoja fue sumergido en una solución de celulasa R10 a 1,5% y macerozima R10 a 0,37% durante aproximadamente 4 a 5 h, con una temperatura de 30°C en un agitador orbital a 40 rpm, mientras que los pétalos fueron incubados en las mismas condiciones por un periodo de 8 a 10 horas en oscuridad, en una solución de 1,5% celulasa R10 y 30 U de pectinasa. Adicionalmente se añadieron MES 20 mM a pH 5,7, cloruro de potasio 20 Mm, manitol a 0,4 M y finalmente cloruro de calcio a 10 mM. Finalmente, se determinó que el tejido a partir de hojas fue eficiente para el aislamiento, obteniendo alrededor de 3×10^5 células por cada g mL^{-1} (Nanjareddy, Arthikala, Blanco, Arellano, & Lara, 2016).

Otro estudio realizado en *Avena sativa* L., reporta el empleo protoplastos a partir de callos obtenidos en un medio Murashige & Skoog (MS) basal solidificado a los 7 días del cultivo. Para el medio de aislamiento emplearon 0,8% de hemicelulosa, 0,175% de celulasa y 0,1% de driselasa, resuspendidas

en sales ASW con adición de 0,6 M de manitol, con agitación suave de aproximadamente 42 rpm a temperatura ambiente durante 16 a 18 h. El volumen de solución fue de aproximadamente 40 mL. La solución enzimática fue filtrada mediante un filtro estéril de 0,2 μm . A pesar de que los resultados no especifican un número concreto de protoplastos obtenidos, aseguran la obtención de los mismos mediante el uso de este protocolo. La finalidad de esta investigación fue la expresión transitoria de ácidos nucleicos en células de avena, mediante el uso de electroporación que requiere menos cantidad de células y de ácidos nucleicos a comparación del polietilenglicol que se usa como método alternativo (Roberts, Zhang, Mihelich, Savino, & Rakotondrafara, 2017).

Brassica oleracea es una de las especies que abarca una variedad de alimentos comunes en la dieta diaria. Un estudio realizado en esta especie determinó el efecto de los genes *PSK*, que intervienen en la actividad biológica en el medio de cultivo y proliferación de protoplastos, en plantas con genotipos que tienen una respuesta baja en la fase de aislamiento. En el medio de incubación para aislamiento de protoplastos, se utilizaron hojas con aproximadamente 4 semanas de edad, mismas que fueron cortadas en tiras finas y sometidas previamente a un proceso de plasmólisis en manitol 0,5 M por aproximadamente 1 hora a 25°C. Luego, el tejido se resuspendió en una mezcla enzimática que constó de celulasa 0,5%, pectoliasa 0,1%, cloruro de calcio 3 mM, tampón MES 2 mM, 0,4 M de manitol y fue posteriormente esterilizada mediante filtración. La agitación fue de aproximadamente 20 rpm y el tiempo de duración de la incubación fue de aproximadamente 18 horas a 25°C. Los resultados que alcanzaron fueron de aproximadamente de un 78% de viabilidad en protoplastos. (Kielkowska & Adamus, 2018).

Las células guarda o protectoras se ubican en la epidermis de hojas, rodeando a los estomas. Participan en la regulación del intercambio gaseoso, transpiración y mecanismos de defensa propios de la planta hacia los patógenos. Una investigación liderada por el científico Xuehui Yao y colaboradores reporta un aislamiento de protoplastos de la especie *Solanum*

lycopersicum, basado en un protocolo de aislamiento realizado en *Arabidopsis thaliana* (Pandey, Wang, Coursol, & Assmann, 2002) con ligeras modificaciones. Se emplearon dos tipos de soluciones enzimáticas: la primera contiene aproximadamente 1% de celulasa, 0,1% de polivinilpirridolina (PVP), 0,25% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,5 mM de ácido ascórbico, resuspendido en un medio básico; mientras que la segunda solución enzimática consta de 1,5% de celulasa, 0,02% de pectoliasa, 0,25% de albúmina de suero bovino y 0,5 mM de ácido ascórbico, disueltos en un medio básico. El volumen de medio fue de aproximadamente 50 mL. El tejido para el aislamiento fue a partir de 10 g de hojas de tomate extraídas de un cultivo hidropónico. La fase de aislamiento para la primera solución enzimática duró aproximadamente 1,5 horas a 27°C con una agitación de 100 rpm en oscuridad. Para el segundo medio enzimático, se empleó el mismo volumen con algunos cambios en las condiciones, por ejemplo, la temperatura fue de 25°C, con una agitación de alrededor de 70 rpm y una duración de 3,5 horas. La viabilidad fue registrada mediante tinción con diacetato de fluoresceína (FDA). Sus resultados establecieron que la osmolalidad es uno de los factores que contribuyen directamente a la mantención de la morfología de las células protectoras, así como la digestión de la pared celulósica. Otro de los factores fue el tiempo de incubación, dependiendo de la edad del cultivo, siendo más corto en hojas jóvenes de tomate. El rendimiento final de protoplastos fue de aproximadamente 4×10^7 protoplastos por cada 10 g de tejido inicial (Yao et al., 2018).

Los protoplastos provenientes de polen proveen un sistema sexual que es empleado para la inducción de plantas haploides, fusión de células y estudios de mutaciones que son usados para el mejoramiento de plantas, así como para el estudio del polen a nivel biológico (Wang, Cheng, Liang, Lu, & Zhang, 2017). Para el mismo estudio se utilizaron los brotes más jóvenes con presencia de anteras. El medio de cultivo se compone de diferentes concentraciones de helicasa, 1% de celulasa, 0,5% de hemicelulasa, 0,5% de pectinasa, 3 mM de tampón MES, 0,01% de CH, 1% de PVP, 0,3 M de manitol o sorbitol, disuelto el medio K3. Fue incubado en oscuridad durante alrededor de 2 y 4 horas, con

agitación de 60 rpm y a 24 - 26°C de temperatura. Los resultados obtenidos fueron aproximadamente de 1×10^3 protoplastos por mL de solución, lo que se traduce en un 68% a 74% de rendimiento del protocolo. Mediante la experimentación observaron un mayor número de protoplastos muertos cuando emplearon la mezcla de sacarosa 0,3 M junto con helicasa al 1,5% en el medio de aislamiento; sin embargo, con una concentración de 1,2% de helicasa, los resultados fueron más favorables. La viabilidad fue evidenciada mediante tinción por diacetato de fluoresceína (Wang et al., 2017). Uno de las primeras investigaciones en el aislamiento de protoplastos a partir de polen se reporta en el año de 1974, empleando especies como *Nicotiana tabacum*, *Atropa belladonna* y *Triticum aestivum* (Bajaj, 1974).

Por otra parte, la viabilidad puede ser observada mediante tinción con *Evans Blue Dye*. En un estudio de transformación transitoria en protoplastos, realizado en hojas de *Brassica napus* se empleó un medio de incubación de 50 mL que consistió en celulosa 1%, macerozima 0,1% disueltos en medio K4, utilizando como regulador osmótico a la sacarosa a 0,3 M. Para la tinción y verificación de viabilidad emplearon una solución de 400 mg/ L disuelto en manitol a 0,5 M y el conteo fue realizado en un hematocitómetro posteriormente. Finalmente, después de considerar varios factores específicos y establecidos para canola, como las enzimas que se pueden utilizar y el tipo de compuesto osmótico, puede llegar a un máximo total de 8×10^6 células de protoplastos por g de tejido de hoja (Sahab, Hayden, Mason, & Spangenberg, 2018).

2.3 Consideración de variables implicadas en el aislamiento de protoplastos

Entre las variables que intervienen directamente en la preparación y desarrollo del medio de aislamiento, figuran principalmente el número de sustancias empleadas para el establecimiento del medio de incubación inicial, así como la determinación del valor de concentración de cada compuesto utilizado, la agitación del medio, cantidad de luz, cambios de temperatura y el tiempo de duración del proceso completo, ya que habitualmente es largo y variable.

El número de reactivos empleados en el desarrollo de protocolos de aislamiento de protoplastos, es un punto de interés para los investigadores, considerando que la mayoría son limitantes por su asequibilidad.

2.3.1 Factores enzimáticos

Debido a la composición de la pared celular distribuida en celulosa, hemicelulosa, pectina y pequeñas cantidades tanto de lípidos como de proteínas, para el aislamiento de protoplastos se emplean compuestos enzimáticos que ayudan a la desintegración de la pared (Poot & Hernández, 2013). Estos factores enzimáticos son específicos para la degradación de tejido vegetal, por lo que su presencia es de gran importancia (Stewart, 2008; Szabados, 1991b).

Las enzimas son obtenidas de manera comercial y las más comunes empleadas en el aislamiento son la celulasa y la pectinasa (Butler et al., 1989). Los extractos crudos de la mezcla de enzimas pueden contener cantidades pequeñas de lipasas, ribonucleasas y proteasas que en conjunto, pueden causar una reducción en la viabilidad y rendimiento del número de protoplastos; además, al no estar definido tanto la actividad de cada enzima en el medio y los constituyentes de la misma, dificulta en la reproducibilidad de protocolos sobre aislamiento de protoplastos (Butler et al., 1989). Sin embargo, la concentración óptima de enzimas presente en el medio de aislamiento depende en gran parte del tipo de explante que se va a utilizar como material de partida (Duquenne, Eeckhaut, Werbrouck, & Van Huylenbroeck, 2007).

El rendimiento de protoplastos también está sujeto al tipo de enzimas que se utilizan en el medio y es de relevancia usar las enzimas en conjunto con otras y no emplearlas de manera individual (Roca & Mroginski, 1991).

Los factores enzimáticos son importantes por su papel degradante; además, se ha demostrado que la concentración específica de estos agentes puede interferir en los protoplastos obtenidos logrando mejores resultados, como es el caso de una investigación realizada en *Spathiphyllum* y *Anthurium* en la cual obtuvieron mayor número de protoplastos cuando la concentración de la

celulasa incrementaba de un 0,5 a 1 % de concentración en el medio de incubación, logrando a su vez mayor viabilidad de las células; sin embargo, esto puede diferir de las diferentes enzimas y especies vegetales empleadas (Duquenne et al., 2007).

2.3.2 Factores osmóticos

Los protoplastos son células muy frágiles por lo que deben encontrarse en un medio que logre mantener la estabilidad osmótica, además de una nutrición balanceada para evitar la lisis y muerte de las células desprovistas de pared celular (Stewart, 2008).

La estabilidad del medio osmótico es uno de los problemas de mayor complejidad en el proceso de aislamiento (Cocking, 2003; Jia, Zhang, Qu, & Han, 2000), además se requiere una serie de compuestos y su concentración es uno de los factores más importantes en el desarrollo del protocolo. Esto se debe a que la eliminación de la pared celular es un riesgo que conlleva la pérdida completa de las células, al no manejarse concentraciones adecuadas y optimizadas de los reactivos. El medio de incubación para el aislamiento además de la solución enzimática, suele tener generalmente sales, por ejemplo, el cloruro de calcio, cloruro de magnesio, fosfato monopotásico, entre otros; una solución amortiguadora o tampón y un estabilizador osmótico. El calcio (2+) figura como un elemento esencial que puede variar entre 1 a 10 mM, ayudando a la preservación de la viabilidad de los protoplastos. Entre las soluciones amortiguadoras más empleadas para el aislamiento de protoplastos están el tampón MES [ácido 2 (N - morfolino) - etanosulfónico] o el tampón fosfato (Roca & Mroginski, 1991).

Entre los reguladores osmóticos más usados están: el sorbitol, glucosa, sacarosa y manitol y su concentración en el medio puede variar de 0,3 a 0,7 M (Roca & Mroginski, 1991). El manitol es el compuesto más usado para la mantención de estabilidad de la integridad osmótica del protoplasto (Stewart, 2008).

Un estudio realizado en el 2017, reportó pruebas a diferentes concentraciones del regulador osmótico en el medio de aislamiento, determinando que, a concentraciones altas, puede perjudicar la ósmosis de los protoplastos ocasionando estrés osmótico. El estrés osmótico producido en el medio, puede conducir a cambios en el flujo de iones que intervienen en la respuesta de señales captadas por receptores que se localizan en la membrana plasmática, y a su vez puede afectar directamente el potencial de la membrana; además, altera los lípidos de la misma, resultando en posibles fallas, modificando las propiedades del área superficial de la membrana de los sitios destinados a compuestos biológicos necesarios para la célula (Sain, Rodríguez, & Disalvo, 2017).

2.3.3 Factores externos

Además de los factores antes mencionados, debemos considerar que las condiciones externas ajenas al medio y a los protoplastos, también influyen en el aislamiento, por lo que una de las causas que alteran los resultados también es la agitación en el medio de cultivo, debido al choque que sufre el tejido por la acción mecánica empleada, que bien puede en algunos casos favorecer a la obtención de un cultivo celular generado en biorreactores; como también puede perjudicar totalmente a las células por una agitación muy fuerte como es el caso de los protoplastos (Bedoya & Hoyos, 2010).

Tanto la presencia de luz, como la temperatura, son factores fijos determinados previamente, dependiendo del tipo de cultivo que se desea obtener. Esto se debe principalmente a las características de los reactivos empleados, ya que en algunos casos pueden ser fotosensibles, termosensibles o a su vez, se puede necesitar de una temperatura determinada para que exista una reacción favorable. En el caso del aislamiento de protoplastos, la temperatura juega un papel destacable por las enzimas utilizadas en el medio; también, la oscuridad favorece en la viabilidad de los protoplastos (Andreu, Arbeloa, Terrén, & Marín, 2009).

Al existir una dependencia de la especie vegetal y tipo de explante empleado en el aislamiento, se pone un mayor énfasis en el tiempo de duración para esta

etapa. Si el tiempo empleado es menor al adecuado, se espera que las enzimas no cumplan su trabajo totalmente, por lo que las paredes celulares del material vegetal no se degradarán eficazmente; y en consecuencia la cantidad de protoplastos obtenidos sería mínima. Por otra parte, al dejar en incubación por un tiempo prolongado, se corre el riesgo que las enzimas efectúen su trabajo con alta actividad, ocasionando la muerte inmediata de las células desprovistas de pared celular (Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DE PLAN EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama experimental

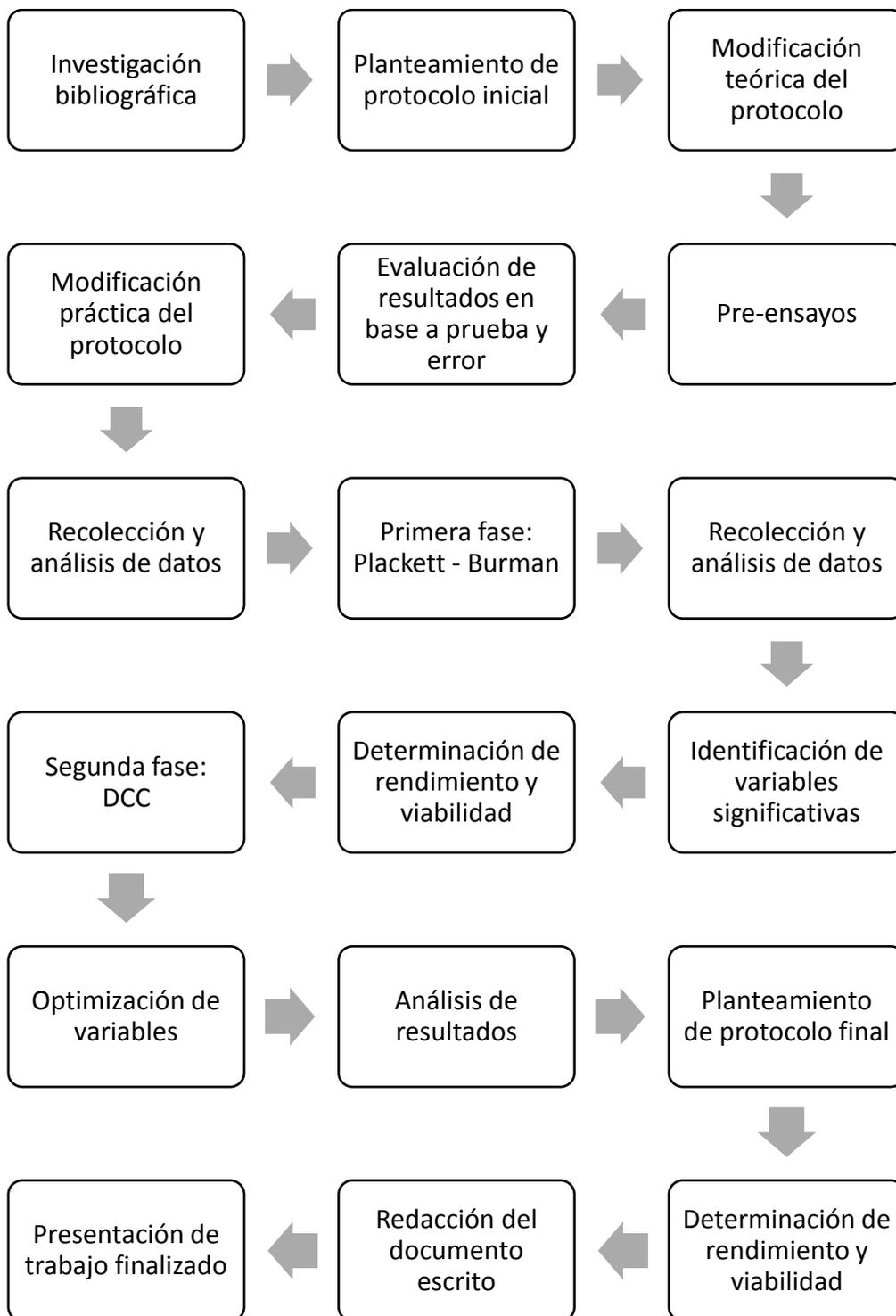


Figura 3. Diagrama experimental del proceso.

3.2 Diseños experimentales aplicados

Para el desarrollo de la presente investigación se emplearon modelos de diseños estadísticos que fueron divididos en dos fases: la primera enfocada en un diseño experimental de Plackett- Burman para la identificación de variables de mayor significancia en el aislamiento de protoplastos vegetales, mediante el análisis de un diagrama de Pareto (Plackett & Burman, 1946); y la segunda fase empleando un modelo de estadística que se basa en una superficie de respuesta, por medio de un Diseño Central Compuesto (DCC), que a través de la secuencia experimental, logra la ubicación de las variables y sus valores óptimos; además de inferir si dichas variables se relacionan, son independientes entre sí o a su vez influyen de manera que impidan la obtención de las variables respuestas (Jiménez, 2015; Khuri & Cornell, 1987).

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 Muestra

La muestra fue extraída a partir de las hojas jóvenes de la sección superior de una planta de *Kalanchoe* spp., obtenida de invernadero. La planta no presentó ningún tipo de enfermedad y sus hojas no presentaron síntomas de estrés o daño físico alguno.



Figura 4. Planta de kalanchoe.

4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos

4.2.1 Preparación de explantes

Se realizó un protocolo de desinfección inicial del material vegetal (Liu, 2012), que consiste en sumergir a las hojas en una mezcla de agua destilada con jabón líquido por 10 min. Luego, los explantes fueron llevados a una solución de etanol al 70% durante 10 s, seguido de un lavado en hipoclorito de sodio al 40% por 10 min. Finalmente, las muestras vegetales fueron trasladadas a la cámara de flujo laminar y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril en intervalos de 5, 10 y 15 min, respectivamente.

4.2.2 Corte de explantes

Con un solo corte se retiró delicadamente los bordes de la hoja (Figura 4A) para evitar daños en el explante (Figura 4B). Luego, se cortaron cuatro cuadrados de aproximadamente 1 cm x 1 cm, equivalente a 0,5 g de material vegetal (Figura 4C).



Figura 5. Proceso del corte de explantes.

- a) Hoja extraída de la sección superior de la planta madre.
- b) Eliminación de bordes y sección intermedia de la hoja.
- c) Obtención de explantes.

Con precaución se retiró la epidermis del haz y envés de la hoja (Figura 5A), dejando solo el mesófilo, mismo que fue cortado en tiras de 0,5 a 1 mm de grosor (Figura 5B). Las tiras obtenidas se llevaron directamente al medio de digestión enzimática con un volumen de 3 mL (Figura 5C).

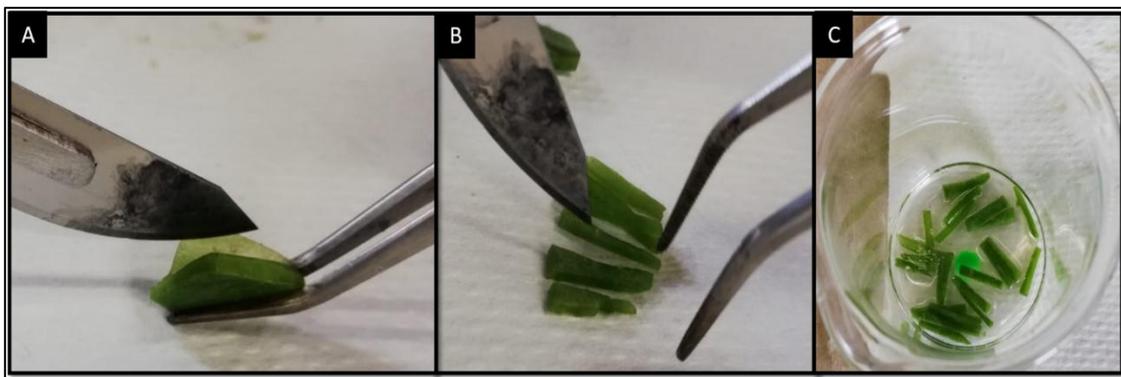


Figura 6. Obtención de explantes finales.

- a) Extracción de la epidermis superior e inferior del explante.
- b) Corte en tiras.
- c) Muestras vegetales en el medio de aislamiento.

4.2.3 Digestión enzimática

El medio enzimático de incubación empleado fue modificado de un reporte realizado por Boncompagni (2013). El medio de aislamiento, se compone de un regulador osmótico, en este caso el manitol; el cloruro de calcio, como solución estabilizadora se empleó buffer MES, y finalmente un coctel de enzimas compuesto por celulasa (Cellulase "Onozuka" R-10, Cas N° 9012-54-8 Duchefa Biochemie), pectinasa (Pectinase from *Aspergillus niger*, Cas N° P4716 Sigma-Aldrich) y hemicelulasa (Hemicellulase from *Aspergillus niger*, Cas N° H2125 Sigma-Aldrich), en concentraciones variadas de acuerdo al diseño experimental. El medio de incubación fue esterilizado mediante un filtro de 0,2 μm (Thermo Scientific Nalgene Syringe Filter 0,2 μm PES, Cat N° 725-2520) y trasladado posteriormente a vasos de precipitación pre-esterilizados de 50 mL de capacidad, en los cuales se depositó aproximadamente 3 mL de la mezcla inicial.

4.3 Diseño experimental

4.3.1 Fase I: Identificación de variables significativas

Para el desarrollo de la experimentación se propuso un diseño experimental de Plackett- Burman (PB) con siete factores de estudio: celulasa, pectinasa, hemicelulasa, manitol, MES, cloruro de calcio y tiempo. El número de protoplastos por mililitro de medio fue la variable respuesta que se midió.

Se emplearon diferentes concentraciones implantando valores máximos (V máx) y mínimos (V mín) establecidos en base a bibliografía reportada previamente (Tabla 2).

El diseño experimental constó de 8 tratamientos con tres repeticiones cada uno, manteniendo tanto la temperatura y la agitación como condiciones estables (Tabla 3 y 4). El experimento se llevó a cabo con tres réplicas independientes.

Tabla 2.

Factores de estudio del diseño experimental Plackett-Burman.

| Factores | | (+) | (-) |
|----------|------------------------|-------|-------|
| | | V máx | V mín |
| x1 | Celulasa (%) | 2,0 | 0,30 |
| x2 | Pectinasa (%) | 0,050 | 0,026 |
| x3 | Hemicelulasa (%) | 1,0 | 0,50 |
| x4 | Manitol (M) | 0,9 | 0,5 |
| x5 | CaCl ₂ (mM) | 20 | 10 |
| x6 | Buffer MES (mM) | 20 | 10 |
| x7 | Tiempo (h) | 6 | 3 |

Tabla 3

Diseño experimental de Plackett- Burman con 7 factores y valores no codificados.

| Tratamiento | Factores | | | | | | |
|-------------|----------|-----------|--------------|---------|-------------------|---------------|--------|
| | x1 | x2 | x3 | x4 | x5 | x6 | x7 |
| | Celulasa | Pectinasa | Hemicelulasa | Manitol | CaCl ₂ | Buffer MES | Tiempo |
| 1 | + | - | - | + | - | + | + |
| 2 | + | + | - | - | + | - | + |
| 3 | + | + | + | - | - | + | - |
| 4 | - | + | + | + | - | - | + |
| 5 | + | - | + | + | + | - | - |
| 6 | - | + | - | + | + | + | - |
| 7 | - | - | + | - | + | + | + |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - |

Diseño base tomado de (Plackett & Burman, 1946).

Tabla 4.

Diseño experimental de Plackett- Burman de 7 factores con valores codificados.

| Tratamiento | Factores | | | | | | |
|-------------|--------------|---------------|------------------|-------------|------------------------|-----------------|------------|
| | x1 | x2 | x3 | x4 | x5 | x6 | x7 |
| | Celulasa (%) | Pectinasa (%) | Hemicelulasa (%) | Manitol (M) | CaCl ₂ (mM) | Buffer MES (mM) | Tiempo (h) |
| 1 | 2 | 0,026 | 0,50 | 0,9 | 10 | 20 | 6 |
| 2 | 2 | 0,05 | 0,50 | 0,5 | 20 | 10 | 6 |
| 3 | 2 | 0,05 | 1,0 | 0,5 | 10 | 20 | 3 |
| 4 | 0,30 | 0,05 | 1,0 | 0,9 | 10 | 10 | 6 |
| 5 | 2 | 0,026 | 1,0 | 0,9 | 20 | 10 | 3 |
| 6 | 0,30 | 0,05 | 0,50 | 0,9 | 20 | 20 | 3 |
| 7 | 0,30 | 0,026 | 1,0 | 0,5 | 20 | 20 | 6 |
| 8 | 0,30 | 0,026 | 0,50 | 0,5 | 10 | 10 | 3 |

4.3.2 Fase II: Optimización

Para el desarrollo de la segunda etapa de la experimentación, se llevó a cabo un Diseño Central Compuesto (DCC) con los factores significativos obtenidos a partir de la primera fase. De igual manera, la variable respuesta en este diseño fue el número de protoplastos obtenidos por mililitro de medio.

Partiendo del tratamiento con mejores resultados en el Plackett- Burman, se plantearon los valores centrales en el DCC. El DCC se basa en un diseño factorial 2^k mediante la combinación de valores, modelando a su vez una superficie curva con puntos centrales y axiales (Figura 6) (Khuri & Cornell, 1987).

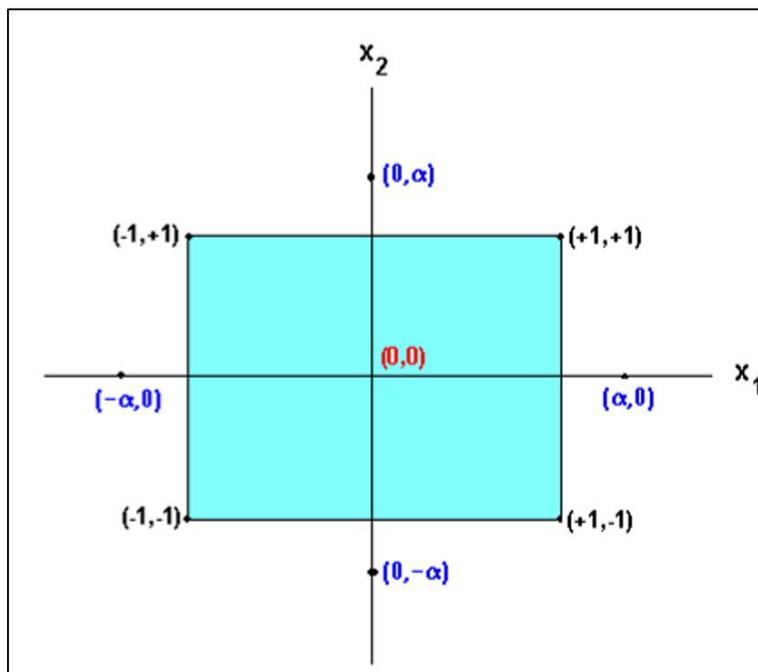


Figura 7. Puntos centrales y axiales en el plano cartesiano del DCC.

Adaptado de (Khuri & Cornell, 1987).

Para la obtención de puntos axiales del diseño se emplea la siguiente ecuación:

Ecuación 1. *Fórmula para la determinación de puntos axiales en el DCC.*

$$\text{Valor codificado} = \frac{\text{Valor no codificado} - \text{Valor central}}{\text{Salto}}$$

El diseño experimental constó de 10 tratamientos con tres repeticiones cada uno, con un total de 30 corridas, manteniendo tanto la temperatura y la agitación como condiciones estables, como se parecía en la Tabla 5. El experimento se implementó con dos réplicas independientes.

Tabla.5

Diseño central compuesto con dos factores.

| Tratamientos | A | B |
|--------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 1,41421356 |
| 3 | 1 | 1 |
| 4 | 1,41421356 | 0 |
| 5 | 1 | -1 |
| 6 | 0 | - 1,41421356 |
| 7 | -1 | -1 |
| 8 | - 1,41421356 | 0 |
| 9 | -1 | 1 |
| 10 | 0 | 0 |

4.4 Variables de respuesta

4.4.1 Conteo de protoplastos

El conteo de protoplastos por cada mL ($p.mL^{-1}$) fue realizado en la cámara de Neubauer, también conocido como hematocitómetro (Boncompagni, 2013). Los datos fueron registrados y evaluados posteriormente. Para el conteo de protoplastos se tomó en cuenta los cuatro cuadrados que se observan con el número 1 en las esquinas en el hematocitómetro como se observa a continuación (Figura 7):

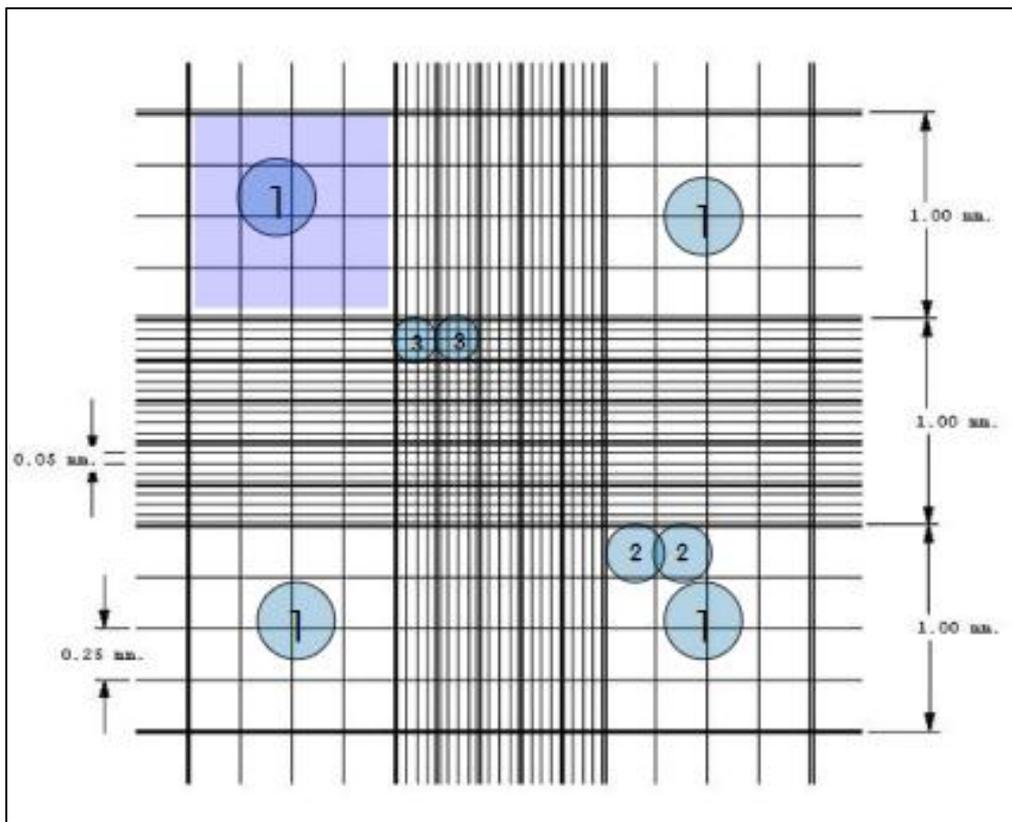


Figura 8. Superficie gráfica de la cámara de Neubauer.

Adaptado de (Bastidas, n.d).

Se empleó la fórmula para el conteo de protoplastos en cámara de Neubauer (Ecuación 2). Además, se realizaron 20 conteos por repetición de tratamiento en los diferentes campos ópticos.

Ecuación 2. *Fórmula para el conteo de protoplastos en cámara de Neubauer.*

$$\frac{P}{S_r (mm^2) \times P_c (mm) \times D} = \frac{\text{Protoplastos}}{\mu L \text{ de medio}}$$

Donde:

P = protoplastos contados

S_r = Superficie recontada

P_c = Profundidad de la cámara

D = Dilución

4.4.2 Pruebas de viabilidad

Las pruebas de viabilidad fueron realizadas mediante una tinción con Evans Blue Dye 2,5%, el cual fue diluido en sorbitol 0,6 M. Para que la viabilidad se conserve, se tomó una alícuota de 1 mL de muestra en un tubo de microcentrífuga y se colocaron 100 μ L de Evans al 2,5%, seguido de un reposo estático durante 10 min. Finalmente, se observaron los resultados en un microscopio de cultivo celular con objetivo 10X (Boncompagni, 2013). El principio del método se basa en que el reactivo en dilución no tiene la capacidad de traspasar la membrana celular, por lo que se acumulará en el caso de que el protoplasto haya perdido la integridad de la misma; es decir, los protoplastos viables no tendrán tinción, mientras que los muertos se verán en color azul (Boncompagni, 2013).

4.5 Evaluación estadística de los resultados

Para la determinación de las variables significativas en los resultados obtenidos mediante el Plackett-Burman, se emplearon tanto el análisis de varianza (ANOVA) como el análisis a través del diagrama de Pareto, que se resume en un gráfico de barras dispuestas de manera horizontal. Por otro lado, para los datos recopilados en el ANOVA se toma en cuenta la aceptación de la hipótesis alternativa sugiriendo que al menos una de los factores estudiados tiene un impacto diferente en el aislamiento según el valor p arrojado. De igual manera la evaluación estadística empleada en el DCC fue mediante un ANOVA. Se trabajó con un nivel de significancia de 0,05. Para los análisis estadísticos se empleó el software estadístico Minitab18.

5. CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de variables significativas

El gráfico de barras a continuación representa el promedio con el porcentaje de error correspondiente del número de protoplastos por mL de medio de aislamiento inicial, obteniendo los mejores resultados en el tratamiento 1 con $2,87 \times 10^4$ p.mL⁻¹, seguido del tratamiento número 3 con $2,52 \times 10^4$ p.mL⁻¹; por

otra parte, los resultados de menor rendimiento fueron el tratamiento 4 con un promedio total de $1,75 \times 10^3$ p.mL⁻¹ y el 6 con $9,16 \times 10^2$ p.mL⁻¹, como se observa en la Figura 8.

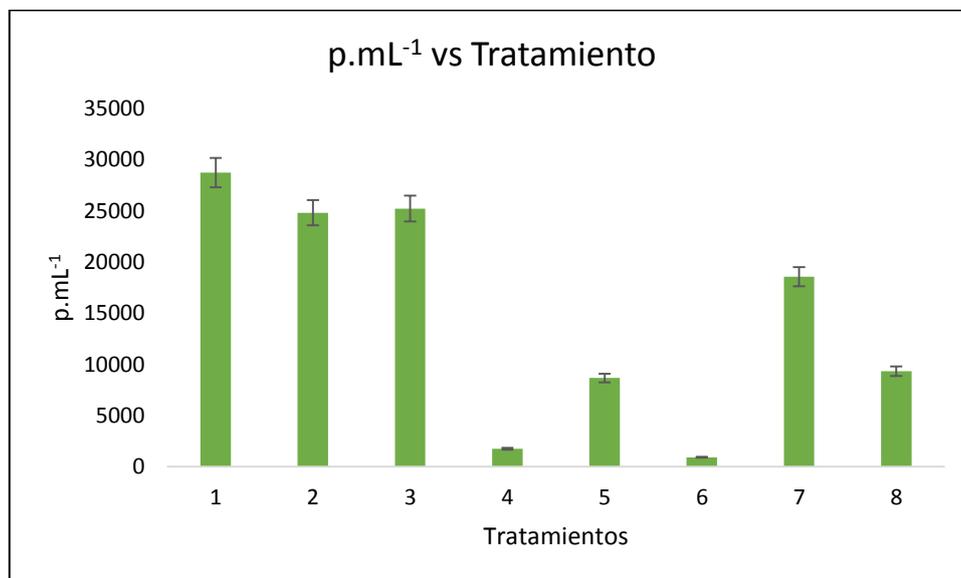


Figura 9. Promedio del número de protoplastos obtenidos por mililitro de medio de incubación inicial por cada tratamiento.

Para determinar las variables significativas, se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (H0): determina que todas las variables empleadas poseen el mismo efecto en el aislamiento de protoplastos; mientras que,

Hipótesis alternativa (H1): determina que al menos una de las variables empleadas no posee el mismo efecto en el aislamiento de protoplastos.

Mediante un ANOVA se obtuvo que la celulosa tiene un valor p correspondiente a 0,016 menor al nivel de significancia; al igual que en el caso del manitol (valor $p = 0,046$); por lo tanto, dichos factores tienen un efecto diferente en el medio de aislamiento de protoplastos (Tabla 6).

Tabla.6

Análisis de varianza obtenido del diseño estadístico Plackett- Burman.

| <u>Análisis de Varianza</u> | | | | | |
|------------------------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor P |
| Modelo | 4 | 799584534 | 199896133 | 12,10 | 0,034 |
| Lineal | 4 | 799584534 | 199896133 | 12,10 | 0,034 |
| Celulasa | 1 | 404806627 | 404806627 | 24,51 | 0,016 |
| Manitol | 1 | 179621442 | 179621442 | 10,88 | 0,046 |
| Buffer MES | 1 | 104454775 | 104454775 | 6,32 | 0,087 |
| Tiempo | 1 | 110701689 | 110701689 | 6,10 | 0,081 |
| Error | 3 | 49546811 | 16515604 | | |
| Total | 7 | 849131344 | | | |

De igual manera, el diagrama de Pareto presenta los factores implicados en forma de barras horizontales, siendo los más significativos solo aquellos que sobrepasan la línea límite de significancia o valor alfa. Mediante una jerarquización de resultados de mayor a menor como se observa en la Figura 9, se demuestra que el factor A correspondiente a celulasa y el D referente a manitol son los que mayor importancia presentan en el aislamiento de protoplastos vegetales de *Kalanchoe* spp.

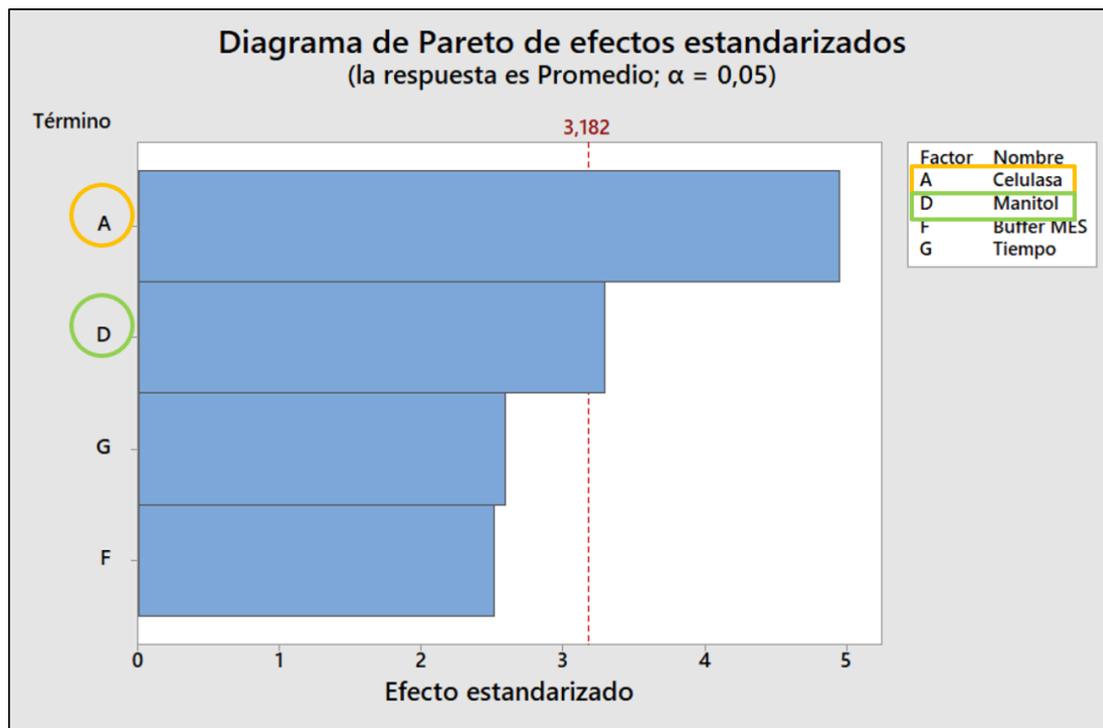


Figura 10. Representación gráfica de las variables significativas del promedio del número de protoplastos por mL de medio inicial mediante diagrama de Pareto.

Adicionalmente, se empleó un diagrama de barras para la verificación de viabilidad de protoplastos, dando como resultado mayor viabilidad en el tratamiento 7 con un aproximado de 4500 p.mL^{-1} de medio de aislamiento, seguido del 3 con un total de 1950 p.mL^{-1} de medio (Figura 10), mientras que en los tratamientos restantes no se obtuvieron protoplastos viables.



Figura 11. Número de protoplastos viables por tratamiento.

Para el caso de la primera variable significativa, podría deberse a la composición química de la pared celular de las células del explante y la afinidad de la celulasa por la misma (Poot & Hernández, 2013). A pesar que la composición de la pared primaria en la mayoría de tejidos vegetales es igual en proporción en todos los componentes principales (celulosa, hemicelulosa y pectina), la presencia de celulosa en la pared secundaria de hasta un 50%, comparada con los otros componentes en conjunto, por lo que su efecto va a ser proporcional, y por ende va a tener un mayor impacto en el aislamiento de protoplastos (Poot & Hernández, 2013). Esto se corresponde con los resultados obtenidos en el presente estudio (Figura 8), en donde el tratamiento 1 contiene la mayor concentración de enzima celulasa en el medio (2%). Como complemento, estos resultados también se asemejan a los reportados por Duquenne et al., (2007) en donde, al incrementar el porcentaje empleado de celulasa en el medio de aislamiento se produjo un mayor número de protoplastos. Sin embargo, dicho tratamiento no mostró resultados positivos en cuanto a viabilidad.

El aislamiento de protoplastos y sobre todo su viabilidad pueden estar afectados por el alto índice de estrés intracelular, debido a la producción de poliaminas y especies reactivas del oxígeno (ROS), interfiriendo en la posterior regeneración de la pared celular de los protoplastos. En una investigación previa de Ishii et al., (1987) argumenta que ciertos compuestos como la

xilanasa y pectoliasa de las enzimas pectinasa y celulasa comercial generan ROS en el medio de aislamiento, provocando un daño celular masivo y en el caso de que aún sobrevivan protoplastos, estos suelen ser recalcitrantes en la fase de cultivo. En ese sentido, la viabilidad de los protoplastos puede estar relacionada con el estado de pureza de la enzima celulasa, ya que se ha reportado que éste puede ser influyente en los resultados (Eeckhaut, Lakshmanan, Deryckere, Van Bockstaele, & Van Huylenbroeck 2013). La celulasa sería uno de los factores con mayor incidencia en este estudio.

Por otro lado, según los reportes de Cassells & Curry (2001), otros factores que causan la pérdida de viabilidad de los protoplastos en los procesos iniciales del aislamiento (fase de desinfección), son el hipoclorito y el etanol. Dichos compuestos son los causantes e indicadores de estrés oxidativo en el material vegetal. Como se mencionó anteriormente, la presencia de ROS en el medio de aislamiento causa pérdida de viabilidad. El daño oxidativo según Kaeppler, Phillips, & Olhoft (1998) puede derivar en mutaciones, debido a una hipermetilación o hipometilación del ADN de la célula vegetal, así como también el cambio de la ploidía genética, deleciones o sustituciones de las bases del ADN que afectan a la viabilidad de los protoplastos. Adicionalmente, esto explicaría en parte la variación somaclonal generada en plantas obtenidas a través de protoplastos (Stewart, 2008).

Otro de los factores que afecta tanto la obtención de protoplastos y la viabilidad, es el tipo de explante que se usa para el aislamiento, en referencia a plantas *in vitro* o *ex vitro* (condiciones normales); Klocke et al., (2012) argumentan que emplear hojas de plantas *in vitro* es más conveniente, además de ser una fuente más eficiente de protoplastos. Sin embargo, el mesófilo de las hojas de plantas *in vitro* puede sufrir una sobre-digestión enzimática a comparación del uso de explantes en condiciones normales generando diferencias cuantiosas en los rendimientos de las plantas empleadas, así sean de la misma especie, por lo que Klocke afirma que no existe una razón clara y específica para este fenómeno; en tal caso, se recomienda empezar con tejido previamente establecido en futuras investigaciones.

En cuanto a la segunda variable significativa, el manitol, se ha determinado que el empleo de una concentración adecuada del regulador osmótico es esencial en la fase de aislamiento de protoplastos (Stewart, 2008). Al no existir la pared celular característica de las células vegetales, los protoplastos tienden a una fragilidad inmediata, por lo que la estabilidad osmótica del medio es muy relevante y bastante compleja de lograr. Esto se afirma a su vez con las investigaciones realizadas por Cocking (2003). Por otra parte, según el gráfico de barras (Figura. 8), tanto el tratamiento 4 y 6 son los resultados que menor desempeño demostraron por el bajo número de protoplastos obtenidos. La obtención de un menor número de protoplastos se explica basándose en los argumentos propuestos en 1991 por Roca y Mroginski, que afirman que los rangos en los que oscila la concentración adecuada de los reguladores osmóticos independientemente del tipo (como glucosa, manitol o sorbitol) se encuentra de 0,3 a 0,7 M, a comparación de la concentración tanto del tratamiento 4 como del tratamiento 6, que fue de 0,9 M, por tanto se puede afirmar según Sain, Rodríguez & Disalvo (2017), que una concentración alta del regulador osmótico puede ocasionar estrés osmótico en el medio de aislamiento produciendo modificaciones en la cantidad de iones que intervienen en la determinación de respuesta a señales por parte de la célula, provocando la muerte de los protoplastos.

Como siguiente factor que afecta al aislamiento es el tiempo, que a pesar de no tener un valor estadístico significativo, tanto en el Pareto y en el análisis de varianza, se debe tomar en cuenta que el conteo de protoplastos fue realizado entre viables y no viables. La importancia del tiempo de incubación en el medio de cultivo es significativa debido a las enzimas presentes en el medio. Esto se corrobora en el gráfico de la viabilidad (Figura 10), por lo que a pesar de haber existencia de protoplastos la viabilidad es nula en ciertos tratamientos. Según Sharry, Adema & Abedini (2015) a mayor tiempo de incubación de los explantes con el medio de aislamiento, se estaría corriendo el riesgo de una pérdida total de los protoplastos, debido a que las enzimas podrían tener una sobreactividad; es decir, un efecto con mayor potencia a la requerida en el medio. Esto explicaría a su vez la ausencia de protoplastos viables en la

mayoría de los tratamientos; sin embargo, es necesario recalcar que los rangos de tiempo empleados para el diseño de Plackett- Burman fueron determinados mediante estudios previos, aunque puede existir una fluctuación por el tipo de tejido y planta utilizada según lo reportado por Poot & Hernández (2013), por lo que se mantiene una posible hipótesis sobre la reducción de tiempo al mejor tratamiento resultado del DCC.

5.2 Análisis de las variables obtenidas

Tomando en cuenta, tanto el número de protoplastos obtenidos mediante el conteo por cámara de Neubauer y la viabilidad, se realizó un breve análisis del resultado de cada tratamiento, mediante la comparación de las dos variables antes mencionados; además de la significancia arrojada por el gráfico de Pareto, tomando en cuenta la concentración de celulasa y manitol como factores a modificar. Se determinó que el tratamiento 1, a pesar de ser el mejor tratamiento, demostrando mayor obtención de número de p.mL⁻¹ de solución, no logró resultados positivos en cuanto a viabilidad, por lo que fue descartado. El tratamiento número 7 obtuvo un considerable número de protoplastos mediante conteo en cámara, además de un buen resultado en la viabilidad; sin embargo, la diferencia con el tratamiento 3 implica una pérdida en promedio de casi 7×10^3 p.mL⁻¹ de medio inicial, además de que los protoplastos obtenidos tenían una mejor morfología. Debido a estos resultados, se tomó como punto de partida para el DCC, el tratamiento número 3 del diseño de Plackett-Burman, que a pesar de no tener un valor máximo de viabilidad, si se presenció protoplastos viables en comparación al resto de tratamientos.

5.2.1 Planteamiento del Diseño Central Compuesto a partir de los resultados obtenidos del Plackett- Burman

Como se mencionó anteriormente, para el DCC, se tomaron como puntos centrales a los datos correspondientes al tratamiento número 3, usando como variables significativas a la celulasa y el manitol, por lo que se procedió a obtener los puntos axiales del plano cartesiano en torno a estos dos factores,

respectivamente empleando la Ecuación 1, generando de esta manera el diseño factorial (Tabla 7 y 8).

Tabla 7.

Determinación de los niveles con valores codificados para las variables significativas en el DCC.

| Salto de celulasa | Salto de manitol |
|--------------------------|-------------------------|
| 0,5 | 0,3 |

| Diseño Central Compuesto | | |
|---------------------------------|--------------|-------------|
| Niveles | A | B |
| | Celulasa (%) | Manitol (M) |
| 1,4 | 2,7 | 0,92 |
| 1 | 2,5 | 0,8 |
| 0 | 2,0 | 0,5 |
| -1 | 1,5 | 0,2 |
| -1,4 | 1,3 | 0,08 |

Tabla 8.

Tratamientos establecidos para el DCC con variables significativas (celulasa y manitol) modificadas según el diseño factorial.

| Tratamientos | Factores | |
|---------------------|-----------------|-------------|
| | Celulasa (%) | Manitol (M) |
| 1 | 2 | 0,5 |
| 2 | 2 | 0,92 |
| 3 | 2,5 | 0,8 |
| 4 | 2,7 | 0,5 |
| 5 | 2,5 | 0,2 |

| | | |
|-----------|-----|------|
| 6 | 2 | 0,08 |
| 7 | 1,5 | 0,2 |
| 8 | 1,3 | 0,5 |
| 9 | 1,5 | 0,8 |
| 10 | 2 | 0,5 |

Cabe mencionar que para el desarrollo del DCC se mantuvieron constantes los valores correspondientes a pectinasa, hemicelulasa, buffer MES, CaCl_2 y tiempo referentes al T3, debido a que son indispensables para el aislamiento de protoplastos, por tanto solo fueron modificados las variables significativas (Tabla 8).

5.2.2 Optimización mediante el diseño central compuesto

Continuando con la segunda fase de la investigación, para el desarrollo del aislamiento optimizado de protoplastos en el DCC de dos factores, se realizaron 10 tratamientos, cada uno con 3 réplicas dando un total de 30 corridas. El mejor tratamiento (T8) tuvo un promedio total de $5,6 \times 10^4$ p.mL⁻¹ de solución de medio de incubación inicial; por otro lado, los resultados de menor cantidad se evidencian en el tratamiento 2 y 9 con un aproximado de $1,3 \times 10^3$ p.mL⁻¹ y $1,4 \times 10^3$ p.mL⁻¹, respectivamente como se observa en la Figura 11.

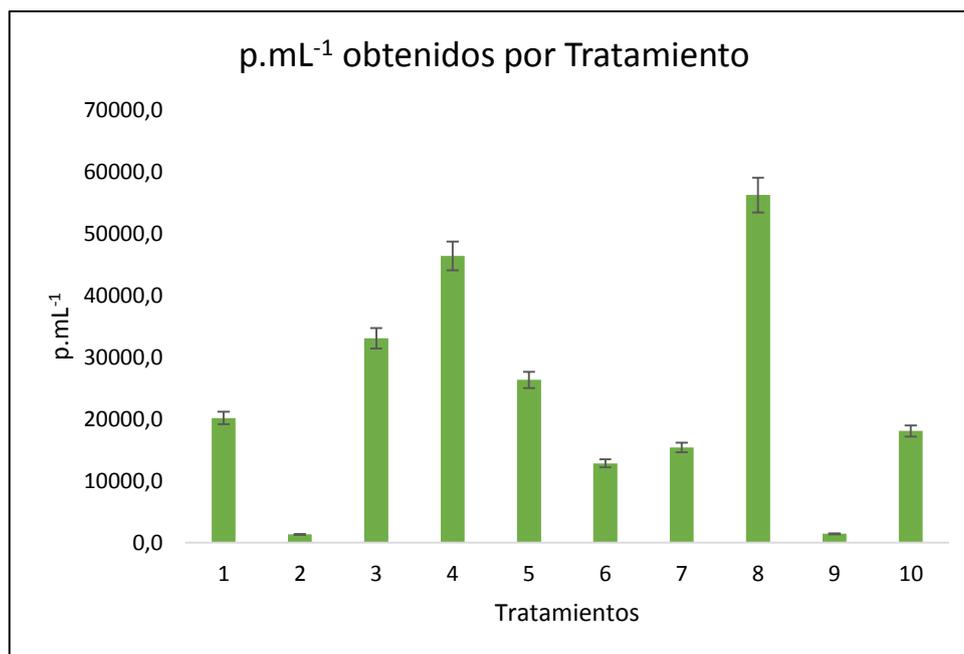


Figura 12. Promedio de p.mL⁻¹ de medio de incubación correspondientes al DCC.

También, se expresó mediante un diagrama de barras la confirmación de la viabilidad de protoplastos, dando como resultado mayor existencia de protoplastos viables en el tratamiento 8 con un aproximado de $2,25 \times 10^4$ p.mL⁻¹ de medio de aislamiento; por otra parte, a pesar de no tener resultados significantes en los demás tratamientos si hay protoplastos viables en menor cantidad (Figura 12), descartando los tratamientos en los que la viabilidad fue nula.

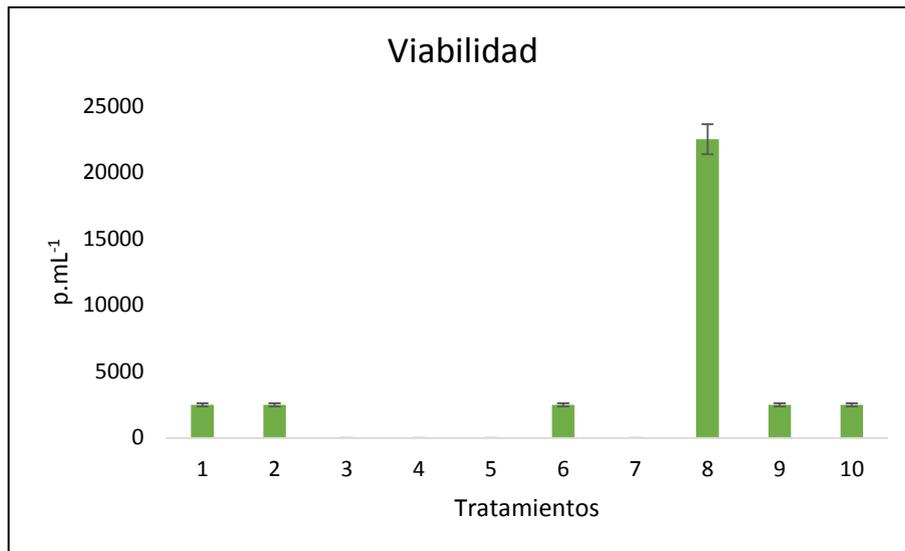


Figura 13. Promedio de protoplastos viables

Mediante el gráfico de superficie de respuesta, se pueden observar las zonas de mayor fluctuación entre las variables celulasa y manitol, teniendo mayor significancia con respecto a la variable respuesta (promedio de p.mL⁻¹) en los extremos de la curvatura correspondientes a los valores codificados para 1,4 denotado en verde oscuro (Figura 13).

Por otra parte, el gráfico obtenido en la superficie de respuesta es atípico a la curvatura opuesta esperada. Sin embargo, se deduce que las concentraciones óptimas estarían en los extremos de la ondulación, específicamente en las zonas donde el color verde tiene mayor intensidad como se observa en la Figura 13.

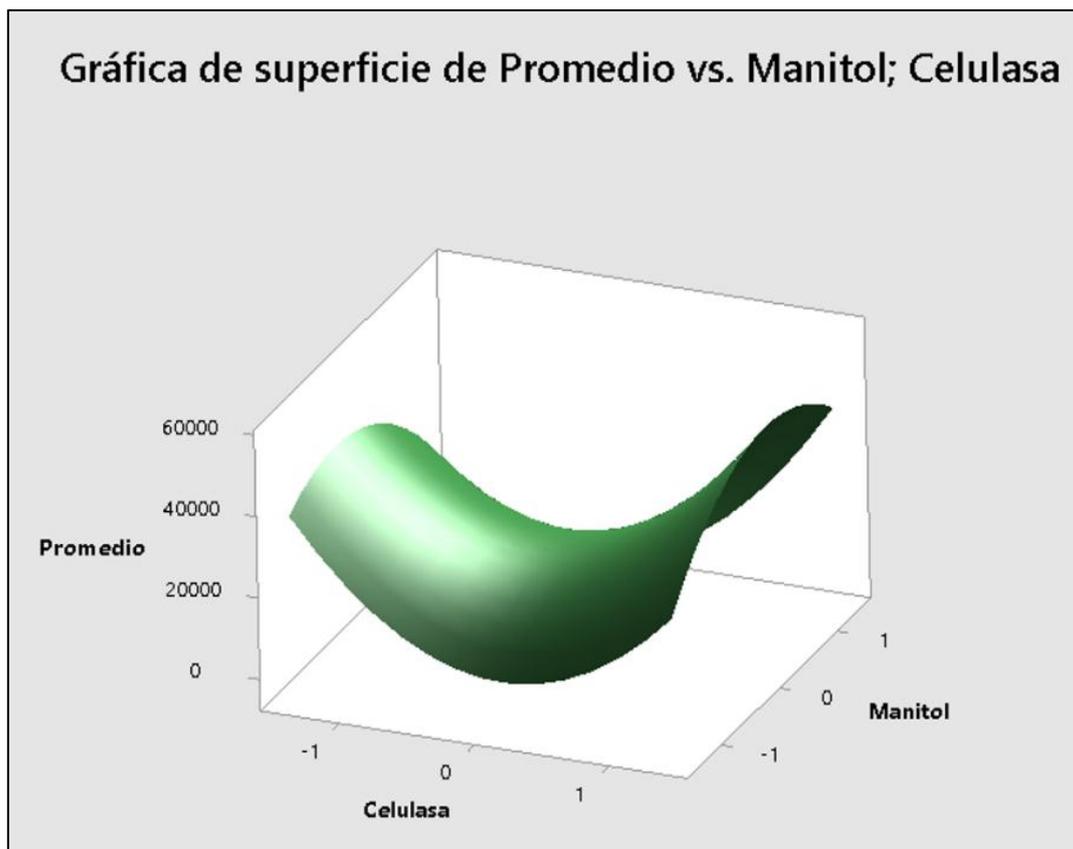


Figura 14. Superficie de respuesta entre el promedio de p.mL⁻¹ y las variables significativas.

Para el DCC, como se explicó anteriormente se empleó como tratamiento base al número 3, según los resultados obtenidos en el diseño estadístico de Plackett- Burman, tomando en cuenta que fue uno de los mejores resultados en p.mL⁻¹ de medio de aislamiento y a su vez que existe la presencia de protoplastos viables comparado a los demás tratamientos, por lo que se asumió que se pueden mejorar los resultados de este tratamiento en específico. Por lo tanto, se procedió a variar las concentraciones, tanto de la celulasa y el manitol por su significancia estadística, mientras que los otros factores se mantuvieron en las mismas condiciones.

En el gráfico de barras que corresponde a p.mL⁻¹ de medio de aislamiento (Figura 11) se observó un cambio en la obtención del promedio de protoplastos en los diferentes tratamientos, descartando a simple vista tanto el tratamiento 2 y 9 por sus resultados desfavorables; en dichos tratamientos la concentración

del manitol excede a los valores dentro del rango adecuado del regulador osmótico, según los fundamentos estipulados por Roca y Mroginski (1991) que sugieren que el rango óptimo de la osmolaridad debe ser entre 0,3 a 0,7 M; a su vez dicha teoría fue corroborada por Sain, Rodríguez & Disalvo en 2017, que al probar concentraciones no adecuadas, en efecto se perdían las propiedades de la superficie de los protoplastos en *Eruca sativa* Mill. Por otra parte, la optimización se evidenció en el tratamiento 8 casi triplicando sus resultados al tratamiento base, que corresponden a los tratamientos 1 y 10. El tratamiento 8 responde a la combinación de 1,3% de celulasa y 0,5 M de manitol.

Los resultados pueden verse afectados por un sin número de factores implicados en el aislamiento, desde factores enzimáticos, osmóticos y externos. Según Roberts, Zhang, Mihelich, Savino, & Rakotondrafara, (2017) los factores que pueden afectar al rendimiento del aislamiento pueden ser: una solución enzimática con concentraciones inadecuadas, el tiempo de digestión por parte de las enzimas es muy corto o muy prolongado, además de que la agitación es muy fuerte para las células; sin embargo, la última condición no se puede enfatizar debido a que la fase experimental sucedió sin la presencia de agitación para el medio de aislamiento, por lo que esta razón es descartada. La investigación de Klocke et al., (2012) también afirma que para la viabilidad de los protoplastos es necesario enfocarse en un ajuste de las concentraciones, dependiendo de la planta empleada, siendo este el factor más importante para obtener un mayor número de protoplastos viables y por ende se espera una correcta digestión enzimática. Con los resultados obtenidos en el DCC, se espera una mejora en cuanto a viabilidad, mediante la reducción del tiempo de incubación en el medio de aislamiento.

5.3 Protocolo final de ejecución de acuerdo al mejor tratamiento

El protocolo se basó en el análisis del tratamiento de mejores resultados obtenidos mediante la combinación de valores, producto del DCC. La reducción del tiempo de incubación de 3 a 1 h, fue debido a la comparación entre la

cantidad de protoplastos obtenidos y la viabilidad de los mismos; motivo por el cual, se modificó al mejor tratamiento obtenido en la optimización.

El protocolo de aislamiento de protoplastos de *Kalanchoe* spp., se compone de lo siguiente que se aprecia en la tabla 9:

Tabla 9.

Protocolo modificado en base a la optimización obtenida mediante el DCC.

| Componentes | Concentraciones |
|------------------------|------------------------|
| Celulasa (%) | 1,3 |
| Pectinasa (%) | 0,05 |
| Hemicelulasa (%) | 1,0 |
| Manitol (M) | 0,5 |
| CaCl ₂ (mM) | 10 |
| Buffer MES (mM) | 20 |
| Tiempo (h) | 1 |

Con el protocolo propuesto se obtuvo una cantidad aproximada de $6,05 \times 10^4$ p.mL⁻¹ de medio de incubación inicial y una viabilidad de $4,50 \times 10^4$ p.mL⁻¹, correspondiente a un porcentaje de 74,38% de viabilidad, como se aprecia en la Figura 14.

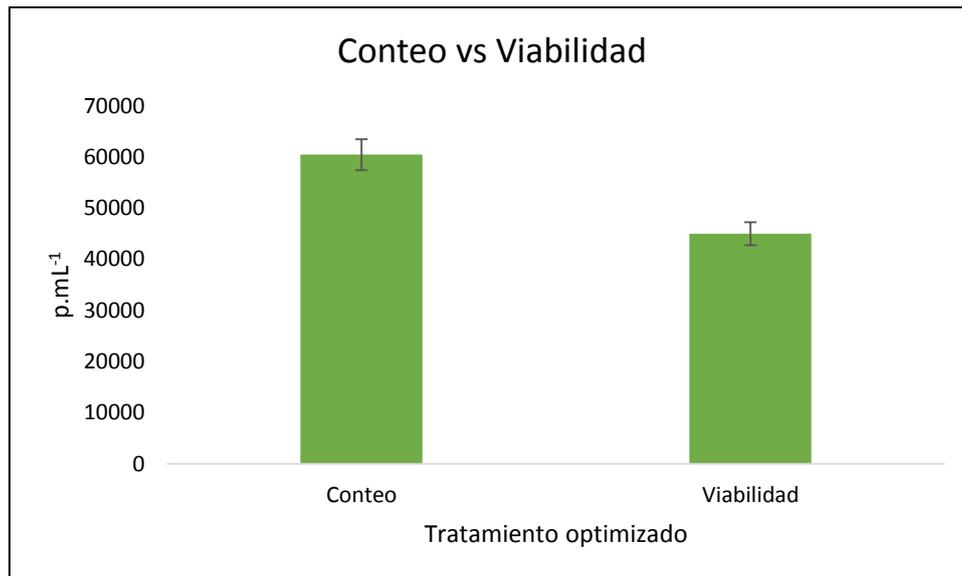


Figura 15. Total de protoplastos obtenidos en el conteo y la viabilidad

El protocolo de ejecución a 1 h de incubación demuestra una mejor morfología y mayor cantidad de protoplastos como se observa en las Figuras 15 y 16. La viabilidad se evidencia en los protoplastos que no se encuentran teñidos por el Evans Blue Dye tomando en cuenta el funcionamiento de la tinción como se describe en la metodología (Figura 17).

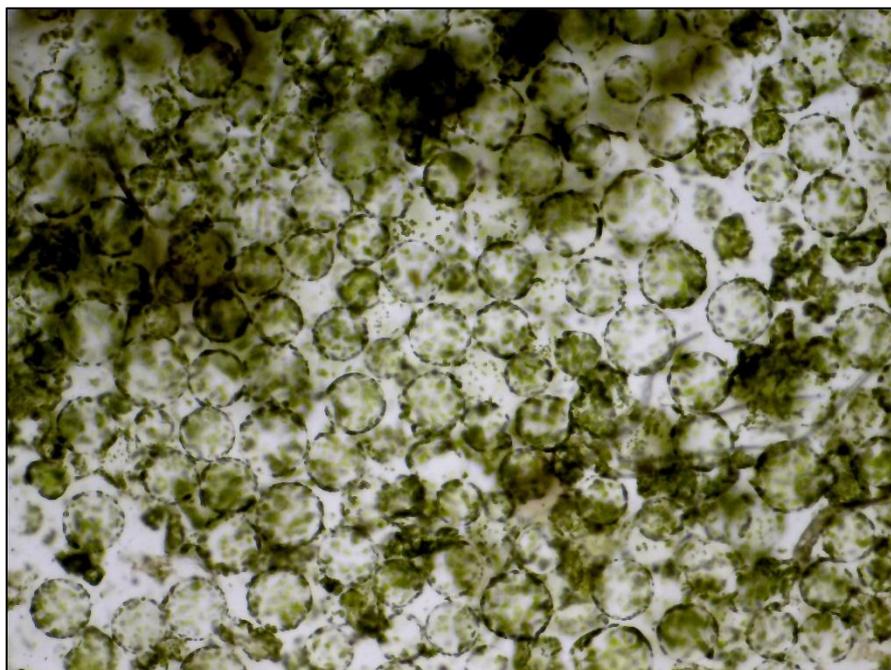


Figura 16. Protoplastos de *Kalanchoe* spp., observados en el microscopio de cultivo celular con objetivo 10X.

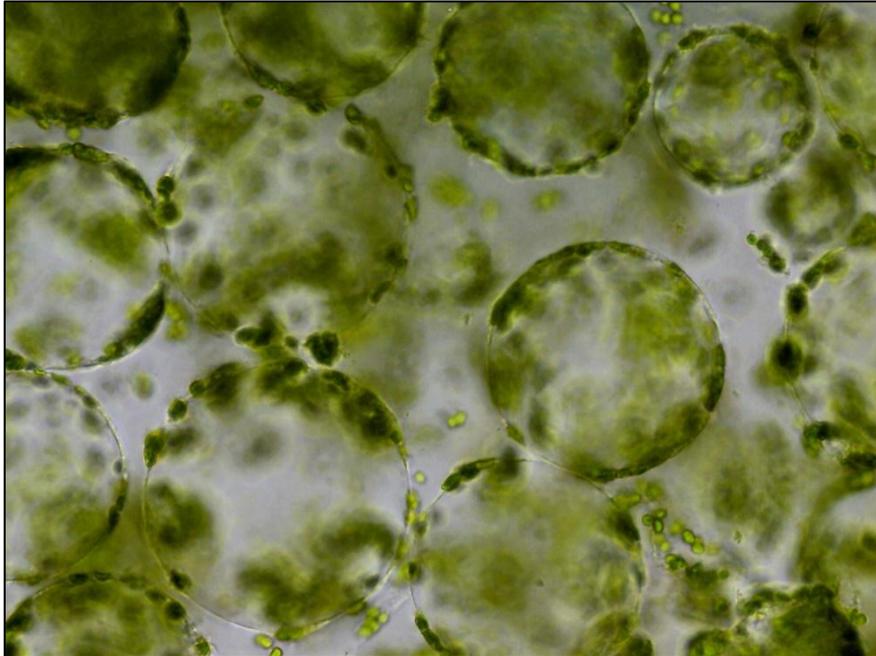


Figura 17. Protoplastos de *Kalanchoe* spp., observados en el microscopio de cultivo celular con objetivo 40X.

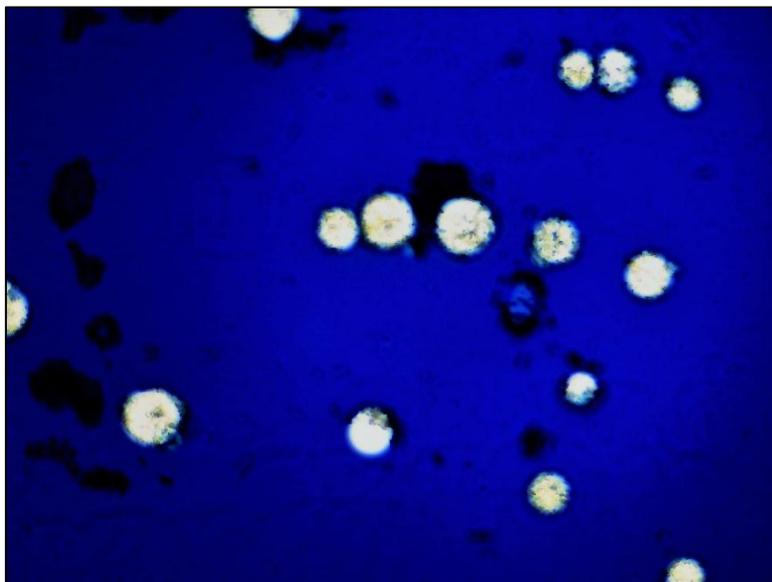


Figura 18. Protoplastos viables obtenidos por el método de tinción de Evans Blue Dye con objetivo 10X.

Según Yoo, Cho, & Sheen (2007) el tiempo de digestión de las enzimas en el medio de cultivo dependerá de los objetivos de la investigación que se desee obtener, por ejemplo en algunos estudios realizados a las 3 h de incubación los protoplastos son liberados y el material vegetal se encuentra degradado casi en su totalidad; sin embargo, se debe tomar en cuenta que la eficiencia del aislamiento difiere según el ecotipo y genotipo de la planta, por lo que la optimización del tiempo de incubación en la fase de aislamiento es único para cada ecotipo y genotipo. También afirman que cuando existe una mayor prolongación del tiempo de incubación, se genera estrés por lo que las respuestas fisiológicas de los protoplastos pueden ser eliminadas, lo que conlleva una pérdida de resultados efectivos (Yoo et al., 2007). Como se evidenció en el presente estudio la gran diferencia que implicó la disminución del tiempo de digestión de 3 a 1 h, dando mejores resultados.

El método de tinción utilizado para los protoplastos también puede ocasionar problemas de viabilidad en la observación de resultados (Tolnai, 1975). El método de tinción por Evans Blue Dye para determinar la viabilidad es empleado debido a su fácil aplicación, además de que no requiere tantos pasos para llevar a cabo el proceso y se obtienen resultados en un tiempo relativamente corto, siendo una ventaja para la investigación; sin embargo, según Tolnai (1975) se debe tomar en cuenta que existen otros métodos de tinción que pueden afectar directamente a la capacidad celular y en ocasiones puede llevar a la muerte celular, como es el caso del azul de tripán, por lo que para el empleo de soluciones de tinción se debe tomar en cuenta condiciones como pH y concentraciones adecuadas del reactivo. Otro método de tinción de protoplastos es la tinción con diacetato de fluoresceína (FDA), mediante el cual, la tinción se presenta solo en las células vivas, es decir viables y se evidencia al exponerlas a luz ultravioleta, emitiendo fluorescencia como respuesta (Roca & Mroginski, 1991). Sin embargo, presenta desventajas al necesitar de un microscopio con fluorescencia y filtros de barrera específicos, además de que el reactivo en solución solo puede ser usado durante 3 h (Widholm, 1972; Zakavi, Askari, & Irvani, 2016).

5.4 Maximización de los resultados obtenidos

Adicionalmente, de manera teórica, por medio del programa estadístico Minitab 18, es posible predecir y obtener un modelo específico maximizado en torno a las dos variables significativas estudiadas previamente. A continuación, se observa el gráfico que presenta la comparación del comportamiento tanto de la celulasa, como del regulador osmótico en este caso el manitol, mediante parábolas a lo largo de la experimentación. Los resultados reflejan que para una maximización de resultados, los valores óptimos no codificados para celulasa y manitol son 1,4142 y 0,2428, respectivamente; es decir en valores codificados correspondería a 2,7% de celulasa y 0,572 M de manitol (Figura 18).

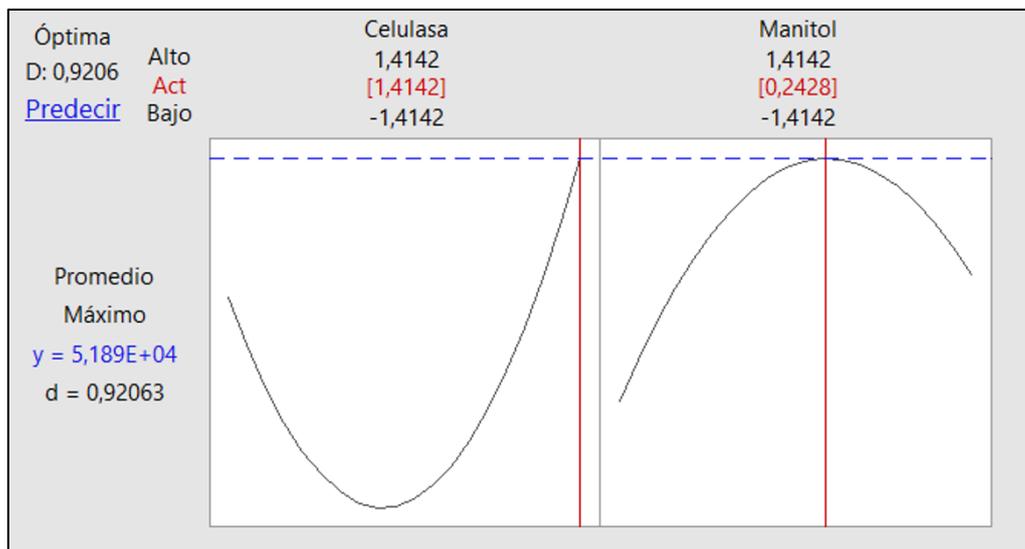


Figura 19. Predicción de la maximización de resultados obtenidos a partir del DCC.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

En la primera fase de la experimentación, correspondiente al Plackett- Burman se determinó que las dos variables más significativas según el diagrama de Pareto, fueron la celulasa y el regulador osmótico en este caso manitol.

En la segunda fase, correspondiente a la optimización de las variables de mayor significancia a través del DCC, se estableció como mejor tratamiento el 8, en el cual la concentración óptima de la celulasa en el medio de aislamiento de protoplastos corresponde a 1,3% (p/v) mientras que la concentración del manitol fue de 0,5 M, para la obtención de un mayor número de protoplastos. Sin embargo, los resultados obtenidos a las 3 h de incubación en oscuridad a 28°C no fueron considerablemente favorables en cuanto a la viabilidad. Debido a los resultados obtenidos en la segunda fase, la viabilidad tuvo mejores resultados al reducir el tiempo de digestión a 1 h.

Finalmente se estableció un protocolo de aislamiento de protoplastos a partir de hojas de *Kalanchoe* spp., logrando mejores resultados, tanto en el conteo de protoplastos como en la viabilidad de los mismos, obteniendo un total de aproximadamente $6,05 \times 10^4$ p.mL⁻¹ de medio inicial y hasta un 74,38% de protoplastos viables.

6.2 Recomendaciones

Se recomienda tomar en cuenta la calidad del material vegetal de partida para el aislamiento de protoplastos, debido a que la planta madre puede influir directamente en los resultados y por ende en el rendimiento del tejido empleado.

Se debe tomar en cuenta el corte de los explantes para lograr una mayor superficie de contacto con el medio de aislamiento.

Para la preparación de stocks de las enzimas empleadas, se recomienda el uso de soluciones tampón; en esta investigación se empleó tampón citrato para la dilución de celulasa y tampón acetato para la dilución de pectinasa y hemicelulasa.

Se propone realizar más estudios con énfasis en los puntos axiales de la superficie de respuesta, tomando en cuenta la maximización de resultados.

Finalmente, se sugiere la continuación de esta investigación a la siguiente etapa de cultivo de protoplastos partiendo de la especie utilizada.

REFERENCIAS

- Abdelnou, A., & Vincent, J. (1996). *Conceptos Basicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Recuperado el 15 de enero de 2019 de <https://books.google.com.ec/books?id=T9QOQAAlAAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Andreu, P., Arbeloa, A., Terrén, N., & Marín, J. (2009). Aislamiento y cultivo de protoplastos del patrón ciruelo 'Mariana 2624' (*Prunus cerasifera Ehrh x P. munsoniana W. Wight & Hedrick*). Recuperado el 16 de diciembre de 2018 de http://digital.csic.es/bitstream/10261/11747/1/AndreuP_ITEA_2009.pdf
- Bajaj, Y. P. S. (1974). *Isolation and culture studies on pollen tetrad and pollen mother-cell protoplasts*. *Plant Science Letters*, 3(2), 93–99. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(74\)90107-2](https://doi.org/10.1016/0304-4211(74)90107-2)
- Bastidas, O. (n.d.). Fórmula de Neubauer. Recuperado el 21 de febrero de 2019 de Celeromics website: <https://studylib.es/doc/4540608/fórmula-de-la-cámara-de-neubauer>
- Bedoya, J., & Hoyos, R. (2010). *Agitation-aeration relation effects on cell culture of Azadirachta indica a. juss neem on azadirachtin production in a stirred tank bioreactor*. En *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* (Vol. 63). Recuperado el 24 de septiembre de 2018 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24950>
- Boncompagni, E. (2013). *Protoplast isolation and fusion*. <https://doi.org/10.1201/9781351075770>
- Brady, N. C. (1976). *Advances in agronomy. Volume 28*. Academic Press.
- Butler, D. M., Ostgaard, K., Boyen, C., Evans, L. V., Jensen, A., & Kloareg, B. (1989). *Isolation conditions for high yields of protoplasts from Laminaria saccharina and L. digitata (phaeophyceae)*. *Journal of Experimental Botany*, 40(11), 1237–1246.

<https://doi.org/10.1093/jxb/40.11.1237>

- Cassells, A. C., & Curry, R. F. (2001). *Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2–3), 145–157. <https://doi.org/10.1023/A:1010692104861>
- Chamani, E., & Tahami, S. K. (2016). *Efficient protocol for protoplast isolation and plant regeneration of Fritillaria imperialis L.* *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(2), 467–482.
- Cocking, E. C. (1960). *A Method for the Isolation of Plant Protoplasts and Vacuoles*. *Nature*, 187(4741), 962–963. <https://doi.org/10.1038/187962a0>
- Cocking, E. C. (2003). *Plant Cell Protoplasts-Isolation and Development*. *Annual Review of Plant Physiology*, 23(1), 29–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.23.060172.000333>
- Duquenne, B., Eeckhaut, T., Werbrouck, S., & Van Huylenbroeck, J. (2007). *Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of Spathiphyllum and Anthurium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(2), 165–173. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9226-3>
- Eeckhaut, T., Lakshmanan, P. S., Deryckere, D., Van Bockstaele, E., & Van Huylenbroeck, J. (2013). *Progress in plant protoplast research*. *Planta*, 238(6), 991–1003. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1936-7>
- Fowke, L. C., & Constabel, F. (1989). *Plant protoplasts*.
- Georgieva, L., Tsvetkov, I., Georgieva, M., & Kondakova, V. (2016). *New protocol for in vitro propagation of berry plants by tis bioreactor*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(5), 745–751.
- Giaja, J. (1919). *Emploi des ferments dans les etudes de physiologie cellulaire:*

Le globule de levure depouille de sa membrane. CR Soc Biol Fil Paris, 82, 719–720.

González, A. (2016). Morfología de plantas vasculares. Recuperado el 10 de abril de 2019 de <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema8/index8.htm>

Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J., & Rodríguez, B. (2003). Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *E-Gnosis*, (1). Recuperado el 26 de noviembre de 2018 de <https://www.redalyc.org/html/730/73000104/>

Hernández, M., Rodríguez, M., Gómez, R., & Chong, B. (2017). Biotecnología vegetal. Recuperado 12 de diciembre de 2018 de [https://ebookcentral.proquest.com/lib/udlasp/detail.action?docID=5425806&query=protoplast isolation](https://ebookcentral.proquest.com/lib/udlasp/detail.action?docID=5425806&query=protoplast%20isolation)

Hofman, M., & Anné, J. (2008). *Plant Tissue Culture Engineering* (Volumen 6). Irlanda: Springer.

Ishii, S. (1987). *Generation of active oxygen species during enzymic isolation of protoplasts from oat leaves. In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 23(9), 653–658. <https://doi.org/10.1007/BF02621075>

Jia, X., Zhang, X., Qu, J., & Han, R. (2000). *Optimization Conditions of Wheat Mesophyll Protoplast Isolation. Agricultural Sciences*, 7, 850–858. <https://doi.org/10.4236/as.2016.712077>

Jiménez, G. (2015). Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto. Recuperado el 17 de octubre de 2018 de http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rv/n11/n11_a07.pdf

Johri, B. M. (1982). *Experimental Embryology of Vascular Plants*. Springer Berlin Heidelberg.

Kaepler, S. M., Phillips, R. L., & Olhoft, P. (1998). *Molecular Basis of Heritable Tissue Culture-induced Variation in Plants*. 465–484. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9125-6_23

- Khuri, A. I., & Cornell, J. A. (1987). *Response surfaces : designs and analyses*. Recuperado el 18 de septiembre de 2018 de https://books.google.com.ec/books/about/Response_surfaces.html?id=0C3vAAAAMAAJ&redir_esc=y
- Kielkowska, A., & Adamus, A. (2018). *Peptide Growth Factor Phytosulfokine- α Stimulates Cell Divisions and Enhances Regeneration from *B. oleracea var. capitata* L. Protoplast Culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9903-y>*
- Klercker, J. (1892). *Eine Methode zur isolier lebender protoplasten*. *Ofvers Vetensk Akad Forhandl* 49:463-474.
- Klocke, E., Weinzierl, K., Abel, S., & Kruger, H. (2012). *Protoplast Fusion for the Generation of Unique Pelargonium Plants. Encyclopedia of Cell Technology*, 119–128. <https://doi.org/10.1002/0471250570.spi096>
- Liu, J. (2012). *Protoplast isolation and culture of woody plants. Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 553–566.
- Lung, S.-C., Schoor, S., Sigurdson, D., Yanagisawa, M., Yeung, K., Liu, M. Q., & Chuong, S. D. X. (2015). *Protoplast Isolation and Staining*. In *Plant Microtechniques and Protocols* (pp. 197–211). https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_12
- Marienfeld. (n.d.). Cámara de recuento.
- Morcillo, G., Cortes, E., & García, J. (2013). *Biotecnología y alimentación*. Uned - Universidad Nacion.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M.-K., Blanco, L., Arellano, E. S., & Lara, M. (2016). *Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and improved Agrobacterium-mediated leaf disc infiltration of Phaseolus vulgaris: tools for rapid gene expression analysis. BMC Biotechnology*, 16(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0283-8>
- Pandey, S., Wang, X.-Q., Coursol, S. A., & Assmann, S. M. (2002). *Preparation*

and applications of Arabidopsis thaliana guard cell protoplasts.

Recuperado el 29 enero de 2019 de www.newphytologist.com

- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). *The Design of Optimum Multifactorial Experiments*. Recuperado el 13 de febrero de 2019 de <https://academic.oup.com/biomet/article-abstract/33/4/305/225377>
- Ponmurugan, P., & Kumar, S. K. (2015). *Applications of Plant Tissue Culture*.
- Poot, W., & Hernández, T. (2013). ¿Qué son los protoplastos y para qué sirven? Recuperado el 17 de enero de 2019 de <http://news.jic.ac.uk>
- Rangel, C., & Duran, E. (2015). Fusión de Protoplastos: Biotecnología Farmacéutica. (1), 346–349.
- Roberts, R., Zhang, J., Mihelich, N., Savino, D., & Rakotondrafara, A. M. (2017). *Manipulation of Oat Protoplasts for Transient Expression Assays*. 1536. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6682-0>
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J., ... Debergh, P. (2005). *Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6746-y>
- Rosiles, A., Durán, E., & Rodríguez, C. (2015). Biotecnología Farmacéutica: Fusión de Protoplastos de dos Especies de Nopal de la Ciudad de Guanajuato. (1), 663–667.
- Sahab, S., Hayden, M., Mason, J., & Spangenberg, G. (2018). *Mesophyll Protoplasts and PEG-Mediated Transfections: Transient Assays and Generation of Stable Transgenic Canola Plants*. *Imperial Leather*, 1864.

- Sain, P. M., Rodríguez, S., & Disalvo, E. A. (2017). *Effect of Osmotic Stress on the Surface Properties of Protoplasts as Measured by Merocyanine 540*. *Vegetos-An International Journal of Plant Research*. <https://doi.org/10.5958/2229-4473.2017.00194.X>
- Sánchez, D., & Trejo, N. (2003). *Biología celular y molecular*.
- Sandoval, E., & Rojas, A. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. UNAM.
- Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta*. 240. Recuperado el 21 de diciembre de 2018 de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Shen, Y., Meng, D., McGrouther, K., Zhang, J., & Cheng, L. (2017). *Efficient isolation of Magnolia protoplasts and the application to subcellular localization of MdeHSF1*. *Plant Methods*, 13(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0193-3>
- Smith, R. H., Park, J. K., Park, S., & Craven, J. E. (2013). *Protoplast Isolation and Fusion*. *Plant Tissue Culture*, 147–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415920-4.00013-X>
- Stewart, N. (2008). *Plant Biotechnology and Genetics*.
- Szabados, L. (1991a). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Recuperado el 12 de enero de 2019 de [http://listas.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo de Tejidos en la Agricultura/capitulo10_parte1.pdf](http://listas.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo10_parte1.pdf)
- Szabados, L. (1991b). *Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas*. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*, 240–270. Recuperado el 28 de noviembre de 2018 de [http://listas.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo de Tejidos en la Agricultura/capitulo10_parte1.pdf](http://listas.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo10_parte1.pdf)
- Tolnai, S. (1975). *A method for viable cell count*. *Tissue Culture Association Manual*, 1(1), 37–38. <https://doi.org/10.1007/bf00914435>

- Wang, Y., Cheng, L., Liang, Y., Lu, X., & Zhang, F. (2017). *Isolation and Culture of Pollen Tetrad Protoplasts from Solanum tuberosum*. *American Journal of Potato Research*, 94(4), 417–424. <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9578-0>
- Widholm, J. M. (1972). *The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells*. *Biotechnic and Histochemistry*, 47(4), 189–194. <https://doi.org/10.3109/10520297209116483>
- Wu, J.-Z., Liu, Q., Geng, X.-S., Li, K.-M., Luo, L.-J., & Liu, J.-P. (2017). *Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (Manihot esculenta Crantz)*. *BMC Biotechnology*, 17(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0349-2>
- Yadav, N. P., & Dixit, V. K. (2003). *Hepatoprotective activity of leaves of Kalanchoe pinnata Pers.* *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2–3), 197–202. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00074-6)
- Yao, X., Zhao, W., Yang, R., Wang, J., Zhao, F., & Wang, S. (2018). *Preparation and applications of guard cell protoplasts from the leaf epidermis of Solanum lycopersicum*. *Plant Methods*, 14(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0294-7>
- Yeung, E. C. T., Stasolla, C., Sumner, M. J., & Huang, B. Q. (2015). *Plant microtechniques and protocols*. *Plant Microtechniques and Protocols*, 1–572. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3>
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., & Sheen, J. (2007). *Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>
- Zakavi, M., Askari, H., & Irvani, N. (2016). *Optimizing micropropagation of drought resistant Pyrus boissieriana Buhse*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22(4), 583–593. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0387-6>

Zhai, Z., Jung, H., & Vatamaniuk, O. K. (2009). *Isolation of Protoplasts from Tissues of 14 day old Seedlings of Arabidopsis thaliana*. *Journal of Visualized Experiments*, (30), 15–17. <https://doi.org/10.3791/1149>

