

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CULTIVO DE PROTOPLASTOS EN
GUADUA ANGUSTIFOLIA KUNTH (POACEAE: BAMBUSOIDEAE)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y
Recursos Naturales para optar por el grado y título de
Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos
Naturales con énfasis en Biotecnología

ANDREA HOLST SANJUÁN

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2014

Agradecimientos

De manera muy especial quisiera agradecer al Dr. Víctor Jiménez por su orientación, apoyo incondicional y valiosas recomendaciones para lograr el desarrollo exitoso de este trabajo y por brindarme una excelente formación académica.

A los miembros del comité de tesis, Dr. Eric Guevara y Dr.rer.nat Federico Albertazzi, mi más sincero agradecimiento por su ayuda y excelentes contribuciones durante la elaboración de la tesis.

A M.Sc. Griselda Arrieta y Dra. Adriana Murillo por sus valiosos aportes durante la revisión de este documento.

A María Viñas por la gran ayuda y las valiosas sugerencias brindadas durante el desarrollo de este trabajo así como por su excelente amistad.

A Paúl Solórzano, Dessirée Zerpa, Catalina Acuña y Andrés Hernández, así como a los asistentes del CIGRAS, muchas gracias por su apoyo y amistad.

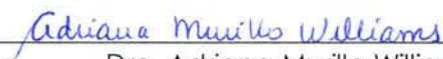
Al Dr. Reinhold Carle por haberme permitido realizar parte de la tesis en el Departamento de Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Hohenheim. A Andreas Nagel por su excelente ayuda, dedicación y apoyo incondicional en la elaboración de mi pasantía durante mi estancia en Alemania.

A mis padres, hermanos y familia por el apoyo de siempre.

A Anthony por el cariño y apoyo incondicional.

Al CONICIT por el gran apoyo económico brindado para poder realizar mi pasantía en Alemania.

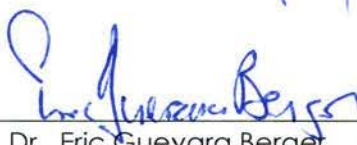
"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología."



Dra. Adriana Murillo Williams
**Representante de la Decana
del Sistema de Estudios de Posgrado**



Dr. Víctor Jiménez García
Director de Tesis



Dr. Eric Guevara Berger
Asesor



Dr.rer.nat. Federico Albertazzi Castro
Asesor



M.Sc. Griselda Arrieta Espinoza
**Representante del Director del Programa de Posgrado
en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales**



Andrea Holst Sanjuán
Candidata

Índice General

AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	IV
RESUMEN.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. GENERAL.....	4
2.2. ESPECÍFICOS	4
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1. GENERALIDADES DEL BAMBÚ	5
3.2. SUBTRIBU GUADUINAE	6
3.2.1 <i>Guadua angustifolia</i> Kunth.....	7
3.3. PROTOPLASTOS	9
3.3.1 <i>Protoplastos en monocotiledóneas</i>	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1. FORMACIÓN DE CALLO	14
4.1.1 <i>Procedencia del material</i>	14
4.1.2 <i>Tratamientos</i>	14
4.1.3 <i>Variables evaluadas y análisis estadístico</i>	15
4.2. CRECIMIENTO DE CALLO	15
4.2.1 <i>Tratamientos</i>	15
4.2.2 <i>Variables evaluadas y análisis estadístico</i>	15
4.3. SUSPENSIONES CELULARES.....	16
4.3.1 <i>Establecimiento</i>	16
4.3.2 <i>Subcultivos</i>	16
4.3.3 <i>Determinación de la tasa de crecimiento</i>	16
4.4. AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE HOJA	17
4.4.1 <i>Preplasmólisis y aislamiento</i>	17
4.5. AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE CALLO	20
4.5.1 <i>Preplasmólisis</i>	20
4.5.2 <i>Aislamiento</i>	20
4.6. DETECCIÓN DE POLIFENOLES	26
4.6.1 <i>Preparación del material</i>	26
4.6.2 <i>Análisis mediante HPLC</i>	27
4.7. ANÁLISIS ENZIMÁTICO MEDIANTE SDS-PAGE	28
4.7.1 <i>Preparación de las enzimas</i>	28
4.7.2 <i>Preparación del SDS-PAGE</i>	29
4.7.3 <i>Tinción del SDS-PAGE</i>	30

4.8. ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR	30
4.8.1 <i>Material insoluble en alcohol (MIA)</i>	30
4.8.2 <i>Extracción secuencial de MIA</i>	31
4.8.3 <i>Hidrólisis ácida</i>	33
4.8.4 <i>Análisis mediante HPAEC-PAD</i>	33
4.8.5 <i>Análisis del contenido de lignina</i>	36
5. RESULTADOS	37
5.1. CALLOS Y SUSPENSIONES CELULARES	37
5.2. PROTOPLASTOS A PARTIR DE HOJA	41
5.3. PROTOPLASTOS A PARTIR DE CALLO	41
5.4. DETECCIÓN DE POLIFENOLES	49
5.5. ANÁLISIS ENZIMÁTICO MEDIANTE SDS-PAGE.....	51
5.6. ANÁLISIS DE LA PARED CELULAR	52
6. DISCUSIÓN	58
6.1. CALLOS Y SUSPENSIONES CELULARES	58
6.2. AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE HOJA	61
6.3. AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE CALLO	62
6.4. COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR	68
7. LITERATURA CITADA	71
8. ANEXOS.....	82

Resumen

El gran interés comercial que existe para la *Guadua angustifolia* ha creado la necesidad de diseñar estrategias para generar cultivares mejorados. Los problemas asociados a la propagación de esta especie hacen de los protoplastos una alternativa interesante para su mejoramiento genético. Para ello, se indujo la formación de callo a partir de segmentos basales de brotes jóvenes y puntas de raíz de plantas de *G. angustifolia* establecidas *in vitro*. Se utilizó los reguladores de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a 0, 3 y 6 mg/l y 2,4-D a 3 mg/l en combinación con tiazurón (TDZ) a 0,01 mg/l; todos los explantes se mantuvieron en oscuridad. El tratamiento en que más explantes desarrollaron callo fue el de 2,4-D a 6 mg/l, tanto para brotes jóvenes (92%), como para puntas de raíz (76%). Los callos obtenidos a partir de segmentos de brote fueron 100% blancos y en su mayoría friables, con excepción del tratamiento 2,4-D+TDZ en el cual el 50% de los callos fue de color café y el 100% de ellos tuvo apariencia nodular. Por otro lado, el 100% de los callos formados a partir de las puntas de raíz en todos los tratamientos fue blanco y en su mayoría con apariencia nodular. Los callos formados se transfirieron a medios de crecimiento, de los cuales únicamente los adicionados con sólo 2,4-D presentaron crecimiento. El tratamiento con 10 mg/l de 2,4-D mostró la menor oxidación a los tres meses de cultivo. A partir de los callos formados de segmentos de brote, se establecieron suspensiones celulares en 2,4-D a 10 mg/l. Se obtuvo un incremento de 250% en el volumen de células compactas (VCC) en los primeros 15 días de cultivo.

Se realizaron varias pruebas para aislar protoplastos a partir de hojas tanto de invernadero como de plantas establecidas *in vitro*, así como de los callos y suspensiones celulares previamente formadas. No se logró obtener protoplastos a partir de hojas (ni de *in vitro* ni de invernadero). En cuanto a los callos, se observó el oscurecimiento del tejido y del medio durante la digestión de la pared celular. El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) mostró la presencia de dos compuestos fenólicos liberados durante la digestión. La adición de cisteína (5,3 g/l) a la solución enzimática disminuyó la oxidación de los fenoles y se logró observar $1,34 \times 10^4$ protoplastos por gramo con un 70% de viabilidad con la solución enzimática compuesta por celulasa RS 4%, macerocima R10 2% y pectoliasa Y23 1%, con un tratamiento de vacío de 40 minutos a 60 cmHg y una digestión total de 2 horas a 100 rpm. No se encontró diferencia al agregar driselasa a la solución enzimática; sin embargo, la pectoliasa Y23 se encontró determinante. Se analizó la pared celular mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) de los callos y hojas (*in vitro* y de invernadero) de *G. angustifolia*, así como de *Petunia hybrida* (hojas *in vitro*), *Salpiglossis sinuata* (callos), *Hylocereus* sp. (callos), *Nicotiana sanderae* (callos), *Nicotiana debneyi* (callos) y *Nicotiana gossei*. Se encontró altos contenidos de xilosa y arabinosa, en especial en los callos de bambú, en las fracciones de hemicelulosa y celulosa; estos azúcares sugieren la presencia de glucuronoarabinosilanos. Esto contrasta con lo encontrado en *N. sanderae*, en donde parecen predominar los xiloglucanos, lo cual sugiere que se debe agregar una enzima con actividad tanto celulasa como xilanasas durante el aislamiento de protoplastos de *G. angustifolia*.

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Condiciones de aislamiento, rendimiento y viabilidad de protoplastos a partir de callo u hoja en diversas especies de monocotiledóneas.....	13
Cuadro 2. Pruebas realizadas para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas <i>in vitro</i> y de invernadero de <i>G. angustifolia</i>	17
Cuadro 3. Medio de cultivo MS modificado (MSBSOH) utilizado para el aislamiento y purificación de protoplastos de <i>G. angustifolia</i>	19
Cuadro 4. Pruebas realizadas para el aislamiento de protoplastos a partir de callo y suspensiones celulares de <i>G. angustifolia</i>	21
Cuadro 5. Composición de los geles separador y espaciador utilizados para el gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	29
Cuadro 6. Condiciones de cultivo y material utilizado de las especies seleccionadas para el análisis de polisacáridos de la pared celular.....	31
Cuadro 7. Reactivos utilizados y soluciones madre para la preparación de soluciones estándar de azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico.....	34
Cuadro 8. Diluciones preparadas para la elaboración de los estándares para análisis de azúcares neutros y ácidos glucurónico y galacturónico.....	34
Cuadro 9. Gradientes de eluentes utilizados para la determinación simultánea de los azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC-PAD).....	35
Cuadro 10. Presencia y características del callo formado a partir de segmentos de brote y puntas de raíz de <i>G. angustifolia</i> , a los 70 días de evaluación.....	37
Cuadro 11. Crecimiento y porcentaje de callos no oxidados de <i>G. angustifolia</i> provenientes de brotes con tres concentraciones de 2,4-D al cabo de tres meses de cultivo.....	39
Cuadro 12. Porcentaje de incremento en el volumen de células compactas (VCC) en cuatro transferencias consecutivas cada 15 días, de suspensiones celulares de <i>G. angustifolia</i>	40
Cuadro 13. Células de <i>G. angustifolia</i> plasmolizadas a distintos tiempos con el medio de Power y Champan (1985) (CPW), más 13% manitol	42
Cuadro 14. Iones característicos de los polifenoles encontrados en el tratamiento de 16 horas de digestión enzimática de los callos de <i>G. angustifolia</i> con las enzimas celulasa 2% y macerocima 1% en las fracciones 1 y 2 a 280 nm.....	51

Cuadro 15. Composición de azúcares neutros y ácido urónico del material insoluble en alcohol (MIA) de la pared celular de callos y hojas de las distintas especies analizadas.....	54
Cuadro 16. Composición de azúcares neutros y ácido urónico de cada fracción de material insoluble en alcohol (MIA) de la pared celular de callos y hojas de <i>G. angustifolia</i> y callos de <i>N. sanderae</i>	55
Cuadro 17. Comparación de las condiciones de digestión enzimática, protoplastos por gramo y viabilidad obtenidos en distintas especies con respecto al porcentaje de lignina obtenido.....	57

Índice de Figuras

- Figura 1.** Tipos de corte utilizados para el aislamiento de protoplastos de *G. angustifolia* a partir de hojas.....18
- Figura 2.** Callos formados a los 70 días de cultivo a partir de segmentos de brotes jóvenes y puntas de raíz de plantas *in vitro* de *G. angustifolia*.....38
- Figura 3.** A) Callos de *G. angustifolia* en medio de cultivo con 10 mg/l de 2,4-D, formados a partir de segmentos de brote, empleados para la elaboración de las suspensiones celulares. B) Suspensiones celulares obtenidas en medio de cultivo líquido con 10 mg/l 2,4-D.....40
- Figura 4.** Representación de células de *G. angustifolia* plasmolizadas a distintos tiempos con el medio de Power y Chapman (1985) (CPW), más 13% manitol.....42
- Figura 5.** Agregados celulares observados luego de 16 horas de digestión enzimática utilizando callos provenientes de brotes, callos de raíz y suspensiones celulares de callos provenientes de brotes de *G. angustifolia*.....43
- Figura 6.** Resultado de la adición de cisteína (5,3 g/l) durante la preplasmólisis y digestión enzimática sobre el oscurecimiento de la solución enzimática y del tejido (experimento 11, cuadro 3).44
- Figura 7.** Protoplastos de *G. angustifolia* obtenidos a partir de callos con una solución enzimática compuesta por celulasa RS 4%, macerocima R10 2%, pectoliasa Y23 1% y cisteína 5,3 g/l, 16 horas de digestión a 100 rpm. Sin tratamiento de vacío y con tratamiento de vacío por 20 minutos a 60 cmHg.45
- Figura 8.** Protoplastos obtenidos por gramo de callo de *G. angustifolia* y su viabilidad con distintos tiempos de digestión enzimática a 100 rpm con una composición de 4% celulasa, 2% macerocima, 1% pectoliasa y cisteína 5,3 g/l, y con un tratamiento de vacío de 20 minutos a 60 cmHg..46
- Figura 9.** Protoplastos obtenidos por gramo de callo de *G. angustifolia* y su viabilidad con una digestión enzimática de 2 horas a 100 rpm en una solución compuesta por 4% celulasa, 2% macerocima, 1% pectoliasa y cisteína 5,3 g/l, y con dos tratamientos de vacío: 20 o 40 minutos a 60 cmHg.....47
- Figura 10.** Protoplastos obtenidos por gramo de callo de *G. angustifolia* y su viabilidad con una digestión enzimática de 2 horas a 100 rpm en una solución base compuesta por 4% celulasa, 2% macerocima, 1% pectoliasa y cisteína 5,3 g/l, con y sin 1% driselasa y sin 1% pectoliasa, con un tratamiento de vacío de 40 minutos a 60 cmHg..48
- Figura 11.** Protoplastos obtenidos por gramo de callo de *G. angustifolia* y su viabilidad con una digestión enzimática de 2 horas a 100 rpm en una solución base compuesta por 4% celulasa, 2% y macerocima, con y sin cisteína 5,3 g/l y manitol al 11% y 5,5%, con un tratamiento de vacío de 40 minutos a 60 cmHg..48

- Figura 12.** Protoplastos de *G. angustifolia* obtenidos a partir de callos con una solución enzimática compuesta por celulasa RS 4%, macerocima R10 2%, pectoliasa Y23 1% y cisteína 5,3 g/l, con tratamiento de vacío durante 40 minutos a 60 cmHg y 2 horas de digestión. A) Anillo de protoplastos observado durante el aislamiento. B) Flechas señalando los protoplastos viables obtenidos.....49
- Figura 13.** Cromatogramas de la fracción 2 (280 nm), para los tratamientos de callos de *G. angustifolia* en A) suspensión celular, B) 16 horas de digestión con una solución enzimática en ausencia de enzimas y C) 16 horas de digestión enzimática con las enzimas celulasa 2% y macerocima 1%.....50
- Figura 14.** Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) del 5-13% teñido con azul de Coomassie de las enzimas celulasa RS 4%, macerocima R10 2% y pectoliasa Y23 1% solas o combinadas, con y sin cisteína.....52
- Figura 15.** Fibras observadas luego de la hidrólisis ácida del material insoluble en alcohol (MIA) en las muestras de *G. angustifolia* de hojas de invernadero y hojas *in vitro*.....56

Índice de Anexos

- Anexo 1.** Medio de cultivo de Power y Chapman (1985) (CPW) utilizado durante la preplasmólisis y el aislamiento de protoplastos de *G. angustifolia*.....82
- Anexo 2.** Solución de azul de Evans de Gaff y Okong´O-Ogola (1971) utilizada para determinar la viabilidad de los protoplastos de *G. angustifolia* obtenidos.....82
- Anexo 3.** Características del equipo de cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC-PAD) empleadas para el análisis de azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico.....83
- Anexo 4.** A) Cromatograma estándar empleado para la determinación de azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico (2,5 mg/l del 1-7+9 y 15 mg/l del 8). B) Representación del cromatograma obtenido para el análisis de azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico (muestra del material insoluble en alcohol (MIA) de callos de *G. angustifolia*).....84

1. Introducción

El bambú es una Poaceae ampliamente distribuida tanto en climas templados como tropicales. Su mayor diversidad se encuentra en Asia, especialmente en India, China y Japón. Tanto los bambúes "leñosos" como los herbáceos se encuentran en la subfamilia Bambusoideae; sin embargo, sólo a los "leñosos" se les ha identificado hasta ahora un potencial económico importante (Quintans, 1998; Gielis y Oprins, 2002).

El género *Guadua* pertenece a la subtribu Guaduinae. Dentro de este género, la especie "leñosa" más útil y de mayor importancia económica en América es *Guadua angustifolia* Kunth (Judziewics *et al.*, 1999). Este bambú ha sido considerado como el tercero más grande del mundo (Londoño, 2000). Debido a su calidad, resistencia y durabilidad se han reportado diversos usos para *G. angustifolia*, principalmente para construcción (Gutiérrez, 2000).

El aumento acelerado en la deforestación hace indispensable la búsqueda de recursos naturales alternativos. Los bambúes "leñosos" son un recurso que podría ayudar a solucionar algunos de los problemas ambientales y sociales ocasionados por la excesiva deforestación, debido a sus características biológicas: evita la erosión, es un cultivo perenne, reduce los niveles de dióxido de carbono en la atmósfera, es ligero, flexible y resistente, por lo que además se pueden emplear en la industria de muebles y materiales de construcción (Quintans, 1998).

El creciente interés agrícola y comercial por *G. angustifolia* en distintas partes del mundo, principalmente en Centro y Sur América, ha creado la necesidad del diseño de estrategias para generar cultivares mejorados. Debido a que el bambú, en general, presenta una floración impredecible y muy espaciada en el tiempo, las técnicas de mejoramiento convencional muchas veces no resultan eficientes, por lo que hace necesario el uso de alternativas parasexuales para generar nuevas combinaciones genéticas, como lo son la fusión de protoplastos y la transformación mediante ADN recombinante (Huang y Murashige, 1983; Huang *et al.*, 1989b).

Los protoplastos son células vegetales desprovistas de pared celular que se pueden obtener a partir de raíces, coleóptilos, hojas, callos o suspensiones celulares (Galun, 1981). El aislamiento de estas células se puede realizar por métodos mecánicos, por digestión de la pared celular mediante enzimas (pectinasas, hemicelulasas, celulasas, entre otras) o por una combinación mecánica-enzimática. Para el aislamiento es necesario contraer la pared, plasmolizando las células con soluciones de sales con azúcares o alcoholes de azúcares (Gutiérrez *et al.*, 2003). Si estas células resultan viables, rápidamente sintetizan una nueva pared celular, crecen y se pueden dividir, llegando, eventualmente, a regenerar una nueva planta (Azpíroz, 1994).

Se han realizado diversos trabajos en protoplastos de monocotiledóneas, principalmente en arroz (Hasezawa *et al.*, 1989; Kyojuka *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1989; Mori *et al.*, 1991), pero también de otras especies como el pasto *Panicum virgatum* L., utilizado para producir biocombustibles (Mazarei *et al.*, 2008), la planta acuática (*Anubias nana*) (Pongchawee *et al.*, 2006), vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) (Prasertsongskun, 2004), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Falco *et al.*, 1996) y palma (*Phoenix dactylifera* L.) (Rizkalla *et al.*, 2007). Además se ha logrado la regeneración de plantas a partir de protoplastos de maíz (Mórocz *et al.*, 1990; Mitchell y Petolino, 1991).

En el caso de bambú, se han realizado pocos estudios utilizando protoplastos. Tseng *et al.*, (1975) obtuvieron protoplastos a partir de hojas de *Bambusa* sp. En otro estudio, Huang *et al.* (1989a) obtuvieron protoplastos de *Bambusa multiplex* y *Bambusa oldhamii* a partir de suspensiones celulares de callos provenientes de ápices. Finalmente Hisamoto y Kobayashi (2010) obtuvieron protoplastos a partir de hojas de *Lithachne pauciflora*, *Phyllostachys meyeri*, *Sasa jotanii* y *Bambusa vulgaris*. Se recalca la necesidad de evaluar parámetros distintos para cada especie de bambú, ya que las enzimas utilizadas para la obtención de protoplastos han mostrado variación en cuanto a su efectividad entre especies. En ninguno de estos estudios fue posible regenerar plantas a partir de los protoplastos obtenidos.

Los protoplastos de plantas proveen el punto de partida para la utilización de diversas técnicas de manipulación genética. Su uso permite la fusión de especies que son sexualmente incompatibles en la naturaleza, permitiendo crear nuevos híbridos mediante la hibridación somática (Szbados, 1993). Además, es ideal para la incorporación de genes foráneos, por medio de microinyección o electroporación, por lo que es una

herramienta importante para la obtención de plantas con características nuevas (Azpiroz, 1994; Davey *et al.*, 2004). Debido a que estas células se encuentran rodeadas solamente por la membrana plasmática, también les confiere gran utilidad para estudios fisiológicos (Szabados, 1993).

Por tanto, debido a que no se han realizado trabajos con protoplastos en *G. angustifolia*, y debido al potencial que tiene esta especie, es importante establecer metodologías para el aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos que permitan crear las bases para futuras investigaciones en mejoramiento genético.

2. Objetivos

2.1. General

Desarrollar protocolos eficientes para aislar, purificar y cultivar protoplastos viables de *Guadua angustifolia* Kunth.

2.2. Específicos

- Establecer una metodología para el aislamiento y purificación de protoplastos viables a partir de hojas y callos de *G. angustifolia*.
- Determinar cuál tejido (hojas o callos), resulta más adecuado para el aislamiento y purificación de protoplastos viables de *G. angustifolia*.
- Definir parámetros de densidad y las condiciones de cultivo adecuadas que permitan mantener la viabilidad de protoplastos de *G. angustifolia* y que luego formen pared y se dividan.

3. Revisión de Literatura

3.1. Generalidades del bambú

El bambú es una Poaceae ampliamente distribuida tanto en climas templados como tropicales. Son plantas muy antiguas ya que datan desde el Mioceno. Su mayor diversidad se encuentra en Asia, especialmente en India, China y Japón. Existen alrededor de 75 géneros y 1250 especies (Mudoji *et al.*, 2013). Tanto los bambúes "leñosos" como los herbáceos se encuentran en la subfamilia Bambusoideae; sin embargo, sólo los "leñosos" poseen un potencial económico importante (Quintans, 1998; Gielis y Oprins, 2002).

Es considerada como una de las plantas que crece con mayor rapidez, debido a que posee un rizoma extensivo que sirve de reserva para almacenar gran cantidad de nutrimentos. Las plantas de bambú pueden llegar a alcanzar los 40 m de altura con un diámetro de hasta 30 cm según la especie (Rao *et al.*, 1992).

Debido a sus características biológicas, es un recurso que podría ayudar a solucionar algunos de los problemas ambientales y sociales ocasionados por la excesiva deforestación, ya que disminuye la erosión y reduce los niveles de dióxido de carbono en la atmósfera. Además, se puede emplear en la industria de muebles y materiales de construcción ya que es ligero, flexible y resistente (Quintans, 1998).

El bambú se ha empleado como material de construcción para techos, paredes, pisos y partes estructurales; así como también para la construcción de puentes, ya que posee una estructura fuerte pero ligera y muy flexible. Además, se utiliza en utensilios de cocina, canastas, alfombras, contenedores, herramientas, escaleras, cañas de pescar, para la elaboración de papel, instrumentos musicales y botes, entre otros (Quintans, 1998; Londoño, 2000; Held y Manzano, 2003).

3.2. Subtribu Guaduinae

La subtribu Guaduinae incluye los bambúes más grandes nativos de América. Se encuentra distribuida desde México hasta Uruguay y Argentina e incluye seis géneros: *Apoclada*, *Criciuma*, *Eremocaulon*, *Guadua*, *Olmeca* y *Otatea*, con aproximadamente 35 especies en total (Londoño, 1996; Judziewicz *et al.*, 1999). Los primeros tres géneros son endémicos de Brasil, *Olmeca* lo es de México. *Otatea* se distribuye desde México, pasando por Centroamérica, hasta el noreste de Colombia. *Guadua* se encuentra desde México hasta Argentina y Uruguay, en especial en Ecuador y Colombia (Londoño, 1996; Quintans, 1998; Held y Manzano, 2003).

El género *Guadua* comprende 24 especies. Es el más ampliamente distribuido y el de mayor importancia económica de los anteriores (Londoño, 1996; Quintans, 1998; Judziewicz *et al.*, 1999). En Costa Rica es posible encontrar las especies *G. angustifolia*, *G. paniculata*, *G. amplexifolia* y *G. macclurei*, donde la *G. angustifolia* es la de mayor importancia comercial (Montiel, 2014¹). Se estimó en el 2005 alrededor de 500 hectáreas de *G. angustifolia* distribuidas principalmente en San Carlos, zona Atlántica y Pérez Zeledón (González, 2014²; Montiel, 2014¹). Las especies en este género pueden llegar a alcanzar alturas hasta de 30 m con culmos de 21 cm de diámetro. Se distinguen de otros miembros de la subfamilia por los culmos largos con presencia de bandas de pelos blancos en la región del nudo, ramas laterales usualmente con espinas y hojas triangulares; además, presentan quillas aladas en la pálea del flósculo de la espiguilla (Londoño, 1996, 2000). Su distribución va desde los 0 a los 2800 msnm, siendo más abundante en elevaciones de los 0 a los 1500 msnm (Judziewicz *et al.*, 1999).

Se ha informado de muchos usos para productos derivados de plantas de este género, principalmente debido a la gran calidad y durabilidad que poseen (Londoño, 1996). Dentro de este género, la especie más útil es *Guadua angustifolia* Kunth, la cual es considerada como la especie "leñosa" de mayor importancia económica en América (Judziewicz *et al.*, 1999).

¹ Montiel, M. 2014. Comunicación personal sobre las especies de *Guadua* en Costa Rica. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica.

² González, A. 2014. Comunicación personal sobre el inventario de bambúes en Costa Rica. Asociación Costarricense de Bambú (ACOBAMBU).

3.2.1 *Guadua angustifolia* Kunth

3.2.1.1 Generalidades y usos

Guadua angustifolia es nativa de Venezuela, Colombia y Ecuador; sin embargo, ha sido introducida a varios países de Centroamérica, el Caribe y Asia (Londoño, 2000). Es posible encontrarla en altitudes que van desde los 0 hasta los 2200 msnm, aunque su máximo desarrollo se logra entre los 1000 y 1600 msnm (Londoño, 1996; Held y Manzano, 2003). Se ha encontrado en distintos tipos de hábitat, con temperaturas de 20 a 26°C, con una humedad relativa de 75 a 85%, una luminosidad de 1800 a 2000 horas/luz por año, en suelos areno-limosos, francos, franco-arenosos y franco-limosos con pH de 5,5 a 6,0 (Held y Manzano, 2003). Es una especie diploide, que posee 23 cromosomas ($2n=46$), los cuales están organizados en cinco grupos de tamaño que varían desde 0,5 a 0,6 μm (Valencia et al., 2012).

Existen varios ecotipos de *G. angustifolia* que responden a condiciones climáticas y edáficas específicas. Dentro de estos se encuentran los denominados como "cebolla", "macana", "cotuda" o "castilla". Adicionalmente, se conocen dos variantes de la *G. angustifolia* típica: *G. angustifolia* var. Bicolor y *G. angustifolia* var. Nigra (Londoño, 2000).

Esta especie es considerada como el tercer bambú más grande del mundo (Londoño, 2000). *G. angustifolia* puede alcanzar alturas de 22 m, sus culmos tienen aproximadamente 12 cm de diámetro interno y 1,5 cm de espesor de la pared; sin embargo, tiene más fibras por unidad de área si se le compara con la *Guadua aculeata* que es una especie de mayor altura (28 m) y mayor grosor (18 cm de diámetro interno y 3 cm de espesor de la pared), por lo que es más resistente y por ende se utiliza frecuentemente en la construcción (Quintans, 1998). Esta característica ha permitido desarrollar diversos productos industriales, tales como paneles, aglomerados, pisos, laminados, esteras, pulpa y papel (CATIE, 2004).

Además de la construcción, los culmos se han utilizado en artesanías, muebles, instrumentos musicales y herramientas, entre otros (Gutiérrez, 2000). Debido a que es un recurso natural renovable de rápido crecimiento y fácil manejo, también ha sido importante para el control de la erosión y protección de cuencas hidrográficas (CATIE, 2004), principalmente por la acción de contención que ejerce el rizoma (Salas, 2006).

3.2.1.2 Propagación

Se han descrito dos tipos de floración para el bambú. La que presenta un comportamiento gregario, es decir, la floración de una especie puede ocurrir en un solo momento e involucrar poblaciones enteras. Los ciclos pueden variar entre 2 y 100 años dependiendo de la especie y, por lo general, la planta muere luego de florecer. El otro tipo es la esporádica, la cual ocurre en intervalos irregulares, cuando los miembros de una generación determinada con origen común entran de forma gradual a la etapa reproductiva, con o sin la muerte de la planta (Londoño, 2003; Gómez y Agudelo, 2004).

Según Londoño (2003), la *G. angustifolia* presenta floración del tipo esporádica ya que no muere después de florecer. Sin embargo, Gómez y Agudelo (2004) han descrito ambos tipos de floración para esta especie: de floración tipo gregario, cuando más del 50% de los culmos presentan espiguillas; y floración esporádica cuando menos del 50% de culmos presentan floración. Además, estos mismos autores destacaron la dificultad que tiene esta especie para florecer por encima de los 1300 msnm, donde los climas fríos y las temperaturas inferiores a los 22°C provocan que las floraciones sean poco periódicas o no ocurran.

La propagación del bambú mediante semilla presenta diversas limitaciones debido a que la floración ocurre muy espaciada en el tiempo, las semillas poseen baja germinación, son propensas a daños por ataque de roedores e insectos y, además, las poblaciones resultan muy heterogéneas en cuanto a su uniformidad, producto de la polinización cruzada. Lo anterior obliga a que la forma de propagación se realice principalmente de forma vegetativa por medio de brotes laterales, secciones de culmos o de rizoma (Ruiz, 1986; Rao et al., 1990; Rao et al., 1992).

Cabe mencionar que la propagación vegetativa también presenta sus desventajas, entre las cuales se pueden citar el alto costo en mano de obra, espacio y transporte de propágulos, así como la baja eficiencia en la tasa de reproducción (Giellis y Oprins, 2002); por tanto se ha sugerido la micropropagación como una alternativa altamente viable. Según Ruiz (1986), el principal tejido meristemático en el bambú se encuentra en las axilas de tallos en crecimiento, arriba de cada uno de los nudos y en las yemas y primordios radicales latentes.

La técnica que se prefiere para la micropropagación de *G. angustifolia* es la que utiliza yemas axilares. Jiménez *et al.* (2006) lograron la propagación *in vitro* de esta especie mediante esta técnica, utilizando el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 3 mg/L de N⁶-bencilaminopurina (BAP) y 2 ml/L de Plant Preservative Mixture® (PPM™) (agente antimicrobiano). Se reportó una tasa de multiplicación de 2,5 macollas cada 6 semanas. Otros trabajos en esta especie han sido publicados por Marulanda *et al.* (2002), utilizando 1 mg/L de BAP, y por Marulanda *et al.* (2005) con 2,5 mg/l de BAP. Sin embargo, ninguno de estos últimos trabajos menciona la tasa de multiplicación lograda.

3.3. Protoplastos

Los protoplastos son células a las cuales se les ha removido la pared celular, por lo que se encuentran delimitadas únicamente por la membrana plasmática (Gutiérrez *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2005). Se pueden obtener a partir de plantas de campo, invernadero o *in vitro*; se pueden utilizar diversos tejidos como raíces, coleoptilos, hojas, pétalos, callos o suspensiones celulares (Galun, 1981; Power y Chapman, 1985).

La remoción de la pared celular para el aislamiento de los protoplastos se puede realizar mediante métodos mecánicos, enzimáticos o una combinación de ambos (Gutiérrez *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2005). El método mecánico consiste en aplicar un choque osmótico para producir plasmólisis en las células, las cuales posteriormente se rompen mediante un corte; finalmente se restablece el nivel osmótico para liberar los protoplastos de las células rotas. Es un método muy tedioso y de muy bajo rendimiento, por lo que es poco utilizado (Szabados, 1993). Por su parte, el método enzimático consiste en incubar las células en una mezcla de enzimas que digieren la pared celular. Se han usado: celulasas (Celulasa RS, Celulasa R10, Celulasa CEL y Meicelasa, todas de *Trichoderma viride*; y Driselasa 25G de Basidiomicetes), pectinasas (Macerocima R10 de *Rhizopus* sp. y pectoliasa Y23 de *Aspergillus japonicus*) y hemicelulasas (Hemicelulasa HP y Rhozima HP150 de *Aspergillus* sp.) (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Los requisitos en cuanto a la combinación de enzimas, su concentración, el tiempo y condiciones de digestión son muy variables y de ellos depende el éxito que se obtenga. Además de las enzimas, durante el aislamiento es necesario contraer la pared plasmolizando las células con una solución que contenga sales (fosfato de potasio monobásico, cloruro de calcio o cloruro de magnesio), un amortiguador tal como el MES (ácido 2-morfolinoetanesulfónico) y un estabilizador osmótico que puede ser azúcar (glucosa o sacarosa) o un alcohol de azúcar (manitol o sorbitol) (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Algunos autores sugieren realizar una etapa previa de preplasmólisis utilizando un medio de cultivo adicionado con el estabilizador osmótico. No siempre se realiza; sin embargo, se ha encontrado que con esta etapa se logra mejorar el rendimiento y viabilidad de los protoplastos obtenidos (Ochatt *et al.*, 1992). Probablemente se deba a que si se exponen las células túrgidas directamente a las enzimas, se incrementa la permeabilidad del protoplasto a electrolitos, que ocasionan su muerte, en contraste a la condición en que este se encuentra previamente separado de la pared celular (Evans y Cocking, 1977).

Una vez aisladas, si estas células resultan viables, rápidamente sintetizan una nueva pared celular, crecen y se pueden dividir, llegando, eventualmente, a regenerar una nueva planta (Azpíroz, 1994). El éxito del aislamiento de protoplastos, su división y, finalmente, la regeneración de plantas está fuertemente influenciado por el genotipo, el estado ontogénico de tejido utilizado, las condiciones de cultivo y la composición del medio de cultivo (Ochatt *et al.*, 1992). La densidad de cultivo es un factor importante a considerar para que ocurra el crecimiento adecuado de los microcallos, la cual debe ser aproximadamente 1×10^5 protoplastos por mililitro; con fuerte dependencia de la especie. Así, por ejemplo, en tabaco se recomienda utilizar una densidad de 5×10^5 mientras que en petunia se utiliza $2,5 \times 10^5$ protoplastos por mililitro (Ochatt *et al.*, 1992).

Los protoplastos de plantas se pueden utilizar para aplicar diversas técnicas de mejoramiento genético. Se puede aprovechar la variación genética que se puede desarrollar durante el cultivo *in vitro* (variación somaclonal); además, se puede realizar la fusión de especies que son sexualmente incompatibles en la naturaleza, permitiendo la oportunidad de crear nuevos híbridos mediante la hibridación somática (Ochatt *et al.*, 1992; Szbados, 1993). La creación de híbridos somáticos mediante el uso de protoplastos ha sido exitoso en diversas especies de interés agrícola como cítricos (Grosser y Gmitter,

2011), *Musa* sp. (Xiao *et al.*, 2009), papa (Rasmussen *et al.*, 1998), tomate (Chen y Adachi, 1998), *Brassica* sp. (Ren *et al.*; 2000), entre otros.

Los protoplastos también pueden ser adecuados para la incorporación de genes foráneos, por medio de microinyección o electroporación, por lo que es una herramienta importante para la obtención de plantas con características nuevas (Azpíroz, 1994; Davey *et al.*, 2004). Ejemplos del empleo de protoplastos para la transformación son: maíz (Huang y Dennis, 1989), arroz (Rao *et al.*, 1995), trigo (He *et al.*, 1994) y arveja (Puonti-Kaerlas *et al.*, 1992), entre otros. Debido a que estas células se encuentran rodeadas solamente por la membrana plasmática, también les confiere gran utilidad para estudios fisiológicos y de interacciones entre planta-patógeno (Szabados, 1993; Davey *et al.*, 2005) así como para la producción de metabolitos secundarios (Aoyagi, 2011).

3.3.1 Protoplastos en monocotiledóneas

La composición de la pared celular es un aspecto importante a tomar en cuenta durante la selección de las enzimas que se utilizan para el aislamiento de protoplastos, ya que la pared celular de las monocotiledóneas, en especial en la familia Poaceae, es diferente a la de las dicotiledóneas, con las cuales se ha hecho el mayor progreso para la aplicación de estas técnicas.

La pared celular se compone básicamente de microfibras de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos no celulosíticos, pectinas y proteínas. En dicotiledóneas, gimnospermas y monocotiledóneas no commelinoides es común encontrar en esta matriz los xiloglucanos y pectinas (35%), por lo que para el aislamiento de protoplastos son necesarias las enzimas pectinasas y celulasas. Mientras que en las monocotiledóneas commelinoides como el bambú, la matriz está constituida principalmente por arabinoxilanos, siendo los polisacáridos pécticos un componente minoritario (5%) (Harris y Smith, 2006; Doblin *et al.*, 2010). Más aún, en las monocotiledóneas commelinoides se destaca la presencia de ácidos fenólicos en la pared, los cuales intervienen y dificultan el proceso de aislamiento (Ishii, 1989). Estos ácidos, tales como los ácidos ferúlico y dehidrodiferúlico, se encuentran enlazados principalmente a los glucuronoarabinoxilanos mediante enlaces tipo éster, lo cual le confiere a la pared celular mayor rigidez y resistencia a la degradación por parte de los microorganismos (Harris y Smith, 2006).

Se han realizado diversos trabajos en protoplastos de monocotiledóneas, algunos de los cuales se detallan en el cuadro 1; sin embargo, son muy pocos los estudios que existen sobre el aislamiento de protoplastos de bambú, ninguno de los cuales incluye a *G. angustifolia*. Se destaca el uso de celulasas (celulasa R10, celulasa RS, celulicina y meicelasa), solas o combinadas en altas concentraciones, junto con pectinasas (macerocima R10, pectinasa y pectoliasa Y23), a una concentración más baja. A pesar de que las pectinas no son un componente principal en la pared celular de las monocotiledóneas commelinoides, se ha demostrado que la adición de pectinasa, tal como pectoliasa Y23 de *Aspergillus japonicus*, mejora el rendimiento de protoplastos obtenidos (Nagata e Ishii, 1979).

Cuadro 1. Condiciones de aislamiento, rendimiento y viabilidad de protoplastos a partir de callo u hoja en diversas especies de monocotiledóneas

Especie	Tejido	Preplasmólisis	Aislamiento		Rendimiento	Viabilidad	Referencia
			Solución enzimática	Condiciones			
Commelinoides							
Arroz (varias especies)	Callo	-	Celulasa RS 2%, Celulasa R10 2%, Driselasa 1%, Macerocima R10 2%, Hemicelulasa 1% y pectoliasa Y23 0,1%	50 rpm por 6 h a 28°C en oscuridad	0-4x10 ⁹ protoplastos/g	-	Mori <i>et al.</i> (1991)
Arroz (varias especies)	Suspensión celular	-	Celulasa RS 1% y Pectoliasa Y23 0,5%	4 h	Aprox. 10 ⁶ protoplastos/ml	-	Wang <i>et al.</i> (1989)
<i>Bambusa</i> sp.	Callo	-	Celulasa R10 4% y Macerocima R10 2%	2 h	9,6x10 ⁴ protoplastos/ml	-	Tseng <i>et al.</i> (1975)
<i>Bambusa oldhamii</i> y <i>Bambusa multiplex</i>	Suspensión celular	-	B. oldhamii: Celulasa 0,5%, Driselasa 1% y Pectoliasa Y23 0,5%. B. multiplex: Celulasa 2%, Driselasa 2% y Pectoliasa Y23 1%	80 rpm por 16 h	1-2x10 ⁶ protoplastos/g	>90%	Huang <i>et al.</i> (1989a)
Caña de azúcar	Suspensión celular	-	Celulasa RS 1% y Pectoliasa Y23 0,2%	45 rpm por 6,5 h en oscuridad	-	97%	Falco <i>et al.</i> (1996)
Cereales	Hojas jóvenes	-	Cellulicina 2%, Macerocima R10 0,2% y Hemicelulasa 0,5%	1-2 h a 30°C en oscuridad	-	-	Power y Chapman (1985)
<i>Lithachne pauciflora</i> , <i>Phyllostachys meyeri</i> , <i>Sasa jotanii</i> y <i>Bambusa vulgans</i>	Hojas jóvenes	Manitol 0,8 M por 4 horas	L. pauciflora: Celulasa 1%, Meicelasa 2,5% y Macerocima R10 2,5%. P. meyeri , S. jotanii y B. vulgaris: Celulasa 2%, Meicelasa 2,5% y Macerocima 3%.	100 rpm por 6-12 h a 32°C	L. pauciflora: 8x10 ⁵ , P. Meyer: 1,2x10 ⁶ S. jotanni: 2x10 ⁶ y B. vulgaris: 1x10 ⁶ protoplastos/ml	L. pauciflora: 83,4% y B. vulgaris: 83,2%	Hisamoto y Kobayashi (2010)
Maiz	Callo	-	Celulasa 1% y Pectoliasa Y23 0,2%	40 rpm por 4 h a 21°C	7,2x10 ⁶ protoplastos/ml	94%	Imbrie-Milligan y Hodges (1986)
<i>Panicum virgatum</i> (Alamo 1 y 2)	Hojas jóvenes y raíces	-	Hojas: Celulasa R10 1,5% y Macerocima R10 0,75%. Raíces: Celulasa RS 1,5% y Macerocima R10 0,75%	40 rpm por 3 h y luego 60 rpm por 10 minutos	6-8x10 ⁵ protoplastos	88,6-92,1%	Mazarei <i>et al.</i> (2008)
<i>Phoenix dactylifera</i> (dos genotipos)	Hojas jóvenes	-	Celulasa 4%, Hemicelulasa 1% y Pectinasa 2%	Sin agitación, 2 días a 26°C en oscuridad	4,53-6,4x10 ⁵ protoplastos/g	-	Rizkalla <i>et al.</i> (2007)
Trigo, cebada	Hojas jóvenes	-	Meicelase 3% y Macerocima R10 0,08%	Incubación durante la noche	-	-	Power y Chapman (1985)
Vetiver	Suspensión celular	-	Celulasa R10 2%, Macerocima R10 2% y Pectinasa 0,5%	50 rpm por 10 h a 25°C en oscuridad	8,4x10 ⁴ protoplastos/ml	-	Prasertsongskun, (2004)
No Commelinoides							
<i>Anubias nana</i>	Hojas jóvenes in vitro	Mannitol 0,5 M por 30 minutos	Celulasa RS 2% y Pectoliasa Y23 0,2%	40 rpm por 4 h a 25°C en oscuridad	4,79x10 ⁶ protoplastos/g	82%	Pongchawee <i>et al.</i> (2006)
Vainilla	Hojas jóvenes in vitro	Mannitol 0,38-0,55 M	Celulasa R10 2% y Macerocima R10 0,5%	8 h a 30°C en oscuridad	V. planifolia: 2,5x10 ⁵ y V. andamanica 1x10 ⁵ protoplastos/g	V. planifolia: 72%. V. andamanica: 55%	Divakaran <i>et al.</i> (2008)

4. Materiales y Métodos

4.1. Formación de callo

4.1.1 Procedencia del material

Se utilizaron plantas *in vitro* de *G. angustifolia* cultivadas en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica, obtenidas a partir de yemas axilares de acuerdo al protocolo descrito por Jiménez *et al.* (2006). Este material se encontraba en un medio de cultivo compuesto por las sales minerales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con: tiamina-HCl (0,1 mg/l), piridoxina-HCl (0,5 mg/l), ácido nicotínico (0,5 mg/l), glicina (2 mg/l), myo-inositol (100 mg/l), BAP (3 mg/l) y sacarosa (3% p/v); pH a 5,8 (\pm 0,01) ajustado con soluciones de KOH de 0,01 a 1 M y gelificado con Pytagel™ al 0,2% (p/v) (Sigma, St. Louis, Mo, EUA). El material se mantuvo con un fotoperiodo de 12 horas ($50-60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), con temperatura y humedad relativa promedio de 24°C y 48% respectivamente.

4.1.2 Tratamientos

Se utilizó el medio MS base indicado anteriormente, desprovisto de BAP y suplementado con los siguientes reguladores de crecimiento como tratamientos: 1) testigo (sin reguladores), 2) 3 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Muñoz *et al.*, 2002), 3) 6 mg/l de 2,4-D (Marulanda *et al.*, 2005) y 4) 3 mg/l de 2,4-D más 0,01 mg/l de tidiazurón (TDZ) (Choun *et al.*, 2004).

Bajo condiciones asépticas se tomaron segmentos de la parte basal de los brotes jóvenes (brotes que aún no presentaban hojas extendidas) y de puntas de raíz (ápice radicular de raíces nuevas) de 3 a 5 mm de longitud. Se colocó por separado cada explante, horizontalmente y de forma aleatoria sobre el medio de cultivo en placas de Petri de vidrio de 90 mm de diámetro, en cada uno de los tratamientos.

Todos los tratamientos se distribuyeron al azar en el estante de crecimiento en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 22°C. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento, cada una con cinco segmentos de tejido. Los explantes se transfirieron a medio de cultivo nuevo una vez al mes.

4.1.3 Variables evaluadas y análisis estadístico

A los 70 días de cultivo, se evaluó el porcentaje de explantes que presentaron callo. Para esta variable, los datos se transformaron con arcoseno de \sqrt{y} (se convirtió el 0% a $1/(4n)$ y el 100% a $(n-1/4)/n$, antes de transformar los datos). Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y se determinaron las diferencias entre tratamientos mediante la prueba de Tukey (Statística 8,0, StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Además, se evaluó el porcentaje de callos que presentaron una coloración blanca o café y el porcentaje de callos friables o nodulares formados según el tipo de explante, estas variables se analizaron mediante una prueba de chi cuadrado en el programa estadístico InfoStat 2011, Argentina.

4.2. Crecimiento de callo

4.2.1 Tratamientos

Se tomaron los callos formados a partir de segmentos de brotes de *G. angustifolia* previamente formados en el medio de cultivo con 6 mg/l de 2,4-D, descrito anteriormente y se colocaron cinco segmentos (aproximadamente 0,5 g) por placa de Petri, para un total de seis placas por tratamiento, en los siguientes tratamientos: 1) 2,4-D (3 mg/l) + 2ip (2-isopentenil adenina) (0,93 mg/l); 2) 2,4-D (3 mg/l) + 2ip (1,9 mg/l); 3) 2,4-D (3 mg/l) + zeatina (1 mg/l); 4) 2,4-D (3 mg/l) + zeatina (2 mg/l); 5) 2ip (0,93 mg/l); 6) 2ip (1,9 mg/l); 7) zeatina (1 mg/l); 8) zeatina (2 mg/l); 9) 2,4-D (3 mg/l); 10) 2,4-D (6 mg/l) y 11) 2,4-D (10 mg/l) (Saxena y Dhawan, 1999; Muñoz *et al.*, 2002; Al-Khayri, 2005, 2007; Eke *et al.*, 2005; Marulanda *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2013). Se mantuvieron en los tratamientos por un periodo de tres meses, se realizó la transferencia mensual del total de cada segmento a medio fresco. Todos los tratamientos se colocaron al azar en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 22°C.

4.2.2 Variables evaluadas y análisis estadístico

Se evaluó el peso fresco inicial y final de cada segmento de callo para determinar el porcentaje de incremento en peso y se realizó un ANDEVA con una prueba de Tukey (Statística 8,0, StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Además se determinó el porcentaje de segmentos que no presentaron oxidación a los tres meses de cultivo. Esta variable se analizó mediante una prueba de chi cuadrado en el programa estadístico InfoStat 2011, Argentina.

4.3. Suspensiones celulares

4.3.1 Establecimiento

Se tomaron 1,25 g (peso fresco) de callo friable obtenido a partir de segmentos de brotes y se colocó en Erlenmeyers de 125 ml de capacidad con 40 ml del medio de cultivo líquido suplementado con 2,4-D (10 mg/l), descrito anteriormente. Se realizaron ocho repeticiones, las cuales se colocaron en agitación constante a 100 rpm en condiciones de oscuridad y a una temperatura promedio de 24°C.

4.3.2 Subcultivos

Se realizaron cuatro subcultivos cada 15 días. Para esto se colocó la mitad del contenido en un nuevo Erlenmeyer y se adicionó la mitad del volumen faltante con medio fresco.

4.3.3 Determinación de la tasa de crecimiento

Se realizó determinaciones de la tasa de incremento en el volumen de células compactas (VCC) desde el inicio de las suspensiones. Al momento de transferencia, se determinó el VCC inicial y final; se realizaron cuatro transferencias.

El VCC se determinó según el procedimiento de Hall (1991). Se agitó la suspensión y con una pipeta de boca ancha se tomó una alícuota de 2 ml, se esperó hasta el asentamiento de las células para anotar el volumen de la masa celular. La determinación del VCC se calculó de la siguiente forma:

$$\text{VCC} = \frac{\text{Volumen de masa celular} \times 100}{\text{Volumen de la muestra (2 ml)}}$$

La tasa de incremento en VCC se determinó una vez realizada la transferencia, y antes de la siguiente transferencia mediante la siguiente fórmula. Para esta variable se realizó un ANDEVA con una prueba de Tukey (Statística 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

$$\% \text{ de incremento en VCC} = \frac{\text{VCC final} - \text{VCC inicial}}{\text{VCC inicial}} \times 100$$

4.4. Aislamiento de protoplastos a partir de hoja

4.4.1 Preplasmólisis y aislamiento

Se realizaron tres pruebas para el aislamiento de protoplastos utilizando tanto hojas provenientes de plantas de *G. angustifolia in vitro* como de invernadero (cuadro 2). En los experimentos 1 y 2 se tomaron hojas jóvenes con la lámina completamente extendida, a las cuales se les realizó distintos tipos de corte (figura 1, cuadro 2), así como un raspado de la parte abaxial de la hoja con un bisturí. En el experimento 3 se seleccionaron hojas completamente cerradas (bandera) y hojas nuevas completamente expandidas, ambas fueron rasgadas en tiras y luego cortadas en cuadros con ayuda de un bisturí.

Cuadro 2. Pruebas realizadas para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas *in vitro* y de invernadero de *G. angustifolia*

Experimento	Tratamiento	Procedencia del material	Tipo de corte	Preplasmólisis (horas)	Digestión enzimática			Referencia	Especie
					Composición enzimática	Agitación (rpm)	Duración (horas)		
1	0,2 g hojas	<i>in vitro</i>	Peine / Raspado	1	Celulasa 0,5% Macerocima 0,2% Celulasa 0,25% Macerocima 0,3%	50	16	Viñas y Mora (2008)	<i>Salpiglossis sinuata</i>
2	0,2 g hojas	Invernadero	Peine / Raspado / Cuadros	1	Celulasa 2% Macerocima 0,2% Hemicelulasa 0,5%	100	16 24	Power y Chapman (1985)	Cereales
3	0,3 g hojas bandera 0,3 g hojas nuevas expandidas	Invernadero	Tiras arrancadas y cortadas en cuadros	0,5	Celulasa 4% Macerocima 3%	100, a 24 y 32°C	16	Hisamoto y Kobayashi (2010)	<i>Lithachne pauciflora</i> , <i>Phyllostachys meyeri</i> , <i>Sasa jotanii</i> y <i>Bambusa vulgaris</i>

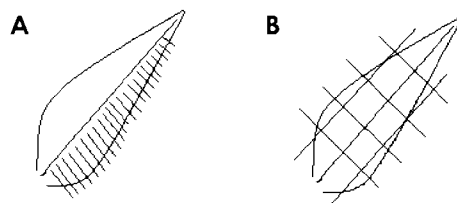


Figura 1. Tipos de corte utilizados para el aislamiento de protoplastos de *G. angustifolia* a partir de hojas: **A)** corte en peine (cortando sólo la lámina, no la nervadura central) y **B)** corte cuadrangular.

La preplasmólisis se realizó colocando de 0,2 a 0,3 g de tejido en Erlenmeyers de 50 ml de capacidad con 10 ml del medio CPW (Power y Chapman, 1985) (anexo 1), suplementado con 13% de manitol como regulador osmótico por un periodo de 0,5 a 1 hora, a una intensidad lumínica de $3-4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 24°C .

Posteriormente, con el uso de pipetas Pasteur, se retiró el medio CPW para agregar 5 ml de la solución enzimática. Se incubaron a 24°C , en la oscuridad bajo agitación a 50 y 100 rpm; en el experimento 3 se probaron temperaturas de digestión enzimática de 24 y 32°C . Se probaron tiempos de 16 y 24 horas de incubación. En cuanto a la solución enzimática, se utilizó como base las sales $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,96 mg/ml) y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,17 mg/ml), así como de buffer MES (ácido 2-morfolinoetanesulfónico) al 0,12% (Grosser y Gmitter, 1990) y manitol al 13%, adicionado de las enzimas celulasas: celulasa RS (origen: *Trichoderma viridae*, Karlan); hemicelulasas: hemicelulasa (origen: *Aspergillus niger*, Sigma); pectinasas: macerocima R10 (origen: *Rhizopus* sp., Karlan), según el experimento como se detalla en el cuadro 1. El pH fue ajustado a $5,8 (\pm 0,01)$ con KOH.

Una vez concluida la digestión enzimática, se vertió el contenido de cada Erlenmeyer a través de una malla (Sigma, Steinheim, Alemania) con un tamaño de poro de $45 \mu\text{m}$ y se recogió el líquido en un tubo de borosilicato de 50 ml. Posteriormente se transfirió el líquido recolectado a un tubo de centrifuga de 15 ml, y se centrifugó (Marathon 6K, FisherScientific, Pittsburgh, EUA) a $100 \times g$ (800 rpm) por 5 minutos.

Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se agregó 3 ml del medio CPW adicionado con sacarosa al 20% en el que se resuspendió el precipitado. Lentamente por las paredes del tubo, se agregaron 3 ml del medio líquido MS modificado (MSBSOH) (cuadro 3) adicionado con manitol al 9,11% como regulador osmótico y de los reguladores BAP (0,5 mg/l) y ANA (2 mg/l). Se centrifugó a 100 xg por 5 minutos y se extrajo con una pipeta Pasteur una porción de solución ubicada entre las dos capas formadas, la cual se colocó en un nuevo tubo de centrifuga de 15 ml. Se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo MSBSOH y se centrifugó a 100 xg por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, dejando 0,5 ml de medio de cultivo, en los cuales se resuspendió el precipitado. Se tomaron 16 µl para realizar el conteo de protoplastos en el hemocitómetro Fuchs-Rosenthal (Weber, Inglaterra) o Fuchs-Rosenthal Ultra Plane (Hausser Scientific, EUA) (0,2 mm) en el microscopio (Modelo 150, Reichert-Jung, EUA). En cada caso se realizaron dos repeticiones.

Cuadro 3. Medio de cultivo MS modificado (MSBSOH) utilizado para el aislamiento y purificación de protoplastos de *G. angustifolia*

Compuesto	Concentración (mg/l)	Referencia
Macronutrientes		
KNO ₃	1700	Murashige y Skoog (1962)
NH ₄ NO ₃	560,3	Oh <i>et al.</i> (1994)
CaCl ₂ *2H ₂ O	440	Murashige y Skoog (1962)
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	Murashige y Skoog (1962)
KH ₂ PO ₄	170	Murashige y Skoog (1962)
Micronutrientes		
MS		Murashige y Skoog (1962)
NaFeEDTA	3,7	Oh <i>et al.</i> (1994)
Otros		
Tiamina HCl	2	Boyes y Sink (1989)
myo -Inositol	1000	Boyes y Sink (1989)
L-Glutamina	250	Boyes y Sink (1989)
Sacarosa	30 000	Boyes y Sink (1989)

4.5. Aislamiento de protoplastos a partir de callo

4.5.1 Preplasmólisis

Con el fin de determinar el momento en el que la mayoría de las células se encuentran plasmolizadas, se tomaron 0,5 g de callo (friable formado a partir de brotes, cultivado en el medio con 10 mg/l de 2,4-D descrito anteriormente), y se colocaron en Erlenmeyer de 50 ml con 10 ml del medio CPW (Power y Chapman, 1985) suplementado con 13% de manitol por un tiempo de 0, 0,5, 1, 1,5 y 2 horas; se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Durante este tiempo se mantuvieron en la cámara de flujo laminar, a una intensidad lumínica de 3-4 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y a una temperatura de 24°C. Al cabo de este tiempo se tomó de cada tratamiento, dos alícuotas de 16 μl , que se colocaron en un hemocitómetro Fuchs-Rosenthal (0,2 mm) para ser observadas al microscopio. Se determinó el porcentaje de células plasmolizadas en cada uno de los tratamientos. Los resultados se analizaron mediante una prueba de chi cuadrado en el programa estadístico InfoStat 2011, Argentina.

4.5.2 Aislamiento

Se realizaron 21 pruebas para el aislamiento de protoplastos utilizando como material callo friable formado a partir de brotes, callo nodular formado a partir de puntas de raíz y suspensiones celulares de *G. angustifolia* establecidas con el callo friable proveniente de brotes como se detalla en el cuadro 4. En cada caso, en cámara de flujo laminar, se tomaron entre 0,5 y 1,5 g de material de callo (con 14 - 40 días de haber sido transferido) o suspensiones celulares (con 7 días de iniciada la suspensión) y se colocaron en frasco tipo Erlenmeyer de 50 ml de capacidad con 10 ml del medio CPW, suplementado con 13% de manitol como regulador osmótico por diversos periodos.

Para los experimentos 18, 19 y 20 detallados en el cuadro 4, se utilizaron 3 g de callo proveniente de brotes que se colocaron en kitsatos de 125 ml con 20 ml del medio CPW, suplementado con 13% de manitol. Solamente en el experimento 11 se experimentó adicionando cisteína (5,3 g/l) en la solución de preplasmólisis (Faye y David, 1983), como se observa también en el cuadro 4.

Cuadro 4. Pruebas realizadas para el aislamiento de protoplastos a partir de callo y suspensiones celulares de *G. angustifolia*

Experimento	Material	Preplasmólisis (horas)	Digestión enzimática			Referencia	Especie
			Composición enzimática	Agitación (rpm)	Duración (horas)		
1	0,5 g callo friable (brote), con 15 días de cultivo	1,5	Celulasa 1% Macerocima 0,25% Celulasa 0,5% Driselasa 1% Pectoliasa 0,5%	50	16	Huang <i>et al.</i> (1989a)	<i>Bambusa oldhamii</i>
2	0,5 g callo friable (brote), con 15 días de cultivo	1,5	Celulasa 2% Driselasa 2% Pectoliasa 1% Celulasa 2% Macerocima 2% Pectoliasa 0,5%	80	16	Huang <i>et al.</i> (1989a) Prasertsongskun (2004)	<i>Bambusa multiplex</i> Vetiver
3	0,5 g callo friable (brote), con 15 días de cultivo	0,5	Celulasa 0,5% Macerocima 0,25% Celulasa 1% Macerocima 0,5%	50	16	-	-
4	0,5 g callo friable (brote), con 15 días de cultivo	1	Celulasa 1% Macerocima 0,25%	50	2, 4, 6, 8 y 16	-	-
5	0,5 g callo friable (brote), con 15 días de cultivo	1	Celulasa 1% Macerocima 0,25% Celulasa 1% Macerocima 0,5%	50 120 50 120	4	-	-
6	0,5 g callo friable (brote), 14 días de cultivo	No	Pectinasa 1,5% Pectinasa 2,5% Pectinasa 3,5% Pectinasa 6,5% Pectinasa 12,5%	50	2,4 y 24	-	-
7	0,5 g callo friable (brote), 14 días de cultivo 0,5 g callo nodular (raíz), 14 días de cultivo suspensión celular, 7 días de cultivo	1,5	Celulasa 4% Macerocima 2%	80	16	Prasertsongskun (2004); Rizkalla <i>et al.</i> (2007)	Vetiver, <i>Phoenix dactylifera</i>

Cuadro 4. Continuación

Experimento	Material	Preplasmólisis (horas)	Digestión enzimática			Referencias	Especies
			Composición enzimática	Agitación (rpm)	Duración (horas)		
8	0,5 g callo friable (brote), 14 días de cultivo	1,5	Celulasa 2% Driselasa 2% Hemicelulasa 1% Macerocima 1% Pectoliasa 1%	100	16	Huang et al. (1989a); Mori et al. (1991)	<i>Bambusa multiplex</i> ; arroz
	0,5 g suspensión celular, 7 días de cultivo						
9	0,5 g callo friable (brote), 14 días de cultivo	No	Celulasa 2% Driselasa 2% Pectoliasa 2% Macerocima 1%	50	8, 16 y 24	Huang et al. (1989a)	<i>Bambusa multiplex</i>
	0,5 g suspensión celular, 7 días de cultivo						
10	0,5 g callo friable (brote), 14 días de cultivo	No	Celulasa 2% Driselasa 2% Pectoliasa 1% Macerocima 1%	50	8 y 16	Huang et al. (1989a)	<i>Bambusa multiplex</i> ; <i>Bambusa oldhamii</i>
			Celulasa 1% Driselasa 2% Pectoliasa 1% Macerocima 0,5%	120			
11	1,5 g callo friable (brote), 16 días de cultivo	0,5	Celulasa 2% Macerocima 1%	100	16	Faye y David (1983)	<i>Pinus pinaster</i>
		0,5 con cisteína 5,3 g/l	Celulasa 2% Macerocima 1%				
		0,5 h	Celulasa 2% Macerocima 1% Cisteína 5,3 g/l				
		0,5 con cisteína 5,3 g/l	Celulasa 2% Macerocima 1% Cisteína 5,3 g/l				
12	1,5 g callo friable (brote), 16 días de cultivo	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2% Pectoliasa 1%, Adicionada de Cisteína 5,3 g/l o PVP 10 g/l	100	16	Faye y David (1983); Greilhuber et al. (2007)	<i>Pinus pinaster</i>
13	1,5 g callo friable (brote), 16 días de cultivo	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2% Pectoliasa 1% Cisteína 5,3 g/l	75	16	Faye y David (1983)	<i>Pinus pinaster</i>
			Celulasa 2% Macerocima 1% Pectoliasa 0,5% Cisteína 5,3 g/l				
			Celulasa 4% Macerocima 1% Pectoliasa 0,5% Cisteína 5,3 g/l				
			Celulasa 2% Macerocima 2% Pectoliasa 1% Cisteína 5,3 g/l				
14	1,5 g callo friable (brote), 16 y 35 días de cultivo	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2% Pectoliasa 1% Cisteína 5,3 g/l	100	16	Faye y David (1983)	<i>Pinus pinaster</i>
			Celulasa 4% Macerocima 2% Cisteína 5,3 g/l				

Cuadro 4. Continuación

Experimento	Material	Preplasmólisis (horas)	Digestión enzimática			Referencias	Especies
			Composición enzimática	Agitación (rpm)	Duración (horas)		
15	1,5 g callo friable (brote), 20 y 40 días de cultivo	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2% Pectoliasa 1% Cisteína 5,3 g/l	100	24, 16 y 16 con cambio de solución enzimática a las 5 h	Faye y David (1983)	<i>Pinus pinaster</i>
16	1,5 g callo friable (brote), 15 días de cultivo	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2% Como tratamientos se le adicionó: Ácido ascórbico 150 mg/l o Carbón activado 1,5 g/l o Cisteína 5,3 g/l o Cisteína 20 mg/l o Ácido cítrico 150 mg/l o BSA 0,05%	100	16	Faye y David (1983); Huang <i>et al.</i> (1989a); Reustle y Natter (1994); Prakash <i>et al.</i> (1997)	<i>Pinus pinaster</i> , <i>B. multiplex</i> y <i>B. oldhamii</i> , <i>Vitis sp.</i> , <i>Capsicum annum</i>
17	1,5 g callo friable (brote), 17 días de cultivo	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2% Ácido ascórbico 150, 500, 1000 mg/l y 5,3 g/l	100	16	Faye y David (1983); Prakash <i>et al.</i> (1997)	<i>Pinus pinaster</i> , <i>Capsicum annum</i>
18	3 g callo friable (brote), 16 días de cultivo (10 ml enzima)	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2% Pectoliasa 1%. Adicionada de Cisteína 2,7 y 5,3 g/l o Ácido ascórbico 150 y 500 mg/l o Amberlite 1 y 2 g/l, con 20 min. de vacío a 60 cmHg	100	16	Faye y David (1983); Prakash <i>et al.</i> (1997); Chen <i>et al.</i> (2006); Grosser (s.f)	<i>Pinus pinaster</i> , <i>Capsicum annum</i> , arroz, cítricos
19	3 g callo friable (brote), 15 días de cultivo (10 ml enzima)	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2% Pectoliasa 1% Cisteína 5,3 g/l, con 20 min. de vacío a 60 cmHg	100	2, 4, 5, 16 y 22	Faye y David (1983); Chen <i>et al.</i> (2006); Grosser (s.f)	<i>Pinus pinaster</i> , arroz, cítricos
20	3 g callo friable (brote), 15 días de cultivo (10 ml enzima)	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2% Pectoliasa 1% Cisteína 5,3 g/l, tratamientos con y sin Driselasa 1%, con 40 min. de vacío a 60 cmHg	100	2	Faye y David (1983); Chen <i>et al.</i> (2006); Grosser (s.f)	<i>Pinus pinaster</i> , arroz, cítricos
21	3 g callo friable (brote), 15 días de cultivo (10 ml enzima)	0,5	Celulasa 4% Macerocima 2%, tratamientos con y sin Cisteína 5,3 g/l y potencial osmótico de 5,5% y 11 % manitol, con 40 min. de vacío a 60 cmHg	100	2	Faye y David (1983); Chen <i>et al.</i> (2006); Grosser (s.f)	<i>Pinus pinaster</i> , arroz, cítricos

Posteriormente, con el uso de pipetas Pasteur, se retiró el medio CPW para agregar 5 ml de la solución enzimática (para los experimentos 18, 19 y 20 se utilizaron 10 ml). Para la solución enzimática se utilizó la misma solución base descrita anteriormente en el aislamiento de protoplastos a partir de hoja, en este caso se probaron las siguientes enzimas: celulasas: celulasa RS (origen: *Tricoderma viridae*, Karlan) y driselasa (origen: Basidiomicetes, Karlan); hemicelulasas: hemicelulasa (origen: *Aspergillus niger*, Sigma); pectinasas: macerocima R10 (origen: *Rhizopus* sp., Karlan), pectoliasa Y23 (origen: *Aspergillus japonicus*, Karlan) y pectinasa 62L-P062L (origen: *Aspergillus* sp., Biocatalysis), según el experimento. En el experimento 21 se modificó el potencial osmótico de la enzima utilizando 5,5% de manitol. Se incubaron a 24°C, en oscuridad y bajo agitación a 50, 75, 80, 100 y 120 rpm. Se probaron tiempos de 2, 4, 6, 8, 16, 22 y 24 horas de incubación con la solución enzimática. En los experimentos 18, 19 y 20 se empleó vacío durante la digestión enzimática mediante una bomba de vacío (modelo 2522B-01, Gardner Denver Welch Vacuum Technology Inc., Louisiana, EUA) a 60 cmHg por 20-40 minutos, realizando agitaciones esporádicas. Posteriormente al tratamiento de vacío, permanecieron en agitación constante a 100 rpm durante 16 horas en oscuridad (cuadro 4).

En los experimentos 9 y 10, se utilizó la solución enzimática basada en Huang *et al.* (1989a), compuesta por las sales minerales del medio MS suplementadas con: tiamina-HCl (0,1 mg/l), piridoxina-HCl (0,5 mg/l), ácido nicotínico (0,5 mg/l), glicina (2 mg/l), myo-inositol (100 mg/l), 2,4-D (10 mg/l), buffer MES al 0,195% y manitol al 13%.

Con el fin de intentar evitar el oscurecimiento del tejido durante la digestión enzimática, se adicionó a la solución enzimática: cisteína, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico, ácido cítrico, carbón activado, albúmina sérica bovina (BSA) y Amberlite XAD-7 (Sigma, St. Louis, EUA), según el experimento. Además, con este mismo propósito, en el experimento 15 se cambió la solución enzimática por solución nueva a las 5 horas de digestión, tal como se detalla en el cuadro 4.

Una vez concluida la digestión enzimática, se vertió el contenido de cada frasco tipo Erlenmeyer a través de una malla (Sigma, Steinheim, Alemania) con tamaño de poro de 45 µm y se recogió el líquido en un tubo de borosilicato de 50 ml (a partir del experimento 12 se utilizó una malla (Sigma, Steinheim, Alemania) con un tamaño de poro

de 100 μm y se recogió el líquido en un beaker de 50 ml). Posteriormente se transfirió el líquido recolectado a un tubo centrífuga graduado de 15 ml, y se centrifugó (Marathon 6K, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) a 100 xg (800 rpm) por 5 minutos.

Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se agregó 3 ml del medio CPW con sacarosa al 20% (a partir del experimento 12 se utilizó sacarosa al 25%), en el que se resuspendió el precipitado. Lentamente, por las paredes del tubo, se agregó 3 ml del medio líquido MS modificado (MSBSOH) (cuadro 3), adicionado con manitol al 9,11% como regulador osmótico y de los reguladores BAP 0,5 mg/l y ácido naftalenacético (ANA) 2 mg/l. Utilizando la misma centrífuga, se centrifugó a 100 xg por 5 minutos y se extrajo con una pipeta Pasteur una porción de solución ubicada entre las dos capas formadas, la cual se colocó en un nuevo tubo de centrífuga de 15 ml. Se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo MSBSOH y se centrifugó a 100 xg por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, dejando 0,3 ml de medio de cultivo en los cuales se resuspendió el precipitado. Se tomaron 16 μl para realizar el conteo de protoplastos en el hemocitómetro Fuchs-Rosenthal (Weber, Inglaterra) o Fuchs-Rosenthal Ultra Plane (Hausser Scientific, EUA) en el microscopio (Modelo 150, Reichert-Jung, EUA). En todos los experimentos se realizaron dos repeticiones (Erlenmeyers) por tratamiento. Los protoplastos obtenidos por gramo de tejido se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Protoplastos/g} = \frac{(\text{protoplastos/ml}) \times \text{ml de solución de la muestra}}{\text{g de tejido que se puso a digerir}}$$

Donde los protoplastos/ml = conteo total de protoplastos de los 9 cuadros grandes x 555,556 para el hemocitómetro Fuchs-Rosenthal (Weber, Inglaterra) o protoplastos/ml = conteo total de protoplastos de los 9 cuadros grandes x 312,5 para el hemocitómetro Fuchs-Rosenthal Ultra Plane (Hausser Scientific, EUA).

Además, se separó una gota de cada repetición a la cual se le agregó una gota de azul de Evans (0,01%) (Gaff y Okong'O-Ogola, 1971) (anexo 2) para cuantificar la viabilidad de los protoplastos obtenidos mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad de protoplastos (\%)} = (\text{No. Protoplastos teñidos} / \text{No. Total protoplastos}) \times 100$$

Para ambas variables se realizó un ANDEVA y se determinó las diferencias entre tratamientos mediante la prueba de Tukey (Statistica 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

4.6. Detección de polifenoles

4.6.1 Preparación del material

Debido al oscurecimiento de la solución enzimática y el tejido durante el aislamiento de protoplastos de *G. angustifolia*, se realizó un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la posible liberación de polifenoles. Para ello, se utilizó el callo friable de *G. angustifolia* cultivado en el medio de cultivo adicionado con 10 mg/l 2,4-D como indicado anteriormente. Para ello se colocaron 1,5 g de callo en Erlenmeyer de 50 ml de capacidad con 5 ml de cada uno de los siguientes tratamientos: medio de cultivo utilizado para las suspensiones celulares (descrito anteriormente); medio de cultivo utilizado durante la digestión enzimática ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,96 mg/ml, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,17 mg/ml, buffer MES al 0,12% y manitol al 13%) y solución enzimática (medio de cultivo utilizado durante la digestión enzimática) adicionado de celulasa RS 2% y macerocima R10 1%.

Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, las cuales se colocaron por 16 horas en oscuridad a 100 rpm. Pasado este tiempo se filtraron a través de una malla (Sigma, Steinheim, Alemania) con un tamaño de poro de 45 μm , el filtrado fue liofilizado en el equipo Christ Alpha 1-2/LD (Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Alemania).

Se unieron las tres repeticiones de cada tratamiento. El protocolo para la preparación de las muestras fue modificado de Kammerer *et al.* (2004), para ello se pesaron 0,8 g del filtrado liofilizado para ser extraído por duplicado durante 2 horas en agitación constante (300 rpm) con una solución de metanol y HCl (0,1%). El extracto fue centrifugado (Labofuge™ 200, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemania) por 10 minutos a 18,8 xg (400 rpm). Ambos sobrenadantes se combinaron y se evaporaron a sequedad al vacío a 30°C, el residuo se disolvió en agua ultrapura a pH 3,0 y se aforó a 2 ml con agua ultrapura. Se filtró con un filtro de membrana de 0,45 μm , el filtrado se utilizó para el análisis de HPLC.

4.6.2 Análisis mediante HPLC

El análisis de polifenoles se llevó a cabo en el Departamento de Alimentos de Origen Vegetal, del Instituto de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología de la Universidad de Hohenheim, Stuttgart, Alemania. El protocolo utilizado para la extracción fue modificado de Kammerer *et al.* (2004). Se utilizó el equipo Agilent HPLC serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemania) equipado con: el software ChemStation, un desgasificador modelo G1322A, una bomba de gradiente binario modelo G1312A, un termoautomuestreador modelo G1329/G1330A, un horno de columnas modelo G1316A y un detector con arreglo de diodos modelo G1315A. La columna utilizada fue la Phenomenex (Torrance, CA, EUA) C₁₈ Hydro-Synergi de 150 mm x 3,0 mm de diámetro interno y 4 µm de tamaño de partícula, con una columna guarda ODS C₁₈ (4,0 mm x 2,0 mm diámetro interna), operado a 25°C. La fase móvil estaba constituida por ácido acético al 2% (v/v) en agua (eluyente A) y de ácido acético 0,5% en agua y metanol 10:90 (v/v) (eluyente B). El gradiente utilizado para la separación de polifenoles en fracción 1 fue de 0% B a 35% B en 35 minutos, 35% B a 75% B en 20 minutos, 75% B a 100% B en 2 minutos, 100% B por 5 minutos y de 100% B a 0% B en 2 minutos. En cuanto a la fracción 2, el gradiente fue el siguiente: de 0% B a 100% B en 83 minutos, 100% B por 5 minutos, de 100% B a 0% B en 2 minutos. Tiempo total fue de 69 y 95 minutos respectivamente, el volumen de inyección fue de 80 µl y el flujo fue de 0,4 ml por minuto. Los compuestos fenólicos fueron monitoreados por separado a 280 nm y a 320 nm.

El análisis de HPLC acoplado a masas (HPLC-MS) se realizó solamente a la muestra del tratamiento bajo solución enzimática en presencia de las enzimas celulasa RS 2% y macerocima R10 1%. Se utilizó el HPLC acoplado en línea a un espectrómetro de masas Bruker 3000 + trampa de iones (Bruker, Daltronic, Alemania) equipado con una fuente ESI, tal como se describe en detalle por Kammerer *et al.* (2004).

4.7. Análisis enzimático mediante SDS-PAGE

La determinación del posible efecto de la adición de cisteína sobre las enzimas (celulasa RS, macerocima R10 y pectoliasa Y23), utilizadas en el aislamiento de protoplastos de *G. angustifolia*, se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Electroforesis del Centro en Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.

4.7.1 Preparación de las enzimas

Se prepararon diez soluciones enzimáticas como tratamientos: 1) celulasa RS al 4%, 2) celulasa RS al 4% más 5,3 g/l cisteína, 3) macerocima R10 al 2%, 4) macerocima R10 al 2% más 5,3 g/l cisteína, 5) pectoliasa Y23 al 1%, 6) pectoliasa Y23 al 1% más 5,3 g/l cisteína, 7) celulasa RS al 4% más macerocima R10 al 2% más pectoliasa Y23 al 1%, 8) celulasa RS al 4% más macerocima R10 al 2% más pectoliasa Y23 al 1% más 5,3 g/l cisteína, 9) celulasa RS al 4% más macerocima R10 al 2% más pectoliasa Y23 al 1% recolectada luego de la digestión de callo de *G. angustifolia* y 10) celulasa RS al 4% más macerocima R10 al 2% más pectoliasa Y23 al 1% más 5,3 g/l cisteína, recolectada luego de la digestión de callo de *G. angustifolia*. Todas las enzimas fueron disueltas en la solución utilizada durante la digestión enzimática: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,96 mg/ml, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,17 mg/ml, buffer MES al 0,12% y manitol al 13%, con el pH ajustado con KOH 0,1M y HCl 0,1M a 5,8. Las soluciones enzimáticas fueron filtradas con un filtro de nitrocelulosa de 0,2 μm para luego ser colocadas durante 40 minutos en tratamiento de vacío a 60 cmHg y posteriormente por 1,2 horas en agitación a 100 rpm.

Para los tratamientos 9 y 10, 0,3 g de callo friable de *G. angustifolia* se colocó en el medio CPW con 13% de manitol utilizado en la preplasmólisis durante 30 minutos. Luego de este tiempo se retiró la solución para agregar 1 ml de solución enzimática, y se mantuvieron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Una vez transcurrido el tiempo, se filtró a través de una malla (Sigma, Steinheim, Alemania) con mesh de 45 μm .

En tubos Eppendorf de 0,5 ml se colocó 25 μl de muestra, 25 μl de buffer de carga y 3 μl de mercaptoetanol. Para los marcadores estándar de peso molecular se mezclaron 5 μl de marcador, 10 μl de buffer de carga y 1 μl de mercaptoetanol. El buffer de carga para

las muestras estaba compuesto de mercaptoetanol 6%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,05% y glicerol 50%.

4.7.2 Preparación del SDS-PAGE

Se preparó un gel discontinuo de poliacrilamida, el gel separador al 13% y el gel espaciador al 5%, de acuerdo con el cuadro 5. En una cámara de electroforesis vertical de 11 x 8 cm (Mini-Protean II Cell, Bio-Rad, California, EUA) se vertió el gel separador con una jeringa hasta tres cuartos de la capacidad de la cámara. Luego se agregaron tres gotas de butanol encima del gel y se dejó polimerizar por una hora. Transcurrido este tiempo se eliminó el butanol y se vertió el gel espaciador, el cual se dejó polimerizar por una hora.

Posteriormente se colocó el buffer de corrida compuesto por SDS 1 g/l, glicina 14,4 g/l y tris-base 5 g/l con un pH de 8,3. Se montaron 4 μ l de cada muestra y 1 μ l de cada uno de los marcadores estándar de peso en cada pozo y se corrió a 100 V por una hora. Transcurrido este tiempo se procedió a la tinción del gel.

Cuadro 5. Composición de los geles separador y espaciador utilizados para el gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Gel separador 13%: 15 ml		Gel espaciador 5%: 7,5 ml	
Acrilamida al 30%	6,5 ml	Acrilamida al 30%	1,25 ml
Buffer separador (1,5 M tris-base, pH 8,8)	3,75 ml	Buffer espaciador (0,5 M tris-HCl, pH 6,8)	1,8 ml
SDS al 10%	150 μ l	SDS 10%	100 μ l
H₂O	4,525 ml	H₂O	4,3 ml
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	~ 25 μ l	TEMED	~ 15 μ l
Persulfato de amonio al (PSA) 10%	~ 50 μ l	PSA al 10%	~ 60 μ l

4.7.3 Tinción del SDS-PAGE

El gel se colocó en un recipiente en agitación con solución fijadora (isopropanol 25% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) por 2 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución fijadora y se colocó la solución de azul de Coomassie (metanol 50% (v/v), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, California, EUA) 0,05% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua destilada 40%) la cual se dejó en agitación durante toda la noche. Al cabo de este tiempo se retiró el azul de Coomassie y se agregó la solución de decoloración (metanol 5%, ácido acético 7% y agua destilada 88%), permaneció en agitación por 2 horas, se repitió este último paso dos veces.

4.8. Análisis de la pared celular

En vista de las dificultades encontradas para aislar protoplastos de *G. angustifolia*, se realizó el análisis de la pared celular con el fin de conocer más a fondo la problemática encontrada e intentar ajustar la composición enzimática. A su vez, se analizaron especies de las cuales se ha aislado exitosamente protoplastos en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas de la Universidad de Costa Rica, como comparación. El análisis de los azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico se llevó a cabo en el Departamento de Alimentos de Origen Vegetal, del Instituto de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología de la Universidad de Hohenheim, Stuttgart, Alemania.

4.8.1 Material insoluble en alcohol (MIA)

Se liofilizaron muestras de *G. angustifolia* (callos, hojas *in vitro* y de invernadero), *Petunia hybrida* (hojas *in vitro*), *Salpiglossis sinuata* (callos), *Hylocereus* sp. (callos), *Nicotiana sanderae* (callos), *Nicotiana debneyi* (callos) y *Nicotiana gossei* (callos) (cuadro 6), en el equipo Christ Alpha 1-2/LD (Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Alemania). Una vez liofilizadas, las hojas se molieron (0,25 mm) con un molino (Retsch®, Haan, Alemania).

Cuadro 6. Condiciones de cultivo y material utilizado de las especies seleccionadas para el análisis de polisacáridos de la pared celular

Especie	Material utilizado para análisis de polisacáridos	Explante utilizado para formación de callo	Medio de cultivo para mantenimiento de callo o crecimiento de planta
<i>Hylocereus</i> sp.	Callos	Segmentos de tallo de plantas <i>in vitro</i>	MS 3% sacarosa + 5 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2ip + 1mg/l 2,4-D + 400 mg/l extracto de malta + 0,8% agar
<i>N. gossei</i>	Callos	Hojas de plantas <i>in vitro</i>	MS 3% sacarosa + 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP + 0,8% agar
<i>N. debneyi</i>	Callos	Hojas de plantas <i>in vitro</i>	MS 3% sacarosa + 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP + 0,8% agar
<i>N. sanderae</i>	Callos	Hojas de plantas <i>in vitro</i>	MS 3% sacarosa + 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP + 0,8% agar
<i>S. sinuata</i>	Callos	Hojas de plantas <i>in vitro</i>	MS 3% sacarosa + 0,5 mg/l AIA + 0,5 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D + 0,8% agar
<i>G. angustifolia</i>	Callos	Porción inferior de brote joven de plantas <i>in vitro</i>	MS 3% sacarosa + 10 mg/l 2,4-D + 0,2% phytigel
<i>P. hybrida</i>	Hojas <i>in vitro</i>	...	MS 3% sacarosa + 0,8% agar
<i>G. angustifolia</i>	Hojas <i>in vitro</i>	...	MS 3% sacarosa + 3 mg/l BAP + 2 ml/l PPM + 0,2% phytigel
<i>G. angustifolia</i>	Hojas de invernadero

Las muestras liofilizadas y molidas (400 mg) se mezclaron con etanol en ebullición (75 ml, 80% v/v) con un homogenizador de alta velocidad (Ultra-Turrax® T25, IKA®, Staufen, Alemania). Posteriormente se agitaron a 700 revoluciones por minuto por 2 horas en baño María a 60°C. Se recuperó el extracto insoluble al filtrarlo mediante un filtro de vidrio G1 con ayuda de una bomba de vacío (Vaccubrand GmbH y Co., Wertheim, Alemania). El precipitado se lavó dos veces con 50 ml de etanol (80% v/v) y dos veces con 25 ml de acetona, posteriormente se secó en un horno a 50°C. Las muestras se mantuvieron en el desecador hasta ser analizadas.

4.8.2 Extracción secuencial de MIA

La extracción secuencial del MIA se realizó únicamente para las muestras de *G. angustifolia* (callos, hojas *in vitro* y hojas de invernadero) y *N. sanderae* (callos). La metodología fue modificada de Endress *et al.* (2009) y Ramírez-Truque *et al.* (2011). Para ello se adicionó 30 ml de agua ultrapura (100°C) a las muestras MIA (400 mg) y se colocaron en agitación a 24°C por 30 minutos. Seguidamente se centrifugó 10 minutos

(6600 xg, 20°C) y se separó el sobrenadante filtrándolo mediante un embudo de Buchner con papel filtro de 90 mm (Whatman® 541 hardened ashless, Maidstone, Inglaterra). El sólido remanente se resuspendió nuevamente en 30 ml de agua ultrapura (100°C) y se agitó a 24°C por 30 minutos. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos (6600 xg, 20°C) y se recolectó el sobrenadante filtrando mediante un embudo de Buchner con papel filtro de 90 mm (Whatman® 541 hardened ashless, Maidstone, Inglaterra). Ambos sobrenadantes se mezclaron para formar la fracción de pectinas solubles en agua caliente (HWSP).

El precipitado insoluble en agua caliente fue resuspendido en 30 ml de una solución de hidróxido de sodio (NaOH, 1M) y extraído en agitación constante durante 3 horas a 5°C. La suspensión fue centrifugada por 10 minutos (6600 xg, 20°C), el sobrenadante se separó mediante filtración con embudo de Buchner con papel filtro de 90 mm (Whatman® 541 hardened ashless, Maidstone, Inglaterra). El sólido restante se lavó dos veces con 30 ml de agua ultrapura, después de cada lavado la muestra se centrifugó por 10 minutos (6600 xg, 20°C) y se filtró con el embudo de Buchner con papel filtro de 90 mm (Whatman® 541 hardened ashless, Maidstone, Inglaterra). El sobrenadante de hidróxido de sodio 1M y los dos sobrenadantes de las resuspensiones con agua ultrapura se unieron para formar la fracción de pectinas solubles en álcali (OHP). El pH de ésta fracción se ajustó a 6 con ácido clorhídrico (HCl) al 10%.

El material insoluble en hidróxido de sodio (NaOH, 1M) se resuspendió en 30 ml de una solución de hidróxido de sodio más concentrada (NaOH, 4M) y se agitó a 24°C por 5 horas. La suspensión fue centrifugada por 10 minutos (6600 xg, 20°C) y el sobrenadante se filtró en un embudo de Buchner con papel filtro de 90 mm (Whatman® 541 hardened ashless, Maidstone, Inglaterra). El sólido restante se lavó dos veces con agua ultrapura de la forma descrita anteriormente. El sobrenadante de hidróxido de sodio 4M y los dos sobrenadantes de las resuspensiones con agua ultrapura se unieron para formar la fracción hemicelulosa (HC). El pH de esta fracción se ajustó a 6 con HCl al 10%. El precipitado restante se resuspendió en 30 ml de agua ultrapura para obtener la fracción de celulosa (C).

Las fracciones obtenidas fueron sometidas a diálisis durante 48 horas utilizando membranas flexibles (36/32, poro 25-30 A, Medicell Internacional, Londres, Reino Unido), en agua ultrapura. Posteriormente las fracciones se liofilizaron.

4.8.3 Hidrólisis ácida

Se sometió a hidrólisis tanto las muestras MIA como las diferentes fracciones obtenidas, realizando dos repeticiones de cada una. La hidrólisis se realizó según la metodología de Kurz *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Para ello se agregaron 500 µl de isopropanol y 300 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 72% p/p) a 20 mg de muestra. Luego de un tiempo de reacción de una hora a temperatura ambiente, se detuvo la reacción colocando las muestras en un baño de agua con hielo y se adicionaron 5 ml de agua ultrapura. Posteriormente se calentaron en un calentador de bloque a 121°C por una hora. Transcurrido este tiempo, el hidrolizado fue enfriado en un baño de agua con hielo, luego se neutralizó con 750 µl de amoníaco (NH₃, 25% v/v). El hidrolizado se transfirió a un balón de 10 ml y se aforó con agua ultrapura. Se tomó una alícuota de 2 ml de esta solución y se aforó en un balón de 50 ml. Las muestras se filtraron utilizando filtros de 0,45 µm (Chromafil® AO-45/15MS, Machery-Nagel GmbH y Co., Düren, Alemania) y se inyectaron en viales de 1,5 ml con tapa (32 x 11,6 mm, VWR® GmbH, Darmstadt, Alemania) para ser analizadas en el sistema de cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada – HPAEC-PAD (Dionex GmbH, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

4.8.4. Análisis mediante HPAEC-PAD

Para el análisis mediante HPAEC-PAD se utilizó el protocolo previamente desarrollado por Nagel *et al.* (2014), con algunas modificaciones, en el Departamento de Alimentos de Origen Vegetal, del Instituto de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología de la Universidad de Hohenheim, Stuttgart, Alemania.

Preparación de soluciones estándar:

Para la preparación de los estándares se utilizaron los reactivos descritos en el cuadro 7. Se prepararon dos soluciones madre, la solución A compuesta por los azúcares neutros y el ácido glucurónico, y la solución B compuesta por el ácido galacturónico.

A partir de las soluciones madre preparadas, se realizaron diluciones de 0,0625, 0,125, 0,5, 0,625, 2,5, 5, 7,5 y 10 mg/l, combinando las cantidades que se detallan en el cuadro 8 de las soluciones A y B previamente preparados. Cada una de ellas se filtró utilizando filtros con un tamaño de poro de 0,45 μm (Chromafil® AO-45/15MS, Machery-Nagel GmbH y Co., Düren, Alemania), e inyectó en viales de 1,5 ml con tapa (32 x 11,6 mm, VWR GmbH, Darmstadt, Alemania) para ser analizadas en el HPAEC-PAD.

Cuadro 7. Reactivos utilizados y soluciones madre para la preparación de soluciones estándar de azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico

Reactivo	Peso molecular (g/mol)	Peso molecular-anhidro (g/mol)	Soluciones madre	
			A (mg/500 ml)	B (mg/200 ml)
L(-)-Fucosa (Sigma-Aldrich)	164,16	146,14	112,33	...
L(+)-Ramnosa monohidratada (VWR GmbH)	182,17	146,14	124,63	...
L(+)-Arabinosa (VWR GmbH)	150,15	132,13	113,64	...
D(+)-Galactosa (VWR GmbH)	180,16	162,14	111,11	...
D(+)-Glucosa monohidratada (VWR GmbH)	198,17	162,14	122,23	...
D(+)-Xilosa (VWR GmbH)	150,13	132,11	113,64	...
D(+)-Manosa (VWR GmbH)	180,16	162,14	111,11	...
D(+)-Ácido glucurónico 98,8% (Fluka AG)	194,14	176,13	110,23	...
D(+)-Ácido galacturónico monohidratado (Sigma-Aldrich)	212,15	176,13	...	120,46

Cuadro 8. Diluciones preparadas para la elaboración de los estándares para el análisis de azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico

Azúcares neutros+GlcUA *		GalUA *	
Estándar (mg/l)	ml solución A/ml de agua ultrapura	Estándar (mg/l)	ml solución B/ml de agua ultrapura
10	1,00/20	56,25	2,25/20
7,5	0,75/20	43,75	1,75/20
5	0,5/20	31,25	1,25/20
2,5	0,25/20	15	0,6/20
0,625	0,625/200	3,75	1,5/200
0,125	0,125/200	0,75	0,3/200
0,0625	1 ml del estándar 0,625/10	0,375	1 ml del estándar 3,75/10

* GlcUA= Acido glucurónico, GalUA= Acido galacturónico.

Condiciones del HPAEC-PAD

Los azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico fueron analizados en el HPAEC-PAD con una columna CarboPac PA20 (Dionex GmbH, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), equipado con el software Chromeleon 6,9 Chromatography Management System (Dionex Corporation). Las características del sistema se detallan en el anexo 3.

Los eluentes utilizados fueron los siguientes: Eluente A (agua ultrapura), se llenó con 1,8 litros de agua ultrapura y se gaseó con N₂ durante 15 minutos, pasado este tiempo, se cerró con una tapa de rosca. Eluente B (100 mM NaOH + 170 mM acetato de potasio), se pesó 27,88 g de acetato de potasio y se aforó a 1 litro a 20°C con agua ultrapura. La solución se filtró a través de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0,2 µm (Whatman GmbH, Maidstone, Inglaterra) con ayuda de una bomba de vacío (Vaccubrand GmbH y Co., Wertheim, Alemania) y se gaseó con N₂ durante 15 minutos. Posteriormente se le adicionó 10,4 ml de NaOH (50%, p/p) y se gasificó con N₂ durante un minuto para mezclar la solución, finalmente se cerró con una tapa de rosca. Eluente C (500 mM NaOH), se llenó con 1,5 litros de agua ultrapura y se gasificó con N₂ durante 15 minutos. Posteriormente se adicionó 39 ml de NaOH (50%, p/p) y se gasificó con N₂ durante un minuto para mezclar la solución, finalmente se cerró con una tapa de rosca. Los gradientes empleados de cada eluente se detallan en el cuadro 9.

Cuadro 9. Gradientes de eluentes utilizados para la determinación simultánea de los azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC-PAD)

Tiempo (minutos)	% Eluente A (Agua ultrapura)	% Eluente C (170mM KAc + 100mM NaOH)	% Eluente D (500 mM NaOH)
-14,00	0	0	40
-12,00	0	0	40
-11,90	98	2	0
0,00	98	2	0
Inyección			
0,00	98	2	0
0,50	99	1	0
30,00	99	1	0
30,10	0	100	0
40,00	0	100	0
40,10	0	0	40
46,00	0	0	40

Determinación de la concentración de los azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico encontrados

Los distintos azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico encontrados en cada muestra se identificaron mediante su comparación con los estándares, según el tiempo de retención de cada uno, tal como se observa en el anexo 4. Las áreas se integraron manualmente con ayuda del software Chromeleon 6,9. La determinación de la concentración se realizó con base en la integración de las áreas de los picos correspondientes a las soluciones estándar (anexo 4A). Se realizaron dos repeticiones de cada muestra, los resultados obtenidos para el MIA se analizaron mediante un ANDEVA y se determinó las diferencias entre muestras mediante la prueba de Tukey (Statística 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

4.8.5. Análisis del contenido de lignina

El porcentaje de lignina de cada muestra MIA se determinó mediante la metodología propuesta por Brinkmann *et al.* (2002), con algunas modificaciones. Para ello se pesaron 10 mg, por duplicado, de cada muestra MIA en tubos Eppendorf de 2 ml a los cuales se les adicionó 1,5 ml de HCl 2M y 0,3 ml de ácido tioglicólico. Las muestras se incubaron en baño María a 95°C durante 4 horas. Pasado este tiempo se colocaron en baño de hielo durante 5 minutos, luego se centrifugaron durante 5 minutos a 14 500 xg, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó tres veces con agua ultrapura. Luego se les adicionó 1 ml de NaOH 0,5 M y se agitaron durante 18 horas. Posteriormente las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 14 500 xg, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y el precipitado se resuspendió en 0,5 ml de NaOH 0,5M, nuevamente se centrifugó. Ambos sobrenadantes se mezclaron y se les adicionó 0,3 ml de HCl 37%. Las muestras permanecieron seguidamente a 4°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron por 5 minutos a 14 500 xg, el sobrenadante se descartó y el precipitado se solubilizó en 1 ml de NaOH 0,5M. Para determinar la absorbancia (UV-Visible Spectrophotometer Carry 100 Conc., Alemania) a 280 nm se tomó una alícuota de 700 ml y se disolvió en 800 ml de NaOH 0,5 M. Las curvas de calibración se generaron utilizando lignina comercial (Sigma) en dosis de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 y 5 mg, para determinar la absorbancia de los estándares, se tomó una alícuota de 200 ml y se disolvió en 1,8 ml de NaOH 0,5 M.

5. Resultados

5.1. Callos y suspensiones celulares

Se logró inducir la formación de callo tanto en brotes como en puntas de raíz con los distintos tratamientos de reguladores de crecimiento evaluados, mientras que en ausencia de reguladores (testigo), los explantes no formaron callo (cuadro 10).

En cuanto al porcentaje de explantes que presentaron callo a partir de brotes, se observa en el cuadro 10 que la mayor concentración de auxina utilizada (6 mg/l de 2,4-D), aumentó significativamente la formación de callo (92%). Con puntas de raíz, los mayores porcentajes (76 y 52%) se obtuvieron con 2,4-D a 6 y 3 mg/l, respectivamente, y no se observó diferencias significativas entre estos tratamientos aunque fueron superiores al testigo. El tratamiento que presentó significativamente el menor porcentaje de formación de callo a partir de brotes (32%) fue el tratamiento compuesto por auxina y citoquinina (2,4-D+TDZ). De igual forma, este tratamiento mostró un porcentaje de formación de callo significativamente menor (28%), en comparación con 2,4-D a 6 mg/l en explantes a partir de puntas de raíz.

Cuadro 10. Presencia y características del callo formado a partir de segmentos de brote y puntas de raíz de *G. angustifolia*, a los 70 días de evaluación

Explante	Tratamiento	% Explantes que presentaron callo*	Color del callo (%)		Tipo de callo (%)	
			Blanco ^o	Café	Friable ^o	Nodular
Brote	Testigo	0 ± 0,0 d	NC	NC	NC	NC
Brote	2,4-D (3 mg/l)	68 ± 8,0 b	100 a	0	72,2 a	27,8
Brote	2,4-D (6 mg/l)	92 ± 4,9 a	100 a	0	73,9 a	26,1
Brote	2,4-D (3 mg/l) + TDZ (0,01 mg/l)	32 ± 4,9 c	50 b	50	0 b	100
Valor de p		0,0000	<0,0001		0,0005	
X ²		-	22,32		15,11	
g.l		-	2		2	
Raíz	Testigo	0 ± 0,0 c	NC	NC	NC	NC
Raíz	2,4-D (3 mg/l)	52 ± 10,2 ab	100 a	0	0 a	100
Raíz	2,4-D (6 mg/l)	76 ± 9,8 a	100 a	0	21,1 a	78,9
Raíz	2,4-D (3 mg/l) + TDZ (0,01 mg/l)	28 ± 4,9 bc	100 a	0	28,6 a	71,4
Valor de p		p=0,0001	0,0568		0,1733	
X ²		-	5,74		3,51	
g.l		-	2		2	

* Cada valor muestra el porcentaje promedio ± el error estándar. *°Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza. NC: No se formó callo.

En cuanto al color, en los brotes con los tratamientos de 2,4-D con 3 y 6 mg/l, el 100% de los callos fueron blancos, mientras que en el tratamiento con 2,4-D+TDZ el 50% presentó una coloración café. Por su parte, el callo formado a partir de puntas de raíz fue 100% blanco en todos los tratamientos (cuadro 10 y figura 2).

Con respecto al tipo de callo formado a partir de brotes, se observó que solo los tratamientos con 2,4-D (sin TDZ) indujeron callo friable (alrededor del 73%). Mientras que al usar TDZ el tipo de callo formado fue 100% nodular. Las puntas de raíz produjeron en su mayoría callo nodular con valores bajos de callo friable con 6 mg/l de 2,4-D y 2,4-D+TDZ (alrededor del 25%) (cuadro 10 y figura 2).

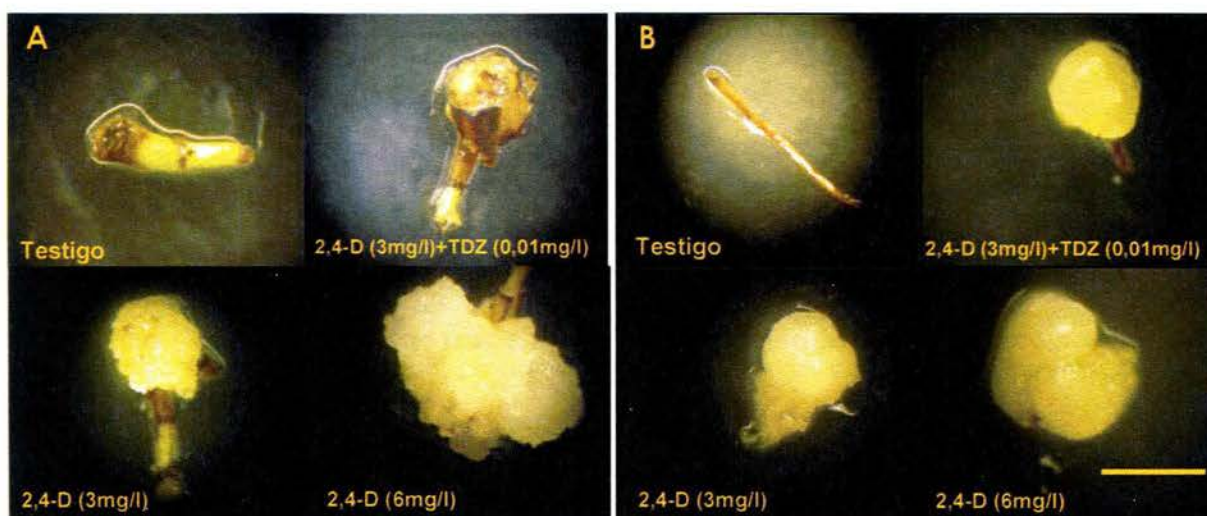


Figura 2. Callos formados a los 70 días de cultivo **A)** a partir de segmentos de brotes jóvenes, **B)** a partir de puntas de raíz de plantas *in vitro* de *G. angustifolia*. Fotos tomadas a 160 X. Barra = 0,5 cm.

En cuanto a los tratamientos empleados para el crecimiento de los callos de *G. angustifolia* formados a partir de brotes, el 100% de los callos bajo los tratamientos 2,4-D (3 mg/l) + 2ip (0,93 mg/l); 2,4-D (3 mg/l) + 2ip (1,9 mg/l); 2,4-D (3 mg/l) + zeatina (1 mg/l); 2,4-D (3 mg/l) + zeatina (2 mg/l); 2ip (0,93 mg/l); 2ip (1,9 mg/l); zeatina (1 mg/l) y zeatina (2 mg/l) se necrosaron por completo. Se observó crecimiento únicamente en los tratamientos que contenían solo 2,4-D (3, 6 y 10 mg/l).

Se obtuvo un incremento en peso fresco de más del 200% en los callos de *G. angustifolia* en los tratamientos con solo 2,4-D. Para esta variable no se observaron diferencias significativas al emplear 3, 6 o 10 mg/l de este regulador. Sin embargo, al utilizar 10 mg/l de 2,4-D se obtuvo significativamente que el 100% de los callos no presentaron oxidación a los tres meses de cultivo (cuadro 11).

Cuadro 11. Crecimiento y porcentaje de callos no oxidados de *G. angustifolia* provenientes de brotes con tres concentraciones de 2,4-D al cabo de tres meses de cultivo

Tratamiento	Incremento en peso (%)*	Callos no oxidados (%)*
2,4-D (3 mg/l)	232,1 ± 26,5 a	43,3 b
2,4-D (6 mg/l)	237,4 ± 19,9 a	51,7 b
2,4-D (10 mg/l)	246,4 ± 38,5 a	100 a
Valor de p	0,8528	< 0,0001
χ^2	---	16,3
g.l	---	2

* Cada valor muestra el porcentaje promedio, para el incremento en peso se muestra además \pm el error estándar. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza.

Se logró establecer suspensiones celulares a partir de callos friables provenientes de brotes (figura 3A), tal como se observa en la figura 3B. Estas suspensiones se evaluaron por cuatro transferencias, durante las cuales presentaron crecimiento y coloración crema. En el cuadro 12 se observa el porcentaje de incremento en el VCC de las suspensiones celulares de *G. angustifolia* para las cuatro transferencias. Se observó que el crecimiento del VCC fue significativamente mayor en la etapa previa a la primera transferencia.

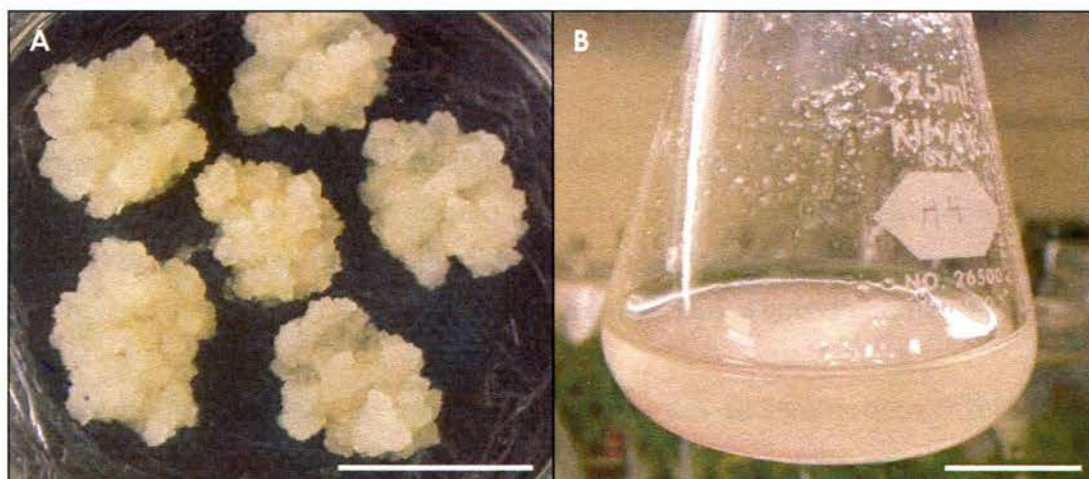


Figura 3. A) Callos de *G. angustifolia* en medio de cultivo con 10 mg/l de 2,4-D, formados a partir de segmentos de brote, empleados para la elaboración de las suspensiones celulares. B) Suspensiones celulares obtenidas en medio de cultivo líquido con 10 mg/l 2,4-D. Barra = 2,5 cm.

Cuadro 12. Porcentaje de incremento en el volumen de células compactas (VCC) en cuatro transferencias consecutivas cada 15 días, de suspensiones celulares de *G. angustifolia*

No. de transferencia	Incremento en VCC (%) *
0-1	250,0 ± 28,8 a
1-2	45,8 ± 20,8 b
2-3	104,2 ± 44,3 b
3-4	62,5 ± 26,0 b
p	0,003

* Cada valor muestra el porcentaje promedio ± el error estándar. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza.

5.2. Aislamiento de protoplastos a partir de hoja

Preplasmólisis y aislamiento

Se realizaron tres experimentos para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas, tanto de plantas *in vitro* como de invernadero (cuadro 2). En el primer experimento, en el cual se utilizaron hojas provenientes de plantas *in vitro*, se observó que el tejido no fue digerido a las 16 horas con ninguna de las dos enzimas empleadas ni tipo de corte.

En el experimento 2 (cuadro 2), a las hojas provenientes de invernadero se les realizó dos tipos de corte (en cuadros y en peine) y raspado de la lámina abaxial; la digestión enzimática fue de 16 y 24 horas. A las 16 horas de digestión enzimática no se observó la digestión del tejido ni la presencia de protoplastos en la solución enzimática luego del período de digestión, por lo que se aumentó el tiempo de la misma a 24 horas. Pasado ese tiempo, el tratamiento de corte en cuadros presentó algunos restos celulares; sin embargo, no fue posible observar protoplastos. De igual forma no se observó digestión ni presencia de protoplastos al utilizar hojas bandera de invernadero con digestión a 100 rpm a 24 y 32°C durante 16 horas (experimento 3, cuadro 2).

5.3. Aislamiento de protoplastos a partir de callo

Preplasmólisis

En el cuadro 13, figura 4, se observa que con el medio CPW con 13% de manitol se logró la preplasmólisis de las células de *G. angustifolia* provenientes de callo. Bajo el tiempo mínimo de exposición (media hora) un 48,52% de las células se observaban plasmolizadas, lo cual no difiere estadísticamente con el porcentaje de células plasmolizadas observadas tanto a una hora como a una hora y media. Se notó un mayor número de células plasmolizadas (63,5%) con el tratamiento de dos horas.

Cuadro 13. Células de *G. angustifolia* plasmolizadas a distintos tiempos con el medio de Power y Chapman (1985) (CPW), más 13% manitol

Tiempo (h)	Células plasmolizadas (%)*
0	0 ± 0 c
0,5	48,5 ± 1,07 b
1	44,4 ± 1,06 b
1,5	53,6 ± 1,08 b
2	63,5 ± 1,83 a
Valor de p	< 0,0001
χ²	96,4
g.l	4

* Cada valor muestra el porcentaje promedio ± el error estándar. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza.



Figura 4. Representación de células de *G. angustifolia* plasmolizadas a distintos tiempos con el medio de Power y Chapman (1985) (CPW) más 13% manitol. Fotografía tomada a 160X a las 2 horas, barra = 100 μm.

Aislamiento

En los experimentos 1 al 10, descritos en el cuadro 4, se utilizaron callos friables provenientes de brotes, callos nodulares formados a partir de puntas de raíz y suspensiones celulares formadas de callos friables. Para la digestión de la pared celular, se emplearon diversas composiciones enzimáticas con tiempos de digestión de 2, 4, 6, 8, 16 y 24, así como a diversas velocidades de agitación (50, 80, 100 y 120 rpm). Luego de la digestión enzimática se observó en todos los casos, independientemente del material empleado, la presencia de muchos agregados celulares, lo que sugiere que no hubo una adecuada disgregación del callo. Asimismo, en ningún caso fue posible obtener protoplastos. La figura 5 muestra una representación de los agregados celulares observados con los distintos tejidos utilizados.

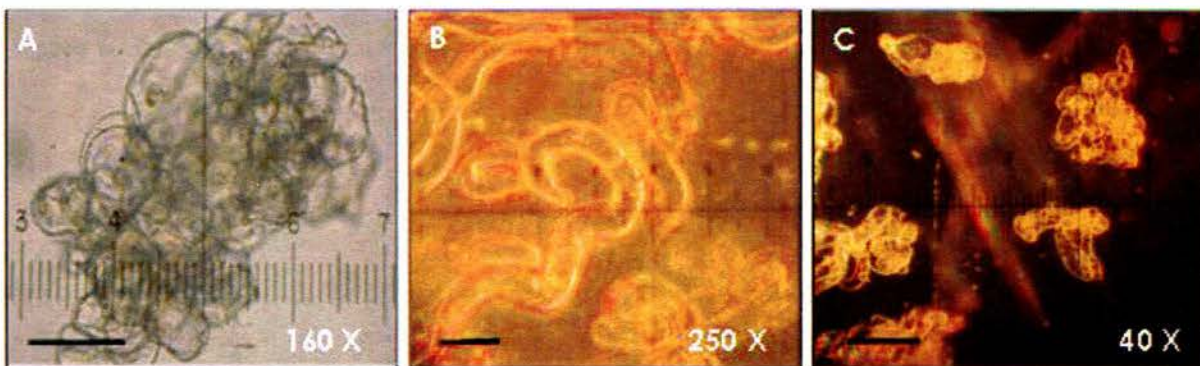


Figura 5. Agregados celulares observados luego de 16 horas de digestión enzimática utilizando **A)** callos provenientes de brotes (barra = 100 μm) **B)** callos provenientes de raíz (barra = 38 μm) y **C)** suspensiones celulares de callos provenientes de brotes de *G. angustifolia* (barra = 250 μm).

También se observó el oscurecimiento de la solución enzimática durante el proceso de digestión enzimática. Por lo tanto, en el experimento 11 se adicionó cisteína (5,3 g/l), tanto a la solución de preplasmólisis como a la enzimática (cuadro 4). Se observa en la figura 6 que al agregar cisteína se logró evitar el oscurecimiento tanto del tejido como de la solución enzimática. Se encontró que el efecto se obtiene solamente al agregarla a la solución enzimática, no durante la preplasmólisis. A pesar de esto, tampoco se observaron protoplastos en este experimento.

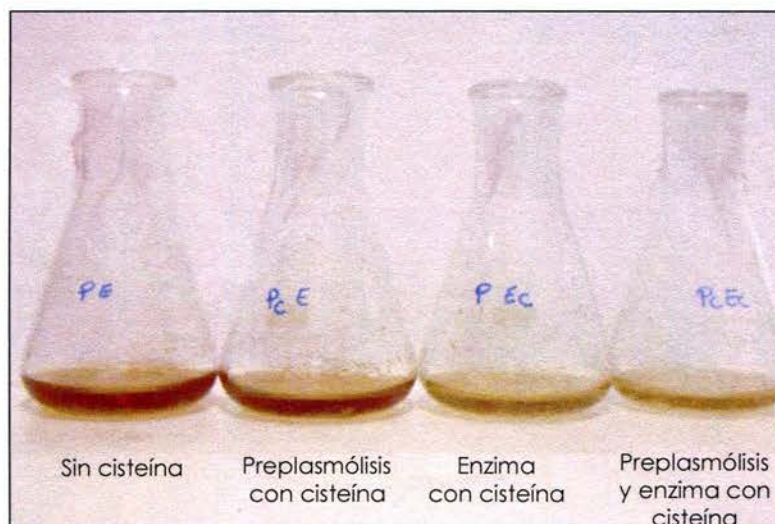


Figura 6. Resultado de la adición de cisteína (5,3 g/l) durante la preplasmólisis y digestión enzimática sobre el oscurecimiento de la solución enzimática y del tejido (experimento 11, cuadro 4).

En los experimentos 12, 16, 17 y 18 se adicionó a la solución enzimática cisteína (0,02, 2,7 y 5,3 g/l), PVP (10 g/l), ácido ascórbico (0,15, 0,5 y 1 g/l), ácido cítrico (0,15 g/l), carbón activado (1,5 g/l), BSA (0,5 g/l) o Amberlite XAD-7 (1 y 2 g/l) (cuadro 4). El tratamiento con cisteína 5,3 g/l fue el único que evitó el oscurecimiento de la solución enzimática y del tejido. Al utilizar una solución enzimática compuesta por celulasa 4%, macerocima 2%, pectoliasa 1% y cisteína 5,3 g/l, a 100 rpm durante 16 horas de digestión (experimento 12), se lograron observar algunos protoplastos aislados tal como se observa en la figura 7A. Lo mismo ocurrió en los experimentos 13, 14, y 15 utilizando esta misma composición enzimática.

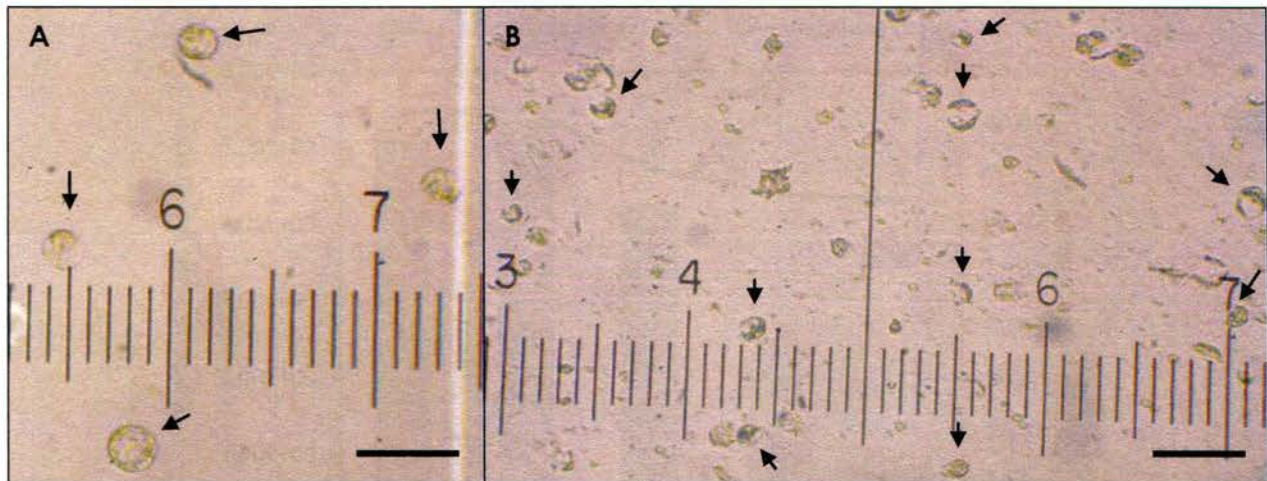


Figura 7. Protoplastos de *G. angustifolia* obtenidos a partir de callos con una solución enzimática compuesta por celulasa RS 4%, macerocima R10 2%, pectoliasa Y23 1% y cisteína 5,3 g/l, 16 horas de digestión a 100 rpm. **A)** Sin tratamiento de vacío y **B)** tratamiento de vacío por 20 minutos a 60 cmHg. Flechas señalan los protoplastos. Fotografías tomadas a 160X, barra = 50 μ m.

En el experimento 18 se utilizó un tratamiento de vacío de 20 minutos a 60 cmHg con cisteína, ácido ascórbico y Amberlite XAD-7. El tratamiento con cisteína 5,3 g/l fue el único con el que se lograron observar algunos protoplastos aislados, con un tamaño aproximado de 10 a 20 μ m. Sin embargo, como se observa en la figura 7B, hay muchos restos celulares y algunos de los protoplastos se muestran dañados.

En vista de la gran cantidad de restos celulares que se observaron en el experimento 18, se probaron distintos tiempos de digestión enzimática utilizando celulasa 4%, macerocima 2%, pectoliasa 1% y cisteína 5,3 g/l con tratamiento de vacío durante 20 minutos a 60 cmHg (experimento 19, cuadro 4). Se obtuvo a las 2 horas $5,11 \times 10^3$ protoplastos por gramo, los cuales no difieren estadísticamente de los obtenidos a las 4 horas ($5,35 \times 10^3$) y 5 horas ($4,26 \times 10^3$); sin embargo, se observaron menos protoplastos con los tiempos de digestión más extensos (16 y 22 horas). En cuanto a la viabilidad, se obtuvieron porcentajes de entre el 82,7% (4 horas) y el 65% (22 horas), sin diferencias significativas entre los tiempos de digestión (figura 8).

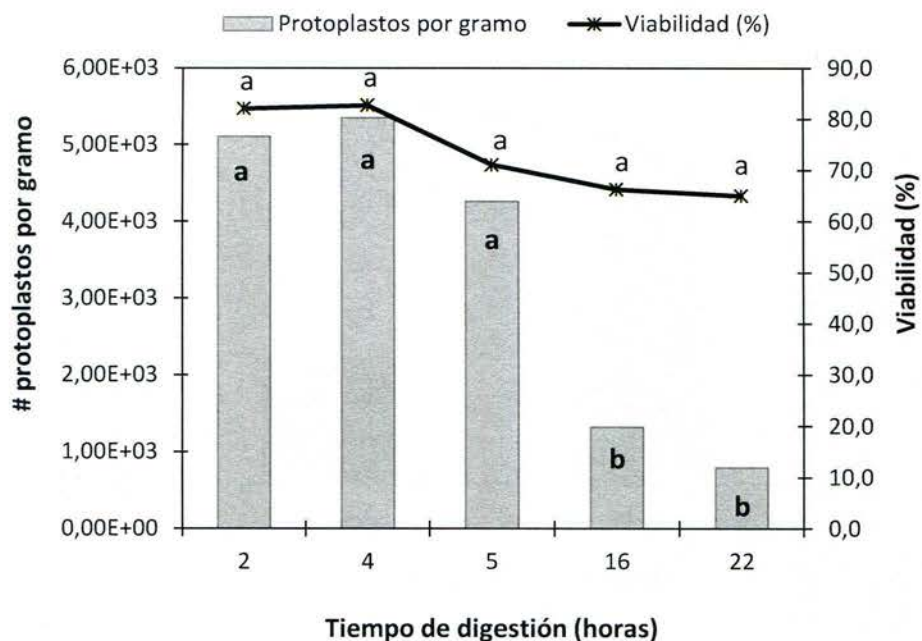


Figura 8. Protoplastos obtenidos por gramo de callo de *G. angustifolia* y su viabilidad con distintos tiempos de digestión enzimática a 100 rpm con una composición de 4% celulasa, 2% macerocima, 1% pectoliasa y cisteína 5,3 g/l, y con un tratamiento de vacío de 20 minutos a 60 cmHg. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza.

En la figura 9 se muestra el efecto de dos períodos de vacío sobre el número de protoplastos por gramo obtenidos y su viabilidad. Se obtuvo significativamente una mayor cantidad de protoplastos por gramo al utilizar un tratamiento de vacío de 40 minutos ($1,34 \times 10^4$), que con 20 minutos ($5,11 \times 10^3$). No se encontraron diferencias en cuanto a su viabilidad.

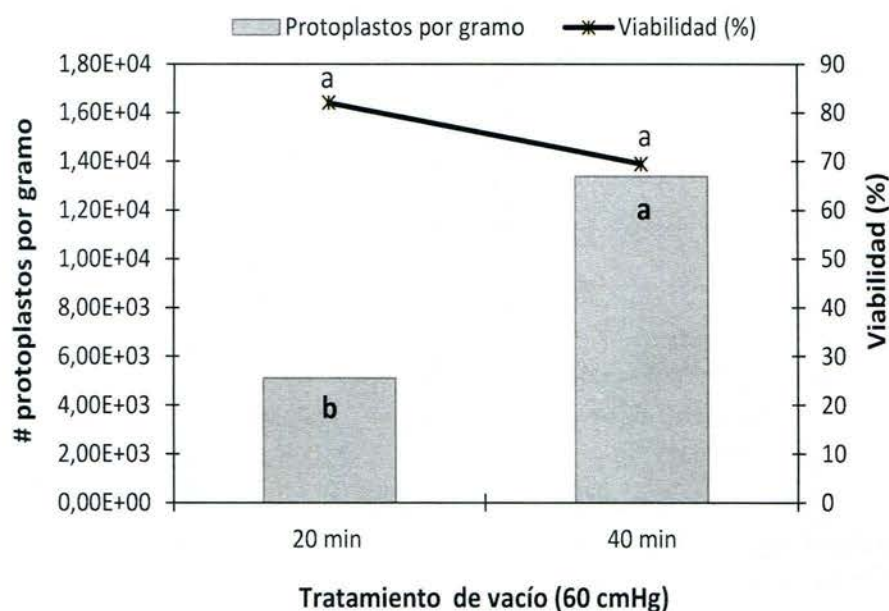


Figura 9. Protoplastos obtenidos por gramo de callo de *G. angustifolia* y su viabilidad con una digestión enzimática de 2 horas a 100 rpm en una solución compuesta por 4% celulasa, 2% macerocima, 1% pectoliasa y cisteína 5,3 g/l, y con dos tratamientos de vacío: 20 o 40 minutos a 60 cmHg. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza.

En la figura 10 se observa que no hubo efecto de la adición de driselasa sobre la cantidad de protoplastos (experimento 20, cuadro 4). Sin embargo, al no adicionar la enzima pectoliasa, se obtuvo de forma significativa menos protoplastos por gramo ($1,95 \times 10^3$). En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas en su viabilidad.

Por otro lado, se encontró determinante la adición de cisteína durante la digestión enzimática también al utilizar bomba de vacío (experimento 21, cuadro 4). En la figura 11 se observa un mayor número de protoplastos por gramo al adicionar cisteína 5,3 g/l a una combinación enzimática compuesta por celulasa 4% y macerocima 2%, durante 2 horas de digestión a 100 rpm y con un tratamiento de vacío de 40 minutos a 60 cmHg. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de protoplastos obtenidos ni su viabilidad al disminuir el potencial osmótico de la solución enzimática al 5,5%.

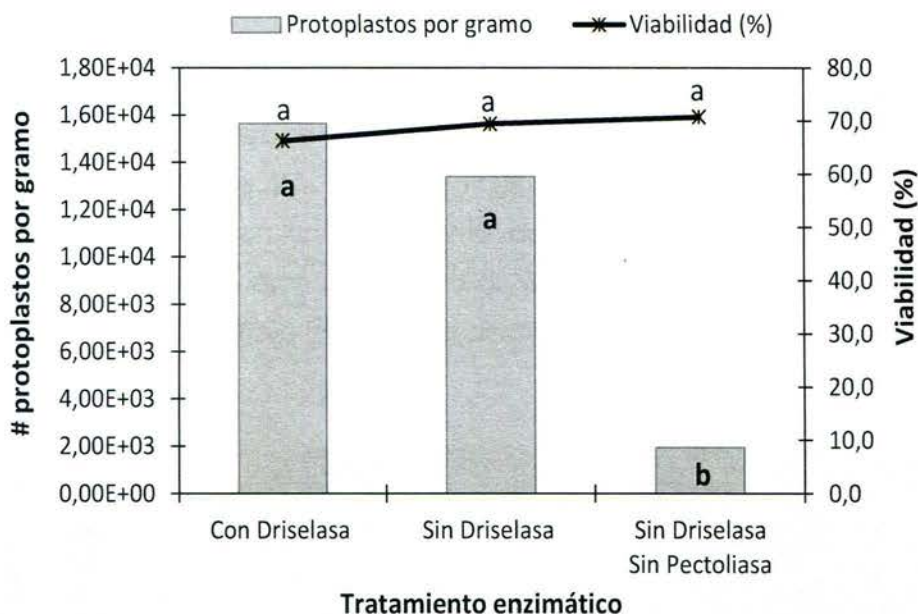


Figura 10. Protoplastos obtenidos por gramo de callo de *G. angustifolia* y su viabilidad con una digestión enzimática de 2 horas a 100 rpm en una solución base compuesta por 4% celulasa, 2% macerocima, 1% pectoliasa y cisteína 5,3 g/l, con y sin 1% driselasa y sin 1% pectoliasa, con un tratamiento de vacío de 40 minutos a 60 cmHg. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza.

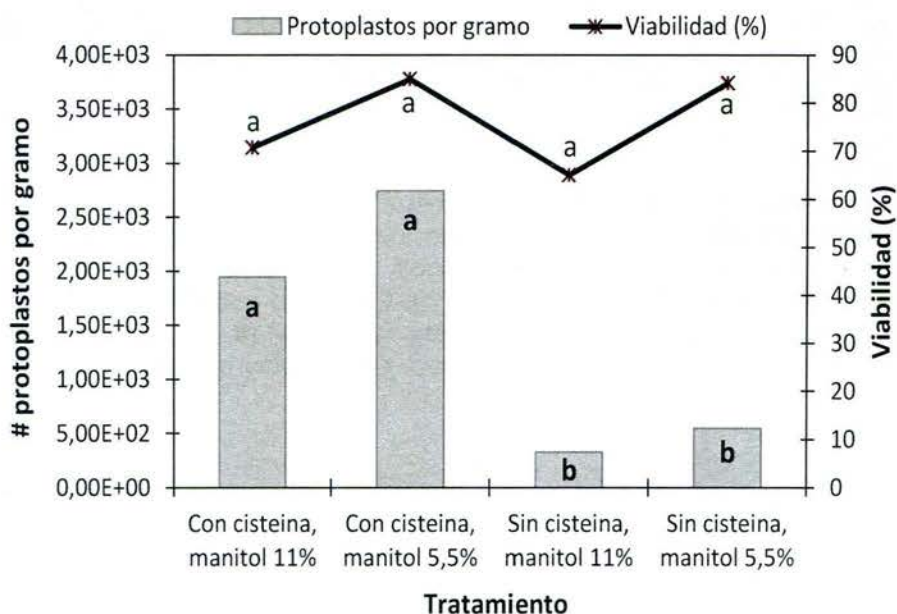


Figura 11. Protoplastos obtenidos por gramo de callo de *G. angustifolia* y su viabilidad con una digestión enzimática de 2 horas a 100 rpm en una solución base compuesta por 4% celulasa, 2% y macerocima, con y sin cisteína 5,3 g/l y manitol al 11% y 5,5%, con un tratamiento de vacío de 40 minutos a 60 cmHg. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza.

En la figura 12 se observa el anillo de protoplastos formado, así como los protoplastos obtenidos con pocos restos celulares, al utilizar una mezcla enzimática compuesta por celulasa 4%, macerocima 2%, pectoliasa 1% y cisteína 5,3 g/l, durante 2 horas de digestión a 100 rpm y con un tratamiento de vacío de 40 minutos a 60 cmHg. Los protoplastos obtenidos tuvieron un tamaño aproximado de 20 a 40 μm . Estos protoplastos no se pudieron cultivar porque las tasas de aislamiento fueron muy bajas.

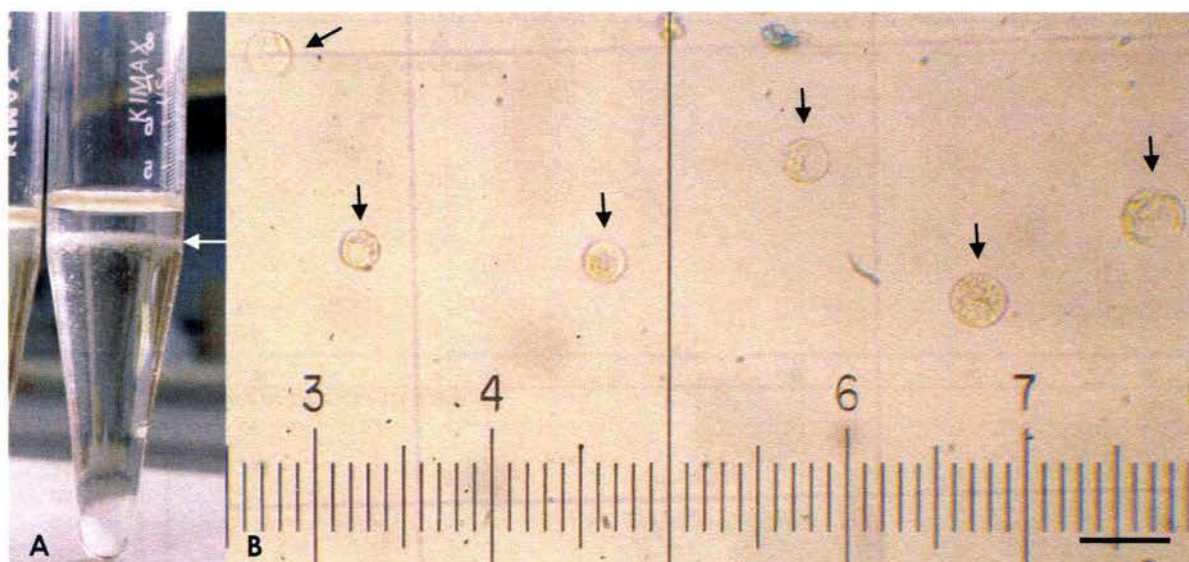


Figura 12. Protoplastos de *G. angustifolia* obtenidos a partir de callos con una solución enzimática compuesta por celulasa RS 4%, macerocima R10 2%, pectoliasa Y23 1% y cisteína 5,3 g/l, con tratamiento de vacío durante 40 minutos a 60 cmHg y 2 horas de digestión. **A)** Anillo de protoplastos observado durante el aislamiento. **B)** Flechas señalando los protoplastos viables obtenidos. Fotografía tomada a 160X, barra = 50 μm .

5.4. Detección de polifenoles

En la figura 13 se muestra los resultados obtenidos para la detección de polifenoles en la fracción 2 a 280 nm (los mismos compuestos se encontraron en la fracción 1), para cada uno de los tratamientos. No se observó la presencia de compuestos a 320 nm, tanto en la fracción 1 como en la 2 en ninguno de los tratamientos.

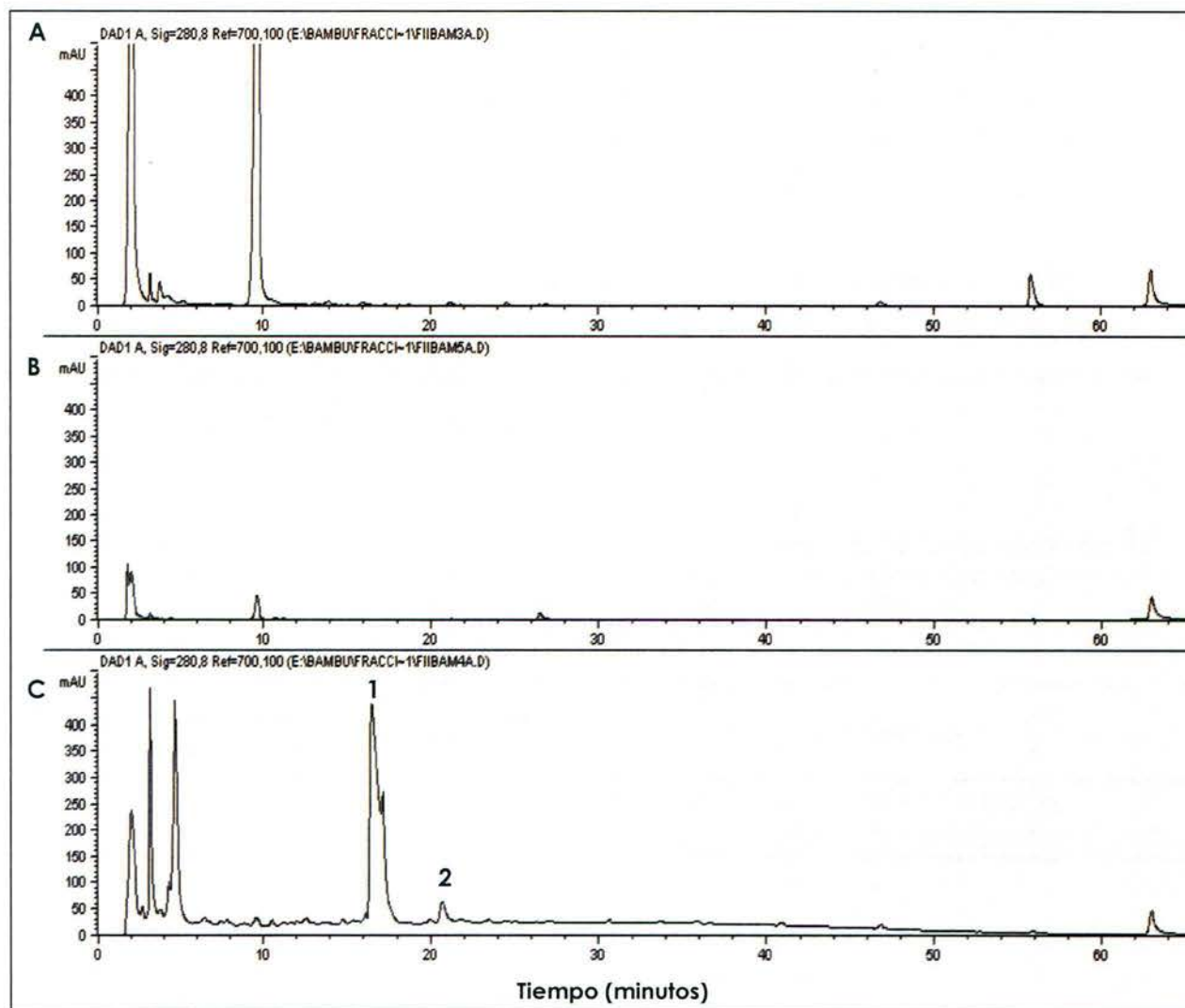


Figura 13. Cromatogramas de la fracción 2 (280 nm), para los tratamientos de callos de *G. angustifolia* en **A)** suspensión celular, **B)** 16 horas de digestión con una solución enzimática en ausencia de enzimas y **C)** 16 horas de digestión enzimática con las enzimas celulasa 2% y macerocima 1%.

Los resultados muestran que no hubo picos evidentes que indiquen la presencia de polifenoles, tanto en el tratamiento de callos en suspensión (figura 13A) como en el tratamiento de callos en solución enzimática en ausencia de enzimas (figura 13B). De forma contraria, existe la presencia de dos compuestos evidentes al colocar los callos en la solución enzimática adicionada con celulasa RS 2% y macerocima R10 1% (picos 1 y 2, figura 13C).

En vista que se observaron compuestos en el tratamiento de los callos con la solución enzimática en presencia de enzimas, se realizó la espectrometría de masas de la cual se obtuvieron los iones característicos de los dos compuestos observados, los cuales, sin embargo, no se lograron identificar (cuadro 14).

Cuadro 14. Iones característicos de los polifenoles encontrados en el tratamiento de 16 horas de digestión enzimática de los callos de *G. angustifolia* con las enzimas celulasa 2% y macerocima 1% en las fracciones 1 y 2 a 280 nm

Núm. Compuesto	Tiempo de retención (min)	Compuesto	[M-H] ⁻ m/z	HPLC-MS ⁿ m/z
1	17,8	Desconocido	202,9	MS ¹ [202,9]: 115,8 (100), 159,7 (83), 158,8 (28)
2	22,1	Desconocido	260,1	MS ² [260,1]: 130,7 (100), 178,7 (80), 202,6 (72), 215,7 (71)

5.5. Análisis enzimático mediante SDS-PAGE

Se realizó un SDS-PAGE con el fin de determinar el posible efecto de la adición de cisteína sobre las enzimas utilizadas en el aislamiento de protoplastos. Se observa en la figura 14 que la adición de la cisteína no afecta el patrón de bandas obtenido en ninguna de las enzimas (celulasa RS, macerocima R10 y pectoliasa Y23), ya sea de forma individual o combinada. De igual forma no se observa una diferencia en el patrón de bandas luego de la digestión enzimática del callo friable de *G. angustifolia* por 2 horas a 100 rpm.

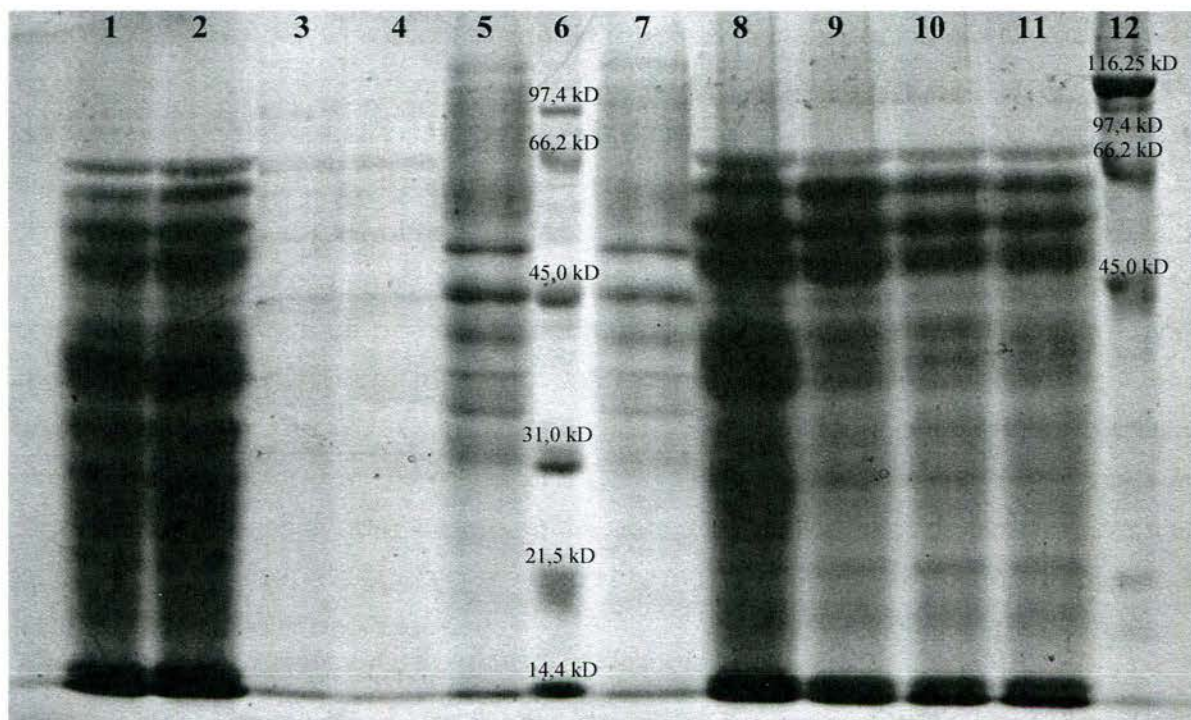


Figura 14. Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) del 5-13% teñido con azul de Coomassie **1)** celulasa RS 4%, **2)** celulasa RS 4% + cisteína, **3)** macerocima R10 2%, **4)** macerocima R10 2% + cisteína, **5)** pectoliasa Y23 1%, **6)** marcador estándar de bajo peso molecular, **7)** pectoliasa Y23 1% + cisteína, **8)** celulasa RS 4% + macerocima R10 2% + pectoliasa Y23 1%, **9)** celulasa RS 4% + macerocima R10 2% + pectoliasa Y23 1% + cisteína, **10)** celulasa RS 4% + macerocima R10 2% + pectoliasa Y23 1% luego de 2 horas de digestión enzimática de callo friable de *G. angustifolia*, **11)** celulasa RS 4% + macerocima R10 2% + pectoliasa Y23 1% + cisteína luego de 2 horas de digestión enzimática de callo friable de *G. angustifolia* y **12)** marcador estándar de alto peso molecular.

5.6. Análisis de la pared celular

Durante el análisis de los azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico, se observó una adecuada separación de la ramnosa de la arabinosa y la manosa de la xilosa con el método empleado. En el anexo 4B se muestra una representación de los cromatogramas obtenidos tanto para las muestras del MIA como de las fracciones en comparación al estándar.

En el cuadro 15 se presenta el contenido de azúcares neutros y ácido urónico del MIA de las distintas muestras analizadas. Se observó un menor contenido de ramnosa y de ácido galacturónico en las muestras de bambú que en todas las otras muestras. La arabinosa se encontró en grandes cantidades en los callos de bambú en comparación con la obtenida en callos de las otras especies analizadas; de igual forma se obtuvo mayor contenido de arabinosa en las hojas de bambú, tanto *in vitro* como de invernadero, en contraste con las hojas de petunia. En cuanto a la galactosa, las hojas de bambú, tanto *in vitro* como de invernadero, mostraron un menor contenido de este azúcar que el resto de materiales analizados. El bambú mostró altos contenidos de xilosa en contraste con las otras muestras analizadas. Los contenidos de manosa observados fueron muy bajos en todas las muestras analizadas, incluso no fue detectado en las hojas de bambú pero sí en los callos. El contenido de ácido glucurónico fue mayor en los callos de bambú que en el resto de los materiales analizados.

Con respecto al fraccionamiento del MIA, se destaca en el cuadro 16 el alto contenido de arabinosa y galactosa en los callos de *G. angustifolia* en todas las fracciones respecto a las demás muestras, así como el alto contenido de xilosa en las muestras de bambú (callos, hojas *in vitro* y hojas de invernadero) respecto a los callos de *N. sanderae* en las fracciones de pectinas solubles en álcali, hemicelulosa y celulosa. Respecto al ácido galacturónico, éste se obtuvo en mayor cantidad en los callos de *N. sanderae* para las fracciones de pectinas solubles en álcali, hemicelulosa y celulosa, siendo mayor en ésta última fracción (9,16 g/100 g de MIA). Se observó además para esta especie un alto contenido de glucosa en las fracciones de pectinas solubles en álcali y hemicelulosa.

Cuadro 15. Composición de azúcares neutros y ácido urónico del material insoluble en alcohol (MIA) de la pared celular de callos y hojas de las distintas especies analizadas

Especie	Material	Rendimiento (% MIA)	Composición de azúcares neutros y ácido urónico (g/100g Peso seco de MIA)*								
			Fucosa	Ramnosa	Arabinosa	Galactosa	Glucosa	Xilosa	Manosa	Ácido galacturónico	Ácido glucurónico
<i>Hylocereus</i> sp.	Callos	39,89	0,38 ± 0,00 a	1,23 ± 0,00 c	3,24 ± 0,02 e	7,87 ± 0,03 c	2,76 ± 0,05 f	1,72 ± 0,01 f	0,15 ± 0,00 c	5,96 ± 0,18 b	0,16 ± 0,00 d
<i>N. gossei</i>	Callos	45,05	tr	1,06 ± 0,01 d	3,45 ± 0,08 e	5,50 ± 0,19 e	5,36 ± 0,04 b	1,62 ± 0,05 f	0,09 ± 0,01 d	5,13 ± 0,03 c	0,17 ± 0,00 d
<i>N. debneyi</i>	Callos	35,35	tr	1,40 ± 0,03 b	6,00 ± 0,03 b	6,88 ± 0,01 d	2,30 ± 0,03 g	1,75 ± 0,01 e	0,25 ± 0,01 b	5,95 ± 0,05 b	0,25 ± 0,00 b
<i>N. sanderae</i>	Callos	48,06	tr	1,46 ± 0,01 b	4,96 ± 0,07 c	5,11 ± 0,04 e	9,33 ± 0,03 a	2,33 ± 0,04 f	0,09 ± 0,00 d	5,74 ± 0,01 b	0,17 ± 0,01 d
<i>S. sinuata</i>	Callos	37,36	tr	1,63 ± 0,02 a	4,16 ± 0,05 d	9,52 ± 0,17 a	1,87 ± 0,02 h	2,91 ± 0,09 d	0,08 ± 0,00 d	7,08 ± 0,15 a	0,22 ± 0,00 c
<i>G. angustifolia</i>	Callos	38,45	0,18 ± 0,01 b	0,34 ± 0,00 e	15,07 ± 0,21 a	8,53 ± 0,06 b	2,98 ± 0,03 e	10,66 ± 0,04 c	0,37 ± 0,01 a	0,60 ± 0,02 d	0,47 ± 0,00 a
<i>Petunia hybrida</i>	Hojas <i>in vitro</i>	50,32	tr	1,25 ± 0,03 c	1,65 ± 0,04 f	3,04 ± 0,09 f	2,81 ± 0,02 e f	1,56 ± 0,03 f	0,16 ± 0,00 c	5,97 ± 0,02 b	0,13 ± 0,00 e
<i>G. angustifolia</i>	Hojas <i>in vitro</i>	63,83	tr	0,16 ± 0,00 f	4,87 ± 0,00 c	1,87 ± 0,01 g	3,61 ± 0,02 d	14,00 ± 0,01 a	nd	0,60 ± 0,01 d	0,08 ± 0,00 f
<i>G. angustifolia</i>	Hojas invernadero	74,91	tr	0,15 ± 0,00 f	4,39 ± 0,03 d	1,69 ± 0,01 g	4,62 ± 0,01 c	11,28 ± 0,02 b	nd	0,55 ± 0,01 d	tr
Valor de p			0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

*Cada valor muestra el porcentaje promedio ± el error estándar. Los valores señalados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza. MIA: material insoluble en alcohol. Nd: no detectado. Tr: trazas azúcares neutros y ácido glucurónico < 0,07 g/100 g, ácido galacturónico < 0,47 g/100.

Cuadro 16. Composición de azúcares neutros y ácido urónico de cada fracción del material insoluble en alcohol (MIA) de la pared celular de callos y hojas de *G. angustifolia* y callos de *N. sanderae*

Fracción MIA	Especie	Material	Rendimiento (% fracción MIA)	Composición de azúcares neutros y ácido urónico (g/100g Peso seco de cada fracción de MIA)*									
				Fucosa	Ramnosa	Arabinosa	Galactosa	Glucosa	Xilosa	Manosa	Ácido galacturónico	Ácido glucurónico	
HWSP	<i>G. angustifolia</i>	Hojas invernadero	0,94	tr	0,73 ± 0,01	6,89 ± 0,19	6,52 ± 0,12	15,12 ± 0,18	1,61 ± 0,03	0,12 ± 0,00	4,00 ± 0,01	tr	
		Hojas <i>in vitro</i>	1,46	tr	0,43 ± 0,01	5,66 ± 0,17	6,03 ± 0,08	3,61 ± 0,01	1,14 ± 0,01	tr	3,04 ± 0,01	tr	
		Callos	2,57	0.25 ± 0.01	1,59 ± 0,02	9,95 ± 0,14	10,79 ± 0,01	8,09 ± 0,09	3,52 ± 0,10	0,67 ± 0,02	0,67 ± 0,02	1,08 ± 0,00	
OHP	<i>N. sanderae</i>	Callos	5,41	tr	2,42 ± 0,07	2,76 ± 0,18	21,62 ± 1,32	6,20 ± 0,02	1,33 ± 0,04	0,18 ± 0,01	3,59 ± 0,07	0,81 ± 0,03	
		<i>G. angustifolia</i>	Hojas invernadero	15,03	0.16 ± 0.00	0,17 ± 0,00	6,34 ± 0,14	3,87 ± 0,06	6,58 ± 0,10	24,69 ± 0,36	nd	tr	0,08 ± 0,00
			Hojas <i>in vitro</i>	10,38	tr	0,10 ± 0,00	6,04 ± 0,08	2,34 ± 0,02	3,28 ± 0,04	22,24 ± 0,51	nd	tr	0,09 ± 0,00
HC	<i>N. sanderae</i>	Callos	15,70	0.24 ± 0.01	0,22 ± 0,01	15,28 ± 0,11	6,00 ± 0,02	3,44 ± 0,03	12,12 ± 0,20	0,46 ± 0,02	tr	0,71 ± 0,00	
		<i>G. angustifolia</i>	Callos	6,45	tr	0,43 ± 0,00	1,64 ± 0,07	2,24 ± 0,05	32,31 ± 1,71	5,72 ± 0,30	0,31 ± 0,01	1,12 ± 0,01	0,28 ± 0,00
			Hojas invernadero	22,07	tr	0,11 ± 0,00	5,35 ± 0,12	2,24 ± 0,05	8,20 ± 0,03	19,47 ± 0,09	nd	tr	tr
C	<i>G. angustifolia</i>	Hojas <i>in vitro</i>	22,42	tr	0,12 ± 0,01	5,77 ± 0,06	1,93 ± 0,01	5,25 ± 0,04	18,31 ± 0,12	nd	tr	tr	
		Callos	17,34	0.24 ± 0.00	0,38 ± 0,00	18,81 ± 0,07	11,07 ± 0,10	8,71 ± 0,04	17,30 ± 0,11	1,02 ± 0,03	0,71 ± 0,01	0,42 ± 0,00	
		<i>N. sanderae</i>	6,17	0.14 ± 0.01	0,58 ± 0,02	7,09 ± 0,05	2,92 ± 0,02	19,21 ± 0,68	6,26 ± 0,21	0,87 ± 0,02	1,12 ± 0,01	0,20 ± 0,00	
C	<i>G. angustifolia</i>	Hojas invernadero	34,26	0.03 ± 0.00	0,14 ± 0,00	4,37 ± 0,03	1,08 ± 0,01	10,05 ± 0,00	6,58 ± 0,06	nd	0,50 ± 0,01	nd	
		Hojas <i>in vitro</i>	38,69	tr	0,18 ± 0,00	4,55 ± 0,09	1,29 ± 0,03	7,77 ± 0,27	6,37 ± 0,22	nd	0,84 ± 0,00	tr	
		Callos	32,91	0.16 ± 0.01	0,31 ± 0,01	14,78 ± 0,14	9,49 ± 0,02	6,14 ± 0,00	11,68 ± 0,05	nd	0,57 ± 0,01	0,33 ± 0,00	
	<i>N. sanderae</i>	Callos	52,71	0.13 ± 0.00	2,36 ± 0,01	6,22 ± 0,09	4,35 ± 0,08	6,90 ± 0,12	2,11 ± 0,05	nd	9,16 ± 1,35	0,14 ± 0,00	

*Cada valor muestra el porcentaje promedio ± el error estándar. MIA: material insoluble en alcohol. HWSP: pectinas solubles en agua caliente. OHP: pectinas solubles en álcali. HC: hemicelulosa. C: celulosa. Nd: no detectado. Tr: trazas azúcares neutros y ácido glucurónico < 0,07 g/100 g, ácido galacturónico < 0,47 g/100.

Al momento de digerir con ácido sulfúrico las muestras de hojas, tanto de plantas en invernadero como *in vitro* de *G. angustifolia*, se encontró un precipitado. Se observa en la figura 15 las fibras del MIA sin romper luego de la hidrólisis ácida.

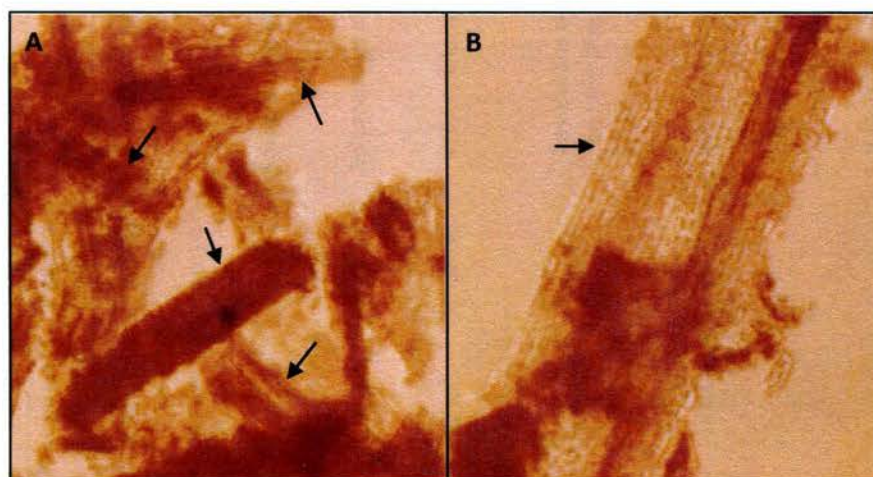


Figura 15. Fibras observadas luego de la hidrólisis ácida del material insoluble en alcohol (MIA) en las muestras de *G. angustifolia* de **A)** hojas de invernadero y **B)** hojas *in vitro*. Flechas señalan las fibras.

En el cuadro 17 se observa el rendimiento y viabilidad de los protoplastos obtenidos en distintas especies (a excepción de *Nicotiana glauca*) con las cuales se trabaja en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, en relación con el porcentaje de lignina encontrado. Se observa que los callos de *G. angustifolia* presentaron el menor porcentaje de lignina (0,5%) en contraste con los callos de las otras especies analizadas (20,6 a 4,5%). En cuanto a las hojas, los mayores porcentajes de lignina se observaron en las hojas *in vitro* (19,5%) y hojas de invernaderos (15,2%) de *G. angustifolia*, las hojas *in vitro* de *P. hybrida* presentaron un 5,1% de lignina.

Cuadro 17. Comparación de las condiciones de digestión enzimática, protoplastos por gramo y viabilidad obtenidos en distintas especies con respecto al porcentaje de lignina obtenido

Especie	Material utilizado para aislamiento de protoplastos	Digestión enzimática			Protoplastos		Referencia	Lignina del MIA (%)*
		Composición enzimática	Agitación (rpm)	Duración (horas)	Protoplastos por gramo	Viabilidad (%)		
<i>Hylocereus</i> sp.	Callos	celulasa 0,5%, macerocima 1%	50	16	$3,2 \times 10^5$	80-90	Viñas (2011)	$10,33 \pm 0,49$
<i>N. gossei</i>			No se han realizado experimentos en esta especie					$20,60 \pm 0,27$
<i>N. debneyi</i>	Callos	celulasa 0,7%, macerocima 0,3%	50	16	$4,6 \times 10^4$	84	Solórzano <i>et al.</i> (2011)	$5,57 \pm 0,25$
<i>N. sanderae</i>	Callos	celulasa 0,8%, macerocima 0,3%	50	16	$3,3 \times 10^5$	sin datos	Solórzano <i>et al.</i> (2011)	$6,77 \pm 0,00$
<i>S. sinuata</i>	Callos	celulasa 0,5%, macerocima 0,2%	50	16	4×10^6	80-90	Viñas y Mora (2008)	$4,50 \pm 0,02$
<i>G. angustifolia</i>	Callos	celulasa 4%, macerocima 2%, pectoliasa 1%, cisteína 5,3 g/l	100	2 (40 min. vacío a 60 cmHg)	$1,34 \times 10^4$	69,5	Resultados de este trabajo (figura 9)	$0,55 \pm 0,14$
<i>P. hybrida</i>	Hojas <i>in vitro</i> sin epidermis	celulasa 1%, macerocima 0,3%	50	16	1×10^7	80-90	Viñas y Mora (2008)	$5,06 \pm 0,12$
<i>G. angustifolia</i>	Hojas <i>in vitro</i>	celulasa 0,25-0,5%, macerocima 0,2-0,3%	50	16	0	0	Resultados de este trabajo	$19,53 \pm 0,65$
<i>G. angustifolia</i>	Hojas invernadero	celulasa 2-4%, macerocima 0,2-3%, hemicelulasa 0-0,5%	100	16-24	0	0	Resultados de este trabajo	$15,20 \pm 0,96$

* Cada valor muestra el porcentaje promedio \pm el error estándar.

6. Discusión

6.1. Callos y suspensiones celulares

Se obtuvo que dosis crecientes de la auxina 2,4-D indujo mayor formación de callo a partir de brotes, específicamente 6 mg/l de 2,4-D que con dosis menores. Marulanda *et al.* (2005) también obtuvieron callos de *G. angustifolia* a partir de yemas axilares en un medio suplementado con 6 mg/l de 2,4-D. Por su parte, Ramanayake y Wanniarachchi (2003) requirieron también altas concentraciones de auxinas (2,4-D a 7,5 mg/l junto con ANA a 3 mg/l) para la inducción de callo a partir de segmentos de brote en *Dendrocalamus giganteus*. Ellos postulan que la necesidad de altas concentraciones de 2,4-D se puede deber al hecho de que los explantes utilizados provenían de plantas expuestas a concentraciones muy altas de citoquinina (6 mg/l de BAP). De forma similar, en este trabajo las altas concentraciones de 2,4-D requeridas para la inducción de callo en *G. angustifolia* también pueden estar relacionadas con el hecho de que los explantes utilizados se tomaron de plantas que se encontraban en un medio suplementado con citoquinina (BAP 3 mg/l), con el consecuente posible efecto residual. En cuanto a las puntas de raíz, los mayores porcentajes de formación de callo se obtuvieron con 2,4-D a 6 y 3 mg/l. Probablemente las causas se pueden explicar por las mismas razones que para los brotes.

Las auxinas, solas o en combinación con las citoquininas, por lo general son necesarias para promover la formación de callo ya que inducen la dediferenciación de las células, su balance determina el tipo de respuesta obtenido. La auxina 2,4-D es la más utilizada para iniciar la formación de callo y para inducir la formación de embriones somáticos. Por lo general este regulador de crecimiento se requiere en altas concentraciones en monocotiledóneas, en especial Poaceas ya que es necesario una alta concentración de auxina respecto a la de citoquinina para la formación de callo (Raghavan, 2004; Machakova *et al.*, 2008; Van Staden *et al.*, 2008). A partir de brotes, el menor porcentaje de formación de callo se dio en el tratamiento compuesto por auxina y citoquinina (2,4-D+TDZ). De igual forma, este tratamiento mostró el menor porcentaje de formación de callo en comparación con 2,4-D a 6 mg/l en explantes a partir de puntas de raíz, de forma contraria a lo observado por Choun *et al.* (2004) en *Bambusa edulis*, quienes obtuvieron callos embriogénicos a partir de nudos y entrenudos con 3 mg/l de 2,4-D junto

con 0,01 mg/l de tiazurón (TDZ). Se observó que el uso de la citoquinina TDZ para la inducción de callo no fue efectivo para *G. angustifolia*. Probablemente el TDZ, al ser una fenilurea que promueve la acumulación de las citoquininas endógenas mediante la inhibición de la citoquinina oxidasa (Van Staden *et al.*, 2008), afectó el balance auxina-citoquinina requerido para la formación de callo en *G. angustifolia*.

Se observó además una tendencia a la aparición de callos friables utilizando segmentos de brote como explante y 2,4-D. Lo anterior también fue reportado por Ramanayake y Wanniarachchi (2003), quienes obtuvieron callos friables a partir de tallos utilizando este regulador. Por otra parte, los callos nodulares en *G. angustifolia* se presentaron en mayor proporción utilizando puntas de raíz como explante. Chang y Lan (1995) obtuvieron callos con apariencia lisa y globular a partir de puntas de raíz de *Bambusa beecheyana* utilizando 2,4-D y kinetina. Diferentes explantes de distintos tejidos pueden dar lugar a callos de diferente color y tipo, variando su capacidad morfogénica (Gahan y George, 2008). Así por ejemplo Muñoz *et al.* (2002) reportaron que los callos nodulares de *D. giganteus* inducidos con auxinas (2,4-D) y citoquininas (zeatina) presentaron capacidad organogénica; por otra parte, Ramanayake y Wanniarachchi (2003) obtuvieron en esta misma especie callos friables, inducidos con 2,4-D, que desarrollaron estructuras proembriogénicas. En este caso, para *G. angustifolia* los callos friables fueron seleccionados ya que para el aislamiento de protoplastos, es recomendable que las células se encuentren menos agregadas, permitiendo así un mayor contacto de las células con las enzimas que digieren la pared (Evans y Cocking, 1977).

Las citoquininas promueven el crecimiento del callo, ya que participan en la regulación del ciclo celular, promoviendo su división (Van Staden *et al.*, 2008). La disminución del 2,4-D solo o en combinación con citoquininas puede conllevar a la formación de brotes o el desarrollo de embriones somáticos (Lin *et al.*, 2012). Por ello, una vez formados, se colocaron los callos en medio de crecimiento suplementado con distintas concentraciones de 2,4-D solo o en combinación con citoquininas. La zeatina ha sido empleada con éxito por Muñoz *et al.* (2002) quienes obtuvieron callos derivados de ápices y hojas jóvenes utilizando 3 mg/l de 2,4-D solo y en conjunto con 1 mg/l de zeatina. Saxena y Dhawan (1999) también utilizaron este regulador para la multiplicación de callos embriogénicos en *Dendrocalamus strictus* y Yuan *et al.* (2013), para la formación de callo embriogénico y promoción del crecimiento en *Phyllostachys heterocycla*. En cuanto al

2ip, éste se ha empleado con éxito en otras monocotiledóneas, tal como en *Phoenix dactylifera* (Al-Khayri, 2005, 2007; Eke *et al.*, 2005). En *G. angustifolia*, tanto las citoquininas solas o en combinación con el 2,4-D ocasionaron el oscurecimiento total del callo (cuadro 11), no se observaron brotes ni embriones. Probablemente las altas concentraciones de auxina requeridas eran necesarias para mantener un balance adecuado de auxina y citoquinina que favoreció el crecimiento del callo.

Los callos friables del medio de crecimiento suplementado con 10 mg/l de 2,4-D fueron los que presentaron el menor oscurecimiento, por lo que se utilizaron para establecer las suspensiones celulares. Según Szabados *et al.* (1993), los callos friables constituyen el mejor material para el inicio de suspensiones celulares al estar las células más disgregadas. Durante las cuatro transferencias fue posible observar para *G. angustifolia* (figura 3), la disociación de los agregados celulares como lo describe Hall (1991).

Power y Chapman (1985) recomiendan utilizar las suspensiones celulares cuando las células se encuentran en su periodo de mayor crecimiento para el aislamiento de protoplastos, ya que las paredes celulares son más delgadas y se podrían requerir menores concentraciones enzimáticas y tiempos de incubación más cortos durante la digestión enzimática. En *G. angustifolia* se observó un mayor crecimiento durante los primeros 15 días de cultivo por lo que se utilizaron en esta etapa para los experimentos posteriores realizados en aislamiento de protoplastos de ésta especie. Es probable que el VCC disminuyera respecto a los primeros 15 días de cultivo por un faltante de nutrimentos en relación a la densidad de células (García-Águila *et al.*, 2012), ya que en cada transferencia se colocó la mitad de la suspensión adicionado de la mitad del volumen faltante con medio fresco.

6.2. Aislamiento de protoplastos a partir de hoja

Las hojas se utilizan comúnmente para el aislamiento de protoplastos ya que presentan altos rendimientos y menor variabilidad genética que los callos. Se prefieren las hojas *in vitro* que las de invernadero ya que con ello se evita realizar la desinfección del material y se reduce el riesgo a que éste se contamine, así como también se disminuye el efecto de las variaciones ambientales (Evans y Cocking, 1977; Davey *et al.*, 2005). Se realizó únicamente un experimento a partir de hojas *in vitro* debido a la poca disponibilidad de material, ya que se requería de una cantidad muy grande de hojas para pesar los 0,2 g necesarios.

En los experimentos posteriores se utilizaron hojas de invernadero. Primeramente se intentó aislar protoplastos utilizando la enzima reportada por Power y Chapman (1985) para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de cereales. Se intentaron dos tipos de corte y raspado de las hojas para intentar eliminar la epidermis y así exponer las células del mesófilo a la enzima (Evans y Cocking, 1977). Posteriormente se intentó obtener protoplastos a partir de hojas basándose en el protocolo de Hisamoto y Kobayashi (2010), quienes lograron obtener alrededor de $2,0 \times 10^6$ protoplastos por 0,3 g de tejido de cuatro especies de bambú: *Lithachne pauciflora*, *Phyllostachys meyeri*, *Sasa jotanii* y *Bambusa vulgaris*, utilizando una solución enzimática compuesta por celulasa 4% y macerocima 3%.

No se lograron aislar protoplastos de *G. angustifolia* utilizando hojas en ninguno de los casos. Aun cuando se utilizaron agitaciones altas por tiempos prolongados (Huang *et al.*, 1989a), no fue posible observar una adecuada digestión del tejido, ya que casi no se observaron restos celulares en las observaciones realizadas con el microscopio invertido. Probablemente la enzima no logró penetrar el tejido para lograr la separación de las células y posteriormente digerir la pared (Evans y Cocking, 1977), o bien, al cortar o raspar las hojas se pudieron haber liberado compuestos inhibitorios que afectaron la actividad enzimática, como fue observado por Butt (1985) en diversas especies leñosas.

6.3. Aislamiento de protoplastos a partir de callo

Durante el proceso de aislamiento de protoplastos se recomienda contraer la pared celular, plasmolizando las células con soluciones de sales con azúcares o alcoholes azucarados, como el manitol (Gutiérrez *et al.*, 2003). Diversos autores que han obtenido protoplastos a partir de callo en monocotiledóneas, tales como arroz (Mori *et al.*, 1991) y maíz (Imbrie-Milligan y Hodges, 1986), no incluyen la preplasmólisis como un paso previo al aislamiento de protoplastos. Aun así, la etapa de preplasmólisis puede ser importante ya le confiere protección al protoplasto al favorecer su separación previa al rompimiento de la pared celular, además que le proporciona resistencia a la célula ante los efectos tóxicos de la enzima utilizada en su digestión (Ochatt *et al.*, 1992). Por tanto, se decidió realizar esta etapa para el aislamiento de protoplastos de *G. angustifolia*. Se determinó que el medio CPW con 13% manitol logró plasmolizar un 48,52% de las células en media hora. Según Gutiérrez *et al.* (2003), la concentración osmótica de la solución y el tiempo debe ser suficiente para causar el desprendimiento de la pared celular sin ocasionarle daño a la célula. En vista de que no hubo diferencias entre 0,5, 1 y 1,5 horas y para facilitar el tiempo de extracción, se decidió seleccionar media hora (a partir de que se empezaron a ver protoplastos, experimento 11).

Durante los primeros experimentos realizados para el aislamiento de protoplastos (1-10, cuadro 4) a partir de callo y suspensiones celulares, no fue posible obtener protoplastos. Se observaron muchos agregados celulares, lo que sugiere que no hubo una adecuada separación de las células, y en consecuencia las enzimas no pudieron digerir la pared celular (Rao y Prakash, 1995). Además, se observó un oscurecimiento de la solución enzimática y del tejido posterior al proceso de digestión enzimática, lo cual también se podría relacionar con la oxidación de fenoles que se liberan luego de la ruptura de algunas células (Huang *et al.*, 2002). La reacción de oxidación produce radicales y quinonas que podrían interferir negativamente con la actividad de las enzimas (Mehrotra y Aggarwal, 2006; Hagerman, 2012).

En vista del evidente oscurecimiento de la solución enzimática durante la digestión, se adicionó cisteína como tratamiento previo durante la preplasmólisis y a la solución enzimática. Faye y David (1983) lograron triplicar el número de protoplastos obtenidos a partir de raíces de *Pinus pinaster* al adicionar cisteína (5,3 g/l) durante la preplasmólisis. Sin

embargo, los resultados de este trabajo sugieren que la cisteína es efectiva solo si se le agrega a la solución enzimática, tal como lo realizó Ishii (1984) en avena. La liberación de compuestos fenólicos ocurre durante la digestión enzimática, probablemente el rompimiento de algunas células ocasiona que se liberen fenoles (ácidos ferúlico, p-coumárico y dehidrodiferúlico) que se encuentran enlazados a los glucuronoarabinosilanos mediante enlaces ésteres, propios de las monocotiledóneas commelinoides como el bambú (Ishii y Hiroi, 1990; Harris y Smith, 2006; Vogel, 2008). Además, se podrían producir o liberar rápidamente ácidos hidroxicinámicos a partir de los ácidos ferúlico y p-coumárico, como se ha visto como resultado del ataque de microorganismos (en este caso podría ser producido por la acción de las enzimas) o daño mecánico. Esto contribuye al endurecimiento de la pared como defensa, reduciendo su digestibilidad, tal como fue observado por Jones *et al.* (2012) durante el aislamiento de protoplastos en hojas y callos de *Ulmus americana*, Prakash *et al.* (1997) en *Capsicum annum* y Wende y Fry (1997) en la poaceae *Festuca arundinaceae* durante la digestión enzimática de suspensiones celulares. El grupo tiol (SH) de la cisteína actúa como agente reductor evitando la oxidación de los fenoles que interfieren inhibiendo acción enzimática (Faye y David, 1983; Richard *et al.*, 1991).

Además de la cisteína, se agregaron otros compuestos a la solución enzimática para evitar su oscurecimiento, tales como el BSA, que ha sido utilizado con éxito para el aislamiento de protoplastos de células corticales de maíz (Gronwald y Leonard, 1982) y *B. multilplex* y *B. oldhamii* (Huang *et al.*, 1989a). Amberlite XAD-7 se ha utilizado durante el aislamiento de protoplastos de cítricos (Grosser, s.f.) y *Catharanthus roseus*, ya que es una resina que adsorbe los compuestos fenólicos y alcaloides (McCaskill y Scott, 1992). El ácido ascórbico se ha empleado con éxito como agente reductor durante el aislamiento de protoplastos de *Capsicum annum* (Prakash *et al.*, 1997). Huang *et al.* (1989a) han observado un incremento en el rendimiento en la obtención de protoplastos de *B. multilplex* y *B. oldhamii* utilizando ácido ascórbico; sin embargo, su uso también aceleró su oscurecimiento. El carbón activado adsorbe todos los compuestos, incluso fenoles que se liberan al medio, y se ha empleado con éxito al adicionarlo al medio durante el cultivo de protoplastos de *Vitis* sp. (Reustle y Natter, 1994) y como pretratamiento enzimático en camote (Perera y Ozias-Akins, 1991). Por último, se ha visto que el PVP puede reactivar enzimas que han sido inactivadas por compuestos fenólicos, ya que posee un grupo amida que se une con los inhibidores en competencia con las proteínas (Schneider y

Hallier, 1970). Este compuesto se ha utilizado durante el aislamiento de protoplastos de *Capsicum annuum* para evitar el excesivo oscurecimiento durante la digestión (Prakash *et al.*, 1997). A pesar de lo observado por otros autores, en este trabajo la cisteína a una concentración de 5,3 g/l fue la única que evitó la oxidación, favoreciendo la digestión enzimática y la obtención de algunos protoplastos.

La cisteína logró resolver el problema de oxidación encontrado; sin embargo, a pesar de ello se lograron observar muy pocos protoplastos. Para que exista una adecuada digestión enzimática, las enzimas deben entrar en contacto con el mayor número de células posible para digerir la pared y liberar el protoplasto. En este caso, utilizando callo como material inicial, debe separar los conglomerados celulares mediante la digestión de la lámina media (compuesta de pectinas) para así favorecer a que mayor número de células estén expuestas a las enzimas que degradan la pared. Para ello se utilizan dos estrategias, la agitación constante para favorecer la exposición uniforme de las células a las enzimas, y el uso de bomba de vacío para favorecer la infiltración de la enzima en el tejido (Rao y Prakash, 1995). La bomba de vacío se ha utilizado con éxito para favorecer la digestión enzimática en muchas especies, tales como maíz (Kanai y Eduards, 1973a; Gronwald y Leonard, 1982), sorgo, *Triticale*, maíz, cebada y trigo (Chin y Scott, 1979), cítricos (Grosser *et al.*, 2007), *Panicum* sp., sorgo, caña de azúcar y maíz, entre otras (Kanai y Eduards, 1973b).

De igual forma, un tratamiento de vacío al inicio de la digestión enzimática mostró ser efectivo durante el aislamiento de protoplastos en *G. angustifolia* en este trabajo, lo cual logró también acortar el tiempo de digestión enzimática a 2-5 horas (figura 8). Una mayor exposición al tratamiento de vacío (40 minutos, figura 9) logró aumentar significativamente el rendimiento de protoplastos obtenidos, probablemente debido a una mayor penetración de la enzima entre los espacios que puedan quedar en el conglomerado celular. Asimismo, en el trabajo realizado por Pai *et al.* (2011) sobre el estudio de la hemicelulosa en *Phyllostachys bambusoides*, se menciona también la dificultad de digerirla con la enzima endoxilanasas. La asociación intermolecular de los arabinoxilanos menos sustituidos, también observados por Sun *et al.* (2012) en el bambú *Neosinocalamus affinis*, con otros arabinoxilanos o β -glucanos, reducen la accesibilidad de la enzima protegiendo a los polímeros de la digestión enzimática. Por tanto, la bomba

de vacío también pudo haber ayudado a que la enzima se infiltre más aumentando el contacto con estos arabinosilanos favoreciendo su digestión.

Los mayores rendimientos obtenidos para *G. angustifolia* fueron $1,34 \times 10^4$ protoplastos por gramo (aproximadamente 7×10^4 protoplastos por mililitro), lo cual es un rendimiento muy bajo comparado a lo obtenido en otras especies de bambú. Así, por ejemplo, Huang *et al.* (1989a) obtuvieron $1-2 \times 10^6$ protoplastos por gramo en *B. multiplex* y *B. oldhamii*. Los bajos rendimientos podrían dificultar el cultivo de los protoplastos, ya que usualmente se requiere de una densidad inicial aproximada de 1×10^5 protoplastos por mililitro (Frearson *et al.*, 1973; Ochatt *et al.*, 1992), para que las células promuevan la división mitótica de células adyacentes al liberar hormonas de crecimiento y otros factores de crecimiento, tal como el oligosacárido encontrado por Schröder y Knoop (1995) en suspensiones celulares de tabaco.

El tratamiento de vacío no afectó la viabilidad de los protoplastos obtenidos. El azul de Evans permite evaluar la viabilidad de los protoplastos, ya que los protoplastos no viables permiten la entrada del tinte, tornándose azules (Gaff y Okong`o-Ogola, 1971). Los valores de viabilidad observados en *G. angustifolia* fueron de entre 65 y 82,7%, los cuales son similares a los obtenidos por Hisamoto y Kobayashi (2010) en diversas especies de bambú. Un porcentaje de viabilidad alto es importante ya que significa mayor cantidad de protoplastos capaces de regenerar la pared celular y dividirse al momento de ser cultivados (Yasugi, 1989).

En cuanto a las enzimas utilizadas, en general, en monocotiledóneas se ha reportado el uso de altas concentraciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos. Por ejemplo Mori *et al.* (1991) utilizaron una enzima compuesta por celulasa RS 2%, celulasa R10 2%, macerocima R10 2%, hemicelulasa 1% y driselasa 1% en arroz. En vetiver, Prasertsongsun (2004) aisló protoplastos utilizando celulasa R10 2%, macerocima R10 2% y pectinasa 0,5%. En *Phoenix dactylifera* Rizcalla *et al.* (2007) reportan el uso de una solución enzimática compuesta por celulasa 4%, hemicelulasa 1% y pectinasa 2%. Por su parte, en bambú, Tseng *et al.* (1975) utilizaron celulasa R10 4% y macerocima R10 2% durante el aislamiento de protoplastos de *Bambusa* sp. Huang *et al.* (1989a) utilizaron celulasa 2%, driselasa 2% y pectoliasa Y23 1% durante el aislamiento de protoplastos en *B. multiplex*. Hisamoto y Kobayashi (2010), en *B. vulgaris*, utilizaron una solución enzimática

compuesta por celulasa 2%, meicelasa 2,5% y macerocima 3%. En relación con lo anterior, en *G. angustifolia* la solución enzimática estuvo compuesta por celulasa RS 4%, macerocima R10 2% y pectoliasa 1%, adicionada de cisteína (5,3 g/l), con lo que se logró aislar protoplastos, aunque no en una cantidad elevada.

La composición de la pared celular en plantas monocotiledóneas, en especial Poaceas, es diferente a la de las dicotiledóneas. Las Poaceas contienen una matriz de arabinoxilanos, por lo que las enzimas con actividad endo-1,4- β -xilanasas son un componente importante durante la digestión enzimática. La driselasa se ha empleado con éxito para el aislamiento de protoplastos de arroz (Mori *et al.*, 1991), *B. odhamii* y *B. multiplex* (Huang *et al.*, 1989a). Esta enzima, a pesar de tener actividad celulasa, también presenta actividad xilanasas (Kanda *et al.*, 1985). En la figura 10 se observa que al utilizar la enzima driselasa no se obtuvo, de forma significativa, mayor cantidad de protoplastos en *G. angustifolia*. Probablemente no se observó una diferencia al emplear esta enzima ya que la celulasa utilizada (celulasa RS) también presenta una alta actividad xilanasas, según lo indica el fabricante, o bien puede ser necesario utilizar una concentración aún mayor para determinar si hay un efecto positivo al adicionar esta enzima.

Además, las dicotiledóneas contienen una gran cantidad de polisacáridos pécticos (~35%) por lo que las enzimas pectinasas junto con las celulasas son esenciales para el aislamiento de protoplastos. Por su parte, los polisacáridos pécticos son un componente minoritario en las poaceas (5%). Por ejemplo, Jarvis *et al.* (1988) encontraron bajos contenidos de pectinas en la pared celular de *Dendrocalamus giganteus*. Sin embargo, se ha observado que las pectinasas en pequeñas cantidades aumentan el rendimiento en obtención de protoplastos de arroz y avena (Nagata e Ishii, 1979; Ishii, 1989), probablemente debido a que existe una adecuada separación de las células por la degradación de la lámina media que se compone principalmente de pectinas (Carpita y McCann, 2000), lo que permite un mayor acceso de las enzimas (celulasas y hemicelulasas) a la pared celular. En especial se destaca la pectoliasa Y23, cuyo uso se ha reportado con éxito en especies monocotiledóneas no commelinoides, tales como arroz (Wang *et al.*, 1989), caña de azúcar (Falco *et al.*, 1996), *B. oldhamii* y *B. multiplex* (Huang *et al.*, 1989a). De igual forma se observó un efecto positivo al utilizar esta enzima durante el aislamiento de protoplastos de *G. angustifolia* (figura 10).

Las pectinas individuales presentes en las poaceas son similares a las de las dicotiledóneas, siendo los homogalacturonanos los más comunes. Estos están compuestos por unidades de ácido D-galacturónico que se encuentran entre 60 y 90% esterificados con metanol (Gummadi y Panda, 2002; Wolf *et al.*, 2009). El efecto positivo observado con la pectoliasa Y23 se asocia con sus componentes, ya que está constituida por una mezcla de endo poligalacturonasa, pectin liasa y un factor de maceración. La endo poligalacturonasa y la pectin liasa son responsables de la maceración de los tejidos, ya que rompen los enlaces α -1,4-glicosídicos en las unidades de ácido D-galacturónico para separar las células. Sin embargo, la pectin liasa tiene un efecto mayor al ser específica para galacturónidos esterificados (Ishii, 1984; Prade *et al.*, 1999.; Gummadi y Panda, 2002; Jayani *et al.*, 2005). Más aún, el factor de maceración favorece la separación de las pectinas de los otros componentes de la pared celular, promoviendo la digestión posterior de las enzimas pectinasas (Ishii, 1977; Nagata y Ishii, 1979).

Además de la composición enzimática, otro factor importante a considerar durante el aislamiento de protoplastos es el potencial osmótico de la solución enzimática. No se observaron diferencias significativas en cuanto al rendimiento de protoplastos obtenido al disminuir el potencial osmótico en *G. angustifolia* (figura 11). El potencial osmótico adecuado depende mucho de la especie, el tejido utilizado para el aislamiento y las condiciones de cultivo en las que se encuentra el material (Evans y Cocking, 1977). Zhang *et al.* (2011) observaron diferencias en cuanto a viabilidad y rendimiento en la obtención de protoplastos de *Carica papaya* L. al modificar el potencial osmótico.

A diferencia del potencial osmótico, se observó en esta misma figura que la adición de cisteína, aún empleándose bomba de vacío, sí tiene un efecto positivo en cuanto al rendimiento de protoplastos obtenido. La liberación de fenoles durante la digestión enzimática de callos fue evidente mediante el análisis con HPLC-MS, en el que se observan dos compuestos fenólicos que no son liberados en las suspensiones celulares o sin la presencia de las enzimas. Estos compuestos observados podrían interferir negativamente con la acción enzimática, como observaron Jones *et al.* (2012) y, por ende, afectar el aislamiento de protoplastos, como se observó en *G. angustifolia*. También se realizó un SDS-PAGE con el objetivo de determinar un posible efecto de la cisteína sobre las enzimas (Marino y Gladyshev, 2010). Se observó que al adicionar cisteína, no parece afectarse el patrón de bandas de las enzimas, por lo que es probable

que no interfieran en su actividad, como sí lo podrían estar haciendo los fenoles que se liberan durante la digestión enzimática (Rohn *et al.*, 2002).

6.4. Composición de la pared celular

En los resultados del fraccionamiento del MIA se puede apreciar un alto rendimiento de la fracción de pectinas solubles en agua (HWSP) en los callos de *N. sanderae* (5,41%) con respecto a las muestras de bambú (0,94-2,57%). Esto indica mayor contenido de polisacáridos pécticos en la pared celular. Las pectinas son polisacáridos ricos en ácido galacturónico (Caffan y Mohnen, 2009); el cual se observó en mayores cantidades en las fracciones de pectinas solubles en álcali (OHP), hemicelulosa y celulosa en los callos de *N. sanderae* con respecto a las muestras de bambú. Los altos contenidos de ácidos galacturónico observados en callos de *N. sanderae* en la fracción de celulosa (9,16 g/100g MIA) pueden estar relacionados con polisacáridos pécticos fuertemente adheridos mediante puentes de hidrógeno a las microfibras de la celulosa en esta especie (Brummell, 2006), no siendo el caso para las muestras de bambú.

Se ha sugerido que las dicotiledóneas contienen mayores cantidades de polisacáridos pécticos (~ 35%) que las monocotiledóneas, especialmente en las Poaceas (~ 5%) (Darvill *et al.*, 1980; Ishii, 1989). Por ejemplo, en el bambú *Dendrocalamus giganteus*, Jarvis *et al.* (1988) encontraron bajo contenido de pectina en la pared celular. Estos resultados concuerdan con lo observado en este trabajo, el bajo contenido de ácido galacturónico en las muestras de *G. angustifolia* y el bajo rendimiento de la fracción de pectinas solubles en agua, tanto en callos como en hojas, refleja el bajo contenido de pectina en la pared celular de este bambú.

Hay dos tipos de pared celular: tipo I y tipo II. La pared tipo I se encuentra en las dicotiledóneas, gimnospermas y monocotiledóneas no commelinoides y consiste de una red de celulosa embebida en una matriz de polisacáridos, donde los más comunes son los xiloglucanos (XyGs) y los polisacáridos pécticos. Las tipo II corresponden a la pared celular de las Poaceas y monocotiledóneas comelinoides como el bambú. Estas están organizadas de la misma forma a excepción de que los glucuronoarabinoxilanos (GAXs) y los (1,3;1,4)- β -D-glucanos (en cereales) predominan en la matriz (Burke *et al.*, 1975;

Carpita y Gibeaut, 1993; Harris y Smith, 2006; Doblin *et al.*, 2010). La composición tipo II fue claramente observada en este trabajo.

La fracción de hemicelulosa presentó altos contenidos de glucosa y xilosa en *N. sanderae*, (encontrándose el primero en mayor cantidad que el segundo); posiblemente son xiloglucanos, los cuales son polímeros de glucosa unidos mediante enlaces β -1,4-glucosídicos con ramificaciones laterales de xilosa, que además pueden presentar uniones con arabinosa, fucosa y galactosa (Pauly *et al.*, 1999). Por ejemplo, en Solanaceae se han reportado los arabinoxiloglucanos (Harris, 2009). Por su parte, las muestras de bambú presentaron altos contenidos de xilosa y en especial, los callos de bambú un alto contenido de arabinosa, galactosa y, en menor cantidad, ácido galacturónico. En la fracción de celulosa, en todas las muestras, el principal azúcar fue la glucosa, a excepción de los callos de bambú en donde se destaca los altos contenidos de arabinosa y xilosa. En bambú, estos azúcares (tanto en la fracción de hemicelulosa como de celulosa), pueden sugerir la presencia de arabinoxilanos (en hojas) o glucuronoarabinoxilanos (en callos) que en la fracción de celulosa, podrían estar en parte unidos mediante puentes de hidrógeno a la celulosa (Sun *et al.*, 2012; Endress *et al.*, 2009).

Meakawa (1976) encontró que la hemicelulosa del bambú *Phyllostachys reticulata* está compuesta principalmente por 4-*O*-metil-D-ácido glucurónico, L-arabinosa y D-xilosa en una razón molar de 1,0:1,3:25. De forma similar se ha encontrado esta composición en culmos de *Phyllostachys makinoi* con una relación arabinosa:xilosa de 1:17 (Fengel y Shao, 1984). Los principales azúcares encontrados en la fracción de hemicelulosa por Pai *et al.* (2011) en culmos de *Phyllostachys bambusoides* fueron, en orden de abundancia, xilosa, glucosa, arabinosa y ácido glucurónico, dicha composición sugiere que los principales componentes son glucuronoarabinoxilanos. Este polisacárido también fue encontrado por Zheng-Jun *et al.* (2011) en culmos de *Dendrocalamus brandisii*, por Yoshida *et al.* (1998) en culmos de *Sasa senanensis* y por Jia-Long *et al.* (2011) en culmos de *Bambusa rigida*. Estos han sido descritos por Pai *et al.* (2011) y Zheng-Jun *et al.* (2011) como una cadena lineal de (1 \rightarrow 4)- β -xilopiranosil con unidades laterales de α -L-arabinofuranosa y/o cadenas cortas de 4-*O*-metil-ácido glucurónico.

En vista que la celulosa es el polisacárido más abundante de la pared celular (Lerouxel *et al.*, 2006), se esperaba un mayor contenido de glucosa en la fracción de celulosa de las muestras. La celulosa se compone de cadenas de 1,4- β -D-glucanos unidas por puentes de hidrógeno, lo cual le confiere cierto grado de cristalinidad que varía según la especie y el tejido (Lodish *et al.*, 2000; Brummell, 2006). Lo anterior, sumado a los enlaces estables que puede formar con la pectina y la hemicelulosa, pueden dificultar su hidrólisis. En la figura 15 se observan las fibras sin digerir luego de la hidrólisis ácida de MIA en hojas de bambú de invernadero e *in vitro* lo cual se relaciona con el bajo contenido de glucosa obtenido. Este grado de cristalinidad posiblemente asociado con la dificultad encontrada para hidrolizar la celulosa, podría explicar también el bajo rendimiento de protoplastos obtenido en *G. angustifolia*.

Durante el crecimiento secundario se observa la deposición de lignina y la deshidratación de la pared, tornándose altamente hidrofóbica. Ambos factores contribuyen a la "recalcitrancia" a la digestión enzimática de las paredes lignificadas. Esta "recalcitrancia" no está influenciada solamente por la composición química de la pared, sino que también por su estructura anatómica. Generalmente las paredes no lignificadas son fácilmente degradadas mientras que las lignificadas son más difícilmente degradadas. Otras estructuras químicas tales como la presencia de ceras y grosor de la cutícula, contribuyen a una menor degradabilidad (Doblin *et al.*, 2010). Esto explica la dificultad de aislar protoplastos a partir de hojas tanto *in vitro* como de invernadero, en las cuales se observaron los mayores porcentajes de lignina (cuadro 17). Por su parte, se han obtenido protoplastos de forma exitosa de tejidos con menores cantidades de lignina como lo son los callos de *Hylocereus* sp. (Viñas, 2011), *N. sanderae* (Solórzano *et al.*, 2011) y *S. sinuata*, y de hojas *in vitro* de *P. hybrida* (Viñas y Mora, 2008).

7. Literatura citada

- AL-KHAYRI, J. M. 2005. Date palm *Phoenix dactylifera* L. **In:** Jain, S. M.; Gupta, P.K. (eds.). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Springer, The Netherlands. pp. 309-319.
- AL-KHAYRI, J. M. 2007. Date palm *Phoenix dactylifera* L. micropropagation. **In:** Jain, S. M.; Häggman, H. (eds.). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, The Netherlands. pp. 509-526.
- AOYAGI, H. 2011. Application of plant protoplasts for the production of useful metabolites. *Biochemical Engineering Journal* 56: 1-8.
- AZPÍROZ, S. 1994. La biotecnia y el sector agropecuario. *Agronomía Mesoamericana* 5:140-158.
- BOYES, C.; SINK, K. 1989. Regeneration of plants from protoplasts of *Salpiglossis*. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 8: Plant Protoplast and Genetic Engineering I. Springer-Verlag, Alemania. pp. 254-261.
- BRINKMANN, K.; BLASCHKE, L.; POLLE, A. 2002. Comparison of different methods for lignin determinations as a basis for calibration of near-infrared reflectance spectroscopy and implications of lignoproteins. *Journal of Chemical Ecology* 28: 2483-2501.
- BRUMMELL, D. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33: 103-119.
- BURKE, D.; KAUFMAN, P.; MCNEIL, M.; ALBERSHEIM, P. 1975. The structure of plant cell walls VI. A survey of the walls of suspension-cultured monocots. *Plant Physiology* 54: 109-115.
- BUTT, A.D. 1985. A general method for the high-yielding isolation of mesophyll protoplasts from deciduous tree species. *Plant Science* 42: 55-59.
- CAFFAN, K.H.; MOHNEN, D. 2009. The structure, function and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344: 1897-1900.
- CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1-30.
- CARPITA, N.C.; MCCANN, M. 2000. Chapter 2: The cell wall. **In:** Buchanan, B.; Grissem, W.; Jones, R. (eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. pp. 52-108.
- CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA (CATIE). 2004. Guadua-Bamboo. Resultados del proyecto de investigación para el manejo y el mercadeo sostenible del Bamboo en Costa Rica y Colombia. Turrialba, Costa Rica.

- CHANG, W.C.; LAN, T.H. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from roots of bamboo (*Bambusa beecheyana* Munro var. *Beecheyana*). *Plant Physiology* 145:535-538.
- CHEN, L.Z.; ADACHI, T. 1998. Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*-complex: somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology. *Plant Cell Reports* 17: 508-514.
- CHEN, S.; TAO, L.; ZENG, L.; VEGA-SÁNCHEZ, M.; UMEMURA, K.; WANG, G.L. 2006. A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice. *Molecular Plant Pathology* 7: 417-427.
- CHIN, J.C.; SCOTT, K.J. 1979. A large-scale isolation procedure for cereal mesophyll protoplasts. *Annals of Botany* 43: 23-32.
- CHOUN, S.L.; CHUNG, C.L.; WEI, C.C. 2004. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 75-82.
- DARVILL, J. E.; MCNEIL, M.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. 1980. Structure of plant cell walls: glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology* 66: 1135-1139.
- DAVEY, M.R.; ANTHONY, P.; POWER, B.; LOWE, K.C. 2004. Thinking outside the cell: plant protoplast technology, status and applications. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41:202-212.
- DAVEY, M.R.; ANTHONY, P.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 23: 131-171.
- DIVAKARAN, M.; PILLAI, G.S.; BABU, K.N.; PETER, K.V. 2008. Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species. *Current Science* 94:115-120.
- DOBLIN, M.S.; PETTOLINO, F.; BACIC, A. 2010. Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Functional Plant Biology* 37: 357-381.
- EKE, C.R.; AKOMEAH, P.; ASEMOTA, O. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'Zebia' and 'Loko' landraces. *African Journal of Biotechnology* 4: 244-246.
- ENDRESS, V.; BARRIUSO, J.; RUPEREZ, P.; MARTIN, J.P.; BLAZQUEZ, A.; VILLALOBOS, N.; GUERRA, H.; MARTIN, L. 2009. Differences in cell wall polysaccharide composition between embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 323-329.
- EVANS, P.K.; COCKING, E.C. 1977. Isolated plant protoplasts. In: Street, H.E.S. (ed.). *Plant tissue and cell culture*. Second edition. Alden Press. Oxford, Inglaterra. pp. 103-135.
- FALCO, M.C.; TULMANN, A.; JANUZZI, B.M.; ZAPATA, F.J. 1996. Isolation and cultivation of sugarcane protoplasts. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8:175-179.

- FAYE, M.; DAVID, A. 1983. Isolation and culture of gymnosperm root protoplasts (*Pinus pinaster*). *Physiologia Plantarum* 59:359-362.
- FENGEL, D., SHAO, X.A. 1984. A chemical and ultrastructural study of the bamboo species *Phyllostachys makinoi* Hay. *Wood Science and Technology* 18: 103-112.
- FREARSON, E.M.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Developmental Biology* 33: 130-137.
- GAFF, D.F.; OKONG`O-OGOLA, O. 1971. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *Journal of Experimental Botany* 22: 756-758.
- GAHAN, P.B.; GEORGE, E.F. 2008. Adventitious regeneration. **In:** George, E.F; Hall, M.A; de Klerk, G.J. (eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. 3 ed. Dordrecht, The Netherlands, Springer. pp. 355-401.
- GALUN, E. 1981. Plant protoplasts as physiological tools. *Annual Review of Plant Physiology* 32:237-266.
- GARCÍA-ÁGUILA, L.; ALVARADO, Y.; KOSKY, R.G.; SARRÍA, Z.; CHONG-PÉREZ, B.; REYES, M.; PÉREZ, B.; CONCEPCIÓN, A.; MOLLINEDA, A. 2012. Análisis del contenido de nutrientes minerales durante la formación y maduración de embriones somáticos de FHIA-21 (*Musa AAAB*). *Biotecnología Vegetal* 12: 33-39.
- GIELIS, J.; OPRINS, J. 2002. Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos – from biotechnological dream to commercial reality. **In:** *Bamboo for Sustainable Development*. Proceedings of Vth Intenational Bamboo Congress. San José, Costa Rica. pp. 333-344.
- GÓMEZ, G.D.; AGUDELO, C.A. 2004. Fenología de *Guadua angustifolia* Kunth. **In:** Simposio Internacional *Guadua*. Pereira, Colombia.
- GREILHUBER, J.; TEMSCH, E.M.; LOUREIRO, J.C.M. 2007. Nuclear DNA content measurements **In:** Dolezel, J.; Greilhuber, J.; Suda, J. (eds.). *Flow cytometry with plant cells, analysis of genes, chromosomes and genomes*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. Weinheim, Alemania. pp. 89-90.
- GRONWALD, J.W.; LEONARD, R.T. 1982. Isolation and transport properties of protoplasts from cortical cells of corn roots. *Plant Physiology* 70: 1391-1395.
- GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.R.; DUNCAN, L.W. 2007. Production of mandarin + pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Horticulturae* 113: 33-36.
- GROSSER, J.W. s.f. Protocolos de aislamiento, fusión y regeneración de protoplastos en cítricos. Citrus Research and Education Center. University of Florida, IFAS, Florida.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Review* 8: 339-374.

- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104: 343-357.
- GUMMADI, S.N.; PANDA, T. 2002. Purification and biochemical properties of microbial pectinases a review. *Process Biochemistry* 38: 987-996.
- GUTIÉRREZ, J.A. 2000. Structural adequacy of traditional bamboo housing in Latin America. Technical report no. 19. International Network for Bamboo and Rattan (INBAR). 112 p.
- GUTIÉRREZ, A.; SANTACRUZ, F.; CABRERA, J.L.; RODRÍGUEZ, B. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. E-Gnosis (en línea) 1:1-19. Consultado el 1 de julio del 2010. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/730/73000104.pdf>
- HAGERMAN, A.E. 2012. Chapter 3: Fifty years of polyphenol-protein complexes. **In:** Cheynier, V.; Sarni-Manchado, P.; Quideau, S. (eds.). *Recent advances in polyphenol research*. Vol. 3. John Wiley and Sons Ltd., U.K. pp. 71-93.
- HALL, R.D. 1991. The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures. **In:** *Plant Tissue Culture Manual*. Lindsey, K. (ed.). Dordrecht, Holanda, Kluwer. A3:1-21.
- HARRIS, P.J. 2009. Cell-wall Polysaccharides of Potatoes. *Advances in Potato Chemistry and Technology* Academic Press. New Zealand. pp. 63-81.
- HARRIS, P.J.; SMITH, B.G. 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology* 41: 129-143.
- HASEZAWA, S.; BABA, A.; SYONO, K. 1989. Protoplast culture and transformation studies on rice. pp. 107-119. **In:** Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 9. *Plant protoplast and genetic Engineering II*. Springer-Verlag. Berlin.
- HE, D.G.; MOURADOV, A.; YANG, Y.M.; MOURADOVA, E.; SCOTT, K.J. 1994. Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) through electroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports* 14: 192-196.
- HELD, C.; MANZANO, I.D. 2003. El sector productivo y el mercado regional de la Guadua en el Eje Cafetero Colombiano. Informe del proyecto Guadua-bambú de la Unión Europea no: ICA4-CT-2001-10091. INBAR. Color Max Publishers. 61 p.
- HISAMOTO, Y.; KOBAYASHI, M. 2010. Protoplast isolation from bamboo leaves. *Plant Biotechnology* 27:353-358.
- HUANG, L.C.; MURASHIGE, T. 1983. Tissue culture investigations of bamboo I. Callus cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa*. *Botanical Bulletin, Academia Sinica* 24:31-52.
- HUANG, L.C.; CHEN, W.L.; HUANG, B.L. 1989a. Tissue culture investigations of bamboo III. A method for viable protoplast isolation from *Bambusa* cells of liquid suspension culture. *Botanical Bulletin, Academia Sinica* 30:49-57.

- HUANG, L.C.; HUANG, B.L.; CHENG, W.L. 1989b. Tissue culture investigations of bamboo IV. Organogenesis leading to adventitious shoots and plants in excised shoot apices. *Environmental and Experimental Botany* 29:307-315.
- HUANG, Y.W.; DENNIS, E.S. 1989. Factors influencing stable transformation of maize protoplasts by electroporation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18: 281-296.
- HUANG, L.C.; LEE, Y.L.; HUANG, B.L.; KUO, C.I.; SHAW, J.F. 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38: 358-365.
- IMBRIE-MILLIGAN, C.W.; HODGES, T.K. 1986. Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta* 168: 395-401.
- ISHII, S. 1977. Purification and characterization of a factor that stimulates tissue maceration by pectolytic enzymes. *Phytopathology* 67: 994-1000.
- ISHII, S. 1984. Cell wall cementing materials of grass leaves. *Plant Physiology* 76: 959-961.
- ISHII, S. 1989. Enzymes for the isolation of protoplasts. pp. 23-33. **In:** Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 8. Plant protoplast and genetic Engineering I. Springer-Verlag. Berlin. pp. 23-33.
- ISHII, T.; HIROI, T. 1990. Linkage of phenolic acids to cell-wall polysaccharides of bamboo shoot. *Carbohydrate Research* 206: 297-310.
- JARVIS, M.C.; FORSYTH, W.; DUNCAN, H. 1988. A survey of the pectic content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiology* 88: 309-314.
- JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40: 2931-2944.
- JIA-LONG, W.; LING-PING, X.; YONG-CHANG, S.; SHAO-NI, S.; FU, X.; RUN-CAN, S.; XUNG-LI, Z. 2011. Comparative study of alkali-soluble hemicelluloses isolated from bamboo (*Bambusa rigida*). *Carbohydrate Research* 346: 111-120.
- JIMÉNEZ, V.M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. 2006. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 389-395.
- JONES, A.M.P.; CHATTOPADHYAY, A.; SHUKLA, M.; ZOÑ, J.; SAXENA, P.K. 2012. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis increases cell wall digestibility, protoplast isolation, and facilitates sustained cell division in American elm (*Ulmus americana*). *BMC Plant Biology* 12: 75.
- JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; STERN, M.J. 1999. *American Bamboos*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. Washington, Estados Unidos. 392 p.

- KAMMERER, D.R.; CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4360-4367.
- KANAI, R., EDUARDES, G.E. 1973a. Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. *Plant Physiology* 51: 1133-1137.
- KANAI, R.; EDUARDES, G.E. 1973b. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C₃, C₄, and crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two-phase system. *Plant Physiology* 52: 484-490.
- KANDA, T.; AMANO, Y.; NISIZAWA, K. 1985. Purification and properties of two endo-1,4- β -xylanases from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *The Journal of Biochemistry* 98: 1545-1554.
- KURZ, C.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. 1998. Characterisation of cell wall polysaccharide profiles of apricots (*Prunus armeniaca* L.), peaches (*Prunus persica* L.), and pumpkins (*Cucurbita* sp.) for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chemistry* 106: 421-430.
- KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K.; OGURA, H. 1989. Regeneration of plants from rice protoplasts. pp. 109-122. **In:** Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 8. *Plant protoplast and genetic Engineering I*. Springer-Verlag, Berlin.
- LEROUXEL, O.; CAVALIER, D.M.; LIEPMAN, A.H.; KEEGSTRA, K. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides: a complex process. *Current Opinions in Plant Biology* 9:621-630.
- LIN, X., HUANG, L.; FANG, W. 2012. Bamboo regeneration via embryogenesis and organogenesis. **In:** Sato, K. I. (ed.). *Embryogenesis*. InTech, China. pp. 359-372.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L. 2000. *Molecular Cell Biology*. Section 22.5, The Dynamic Plant Cell Wall. 4th edition. W. H. Freeman, New York. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21709/>
- LONDOÑO, X. 1996. Diversity and distribution of new world bamboos, with special emphasis on the Bambuseae. Working paper no. 8. INBAR. New Delhi, India. 25 p.
- LONDOÑO, X. 2000. La Guadua un gigante dormido. Sociedad Colombiana del Bambú. **In:** Seminario Guadua en la reconstrucción. Memorias. Quindío, Armenia. pp. 1-5.
- LONDOÑO, X. 2003. Recurso sostenible de incalculable valor. **In:** Villegas, M. (ed.). *Guadua, arquitectura y diseño*. Villegas editores. Colombia. pp. 30-31.
- MACHAKOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E.F. 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and inhibitors. **In:** George, E.F; Hall, M.A; de Klerk, G.J. (eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. 3 ed. Dordrecht, The Netherlands, Springer. pp. 175-204.

- MARINO, S.M.; GLADYSHEV, V.N. 2010. Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces. *Journal of Molecular Biology* 404: 902-916.
- MARULANDA, M.L.; CARVAJALINO, M.; CAROLINA, V.; LONDOÑO, X. 2002. La biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la Guadua. Seminario: Taller Avances en la Investigación sobre Guadua. Pereira. pp 1-5.
- MARULANDA, M.L.; GUTIÉRREZ, L.G.; MÁRQUEZ, M.P. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. *Actualidades Biológicas (Colombia)* 27: 5-15.
- MAZAREI, M.; AL-AHMAD, H.; RUDIS, M.R.; STEWART, C.N. 2008. Protoplast isolation and transient gene expression in switchgrass, *Panicum virgatum* L. *Biotechnology Journal* 3: 354-359.
- McCASKILL, D.; SCOTT, I. 1992. Visualization of vacuoplasts in isolated vacuole preparations from mesophyll protoplasts of periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). *Plant Cell Reports* 11: 310-313.
- MEAKAWA, E. 1976. Studies on hemicellulose of bamboo. *Wood Research: Bulletin of the Wood Research Institute* 59: 153-179.
- MEHROTRA, R.S.; AGGARWAL, A. 2006. Enzymes and toxins in plant disease. *Plant Pathology*. Segunda edición, Tata McGraw Hill. New Delhi, India. 64-100 pp.
- MITCHELL, J.C.; PETOLINO, J.F. 1991. Plant regeneration from haploid suspension and protoplast cultures from isolated microspores of maize. *Journal of Plant Physiology* 137: 530-536.
- MORI, K.; KINOSHITA, T.; YAMADA, Y. 1991. Callus formation and protoplast isolation in rice (*Oryza sativa* L.) and its related species. *Journal of the Faculty of Agricultura, Hokkaido University*. 64(4): 304-310.
- MÓRO CZ, S.; DONN, G.; NÉMETH, J.; DUDITS, D. 1990. An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 721-726.
- MUDOI, K.D.; SAIKIA, S.P.; GOSWAMI, A.; GOGOI, A.; BORA, D.; BORTHAKUR, M. 2013. Micropropagation of important bamboos: a review. *African Journal of Biotechnology* 12: 2770-2785.
- MUÑOZ, M.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. 2002. Plant regeneration via indirect organogenesis in callus derived from young leaves of *Dendrocalamus giganteus*. **In:** Kumar, A.; Ramanuja-Rao, I.V.; Sastry, C. (eds.). *Bamboo for Sustainable Development: Proceedings of the 5th International Bamboo Congress of the 6th International Bamboo Workshop*. V.S.P. Intl Science. pp. 373-384.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- NAGATA, T.; ISHII, S. 1979. A rapid method for isolation of mesophyll protoplasts. *Canadian Journal of Botany* 57: 1820-1823.
- NAGEL, A.; SIRISAKULWAT, S.; CARLE, R.; NEIDHART, S. 2014. An acetate-hydroxide gradient for the quantitation of the neutral sugar and uronic acid profile of pectins by HPAEC-PAD without postcolumn pH adjustment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 2037-2048.
- OCHATT, S.J.; PATAT-OCHATT, E.M.; POWER, J.B. 1992. Chapter 4: Protoplasts. **In:** *Biotechnology of perennial fruit crops*. Hammerschlag, F.A.; Litz, R.E. (eds.). C.A.B. International. Wallingford, UK. 550 p.
- OH, M.O.; CHEONG, K.; SANGU-GU, K. 1994. Changes of protein patterns during induction of the first cell divisions in petunia (*Petunia hybrida*) protoplast cultures. *Journal of Plant Physiology* 144: 555-561.
- PAI, P.; FENG, P.; JING, B.; FENG, X.; RUNCANG, S. 2011. Studies on the starch and hemicelluloses fractionated by graded ethanol precipitation from bamboo *Phyllostachys bambusoides* f. shouzhu Yi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 2680-2688.
- PAULY, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; YORK, W. 1999. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal* 20: 629-639.
- PERERA, S.C.; OZIAS-AKINS, P. 1991. Regeneration from sweet potato protoplasts and assessment of growth conditions for flow-sorting of fusion mixtures. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 917-922.
- PONGCHAWEE, K.; NA-NAKORN, U.; LAMSEEJAN, S. 2006. Factors affecting protoplast isolation and culture of *Anubias nana* Engler. *International Journal of Botany* 2:193-200.
- POWER, J.B.; CHAPMAN, J.V. 1985. Chapter 3: Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. pp. 37-66. **In:** Dixon, R.A. (ed.). *Plant Cell Culture: a practical approach*, IRL press, Oxford, England. 238 p.
- PRADE, R.A.; ZHAN, D.; AYOUBI, P.; MORT, A.J. 1999. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Vol. 16. Intercept Ltd. Hampshire, Reino Unido. pp. 361-391.
- PRAKASH, A.H.; RAO, K.S.; KUMAR, M. 1997. Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum* L. cv. California Wonder. *Journal of Bioscience* 22: 339-344.
- PRASERTSONGSKUN, S. 2004. Isolation and culture of suspension protoplasts of vetiver. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26:411-416.
- PUONTI-KAERLAS, J.; OTTOSSON, A.; ERIKSSON, T. 1992. Survival and growth of pea protoplasts after transformation by electroporation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 141-148.

- QUINTANS, K.N. 1998. Ancient grass, future natural resource. Working paper no. 16. The national bamboo project of Costa Rica: a case study of the role of bamboo in international development. INBAR. Artstock, New Delhi, India. 58 p.
- RAGHAVAN, V. 2004. Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *American Journal of Botany* 91: 1743-1756.
- RAMANAYAKE, S.M.S.D.; WANNIARACHCHI, W.A.V.R. 2003. Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). *Scientia Horticulturae* 98: 195-200.
- RAMÍREZ-TRUQUE, C.; ESQUIVEL, P.; CARLE, R. 2011. Neutral sugar profile of cell wall polysaccharides of pitaya (*Hylocereus* sp.) fruits. *Carbohydrate Polymers* 83: 1134-1138.
- RAO, I.U.; YUSOFF, A.; RAO, A.; SASTRY, G. 1990. Current status of bamboo cultivation: the necessity for tissue culture based mass propagation. Propagation of bamboo and rattan through tissue culture. IDRC, Bamboo and Rattan Research Network. Tanglia, Singapore. 60 p.
- RAO, I.V.R.; RAO, I.U.; ROOHI, F. N. 1992. Bamboo propagation through conventional and *in vitro* techniques. **In:** Rapid propagation of fast-growing wood species (Baker, F.W.G). CAB International Wallingford, Oxfordshire, UK. 1250 p.
- RAO, K.S.; PRAKASH, A.H. 1995. A simple method for the isolation of plant protoplasts. *Journal of Bioscience* 20: 645-655.
- RAO, K. V.; RATHORE, K.S.; HODGES, T.K. 1995. Physical, chemical and physiological parameters for electroporation-mediated gene delivery into rice protoplasts. *Transgenic Research* 4: 361-368.
- RASMUSSEN, J.O.; NEPPER, J.P.; KIRK, H.G.; TOLSTRUP, K.; RAMUSSEN, O.S. 1998. Combination of resistance to potato late blight in foliage and tubers by intraspecific dihaploid protoplast fusion. *Euphytica* 102: 363-370.
- REN, J.P.; DICKSON, M.H.; EARLE, E.D. 2000. Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *B. olerace*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 810-819.
- REUSTLE, G.; NATTER, I. 1994. Effect of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal on formation of microcallus from grapevine protoplasts (*Vitis* sp.). *Vitis* 33: 117-121.
- RICHARD, F.C.; GOUPY, P.M.; NICOLAS, J.J.; LACOMBE, J.M.; PAVIAT, A.A. 1991. Cysteine as an Inhibitor of enzymatic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 841-847.

- RIZKALLA, A.A.; BADR-ELDEN, A.M.; NOWER, A.A. 2007. Protoplast isolation, salt stress and callus formation of two date palm genotypes. *Journal of Applied Sciences Research* 3: 1186-1194.
- ROHN, S.; RAWEL, H.M.; KROLL, J. 2002. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3566-3571.
- RUIZ, A.I. 1986. Efecto de la edad y selección del culmo en la propagación asexual de la Guadua (*Bambusa guadua*) y su respuesta a la cobertura con *Pennisetum purpureum* var. King Grass. Universidad de Costa Rica. Tesis de Licenciatura. Costa Rica. 54 p.
- SALAS E. 2006. Actualidad y futuro de la arquitectura de bambú en Colombia. Tesis de doctorado. Programa de Doctorado en Construcción, Restauración y Rehabilitación Arquitectónica. Escuela Técnica Superior de Arquitectura de Barcelona. Universidad Politécnica de Cataluña. 402 p.
- SAXENA, S.; DHAWAN. 1999. Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 18: 438-443.
- SCHNEIDER, V.; HALLIER, U.W. 1970. Polyvinylpyrrolidon als Schutzstoff bei der Untersuchung gerbstoffgehemmter Enzymreaktionen. *Pflanze* 94:134-139.
- SCHRÖDER, R.; KNOOP, B. 1995. An oligosaccharide growth factor in plant suspension cultures: a proposed structure. *Journal of Plant Physiology* 146: 139-147.
- SOLÓRZANO, P. VARGAS, E., ALFARO, Y.; FERNÁNDEZ, M. 2011. Aislamiento, purificación y cultivo de Nicotianas (comunicación personal). San José, Universidad de Costa Rica.
- SUN, S. N.; YUAN, T.Q.; LI, M.F.; CAO, X.F.; XU, F.; LIU, Q.Y. 2012. Structural characterization of hemicelluloses from bamboo culms (*Neosinocalamus affinis*). *Cellulose Chemistry and Technology* 46: 165-176.
- SZABADOS, L. 1993. Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. **In:** Cultivo de tejidos en la agricultura. Mroginski, L.A. y Roca, W.M. (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 970 p.
- SZABADOS, L.; MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. 1993. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. **In:** Cultivo de tejidos en la agricultura. Mroginski, L.A. y Roca, W.M. (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 970 p.
- TSENG, T.C.; LIU, D.F.; SHIAO, S.Y. 1975. Isolation of protoplasts from crop plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 16:55-60.
- VALENCIA, J.; RODRÍGUEZ, N.; HERRERA, J.C., CAMACHO, G. 2012. Caracterización morfológica del cariotipo de *Guadua angustifolia* Kunth Var. *angustifolia*. (Bambusoide: Poaceae). *Revista Universidad Del Quindío* 23: 17-23.

- VAN STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E.F. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins. **In:** George, E.F; Hall, M.A; de Klerk, G.J. (eds.). Plant propagation by tissue culture. Vol. 1. 3 ed. Dordrecht, The Netherlands, Springer. pp. 205-226.
- VIÑAS, M. 2011. Aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos viables de pitahaya (*Hylocereus* sp. [Weber] Britton & Rose). Tesis de Maestría. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 112 p.
- VIÑAS, M.; MORA, I. 2008. Aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos de *Petunia hybrida* y *Salpiglossis sinuata* (comunicación personal). San José, Universidad de costa Rica.
- VOGEL, J. 2008. Unique aspects of the grass cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 301-307.
- WANG, D.; MILLER, P.D.; SÖNDAHL, M.R. 1989. Plant regeneration from protoplasts of Indica type rice and CMS rice. *Plant Cell Reports* 8: 329-332.
- WENDE, G.; FRY, S. C. 1997. Digestion by fungal glycanases of arabinoxylans with different feruloylated side-chains. *Phytochemistry* 45: 1123:1129.
- WOLF, S., MOUILLE, G., PELLOUX, J. 2009. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant* 2: 851-860.
- XIAO, W.; HUANG, X.; GONG, Q.; DAI, X.M.; ZHAO, J.T.; WEI, Y.R.; HUANG, X.L. 2009. Somatic hybrids obtained by asymmetric protoplast fusion between *Musa Silk* cv. Guoshanxiang (AAB) and *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 313-321.
- YASUGI, S. 1989. Isolation and culture of orchid protoplasts. **In:** Bajaj, Y. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 235-253.
- YOSHIDA, S.; KUNO, A.; SAITO, N.; AOYAMA, M.; KUSAKABE, I. 1998. Structure of xylan from culms of bamboo grass (*Sasa senanensis* Rehd.). *Journal of Wood Science* 44: 457-462.
- YUAN, J.L.; YUE, J.J.; WU, X.L.; GU, X.P. 2013. Protocol for callus induction and somatic embryogenesis in Moso Bamboo. *PLoS ONE* 8: 1-6.
- ZHANG, J.; SHEN, W.; YAN, P.; LI, X.; ZHOU, P. 2011. Factors that influence the yield and viability of protoplasts from *Carica papaya* L. *African Journal of Biotechnology* 10: 5137-5142.
- ZHENG-JUN, S.; LING-PING, X.; JIA, D.; FENG, X.; RUN-CANG, S. 2011. Isolation and characterization of soluble polysaccharides of *Dendrocalamus brandisii*: a high-yielding bamboo species. *Bio Resources* 6: 5151-5166.

8. Anexos

Anexo 1. Medio de cultivo de Power y Chapman (1985) (CPW) utilizado durante la preplasmólisis y el aislamiento de protoplastos de *G. angustifolia*

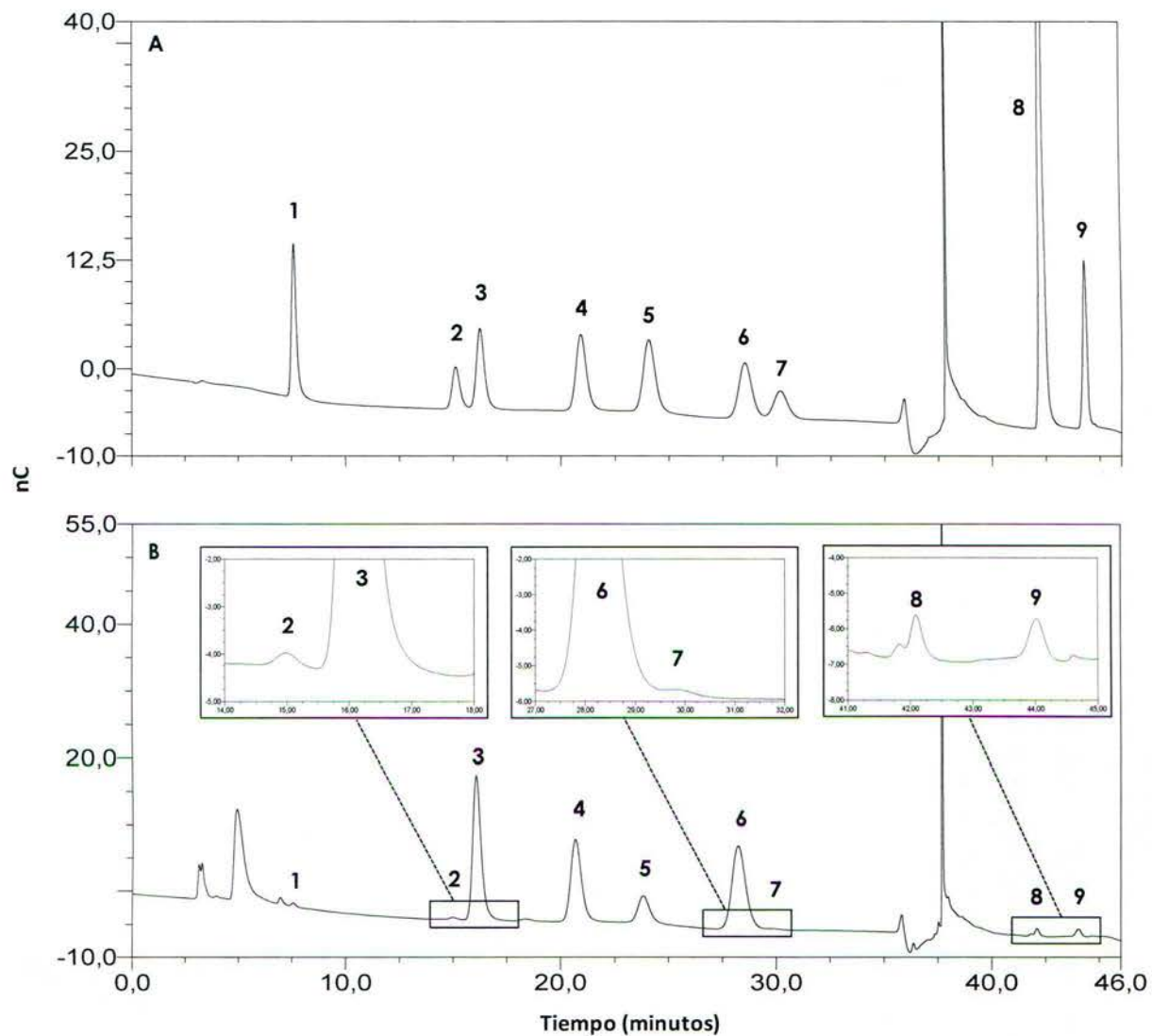
Compuesto	Concentración (mg/l)
Macroelementos	
KNO ₃	101
CaCl ₂ *2H ₂ O	1480
MgSO ₄ *7H ₂ O	246
KH ₂ PO ₄	27,2
Microelementos	
KI	0,16
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025

Anexo 2. Solución de azul de Evans de Gaff y Okong´O-Ogola (1971) utilizada para determinar la viabilidad de los protoplastos de *G. angustifolia* obtenidos

Compuesto	Concentración (mg/l)
Macroelementos	
KNO ₃	101
CaCl ₂ *2H ₂ O	1480
MgSO ₄ *7H ₂ O	246
KH ₂ PO ₄	27,2
Microelementos	
KI	0,16
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
Otros	
Manitol 13% (p/v)	130000
Azul de Evans 0,01% (p/v)	100

Anexo 3. Características del equipo de cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAEC-PAD) empleadas para el análisis de azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico

Presion superior	200 psi
Presion inferior	3000 psi
Maximo flujo	6,0 ml/min. ²
CR_TC	Apagado
Altura de aguja	1 mm
Volumen enjuage	500 µl
Velocidad jeringa	3
Temperatura bandeja	20°C
EDet1.Modo	IntAmp
EDet1.ControlCelda	Encendido
pH limite superior	13
pH limite inferior	10
Temperatura referencia	28°C
EGC_1.Curva	5
Columna_TC.Modo	Encendido
Volumen inyeccion	10 µl
Flujo	0,2 ml/min.
Eluente A	Agua ultrapura
Eluente B	...
Eluente C	170 mM KAc + 100 mM NaOH
Eluente D	500 mM NaOH
Columna	CarboPac PA20 (Dionex GmbH, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos).
Precolumna	CarboPac PA20 + AminoTrap (Dionex GmbH, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos).



Anexo 4. A) Cromatograma estándar empleado para la determinación de azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico (2,5 mg/l del 1-7+9 y 15 mg/l del 8). **B)** Representación del cromatograma obtenido para el análisis de azúcares neutros y ácidos galacturónico y glucurónico (muestra de material insoluble en alcohol (MIA) de callos de *G. angustifolia*). 1: Fucosa; 2: Ramnosa; 3: Arabinosa; 4: Galactosa; 5: Glucosa; 6: Xilosa; 7: Manosa; 8: Acido galacturónico; 9: Acido glucurónico.