

Aislamiento, cultivo y fusión de protoplastos en el género *Vasconcellea*

Omar Francisco Arias Andrade^{1*}, Idamis Bermúdez-Carabaloso², Mónica Jadán¹

¹Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Ave Gral Rumiñahui. Sangolquí. Quito. Ecuador. PO BOX 171-5-31B.

²Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

RESUMEN

Las especies del género *Vasconcellea*, frecuentemente denominadas papayas de las tierras altas, son parientes silvestres de la papaya común (*Carica papaya* L.) ampliamente distribuida en la América tropical. Sus usos son varios entre los que se incluyen: materia prima en la industria de las frutas tropicales como fuente de papaína o su empleo en programas de mejoramiento genético. El presente trabajo se realizó con el objetivo de realizar una revisión de literatura científica sobre el aislamiento, purificación y fusión de protoplastos en el género *Vasconcellea* y sus usos en el mejoramiento genético. Además, se describen las principales fuentes de protoplastos del género *Vasconcellea*, los factores que influyen en el proceso de aislamiento, las condiciones de cultivo y la fusión de los protoplastos. Finalmente, se resumen los adelantos alcanzados hasta la fecha en la hibridación intergenérica con *Carica papaya* para generar mayor resistencia y productividad.

Palabras clave: Caricaceae, herramientas biotecnológicas, hibridación intergenérica

Isolation, culture and fusion of protoplasts in the genus *Vasconcellea*

ABSTRACT

Species of the genus *Vasconcellea*, often called highland papayas, are wild relatives of the common papaya (*Carica papaya* L.) widely distributed in tropical America. Its uses are various, including: raw material in the tropical fruit industry as a source of papain or its use in genetic improvement programs. The present work was carried out with the objective of carrying out a review of scientific literature on the isolation, purification and fusion of protoplasts in the genus *Vasconcellea* and their uses in genetic improvement. In addition, the main sources of protoplasts of the genus *Vasconcellea*, the factors that influence the isolation process, the culture conditions and the fusion of the protoplasts are described. Finally, the advances achieved to date in intergeneric hybridization with *Carica papaya* to generate greater resistance and productivity are summarized.

Keywords: biotechnological tools, *Caricaceae*, intergeneric hybridization

Editora:

Yelenys Alvarado Capó
Instituto de
Biotecnología de las
Plantas, Universidad
Central Marta Abreu de
Las Villas.

Correspondencia:

e-mail:
ofarias@espe.edu.ec

Recibido: 26-12-2021

Aceptado: 08-02-2022

Copyright:

Este es un artículo de
acceso abierto
distribuido bajo una
Licencia Creative
Commons Atribución-
NoComercial 4.0
Internacional (CC BY-NC
4.0)

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Está permitido
su uso, distribución o
reproducción citando la
fuente original y los
autores.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia de las *Caricaceae* el género *Vasconcellea*, comprende 21 especies. Usualmente es conocido por el género monotípico *Carica*, incluida papaya (*Carica papaya* L.), uno de los cultivos de frutas tropicales más importantes. Se distribuye desde México hasta Chile, con el centro de diversidad

en Ecuador y Colombia. Debido a su preferencia por las altitudes más altas, la mayoría de las especies de *Vasconcellea* se conocen como papayas de las tierras altas o de montaña (Scheldeman *et al.*, 2011).

En los Andes, las papayas de altura se consumen principalmente como frutos frescos, tostados, en jugo, mermeladas, conservas o cocidos en salsas. La mayor parte del consumo es doméstico y la comercialización es escasa, excepto en el caso del híbrido *Vasconcellea x heibornii*, conocido como babaco, importante comercialmente en Ecuador e introducido con poco éxito en países de Europa y África. Existe una amplia gama de agentes fitopatógenos que se relacionan con el cultivo de *Vasconcellea* en sus diferentes etapas vegetativas, dentro de ellos nematodos, virus, bacterias y hongos que afectan en gran medida a su reproducción.

Los métodos de mejoramiento genético tienen como objetivo seleccionar los mejores genotipos dentro de una población, o crear genotipos nuevos con características previamente definidas. Tal es el caso de la fusión de protoplastos mediante el cual se puede transferir genes útiles de una especie a otra, mediante procesos de transporte y división celular, mutagénesis, variación somaclonal y en especial transformación genética mediante hibridación somática (Davey *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019).

Es importante señalar que la investigación de la técnica de cultivo de protoplastos en el género *Vasconcellea* es escasa, por lo que el objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de literatura científica sobre el aislamiento, purificación y fusión de protoplastos en el género *Vasconcellea* y sus usos en el mejoramiento genético. Mediante la recopilación de información confiable se ofrece una visión más amplia de la técnica de fusión de protoplastos, los factores que influyen en el aislamiento y la fusión, la selección de plantas híbridas y la utilización de los híbridos somáticos en el cultivo de plantas pertenecientes al género *Vasconcellea*, debido a que, entre sus representantes hay cultivos importantes para la población humana como es *Carica papaya*.

GENERALIDADES DEL GÉNERO VASCONCELLEA

Las plantas pertenecientes al género *Vasconcellea* originalmente se incluían en *Carica*. Sin embargo, análisis moleculares demostraron que estos géneros no eran monofiléticos, y *Vasconcellea* se restituyó como uno diferente (Badillo, 2000).

El género *Vasconcellea* se caracteriza por tener hojas simples, lobuladas o con lóbulos de palma con cinco a seis nervaduras principales. Asimismo, las flores poseen una corola con lóbulos curvos a la izquierda, estigmas lineales, cinco ovarios lóculos y óvulos dispersos en dos divisiones yuxtapuestas (Scheldeman *et al.*, 2011).

Los Andes son las áreas con mayor diversidad de especies de *Vasconcellea*. Se distribuyen desde las laderas secas de los Andes en Ecuador, Colombia y Perú (3 500 msnm) hasta las tierras bajas de Panamá y en el sur de Brasil (Tabla 1; Figura 1). Se denominan papayas de las tierras altas vistas sus preferencias climáticas. Estas se caracterizan por una serie de atributos deseables, como resistencia a enfermedades, tolerancia al frío, alta actividad enzimática del látex y alto contenido de proteínas y vitaminas, lo cual sugiere su potencial agronómico, especialmente en los pueblos andinos (Tineo *et al.*, 2020).

Tabla 1. Distribución de especies de *Vasconcellea* en el continente americano. (Carvalho y Renner, 2014).

Nº	Especies	Distribución
1	<i>V. weberbaueri</i>	Ecuador, Perú
2	<i>V. parviflora</i>	Ecuador, Perú
3	<i>V. stipulata</i>	Ecuador
4	<i>V. candicans</i>	Ecuador, Perú
5	<i>V. chilens</i>	Chile
6	<i>V. quercifolia</i>	Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú
7	<i>V. glandulosa</i>	Bolivia, Argentina, Perú, Brasil
8	<i>V. horovitziana</i>	Ecuador
9	<i>V. pulchra</i>	Ecuador
10	<i>V. monoica</i>	Ecuador, Bolivia, Perú
11	<i>V. omnilingua</i>	Ecuador
12	<i>V. sprucei</i>	Ecuador
13	<i>V. crassipetala</i>	Colombia
14	<i>V. cauiflora</i>	Colombia, Costa Rica, Venezuela, Nicaragua, Panamá, Guatemala, México, Honduras, Salvador
15	<i>V. microcarpa</i>	Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Panamá, Chile, Costa Rica
16	<i>V. paladencis</i>	Colombia, Ecuador
17	<i>V. cundinamarcensis</i>	Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú, Bolivia, Panamá, Chile, Costa Rica
18	<i>V. longiflora</i>	Colombia
19	<i>V. sphaerocarpa</i>	Colombia
20	<i>V. goudotiana</i>	Colombia
21	<i>V. x heilbornii</i>	Colombia, Ecuador

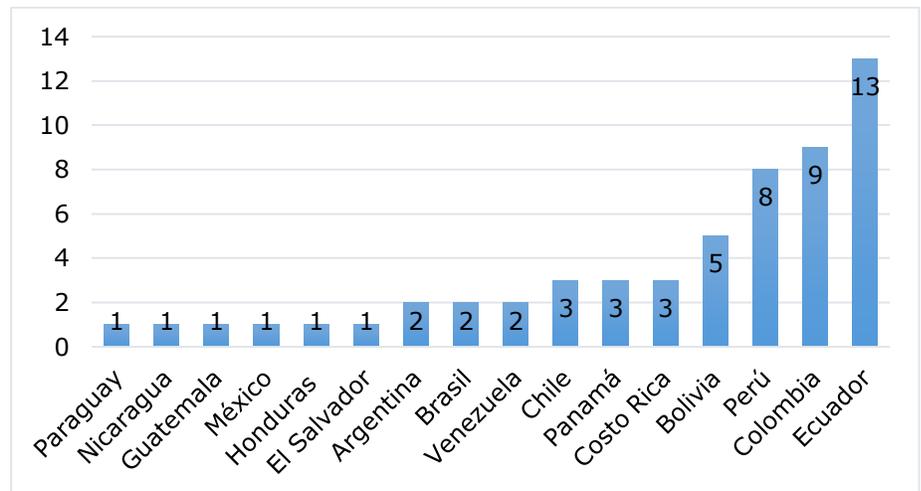


Figura 1. Distribución de especies de *Vasconcellea* por países.

Las especies de *Vasconcellea* son plantas silvestres, semi domesticadas o domesticadas, con un hábito pauciculoso y arbustivo o arbóreo. Las plantas suelen ser dioicas, pero a veces monoicas o polígamas (Kyndt *et al.*, 2005).

Son arbustos o pequeños árboles perennes con aspecto robusto que se adaptan a climas fríos y bosques brumosos de la cordillera andina, aun cuando se establecen también en zonas subtropicales y zonas templadas cálidas. Requiere precipitaciones anuales promedio de 1000 – 1 700 mm, pero tolera rangos de 500 – 2 500 mm. Prefiere temperaturas medias entre 17 y 22 °C. En relación con el suelo requiere terrenos fértiles y bien drenados, con pH en el rango de 6 – 7 (Fuertes, 2019).

Importancia de la familia *Vasconcellea*

Las frutas tropicales juegan un papel importante en la economía mundial. Contribuyen sustancialmente a la nutrición humana y se utilizan para la medicina, la madera, el combustible y la alimentación del ganado (Drew, 2016). Los centros con mayor diversidad genética de *Vasconcellea* son Ecuador, Colombia y Perú (Salvatierra y Jana, 2015). La papaya de montaña más grandes es el babaco (*V. × heilbornii*) se cultiva comercialmente en Nueva Zelanda donde se introdujo en 1973, y es cultivo de babaco en Ecuador la especie *Vasconcellea* más tolerante al frío (Scheldeman *et al.*, 2007).

Vasconcellea en Ecuador

El babaco es el cultivo frutícola más importante entre las papayas de montaña ecuatorianas. Pertenece a *Vasconcellea × heilbornii*, que también incluye plantas con frutos más pequeños e interesantes perspectivas comerciales. Los baby babacos, supuestamente es un híbrido entre dos especies cultivadas ocasionalmente; *V. stipulata* y *V. cundinamarcensis* (Restrepo *et al.*, 2004). Análisis moleculares confirman la hibridación contemporánea ocasional entre *V. stipulata*, *V. cundinamarcensis* y *V. × heilbornii* y sugirió la posible implicación de *V. weberbaueri* en el origen de *V. × heilbornii* (Droogenbroeck *et al.*, 2006).

Ciertas especies del género *Vasconcellea* tienen características muy prometedoras como resistencia a organismos fitopatógenos y excelentes propiedades organolépticas del fruto. Tiene un interés relevante para programas de mejoramiento genético tanto de *Vasconcellea x heilbornii* (babaco) como de la papaya común (*Carica papaya*) (Mariño, 2019).

AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS

En 1880, Von Hannstein sugirió que la unidad básica vegetal se llamara protoplasto, en referencia a toda la célula excepto a la pared celular. En 1892, Klercker describió un método para aislar protoplastos vivos; y este método mecánico de aislamiento de protoplastos lo refinó Plowe en 1931, quien aisló protoplastos de las células de la epidermis de la cebolla (*Allium cepa* L.) mediante plasmólisis en sacarosa (Cocking, 2000).

Los protoplastos son células vegetales carentes de pared celular que tienen un rol protagónico esencial en la biotecnología vegetal. Por sus particularidades, se consideran una alternativa viable a los cultivos vegetales convencionales e igualmente sería factible su manipulación genética utilizando vectores (Márquez, 2019).

Los protoplastos vegetales aislados son en realidad células vegetales desnudas en las que la pared celular se ha eliminado mediante un método mecánico o enzimático (Dodds, 1983). Las células vegetales están rodeadas por una pared celular compleja compuesta principalmente por polisacáridos. Se han desarrollado técnicas para la eliminación rutinaria de esta pared de una amplia gama de células vegetales (Fowke y Gamborg, 1980). Los protoplastos vegetales son totipotentes y pueden regenerarse en varios órganos. Además, pueden absorber fácilmente material genético extraño, como ADN (Ácido desoxirribonucleico), cromosomas, orgánulos y partículas virales (Kang *et al.*, 2020).

El aislamiento de protoplastos es un descubrimiento realizado en levaduras en 1960 que desencadenó posteriormente investigaciones en esta área sobre células vegetales, luego se evidenció que privar momentáneamente la célula vegetal de su pared no altera ninguna de sus capacidades (Tomar y Dantu, 2010). La forma original de preparar protoplastos era mediante plasmólisis del tejido, seguida de abrasión mecánica. El método mecánico de aislamiento de protoplastos tiene la desventaja de requerir mucho tiempo y, solo se pueden aislar cantidades muy pequeñas (Dodds, 1983).

En tal sentido, a través de los protoplastos pueden ser superadas las incompatibilidades entre cruces de especies, promover la formación de híbridos somáticos. Una vez obtenidas las células con las características esperadas, puede regenerarse la planta completa, plantear un cultivo selectivo de sus órganos o efectuar un cultivo *in vitro*. Los protoplastos podrían utilizarse a modo de biofactorías, perfeccionar la producción de los metabolitos secundarios de la especie escogida (con el complemento añadido de precursores, elicitación, etc.) (Márquez, 2019).

Los protoplastos pueden aislarse de diferentes partes de la planta, tales como las hojas, raíces, tallos, frutos, etc., y se emplean protocolos de asepsia para evitar la contaminación microbiana de la muestra obtenida (Davey *et al.*, 2005).

Aisladas las células vegetales se elimina la pared celular bien por medios mecánicos o por enzimáticos. El método mecánico se utiliza menos que el enzimático pues está condicionado a tejidos con un gran contenido de células y grandes vacuolas y escaso tejido meristemático. Además, resulta muy complejo y origina protoplastos con una viabilidad muy baja y actualmente se recomienda cuando es imposible apelar al método enzimático (Chawla, 2009).

El método enzimático se basa en la incubación de células vegetales obtenidas de la muestra de tejido vegetal de donde se extraen las células que se pretenden cultivar, en una mezcla enzimática de origen comercial. Principalmente está formada por celulasas, hemicelulasas y pectinasas de diferente tipo, las cuales degradan los elementos de la pared celular y el tejido que une a las células entre sí, de modo que los protoplastos quedan aislados en la suspensión. Estas mezclas comerciales contienen reguladores, provenientes del pH y de la osmolaridad, para garantizar una actividad inapreciable de las enzimas y una excelente viabilidad de los protoplastos (Szabados, 1991; Chawla, 2009).

Posterior a la digestión enzimática, se hace una purificación para separar los protoplastos sanos, de los restos celulares, protoplastos rotos y células que no fueron digeridas entre otros elementos. Luego son sometidos a un conjunto de procedimientos de centrifugado, filtrado y lavado que da como resultado una suspensión pura de protoplastos. Obtenidos los protoplastos viables, se inicia el proceso de ubicación de las áreas donde serán utilizados, las cuales son muy diversas, como la manipulación genética y la obtención de híbridos somáticos, sin relegar el estudio de las biomembranas (Márquez, 2019).

Factores que influyen en aislamiento de protoplastos

Varios factores influyen en la liberación de protoplastos, incluido el grado de engrosamiento de la pared celular, la temperatura, la duración de la incubación de la enzima y el pH de la solución enzimática (Chamani *et al.*, 2012). Por otro lado, el crecimiento de protoplastos depende de factores como la densidad de la placa y la naturaleza y condición del material vegetal de partida (Gray, 1993; Davey *et al.*, 2005).

Enzimas para el aislamiento de protoplastos

Las enzimas utilizadas para digerir la matriz de la pared celular generalmente consisten en varias mezclas de celulasa, hemicelulasa y pectinasa. Se obtienen principalmente de hongos o bacterias que crecen en sustratos de la pared celular. Se producen comercialmente muchas preparaciones de enzimas y se han utilizado con éxito para el aislamiento de protoplastos de plantas (Ishii, 1989; Kozlowski y Pallardy, 1997; Anand *et al.*, 2020).

El protoplasto vegetal se puede generar utilizando procedimientos de uno o dos pasos. En el método de dos pasos, las células se maceran (separan) primero con pectinasas (o pectoliasas) antes de convertirlas en protoplastos mediante tratamiento con celulasa (Burriss *et al.*, 2016).

El aislamiento eficiente de protoplastos, la fusión y la regeneración de los productos de fusión son pasos indispensables hacia la creación de un híbrido

somático y, por lo tanto, exigen un enfoque integrado de las técnicas (Duquenne *et al.*, 2007). La pared celular se puede digerir mediante mezcla de enzimas lo que da como resultado protoplastos unidos a la membrana (Wua *et al.*, 2019).

La composición de las soluciones enzimáticas para aislar protoplastos es fundamental para obtener un gran número de protoplastos viables. La duración de la incubación durante el proceso de aislamiento también determina la cantidad y calidad del protoplasto liberado (Mastuti y Rosyidah, 2019).

Purificación de protoplastos

Después de la incubación de los fragmentos foliares en la solución enzimática, puede observarse un numeroso grupo de protoplastos que flotan libres entre los residuos de tejido foliar que no fue digerido y de restos celulares. Los protoplastos deben purificarse de los residuos, la mezcla enzimática se reemplaza por un medio de cultivo. Generalmente se emplean varios procesos de filtración y centrifugación para conseguir una suspensión de protoplastos pura y libre de enzimas (Szabados *et al.*, 1987).

Los protoplastos se suelen purificar mediante una combinación de filtración, centrifugación y lavado. La solución enzimática que contiene los protoplastos se filtra a través de un tamiz de metal o *nylon* (50-100 μm) para eliminar las partes más grandes de tejido no digerido y los grupos de células. La eliminación adicional de las células dañadas y de las enzimas de aislamiento se realiza mediante centrifugación repetida (3-10 minutos, 75-100 $\times g$) y resuspensión en un medio de lavado (Ondrej, 1985). En el caso de suspensiones de protoplastos que contienen muchos residuos, se puede utilizar la flotación de protoplastos en un gradiente. Entonces, los protoplastos se mezclan con sacarosa al 20% y se cubren con medio de lavado. Tras la centrifugación, los protoplastos flotantes se recogen del anillo en la capa superior de sacarosa, mientras que los orgánulos y los residuos celulares se encuentran en el *pellet* del fondo del tubo de ensayo de centrifugación. El lavado se repite 2-3 veces. El gradiente separa los protoplastos obtenidos de diferentes tejidos y hojas de la misma edad que permiten obtener material homogéneo (Navrátilova, 2004). Los protoplastos purificados deben carecer de cualquier pared celular detectable y ser viables (Graham, 2002).

Medios de cultivo para protoplastos

Habitualmente los medios de cultivo de protoplastos son semejantes a los destinados al cultivo de células y tejidos *in vitro*. No obstante, los protoplastos aislados necesitan una estabilización osmótica lograda a través del aditamento de elevadas concentraciones de manitol o glucosa, en el medio de cultivo (un ejemplo de ello, 0.35 M de glucosa en el caso de cultivo de protoplastos de yuca (*Manihot sculenta* L.). Los protoplastos parecen aprovecharse de altas concentraciones de iones de Ca^{2+} en el medio (600-900 mg l^{-1} CaCl_2), que favorecen la estabilización de la membrana celular. Aparte de estas modificaciones, el medio de cultivo de protoplastos ordinariamente es enriquecido mediante la adición de vitaminas, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, hidrolizado de caseína o agua de coco (Szabados *et al.*, 1987; Szabados, 1991).

CULTIVO DE PROTOPLASTOS

Mediante el cultivo de protoplastos puede llegar a ser inducida la organogénesis o el desarrollo de una planta completa. Para lograr estas fases, el cultivo de protoplastos debe primero formar un callo cuyo crecimiento es lento y heterogéneo. La composición del medio de cultivo del callo es fundamental para su desarrollo (Davey *et al.*, 2005; Márquez, 2019).

El tipo de cultivo a desarrollar debe considerar las particularidades y propiedades de la especie y la elección de la muestra. El medio de cultivo y sus condiciones deben controlarse durante todo el proceso del cultivo. Los medios de crecimiento apropiados deben contar con fuentes suficientes de carbono y nitrógeno, una ordenada relación de macro y micronutrientes y reguladores del crecimiento entre otros elementos. Estos son los constituyentes principales que deben estar presentes. Otros factores como el pH, la iluminación, la aireación y la temperatura también pueden influir en el crecimiento. No obstante, la optimización también puede variar en función de la especie y del órgano de procedencia del explante (Szabados, 1991; Davey *et al.*, 2005).

Condiciones de cultivo de protoplastos

En condiciones apropiadas de cultivo *in vitro*, los protoplastos reconstruyen una nueva pared y luego se dividen para formar colonias de células, a partir de las cuales se pueden desarrollar plántulas (Wiszniewska y Pindel, 2009). El pH de la solución de maceración afecta la activación enzimática e influye en el rendimiento obtenido de protoplastos (Amroune, 2011). El cultivo exitoso de protoplastos y una mayor fusión requiere una población pura de alta densidad de protoplastos viables e intactos. Por lo tanto, los protoplastos deben separarse del material vegetal no digerido (detritos), los protoplastos inviables y las enzimas (Echeverri *et al.*, 2019). Aunque ciertos protoplastos se pueden aislar de plántulas o de cultivos en suspensión celular, la preparación de esos tejidos donantes puede, en oportunidades, ser ineficaz, lenta y laboriosa (Poddar *et al.*, 2020).

FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

La mejora genética de plantas para obtener características deseables a través del cultivo de protoplastos y su regeneración se están volviendo especialmente significativos debido a la hibridación somática y la posible transformación del protoplasto, para especies vegetales usadas para la alimentación y la ornamentación. En este sentido, un protocolo exitoso para el aislamiento, cultivo y regeneración de protoplastos es un paso clave hacia la manipulación genética de plantas y un programa de mejoramiento combinado (Ahmed *et al.*, 2021).

La fusión de protoplastos es un método conveniente para transferir genes entre variedades o especies para desarrollar nuevas variedades con características deseables, como calidad y rendimiento. Dicha tecnología incluye la fusión entre dos protoplastos genéticamente distintos derivados de diversas células somáticas para obtener híbridos de protoplastos parasexuales. Sin embargo, para implementar la fusión de protoplastos, es preciso un sistema de cultivo de tejidos establecido de manera eficiente, incluido el aislamiento de protoplastos y su regeneración. Los protoplastos de plantas son un modelo experimental basado en células, por lo que pueden emplearse para incorporar macromoléculas, por

ejemplo, ADN, ARN y proteínas, utilizando varios enfoques, incluida la electroporación, la transformación asistida por Polyethyleneglicol (PEG) y la microinyección (Ahmed *et al.*, 2021).

Los protoplastos al fusionarse forman híbridos somáticos con la unión de sus citoplasmas y núcleos. Cuando se produce la fusión de citoplasmas entre dos protoplastos, con la presencia del núcleo de uno solo de estos, da origen a un híbrido citoplasmático, el cual puede ser homocariones (fusión de protoplastos de dos plantas de la misma especie) y heterocariones (de diferentes especies). En otras palabras, la célula de una especie A, se fusiona una de la especie B y da origen a una especie completamente nueva, o dos células de la misma especie se fusionan entre ellas (Montero-Carmona y Jiménez; 2009; Márquez, 2019).

Obtenidas las características deseadas pueden emplearse tres tipos diferentes de cultivo: cultivo de células *in vitro* (usualmente asistido de diferentes procesos para mejorar la producción), cultivo de órganos vegetales u organogénesis (en oportunidades únicamente interesa cultivar selectivamente ciertas partes de una especie) y la regeneración completa de una planta (cuando dada la modificación o hibridación se produce una especie totalmente nueva) (Márquez, 2019).

Desde otra perspectiva, los protoplastos se utilizan para producir nuevos cultivos, en plantas con barreras de incompatibilidad en la hibridación sexual, mediante la fusión de protoplastos (Naing *et al.*, 2021). Los protoplastos aislados también pueden fusionarse espontáneamente y este fenómeno se denomina fusión espontánea. Durante el procesamiento enzimático de protoplastos de células adyacentes, se fusionan por sus plasmodesmos para formar protoplastos multinucleados (Gares y Saidi, 2016).

En el caso de la electroporación de protoplastos, esta se utiliza para introducir macromoléculas exógenas como el ADN en las células vegetales al cambiar reversiblemente la permeabilidad de la membrana plasmática. El método de fusión química más utilizado consiste en usar PEG, cationes de calcio (Ca^{2+}) y pH elevado (entre 9 y 11). Durante este proceso las membranas plasmáticas de los protoplastos se ponen en contacto, y se forma puentes citoplasmáticos entre ellas que son promovidos por el uso del PEG. Por otro lado, el alto pH y la elevada concentración de Ca^{2+} reducen la carga negativa neta que hay en la superficie de las membranas, que disminuye la repulsión y facilita este contacto inicial. Finalmente, las interconexiones citoplasmáticas entre las células se expanden y dan lugar a una fusión de los protoplastos. Se trata de un proceso complejo en el que hay que cuidar mucho tanto la concentración de PEG (15%-45%) como la concentración de protoplastos en la suspensión (un 4%-5% aproximadamente). Cuando se retiren los híbridos somáticos de la solución, tendrá que hacerse poco a poco lavando con solución alcalina y reduciendo la concentración de PEG progresivamente (Márquez, 2019).

Por otra parte, la electrofusión utiliza campos eléctricos intensos y de corta duración que, al desestabilizar las membranas, conducen a la fusión de los protoplastos. El último paso es inducir la división de las células y da lugar a la formación de callos. Luego, se hace que la diferenciación de tejidos conduzca a la regeneración de una planta completa (Djoudi y Hadji, 2020).

OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS A TRAVÉS DEL CULTIVO DE PROTOPLASTOS

Los protoplastos han sido fundamentales para estudiar muchos aspectos de la biología vegetal, incluida la hibridación, las actividades relacionadas con la luz / cloroplasto, los mecanismos de defensa de las plantas y de respuesta la estrés (Zhao *et al.*, 2016; Gilliard *et al.*, 2021).

El uso más prometedor de los protoplastos para la mejora de las plantas es la hibridación celular, ya que mediante técnicas apropiadas es posible inducir la fusión entre protoplastos de plantas que normalmente no hibridan sexualmente (Roberts y Schum, 2003; Marques *et al.*, 2012). La fusión de protoplastos entre diferentes variedades de especies y géneros es fácil, pero la producción de híbridos somáticos viables no siempre es posible (Bhatia, 2015).

La hibridación interespecífica se utiliza para la incorporación de genes de especies silvestres en el genotipo. Si la hibridación no es posible debido a la incompatibilidad del polen y el estigma, podrían obtenerse híbridos interespecíficos mediante técnicas de fusión de protoplastos, seguidas de la regeneración del producto de fusión o mediante técnicas de rescate de embriones y otros métodos (Pavelek *et al.*, 2020).

CULTIVO DE PROTOPLASTOS EN GÉNERO *VASCONCELLEA*

Los protoplastos son una herramienta biotecnológica útil para la mejora de las plantas (Barceló *et al.*, 2019). En *Vasconcellea*, se han realizado muy pocos estudios sobre tecnología de protoplastos. Se han estandarizado protocolos efectivos para el aislamiento y fusión de protoplastos de babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) y jigacho (*Vasconcellea pubescens*), de callo y hoja respectivamente (Rivera y Jadán, 2010).

Las fuentes de explantes en el género *Vasconcellea* para el trabajo con protoplastos generalmente son las hojas (Tabla 2).

Tabla 2. Fuentes de explantes para aislamiento protoplastos del género *Vasconcellea*.

Especies	Fuentes de protoplastos	Referencia
<i>Vasconcellea</i> sp.	Hojas jóvenes y adultas, cotiledones, suspensiones celulares de embriones somáticos y callos provenientes de hojas e hipocótilos	Carvajal, 2020
<i>V. pubescens</i> ; <i>V. parviflora</i>	Hojas, cotiledones	Fitch, 2022
<i>Vasconcellea</i> spp.	Hojas	Dhekney <i>et al.</i> , 2016
<i>V. quercifolia</i>	Mesófilo de la hoja	Drew <i>et al.</i> , 2014

Desafortunadamente aún falta mucho por investigar ya que la mayoría de especies se encuentran en estado silvestre y amenazadas por un alto grado de erosión genética (Morales *et al.*, 2004). Además, en vista de las graves pérdidas económicas causadas por organismos fitopatógenos, la tecnología de fusión de protoplastos, es económica, sencilla y puede ser una solución doble (Hayat y Christias, 2010).

Las plantas híbridas desarrolladas a partir de cultivos de protoplastos postfusionados se pueden identificar basándose en análisis morfológico, citológico (recuento de cromosomas, análisis de citometría de flujo y análisis de isoenzimas) y análisis molecular (marcadores de ADN) (Tapingkae *et al.*, 2012).

Técnicas como el cultivo *in vitro* tienen como objetivo mejorar los tiempos de producción de plantas de babaco y obtener plantas libres de enfermedades y genéticamente mejoradas (Jadán y Dorca, 2019).

HIBRIDACIÓN INTERGENÉRICA DEL GÉNERO *VASCONCELLEA*

Es importante señalar que en la revisión documental efectuada en las bases de datos seleccionadas no se ubicaron estudios divulgados con respecto a la hibridación somática intraespecífica e interespecífica del género *Vasconcellea*, así como de la hibridación, sino solamente de la hibridación intergenérica con Papaya (*Caraca papaya* L.).

La papaya es aquejada por una serie de organismos nocivos, uno de ellos es el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-P, abreviatura en inglés), el cual genera una enfermedad muy destructiva que perjudica a los frutos y se encuentra presente en gran parte de las áreas de cultivo a nivel mundial (Teixeira-Da Silva *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Vista la relevancia económica de la producción de la papaya se han procurado opciones para mejorarla genéticamente. Una alternativa es la hibridación somática partiendo de protoplastos. El género *Vasconcellea* constituye el aspirante más prometedor para alcanzar este fin (Jordan *et al.*, 1986; Kyndt y Gheysen, 2007). Una realidad favorable es que muchos integrantes de este género presentan alta resistencia al virus PRSV-P, y conjuntamente, tienen mejor sabor, y una elevada tolerancia al frío, con relación a *C. papaya* (Carvajal, 2020).

Por ejemplo, en cuanto a la hibridación intergenérica con *Vasconcellea cauliflora*, Magdalita *et al.* (1996) hicieron cruces de *C. papaya* x *Vc* y rescataron embriones F_1 *in vitro* para desarrollar individuos híbridos. Las plantas híbridas fueron inoculadas de forma artificial con dos aislados de PRSV-P procedentes de Australia. De un total de 114 plantas que fueron inoculadas en el invernadero, 22 lograron sobrevivir y el 100% no desarrolló síntomas de infección por virus. En un lote diferente de 20 plantas híbridas cultivadas a campo abierto, 12 sobrevivieron y ninguna desarrolló infección por virus, hecho que se confirmó mediante la técnica ELISA.

Otra opción para obtener embriones intergenéricos sería eliminar la incompatibilidad existente en los cruces artificiales entre papaya y *Vc*. En este orden de ideas, Dinesh *et al.* (2007), aplicaron una solución de sacarosa al 5% a los estigmas florales previo a la polinización manual y lograron semillas híbridas en los cruces entre las variedades de papaya *Surya* y *Pusa Dwarf* x *Vc*. Un 71.1%

de las flores que fueron polinizadas además de dar frutos produjeron en promedio 13.7 semillas F_1 . Usando marcadores moleculares ISSR, los autores confirmaron que las semillas eran híbridos interespecíficos.

Más adelante, Jayavalli *et al.* (2011) y Jayavalli (2012) efectuaron hibridaciones entre *Vc* y nueve variedades de papaya de la India con la aplicación de soluciones de sacarosa al 5% combinadas con cloruro de calcio y boro. De las 1197 flores que fueron polinizadas el 25.7% logró dar frutos y cada uno de ellos en promedio dio 2.3 semillas híbridas de las cuales germinó el 58.1%. Las plantas F_1 tuvieron un buen comportamiento y fueron inoculadas con PRSV-P. El 23.6% no desarrolló síntomas virales, pero en el porcentaje restante se observó un mosaico y deformación de hojas. Se determinó que *Pusa Nanha* x *Vc* resultó ser el mejor híbrido intergenérico.

De igual forma, Sudha *et al.* (2013) valoraron una generación F_2 de cruces entre las variedades *Vc* y *Pusa Nanha*, CP50 y CO7. De 700 plantas F_2 inoculadas con PRSV-P, solo el 46% de ellas no evidenció síntomas de infección viral. Tomando en cuenta el número de días desde la fecha de inoculación hasta la aparición de los síntomas, así como su gravedad, la familia que resultó mejor fue la F_2 procedente del cruce entre *Pusa Nanha* x *Vc*. Luego, utilizando una generación F_3 , Sudha *et al.* (2015), analizaron 1778 plantas F_3 que fueron inoculadas con PRSV-P y encontraron que el 30.7% no presentó síntomas de infección viral luego de 27 días. Por tanto, según la escala de gravedad, fueron consideradas resistentes; el resto del porcentaje de plantas fueron clasificadas susceptibles y altamente susceptibles. Cuando las plantas resistentes fueron llevadas al invernadero y evaluadas hasta 270 días posterior a la inoculación, las plantas procedentes de los cruces entre *Pusa Nanha* x *Vc* fueron resistentes y medianamente resistentes.

Jayavalli *et al.* (2015) investigaron una generación F_2 a partir de cruces CO7 x *Vc*, *Pusa Nanha* x *Vc* y CP50 x *Vc*. En consecuencia, lograron inocular 683 plántulas de los tres cruces con PRSV-P, y determinaron que el 12.8% no presentaba síntomas de infección, pero en un ensayo de detección de virus mediante DAS-ELISA obtuvieron valores de absorbancia bajos (<0.24). En un cruce CO7 x *Vc* lograron ejemplares resistentes en una proporción de susceptibles: resistentes equivalente a 15: 1; en tanto que en los otros dos cruces (*Pusa Nanha* x *Vc* y CP50 x *Vc*), los ejemplares resistentes se relacionaron en una proporción de 13: 3.

La estructura genética planteada por Jayavalli *et al.* (2015), sugiere que la presencia de dos genes dominantes puede explicar la proporción de individuos susceptibles. Observaron que no se dio segregación en una proporción de 3: 1 como lo explica la Ley de Mendel. De la misma forma, las proporciones observadas indicaron que existen múltiples alelos en ambas especies que al interactuar producen combinaciones genéticas asociadas al virus PRSV-P.

La hibridación intergenérica del género *Vasconcellea* procedente de combinaciones con variedades de *Carica papaya* ha sido informada por diferentes autores (Tabla 3).

Tabla 3. Hibridación intergenérica del género *Vasconcellea* con *Carica papaya*.

Combinaciones	Referencia
<i>V. parviflora</i> + <i>Carica papaya</i> L; <i>V. goudotiana</i> + <i>Carica papaya</i> L; <i>V. cundinamarcensis</i> + <i>Carica papaya</i> L; <i>V. quercifolia</i> + <i>Carica papaya</i> L	Droogenbroeck et al., 2005
<i>V. Cauliflora</i> + <i>Carica papaya</i> ; <i>V. pubescens</i> + <i>Carica papaya</i>	Drew et al., 2007
<i>V. pubescens</i> + <i>V. parviflora</i> + <i>Carica papaya</i> L	O'Brien y Drew, 2009
<i>V. quercifolia</i> + <i>C. papaya</i> ; <i>V. parviflora</i> + <i>C. papaya</i> ; <i>V. pubescens</i> + <i>C. papaya</i> ;	O'Brien y Drew, 2010
<i>C. papaya</i> + <i>V. quercifolia</i>	Siar et al., 2011
<i>V. quercifolia</i> + <i>Carica papaya</i> ; <i>V. cauliflora</i> + <i>Carica papaya</i>	Sharma y Tripathi, 2014
<i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> + <i>Carica papaya</i>	Tarora et al., 2016
<i>Carica papaya</i> + <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	Tarora et al., 2018
<i>V. cundinamarcensis</i> + <i>Carica papaya</i> ; <i>V. parviflora</i> + <i>Carica papaya</i>	Sharma y Tripathi, 2021

CONCLUSIONES

Atendiendo a la literatura científica analizada, se establece que las técnicas de aislamiento, purificación y fusión de protoplastos en el género *Vasconcellea* permiten obtener células con características esperadas y mediante el proceso de fusión, transferir genes entre variedades o especies para mejorar su calidad y producción. Estos procesos requieren de una población pura de alta densidad de protoplastos viables e intactos, los cuales se pueden controlar mediante protocolos eficientes de purificación y cultivo debidamente estandarizados. La fuente de protoplastos para experimentar con el género *Vasconcellea* y *Carica papaya* que se emplearon son generalmente hojas.

Es importante resaltar que no se encontraron estudios con respecto a la hibridación somática intraespecífica e interespecífica del género *Vasconcellea*, sino solamente de la hibridación intergenérica con papaya para la búsqueda de resistencia al virus de la mancha anular.

REFERENCIAS

Ahmed M, Miao M, Pratsinakis E, Zhang H, Wang W, Yuan Y, Lyu M, Iftikhar J, Ahmed F, Modesis P, Wu B (2021) Protoplast Isolation, Fusion, Culture and Transformation in the Woody Plant *Jasminum* spp. *Journal of Agriculture* 11(8): 699; doi: 10.3390/agriculture11080699

Amroune A (2011) Isolement, Purification et culture de protoplastos de *Datura stramonium*. Doctoral Thesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, Alger

Anand G, Yadav S, Gupta R, Yadav D (2020) Pectinases: from microbes to industries. En: Chowdhary P, Raj A, Verma D, Akhter Y (Eds). *Microorganisms for*

Sustainable Environment and Health, pp. 287-313. Elsevier, London; doi: 10.1016/B978-0-12-819001-2.00014-0

Badillo VM (2000) *Carica* L. vs. *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae): con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10: 74–79

Barceló M, Wallin A, Medina J, Gil D, López G, Juárez J, Sánchez J, López C, López J, Mercado J, Pliego F (2019) Isolation and culture of strawberry protoplasts and field evaluation of regenerated plants. *Scientia Horticulturae* 256: 108552; doi: 10.1016/j.scienta.2019.108552

Bhatia S (2015) Application of Plant Biotechnology. En: Bhatia S, Sharma K, Dahiya R, Bera T (Eds). *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, pp. 157-207. Elsevier, London; doi: 10.1016/C2014-0-02123-5

Burris K, Dlugosz E, Collins A, Stewart C, Lenaghan S (2016) Development of a rapid, low-cost protoplast transfection system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Cell Reports* 35: 693-704; doi: 10.1007/s00299-015-1913-7

Carvajal P (2020) Hibridación somática de *Carica papaya* var. *pococi* y *Vasconcellea* sp. (Brassicales: Caricaceae) mediante electrofusión de protoplastos. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Carvalho F, Renner S (2014) The Phylogeny of the *Caricaceae*. En: Ming R, Moore P (Eds). *Plant Genetics and Genomics*, pp. 81-92; Springer, New York; doi: 10.1007/978-1-4614-8087-7_5

Chamani E, Tahami K, Zare N, Zakaria R (2012) Effect of Different Cellulase and Pectinase Enzyme Treatments on Protoplast Isolation and Viability in *Lilium ledebourii* Bioss. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40(2): 123-128; doi: 10.15835/nbha4028055

Chawla H (2009) *Introduction to Plant Biotechnology*. CRC Press, New York

Cocking E (2000) Turning point article plant protoplasts. *In Vitro Cell Dev Biol* 36 (2): 1-6; doi: 10.1007/s11627-000-0018-2

Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv* 23(2):131-71; doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.09.008

Dhekney S, Kandel R, Bergeya D, Sittther V, Soorianathasundaram K, Litz R (2016) Advances in papaya biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 5: 133-142

Dinesh M, Rekha A, Ravishankar K, Praveen K, Santosh L (2007) Breaking the intergeneric crossing barrier in papaya using sucrose treatment. *Scientia Horticulturae* 114: 33–36; doi: 10.1016/j.scienta.2007.05.010

Djoudi N, Hadji B (2020) Application de la biotechnologie de la culture *in vitro* pour les plantes médicinales. Maestría Académica (En biotecnología vegetal), Université Mohamed Boudiaf - M'Sila, Algerienne, Italia

Dodds JH (1983) The use of protoplast technology in tissue culture of trees. En: Dodds JH (Eds). Tissue Culture of Trees , pp. 103-112. Springer, Boston

Drew R (2016) Applications of biotechnology to tropical fruit crops in australia and worldwide. Acta Horticulture 1-8; doi: 10.17660/ActaHortic.2008.787.18

Drew R, Kyndt T, Scheldeman X (2014) *Vasconcellea* for Papaya Improvement. En: Ming R, Moore PH (Eds). Genetics and Genomics of Papaya, pp. 47-79. Springer, Dordrecht; doi: 10.1007/978-1-4614-8087-7_4

Drew R, Siar S, Dillon S, Ramage C, O'Brien C, Sajise A (2007) Intergeneric hybridisation between *Carica papaya* and wild *Vasconcellea* species and identification of a PRSV-P resistance gene. Acta Hortic 738: 165-169; doi: 10.17660/ActaHortic.2007.738.14

Droogenbroeck B, Haegeman A, Kyndt T, O'Brien C, Drew R, Gheysen G (2005) Maternal inheritance of cytoplasmic organelles in intergeneric hybrids of *Carica papaya* L. and *Vasconcellea* spp. (*Caricaceae* Dumort., *Brassicales*). Euphytica 143: 161-168; doi: 10.1007/s10681-005-3156-0

Droogenbroeck B, Kyndt T, Romeijn P, Thuyné W, Motochi J, Gheysen G (2006) Evidence of Natural Hybridization and Introgression between *Vasconcellea* Species (*Caricaceae*) from Southern Ecuador Revealed by Chloroplast, Mitochondrial and Nuclear DNA Markers. Annals of Botany 97 (5): 793-805; doi: 10.1093/aob/mcl038

Duquenne B, Eeckhaut T, Werbrouck S, Huylenbroeck J (2007) Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. Plant Cell Tiss Organ Cult 91:165-173; doi: 10.1007/s11240-007-9226-3

Echeverri D, Romo J, Giraldo N, Atehortúa L (2019) Microalgae protoplasts isolation and fusion for biotechnology research. Revista Colombiana de Biotecnología 21(1): 101-112; doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.80248

Fitch M (2022) Biotechnology of fruit and nut Crops. En: Litz RE (Ed). *Caricaceae-Carica papaya*, pp. 174-201. CAB International, London; ISBN: 9781780648279

Fowke L, Gamborg O (1980) Applications of Protoplasts to the Study of Plant Cells. International Review of Cytology 68: 9-51; doi: 10.1016/S0074-7696(08)62306-2

Fuertes C (2019) Diversidad, distribución y uso del género *vasconcellea* (*caricaceae*) en el sur de los andes colombianos. Tesis de Pregrado, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

Gares M, Saidi S (2016) Etude de l'amélioration de la production d'éthanol par la technique de fusion des protoplastes entre deux souches fongiques. Mémoire

présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie Filière, Université des Frères Mentouri Constantine. Constantina, Argelia

Graham J (2002) Purification of intact plant protoplasts by flotation at 1g. The Scientific World Journal (2002) 2: 1397-1399; doi: 10.1100/tsw.2002.835

Gray A (1993) Broccoli: *Brassica oleracea* L. (Italica group). En: Kalloo G, Bergh BO (Eds). Genetic Improvement of Vegetable Crops, pp. 61-86. Pergamon, Roma; doi: 10.1016/B978-0-08-040826-2.50010-2

Gilliard G, Huby E, Cordelier S, Ongena M, Dhondt-Cordelier S, Deleu M (2021) Protoplast: A Valuable Toolbox to Investigate Plant Stress Perception and Response. Front Plant Sci (5)12:749581; doi: 10.3389/fpls.2021.749581

Hayat S, Christias C (2010) Isolation and fusion of protoplasts from the phytopathogenic fungus. *Sclerotium rolfsii*. Brazilian Journal of Microbiology 41(1): 1-11; doi: 10.1590/S1517-838220100001000035

Ishii S (1989) Enzymes for the Isolation of Protoplasts. En: Bajaj YPS (eds). Plant Protoplasts and Genetic Engineering I, pp. 23-33. Springer, Berlín; doi: 10.1007/978-3-642-73614-8_2

Jadán M, Dorca C (2019) Propagation methods in Babaco plants (*Vasconcella x helbornii*). Tropical Plant Research 6(1): 37-45; doi: 10.22271/tpr.2019.v6.i1.007

Jayavalli R, Balamohan T, Manivannan N, Govindaraj M (2011) Breaking the intergeneric hybridization barrier in *Carica papaya* and *Vasconcellea cauliflora*. Scientia Horticulturae 130(7): 87-794; doi: 10.1016/j.scienta.2011.09.004

Jayavalli R, Balamohan T, Manivannan N, Shahidul IR (2012) Analysis of papaya intergeneric hybrids for morphological traits. Madras Agriculture Journal 99(4-6): 166-170

Jayavalli R, Balamohan T, Manivannan N, Rabindran R, Paramaguru P, Robin R (2015) Transmission of resistance to papaya ringspot virus (PRSV) in intergeneric populations s of *Carica papaya* and *Vasconcellea cauliflora*. Scientia Horticulturae 187: 10-14; doi: 10.1016/j.scienta.2015.01.020

Jordan M, Ciudad G, Roja M, Valverde F (1986) Isolation, culture and fusion of *Carica candamarcensis* and *Carica papaya* protoplasts. Gartenbauwissenschaftl 51(4): 175-178

Kang H, Naing A, Kim C (2020) Protoplast Isolation and Shoot Regeneration from Protoplast-Derived Callus of *Petunia hybrida* Cv. *Mirage rose*. Biology: 1-8; doi: 10.3390/biology9080228

Kozlowski T, Pallardy S (1997) Growth Control in Woody Plants. Academic Press, California; ISBN: 0-12-424210-3

Kyndt T, Gheysen G (2007) Evolutionary relationships between and within the highland papayas (Genus *Vasconcellea*) and the common papaya (*Carica papaya*). ISHS Acta Horticulturae 740: 61-72; doi: 10.17660 / ActaHortic.2007.740.6

Lin HY, Chen JC, Fang SC (2018) A protoplast transient expression system to enable molecular, cellular, and functional studies in phalaenopsis orchids. Front Plant Sci 9:843; doi: 10.3389/fpls.2018.00843

Magdalita P, Adkins S, Godwin I, Drew R (1996) An Improved Embryo-Rescue Protocol for a *Carica* Interspecific Hybrid. Australian Journal of Botany 44: 343-353; doi: 10.1071/BT9960343

Mariño M (2019) Determinación del cariotipo de jigacho (*Vasconcellea stipulata* Badillo) mediante técnicas citogenéticas. Tesis de Pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí, Ecuador

Marques J, Paiva R, Atala L, Rodrigues M, Alves M, Carvalho F, Campos W (2012) Protoplast production and isolation from *Etilingera elatior*. Acta Scientiarum-Agronomy 1-17; doi: 10.1590/S1807-86212012000100007

Márquez F (2019) El cultivo de protoplastos como herramienta biotecnológica aplicable a las plantas medicinales. Tesis de Pregrado, Universidad Complutense, Facultad de Farmacia, Madrid, España

Mastuti R, Rosyidah M (2019) *In vitro* enzymatic isolation of protoplasts from tissues of the medicinal plant *Physalis angulata* L. AIP Conference Proceedings 2019 (1): 1-9; doi: 10.1063/1.5061838

Morales A, Medina D, Yaguache B (2004) Genetic diversity, phylogeny and geographic distribution of the genus *Vasconcellea* in Southern Ecuador. Lyonia 7: 4-15

Nagata T, Takebe I (1971) Planting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Springer Planta (Berl) 99: 12-20

Naing A, Suleimon O, Kil C (2021) Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement. Scientia Horticulturae 283: 1-9; doi: 10.1016/j.scienta.2021.110043

Navrátilova B (2004) Protoplast cultures and protoplast fusion focused on *Brassicaceae* – a review. Hort Sci (PRAGUE) 31(4): 140-157; doi: 10.17221/3809-HORTSCI

O'Brien C, Drew R (2009) Potential for using *Vasconcellea parviflora* as a bridging species in intergeneric hybridisation between *V. pubescens* and *Carica papaya*. Australian Journal of Botany 57(7): 592-601; doi: 10.1071/BT09111

O'Brien C, Drew R (2010) Marker-assisted hybridisation and backcrossing between *Vasconcellea* species and *Carica papaya* for PRSV-p resistance. ISHS Acta Horticulturae 859: 361-368; doi: 10.17660/ActaHortic.2010.859.43

ONDŘEJ M (1985) Cytogenetika a molekulární genetika rostlin. Academia, Praha

Ondráčková E, Ludvíková M, Griga M (2020) Developments in fibrous flax and linseed breeding and cultivation. n: Kozłowski RM, Mackiewicz-Talarczyk M (Eds). Handbook of Natural Fibres, pp. 605-692. Woodhead Publishing, Cambridge; doi: 10.1016/b978-0-12-818398-4.00019-0

Pavelek M, Prokopová V, Ondrackova M, Ludvikova M, Griga M (2020) Developments in fibrous flax and linseed breeding and cultivation. En: Kozłowski RM, Mackiewicz-Talarczyk M (Eds). Handbook of Natural Fibres, pp. 605-692. Woodhead Publishing, Cambridge; doi: 10.1533/9780857095503.2.391

Poddar S, Tanaka J, Cate J, Staskawicz B, Cho M (2020) Efficient isolation of protoplasts from rice calli with pause points and its application in transient gene expression and genome editing assays. Plant Methods 16: 151; doi: 10.1186/s13007-020-00692-4

Restrepo M, Eeckenbrugge G, Jiménez D, Veja J (2004) Morphological diversity of cultivated mountain papayas (*Vasconcellea* spp.) in Ecuador. Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture 48: 119-123

Rivera U, Jadán M (2010) Aislamiento, purificación y fusión de protoplastos, obtenidos a partir de hojas *in vitro* y callos friables de babaco (*Vasconcellea heibornii*) y jigacho (*Vasconcellea stipulata*). EIDOS 3-7; doi: 10.29019/eidos.v

Roberts AV, Schum A (2003) Cell, tissue and organ culture. En: In Roberts AV, Debener T, Gudin S (eds). Encyclopedia of rose science, 57-66. Elsevier Academic Press, Pune; doi: 10.1016/B0-12-227620-5/00124-5

Salvatierra M, Jana C (2015) Floral expression and pollen germination ability in productive mountain papaya (*Vasconcellea pubescens* A.DC.) orchards. Revista Chilena de Investigación Científica 76(2): 136-142; doi: 10.4067/S0718-58392016000200001

Scheldeman X, Kyndt T, d'Eeckenbrugge G, Ming R, Drew R, Van Droogenbroeck B, Van Damme P, Moore P (2011) *Vasconcellea*. En: Kole C (ed). Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, pp. 213-249. Springer-Berlin-Heidelberg, Dordrecht; doi: 10.1007/978-3-642-20447-0_11

Scheldeman X, Willemen L, Coppens G, Romeijn E, Restrepo M, Romero J, Jiménez D, Lobo M, Medina C, Reyes C, Rodriguez D, Ocampo Jhon, Van Damme P, Goetgebeur P (2007) Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papaya (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical America. En: Hawksworth DL, Bull AT (eds). Biodiversity and Conservation, pp. 293-310. Springer, Dordrecht; doi: 10.1007/978-1-4020-6444-9_19

Sharma SK, Tripathi S (2014) Papaya ringspot virus-P In Plant Virus-Host Interaction: Molecular Approaches and Viral Evolution. Academic Press, Pune; doi: 10.1016/B978-0-12-411584-2.00009-3

Sharma SK, Tripathi S (2021) Overcoming limitations of resistance breeding in *Carica papaya* L. against papaya ringspot virus—Recent approaches En:

Lashmangarh S (Ed). Plant Virus-Host Interaction Molecular Approaches and Viral Evolution, pp. 489-506. Academic Press, Pune; doi: 10.1016/B978-0-12-821629-3.00008-7

Siar SV, Beligan GA, Sajise AJ, Villegas VN, Drew RA (2011) Papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya* via introgression from *Vasconcellea quercifolia*. Euphytica 181: 159-168; doi: 10.1007/s10681-011-0388-z

Sudha R, Balamohan T, Soorianathasundaram K, Manivannan N, Rabindran R (2013) Evaluation of F2 intergeneric population of papaya (*Carica papaya* L.) for resistance to papaya ringspot virus (PRSV). Scientia Horticulturae 158: 68-74; doi: 10.1016/j.scienta.2013.04.031

Sudha R, Balamohan T, Soorianathasundaram K, Rabindran R, Manoranjitham S (2015) Studies on resistance to papaya ring spot virus (PRSV) in intergeneric populations of *Carica papaya* L. and *Vasconcellea cauliflora*. SABRAO Journal of Breeding and Genetics 47(2): 113-123

Szabados L (1991) Protoplasto: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. En: Roca WM, Mrogisnski LA (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura, Fundamentos y aplicaciones, 239-270. CIAT, Cali; ISBN: 958-9183-15-8

Szabados L, Narváez J, Roca W (1987) Técnicas para el Aislamiento y Cultivo de Protoplastos de Yuca (*Manihot esculenta Crantz*). CIAT, Cali

Tapingkae T, Zulkarnain Z, Ikeda T, Kawaguchi M (2012) Somatic (asexual) procedures (haploids, protoplasts, cell selection) and their applications. Plant Biotechnology and Agriculture 141-162; doi: 10.1016/B978-0-12-381466-1.00001-8

Tarora K, Shudo A, Kawano S, Yasuda K, Ueno H, Matsumura H, Urasaki N (2016) Development of plants resistant to Papaya leaf distortion mosaic virus by intergeneric hybridization between *Carica papaya* and *Vasconcellea cundinamarcensis*. Japanese Society of Breeding 66(5): 734-741; doi: 10.1270/jsbbs.16107

Torora K, Irei A, Tamaki M, Kawano S, Yasuda K, Shoda M, Urasaki N, Matsumura H (2018) Production of backcross plants between intergeneric hybrids (*Carica papaya* × *Vasconcellea cundinamarcensis*) and *C. papaya*, as a novel breeding material for Papaya leaf distortion mosaic virus resistance. Breeding Research 20(2): 115-123; doi: 10.1270/jsbbr.18j08

Teixeira Da Silva J, Rashid Z, Tan D, Sivakumar D, Gera A, Texeira M, Tennant P (2007) Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. Tree and Forestry Science and Biotechnology 1(1): 47-73

Tineo D, Bustamante D, Calderón M, Mendoza J, Huaman E, Oliva M (2020) An integrative approach reveals five new species of highland papayas (*Caricaceae*, *Vasconcellea*) from northern Peru. PLOS ONE 15(12): e0242469; doi: 10.1371/journal.pone.0242469

Tomar U, Dantu P (2010) Protoplast Culture and Somatic Hybridization. In: Tripathi GIK, (Ed). Cellular and Biochemical Sciences, pp. 876-891. International Publishing House, New Delhi

Wiszniewska A, Pindel A (2009) Protoplast culture utilization in studies on legume crops. Acta Agriculturae Scandinavica , Section B — Soil & Plant Science 60(5): 389–399; doi: 10.1080/09064710903179545

Wua J, Choub J (2019) Optimization of Protoplast Preparation and Regeneration of a Medicinal Fungus *Antrodia cinnamomea*. Journal of Mycobiology 47(4): 483–493; doi: 10.1080/12298093.2019.1687252

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(26): 5137-5142; doi: 10.5897/AJB10.1156

Zhao F, Li Y, Yang H, Gao R, Zang X, Qin D, Wang J, Qiang Y (2016) A highly efficient grapevine mesophyll protoplast system for transient gene expression and the study of disease resistance proteins. Plant Cell Tiss Organ Cult 125: 43-57; doi: 10.1007/s11240-015-0928-7

Zhao C, Randall D, Holford P, Haigh A M, Chen ZH (2019) Isolation of high purity guard cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* for omics research. Plant Growth Regul 89(1): 37-47; doi: 10.1007/s10725-019-00520-3

Financiamiento: Este trabajo no contó con fuentes de financiamiento externas.

Conflicto de interés: El autor no declara conflictos de intereses.

Contribución de los autores: Conceptualización, Metodología, Escritura: primera redacción, Escritura: revisión y edición OFAA

Disponibilidad de datos: Los datos del estudio se presentan en el artículo. Para otras consultas dirigirse al autor para correspondencia.

Como citar: Arias OF (2022) Aislamiento, cultivo y fusión de protoplastos en el género *Vasconcellea*. Biotecnología Vegetal 22: 220420

Omar Francisco Arias Andrade, <https://orcid.org/0000-0001-9689-1853>

Mónica Jadán, <https://orcid.org/0000-0003-2296-7733>

Idalmis Bermúdez-Caraballoso, <https://orcid.org/0000-0002-6991-480X>