

**AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE ÑAME  
(*Dioscorea alata* L.) cv. DARIÉN. PANAMÁ, 2002-2003.**

**PROTOPLAST ISOLATION OF YAM (*Dioscorea alata* L.) cv. DARIEN.  
PANAMA, 2002-2003.**

**Carmen Y. Bieberach Forero <sup>1</sup>; Heidi Hernández Ibarra <sup>2</sup>**

## INTRODUCCIÓN

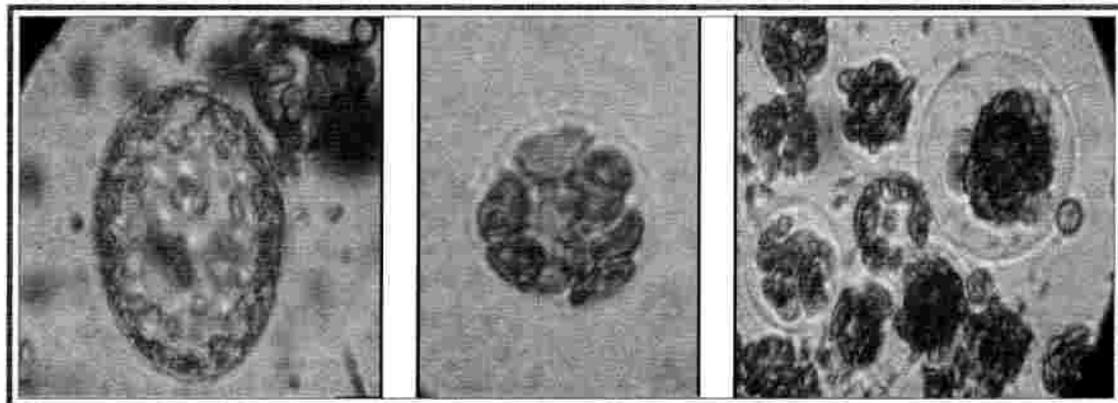
El cultivo de ñame ha cobrado auge en la última década, lo que ha significado un incremento en la superficie cultivada, la incorporación de prácticas agronómicas novedosas y la introducción de nuevos cultivares con características para la exportación. Los cultivares consumidos localmente tienen buena productividad y calidad culinaria; sin embargo, son susceptibles a la antracnosis, principal limitante del cultivo en el país. Existen otros cultivares que muestran tolerancia a la enfermedad, tales como el "Diamante 6322", introducido de Costa Rica y el cultivar cubano "Blanco" o "Pelú" (Folgueras y col., 1992).

Muchos de los cultivares propagados vegetativamente han perdido la capacidad de floración y producir semillas (Tor y col., 1998), por lo tanto, se intenta desarrollar métodos para el mejoramiento genético que permitan obviar las limitaciones reproductivas de la especie. Entre éstos tenemos la hibridación somática que posibilita la recombinación genética, la formación de híbridos somáticos y la regeneración de plantas.

El objetivo de esta investigación fue evaluar enzimas degradantes de la pared celular y aislar protoplastos de ñame, tanto de hojas como de raíz.

<sup>1</sup> Ing. Agr., M.Sc. Cultivos Tropicales. Laboratorio de Agrobiotecnología, IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAOC). e-mail: [idiap\\_div@cwpanama.net](mailto:idiap_div@cwpanama.net)

<sup>2</sup> Agrónoma, Asistente. Laboratorio de Agrobiotecnología. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAOC).



**FIGURA 1. Protoplastos de hoja de Ñame cv. Darién.**

## METODOLOGÍA

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Agrobiotecnología del IDIAP entre octubre de 2002 y abril de 2003. La metodología empleada consistió en plasmólisis de los tejidos durante tres horas, en un medio de cultivo, digestión de la pared celular a 25° y 37°C, en la oscuridad, purificación y cultivo en medio nutritivo. Se usaron hojas y raíces

de vitroplantas del cultivar Darién. Las enzimas evaluadas fueron: celulasas; celulasas + pectinasa; celulosa + hemicelulasa; y celulosa + hemicelulasa + pectinasa.

## RESULTADOS

Las mezclas enzimáticas probadas permitieron obtener protoplastos de hojas, pero no de raíces. La mayor cantidad de

### MEZCLAS ENZIMÁTICAS (P/V) PROBADAS PARA EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE ÑAME DARIÉN.

Celulasas	1% Onozuka R 10 + 0.25% Macerozoma R10
Celulosa + hemicelulasa	1% Macerozoma R10 + 1% Hemicelulasa
Celulasas + pectinasa	1.5% Onozuka R10 + 0.1% Macerozoma R10 + 0.1% pectinasa. Todas las enzimas aplicadas al mismo tiempo.
Celulosa + hemicelulasa + pectinasa	1% Macerozoma R10 + 1% hemicelulasa + 1% pectinasa. Solo se probó con segmentos de hojas
Pectinasa + celulosa	1% Pectinasa + 1% Onozuka R10. Incubación 3 h en pectinasa, luego se añade celulosa y se incuba 16 h.

protoplastos se obtuvo incubando en una mezcla de celulasa, hemicelulasa y pectinasa, todas al 1% p/v. La incubación de segmentos de hojas de pectinasa al 1% (3 h) y luego en celulasa Onozuka R10 1% (16 h), también permitió un rendimiento aceptable de protoplastos. Posiblemente, la mezcla de celulosas y pectinasa no haya funcionado debido a la baja concentración de pectinasa que se usó en ésta.

En extractos crudos se obtuvo gran cantidad de protoplastos, pero en el proceso de eliminación de los restos de tejidos y células, muchos protoplastos se desintegraban. Las enzimas trabajaron mejor a 37°C, liberando mayor cantidad de protoplastos que a 25°C. Los protoplastos suspendidos en un medio sin enzimas se mantuvieron viables hasta 24 horas después, no se observó regeneración de pared ni división celular.

#### NÚMERO PROMEDIO DE PROTOPLASTOS EN 1 ML DE SUSPENSIÓN PURIFICADA.

Celulasas	Celulasa + hemicelulasa	Celulasas + pectinasa	Celulasa + hemicelulasa + pectinasa	Pectinasa + celulasa
390	766	2670	7200	5950

#### CONCLUSIONES

- ❖ La mejor mezcla para el aislamiento de protoplastos de hojas de ñame fue 1% celulasa Onozuka R10 + 1% hemicelulasa + 1% pectinasa.
- ❖ La pectinasa tuvo un efecto importante en el aislamiento de protoplastos de hoja, ya que el rendimiento aumentó considerablemente en las mezclas que la contenían.

#### RECOMENDACIONES

- ⊗ Se ensayarán periodos de incubación menores a 16 horas.
- ⊗ Se probarán distintas combinaciones de celulosas y pectinasa (con

centración, orden de aplicación y períodos de incubación).

#### LITERATURA CITADA

- FOLGUERAS M. M.; CASTELLÓN VALDÉZ, M. DEL C.; FUENTES VEGA, H. 1992. Evaluation for resistance, tolerance and susceptibility to anthracnose in promising clones of yam. *Agrotecnia de Cuba (Cuba)* 24 (2): 11-20.
- TOR, M.; TWYFORD, C.T.; FUNES, I.; BOCCON-GIBOD, J.; AINSWORTH, C.C.; MANTELL, S.H. 1998. Isolation and culture of protoplasts from immature leaves and embryogenic cell suspensions of *Dioscorea* yams: tools for transient gene expression studies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53 (2):113-126.