

# AISLAMIENTO Y FUSIÓN DE PROTOPLATOS DE *Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews y *Vanilla pompona* Schiede

## ISOLATION AND PROTOPLAST FUSION OF *Vanilla planifolia* JACKS. Ex Andrews AND *Vanilla pompona* Schiede

Luis Carlos Ortega Macareno<sup>1</sup>, Lourdes Georgina Iglesias Andreu<sup>2</sup>,  
Javier Darío Beltrán Herrera<sup>1</sup>, Marco Antonio Ramírez Mosqueda<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidad de Sucre. Programa de Biología. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Grupo de Investigación en Biotecnología Vegetal

<sup>2</sup> Universidad Veracruzana. Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Av. de las Culturas Veracruzas No. 101, Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Col. Emiliano Zapata, Xalapa, Veracruz, México

Recibido: Octubre 15 de 2016

Aceptado: Noviembre 10 de 2016

\*Correspondencia del autor: Javier Darío Beltrán Herrera. Barrio Puerta Roja, Sincelejo, Sucre, Colombia. E-mail: javier.beltran@unisucra.edu.co

### RESUMEN

Con el fin de mejorar los procesos de producción de vainilla se propone el aislamiento y fusión de protoplastos de *V. planifolia* Jacks. Ex Andrews y *V. pompona* Schiede. En este proceso de mejoramiento se obtuvieron células híbridas con posible tolerancia a fusarium, hongo al cual es altamente susceptible *V. planifolia*. Para el aislamiento de protoplastos, de hojas de plántulas *in vitro*, se evaluaron tres enzimas (Celulasa-C, Pectinasa-P y Driselasa-D), combinadas en tres diferentes tratamientos-T, así: T1 (1% C +1% P), T2 (2% C + 1% P) y T3 (2% C + 1% P + 1% D). Se evaluaron variables como número de protoplastos aislados y viabilidad.

Previo a la inducción química de híbridos con polietilenglicol-PEG (4% p/v), los protoplastos de *V. pompona* se tiñeron con sales de tetrazolio (1%), para identificar las fusiones con los protoplastos no teñidos de *V. planifolia*. Como resultado, de los mejores tratamientos enzimáticos, se observa que para *V. planifolia* se dan en el tratamiento T1, y para *V. pompona* en el T2; con los siguientes porcentajes de protoplastos viables: 80.32% para *V. planifolia*, y 81.27% para *V. pompona*. En relación a la fusión de protoplastos, en el tratamiento con PEG al 4%, se obtuvieron  $3.16 \times 10^5$  protoplastos fusionados, lo que corresponde a un 15.6% de células híbridas. Lo anterior indica el gran potencial del proceso de aislamiento y producción de células híbridas del género *Vanilla* para el mejoramiento varietal del cultivo.

**Palabras claves:** *Vanilla planifolia*, Protoplastos, hibridación somática, polietilenglicol

## ABSTRACT

In order to improve vanilla production processes, isolation and protoplast fusion of *V. planifolia* Jacks. Ex Andrews and *V. pompona* Schiede was proposed. In this process of improvement is expected to obtain potentially fusarium tolerant hybrids to which *V. planifolia* are highly susceptible. For the isolation of protoplasts, from in vitro leaf plantlets, three enzymes (cellulase-C, pectinase-P and Driselase-D), were combined and evaluated in three different treatments-T: T1 (1% C + 1% P), T2 (2% C + 1% P) and T3 (2% C + P 1% + 1% D). Variables such as number of isolated protoplasts and viability were assessed. Prior to chemical hybrids induction with polyethylene glycol-PEG (4% w/v), *V. pompona* protoplasts were stained with tetrazolium salts (1%), to identify the protoplasts fusions with the unstained *V. planifolia*. As a result of the enzymatic treatments, the best for *V. planifolia* was observed in the T1 treatment; and the best for *V. pompona* in T2; with the following percentages of viable protoplasts: for *V. planifolia* 80.32%, and for *V. pompona* 81.27%. Regarding protoplast fusion, in the treatment with 4% PEG, 15.6% of hybrid cells were obtained, corresponding to  $3.16 \times 10^5$  fused protoplasts. This indicates the great potential of the protoplast isolation process and production of hybrid cells of the genus *Vanilla* for varietal crop improvement.

**Keywords:** *Vanilla planifolia*, protoplasts, somatic hybridization, polyethylene glycol.

## INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es originaria de las regiones húmedas tropicales de América Central, pero también se encuentra en forma silvestre en las selvas de América del Sur (1,2). El género *Vanilla* Plum. ex Mill. incluye la única especie de orquídea de importancia económica, aparte de las especies ornamentales. Los frutos de *V. planifolia* G. Jackson producen la vainilla comercial una vez que las cápsulas carnosas se deshidratan y fermentan (2).

Se conocen más de 110 especies del género *Vanilla*, de las cuales solo tres son cultivadas por su importancia comercial: *V. planifolia*, *V. tahitensis*, y *V. pompona*. Duval, *et al.* (3) señalan que el 95% de la vainilla que se comercializa, corresponde a la especie *V. planifolia* (la vainilla mejicana o genuina), siendo la más cultivada por su alta productividad, pero suele presentar una alta susceptibilidad a fusarium (4,5).

*Vanilla planifolia* se caracteriza por tener una reproducción sexual mediante polinización manual o asexual mediante esquejes, lo cual reduce drásticamente la base genética (4,6) y con ello al aumento de la susceptibilidad a factores bióticos de tipo patológicos, como la pudrición negra de tallos y raíces causada por *Fusarium oxysporum* f. *vanillae* (7) y abióticos como la sequía, que causa la caída prematura de los frutos o vainas (8) es así como la suma de estos problemas puede causar pérdidas de hasta el 80% en los cultivos (9,10).

Una de las herramientas de mayor utilidad para solucionar este tipo de problemas a nivel del sector agrícola, son las técnicas biotecnológicas para el mejoramiento genético vegetal: entre ellas el cultivo de tejidos, y el aislamiento y fusión de protoplastos, que buscan aumentar la producción, mejorar de la calidad, y/o obtener nuevas características de interés. También, se busca conferir resistencia a factores bióticos o abióticos perjudiciales a los cultivos (11).

Sin embargo, han sido pocos los trabajos realizados en la fusión de protoplastos entre las especies de mayor importancia del género *Vanilla* (*V. planifolia* y *V. pompona*), sólo Divakaran *et al.*, (11) han evaluado la posibilidad de obtener híbridos somáticos, en busca de generar resistencia a patógenos fúngicos como *Fusarium oxysporum*. Por ésta razón, la mayoría de los protocolos estandarizados para aislar, evaluar la viabilidad, y fusionar protoplastos en *Vanilla planifolia* suelen tener combinaciones de enzimas poco eficientes, tiempos muy prolongados de incubación para su aislamiento, una baja viabilidad de los protoplastos, así como también un bajo porcentaje de protoplastos fusionados.

Por tanto, se plantea realizar la fusión química (10,11) entre protoplastos de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*, con el fin de obtener células fusionadas viables, con el objeto de regenerar, posteriormente, plántulas tolerantes a este patógeno. Por lo tanto, establecer un protocolo eficiente para aislar, y fusionar protoplastos viables de estas dos especies del género *Vanilla* que faciliten procesos de mejoramiento de este cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

El material vegetal utilizado fue proporcionado por el Laboratorio de Cultivo de tejidos vegetales del Instituto de Biotecnología y Ecología aplicada (INBIOTECA) de Méjico. Este material consistió en vitroplantas sembradas en medios de cultivo Murashige & Skoog, y mantenidas bajo condiciones controladas a temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , una intensidad lumínica de  $50\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ , un fotoperiodo de 12 horas luz y una humedad relativa del 45-60%. Posteriormente, tejidos foliares de estos materiales fueron expuestos a los diferentes tratamientos enzimáticos para el aislamiento de los protoplastos (11).

### Preparación de los cocteles enzimáticos

Se prepararon los cocteles o soluciones enzimáticas con diferentes concentraciones de enzimas para inducir a la degradación de la pared celular. El aislamiento se realizó a partir de hojas jóvenes de plantas *in vitro* de color verde claro, mantenidas en el laboratorio bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura, para ello se establecieron 3 tratamientos (Tabla 1) con 5 repeticiones cada uno y se aplicaron independientemente a las dos especies (*V. planifolia* y *V. pompona*), para un total de 30 unidades experimentales. Cada repetición consistió en una cantidad de tejido foliar inmerso en 10 ml de coctel enzimático, según el protocolo establecido por Divakaran *et al*, (11).

**Tabla 1.** Tratamientos enzimáticos utilizados en aislamiento de protoplastos de hojas de plántulas *in vitro* de *V. planifolia* y *V. pompona*.

Tratamientos Aislamiento de Protoplastos <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>		
Tejido	Tratamiento	Concentración enzimática y estabilizador osmótico
Mesófilo de la Hoja	T1	1% Celulasa
		1% Pectinasa
		9% Manitol
	T2	2% Celulasa
		1% Pectinasa
		9% Manitol
	T3	2% Celulasa
		1% Pectinasa
		1% Driselasa
		9% Manitol

Las soluciones enzimáticas se prepararon individualmente y se refrigeraron hasta su uso. Se prepararon 30

ml de cada coctel para cada tratamiento, al interior de una cámara de flujo laminar, tomando la cantidad requerida de cada solución enzimática y haciéndola pasar por un filtro millipore de  $0.45\ \mu\text{m}$  y depositándolas en un beaker conteniendo 15 ml de una solución estéril de manitol al 9%, adicionándole un volumen 35 ml de agua destilada estéril, hasta alcanzar un volumen final de 50 ml. Cada solución enzimática se distribuyó en otros cuatro beakers, de manera que cada unidad experimental tuviera 10 ml de solución enzimática, éste procedimiento se realizó para cada especie.

### Aislamiento de protoplastos de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona* a partir de mesófilo de hojas de vitroplántulas.

Se pesaron 0.5 gr de hojas jóvenes de las vitroplántulas para cada una de las unidades experimentales de cada tratamiento. Los tejidos de cada unidad experimental se maceraron, y luego se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas, bajo condiciones de oscuridad y agitación orbital constante a 700 rpm. En cada tratamiento, para determinar el número de protoplastos aislados con respecto al tiempo de incubación, se realizaron observaciones microscópicas a intervalos de dos horas durante 8 horas, utilizando la cámara de Neubauer y un contador manual. Una vez culminado el tiempo de incubación, se caracterizaron microscópicamente los protoplastos de cada tratamiento, evaluándose variables como forma y tamaño de los protoplastos recién aislados.

### Purificación de los protoplastos aislados de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*.

Los protoplastos aislados se purificaron para obtener los protoplastos viables de cada tratamiento, y de cada especie para llevar a cabo la fusión química. Todos los tratamientos fueron filtrados a través de una malla de acero inoxidable ( $60\ \mu\text{m}$ ); los filtrados se depositaron en tubos eppendorf conteniendo los protoplastos recién aislados, y se centrifugaron a 700 rpm durante 10 minutos. Luego de la primera centrifugación, se descartó el sobrenadante, se adicionaron 9 ml de medio CPW y se repitió este mismo procedimiento dos veces con las mismas condiciones de centrifugación, para eliminar los restos celulares.

Determinación de la viabilidad de los protoplastos aislados de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*.

Para evaluar la viabilidad de los protoplastos recién ais-

lados de *V. planifolia* y *V. pompona*, se utilizó la tinción con azul de Evans. Para realizar ésta tinción se prepararon 500 µl del colorante, y se realizaron montajes de las suspensiones en portaobjetos, mezclando 50 µl de muestra de protoplastos y 5 µl del colorante, incubándose en una estufa a 45°C durante 30 minutos. Luego se observaron en un microscopio óptico para determinar la viabilidad, con base a los porcentajes de protoplastos no coloreados por el azul de Evans para cada tratamiento de las dos especies. Estas determinaciones se hicieron, en el proceso de incubación, cada dos horas durante 8 horas.

### Obtención de células híbridas somáticas de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*.

#### Tinción de los protoplastos.

Para realizar la fusión química entre *V. planifolia* x *V. pompona*, previamente los protoplastos *Vanilla pompona* fueron teñidos con sales de tetrazolio (MTT), para luego poder identificar los protoplastos fusionados en base al color rosado típico de éstas sales, mediante la identificación y selección de heterocariontes (12). Ésta tinción se realizó resuspendiendo 5 ml de los protoplastos en 15 ml de MTT, agitándose constantemente durante 30 minutos.

#### Fusión química de protoplastos.

Posterior a la tinción de los protoplastos de *V. pompona*, se tomaron 5 ml de los protoplastos de las dos especies y se mezclaron con 5 ml de la solución PEG (4%) (11) en un tubo eppendorf. Esta mezcla se mantuvo en agitación constante durante 8 horas, a una temperatura de 26°C, en condición de oscuridad. Para corroborar la fusión de los protoplastos, cada dos horas se realizaron observaciones al microscopio, para evaluar el porcentaje de protoplastos fusionados en función del tiempo de incubación. Aquellos protoplastos que presentaron citoplasmas coloreados en tonalidades rosa y verde, es decir, de los protoplastos teñidos de *Vanilla pompona* con MTT y no teñidos de *Vanilla planifolia*, se consideraron fusionados confirmándose así la obtención de células híbridas (12).

#### Diseño experimental.

En esta investigación se utilizó un diseño experimental completamente al azar en la etapa de aislamiento

de protoplastos y en la determinación de la viabilidad de los mismos, a los datos obtenidos se les realizó las correspondientes pruebas de normalidad, un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de separación de medias (Tukey 95%), para analizar la eficiencia de cada tratamiento, representada en el número de protoplastos aislados, protoplastos viables y número de protoplastos fusionados, éstas variables se evaluaron también con respecto al tiempo de incubación en cada caso.

## RESULTADOS

### 1. Fase de aislamiento de protoplastos de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*.

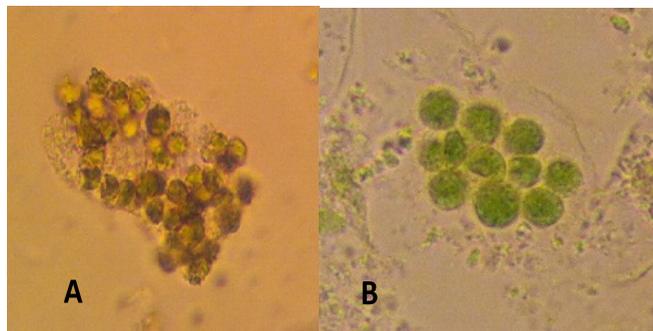
En las dos especies se observaron diferencias significativas en el número de protoplastos aislados (Fig.1) y viabilidad de estos en relación con los distintos tratamientos enzimáticos. La prueba de Tukey 95% para *V. planifolia* en número de protoplastos se obtuvo ( $F=88.43$ ;  $P<0.001$ ) (Tabla 2). Para *V. pompona* en número de protoplastos se obtuvo ( $F=408.92$ ;  $P<0.001$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto de los diferentes tratamientos enzimáticos en el aislamiento de protoplastos de *Vanilla spp.*

Tratamiento	N° Protoplastos/ml	
	<i>Vanilla planifolia</i>	<i>Vanilla pompona</i>
1	$2.8 \times 10^6 \pm 5.1b$	$2.2 \times 10^6 \pm 3.4b$
2	$4.0 \times 10^6 \pm 3.0^a$	$3.8 \times 10^6 \pm 2.9^a$
3	$3.4 \times 10^6 \pm 4.0^a$	$2.0 \times 10^6 \pm 0.5c$

Los valores representan la media  $\pm$  ES (error estándar). Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

El mejor tratamiento para el aislamiento de protoplastos de *V. planifolia* fue el T2 ( $4.0 \times 10^6 \pm 3.0 \times 10^4$  por ml) Sin embargo, como se muestra más adelante la viabilidad de los protoplastos disminuyó (Tabla 1). Para *V. pompona* se obtuvo un mayor número de protoplastos ( $3.8 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^4$  por ml) al utilizar el tratamiento T2. (Tabla 2).



**Figura 1.** Protoplastos aislados de A) *V. planifolia* y B) *V. pompona*. 400x

**Protoplastos aislados en función del tiempo de incubación.**

El ANOVA realizado a esta variable mostró que existen diferencias significativas entre los tiempos de incubación evaluados durante la fase de aislamiento de protoplastos, tanto para *V. planifolia* como para *V. pompona* ( $F= 10.523$ ;  $P < 0.001$ ) y ( $F= 28.502$ ;  $P < 0.001$ ). De igual manera al realizar la prueba de Tukey (95%), a cada especie, se corroboraron las diferencias arrojadas por el ANOVA entre los tiempos de incubación. Así, se observa que los tiempos en los que se liberaron mayores cantidades de protoplastos fueron de 8 horas para *V. planifolia* y 10 horas para *V. pompona* (Tabla 3).

**Tabla 3.** Protoplastos aislados en función de tiempo de incubación durante el aislamiento de protoplastos de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*.

Tiempo (horas)	N°Protoplastos/ml	Tiempo (horas)	N°Protoplastos/ml
	<i>Vanilla planifolia</i>		<i>Vanilla pompona</i>
2	4.13 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	2	1.83 x 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>
4	1.73 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>	4	1.68 x 10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>
6	1.99 x 10 <sup>6</sup> <sup>ba</sup>	6	1.97 x 10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>
8	2.36 x 10 <sup>6</sup> <sup>c</sup>	8	2.06 x 10 <sup>6</sup> <sup>b</sup>
10	2.12 x 10 <sup>6</sup> <sup>bc</sup>	10	2.25 x 10 <sup>6</sup> <sup>c</sup>

Los valores representan la media ± ES (error estándar). Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**2. Fase de viabilidad de los protoplastos aislados de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*.**

El análisis de varianza realizado a ésta variable mostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos enzimáticos, aplicados a las dos especies para la liberación de los protoplastos, donde  $F=35.76$ ;  $P < 0.001$  para *Vanilla planifolia* y  $F= 22.52$ ;  $P < 0.001$  para *Vanilla pompona*.

Estas diferencias significativas fueron corroboradas mediante la prueba de Tukey (95%), aplicada para realizar la comparación de medias entre los protoplastos viables de cada especie, entre las cuales se observa que T1 mostró la media más alta para *V. planifolia*, mientras que para *V. pompona* fue en el tratamiento T2 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Efecto de los diferentes tratamientos enzimáticos en el aislamiento de protoplastos de *Vanilla spp.*

Tratamiento	% de viabilidad	
	<i>Vanilla planifolia</i>	<i>Vanilla pompona</i>
1	80.32 ± 0.36 <sup>a</sup>	47.02 ± 4.77 <sup>b</sup>
2	48.90 ± 2.38 <sup>b</sup>	81.27 ± 4.48 <sup>a</sup>
3	27.37 ± 4.15 <sup>c</sup>	41.08 ± 2.70 <sup>b</sup>

Los valores representan la media ± ES (error estándar). Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Los protoplastos aislados fueron teñidos con azul de Evans para determinar la viabilidad los mismos, encontrándose que el tratamiento con mayor número de protoplastos viables para *V. planifolia* fue el T1 con un 80,32% y para *V. pompona* el T2 con un 81,27% de protoplastos viables.

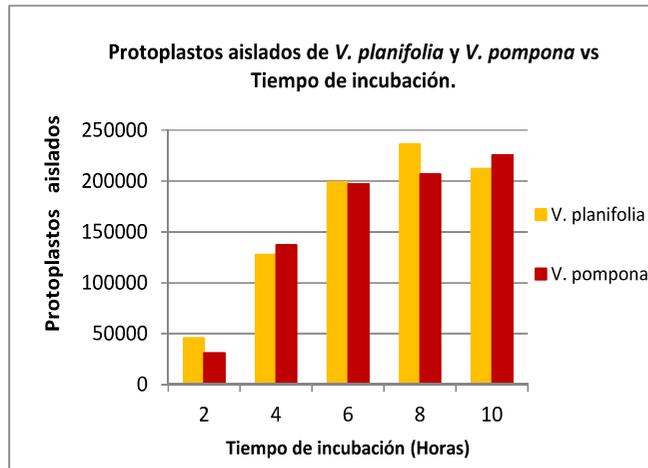
**Viabilidad de los protoplastos de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona* en función de los tiempos de incubación.**

La viabilidad de los protoplastos aislados se evaluó con respecto al tiempo de incubación, con el fin de determinar el tiempo adecuado para obtener las mayores cantidades protoplastos viables de cada especie.

En este caso la prueba de Tukey (95%) mostró que el tiempo adecuado para obtener protoplastos viables para las dos especies tratadas, concuerda con el tiempo de incubación en la fase de aislamiento de protoplastos, es decir 8 horas para *V. planifolia* y 10 horas para *V. pompona* (Gráfica 1).

Los resultados obtenidos muestran que inicialmente el número de protoplastos viables es bajo en comparación a las 8 horas de incubación, tiempo en el cual se muestra un aumento significativo en el número de protoplastos viables para las dos especies. Algo particular sucedió a las 10 horas de incubación para *Vanilla planifolia*, tiempo en el cual se logró comprobar que la población de protoplastos viables obtenida empezó a disminuir, posiblemente debido a un exceso de tiempo de contacto

del coctel enzimático con el tejido vegetal, el cual provoca la degradación completa de la pared celular, y con ello la posterior ruptura de su membrana plasmática.



**Grafica 1** Protoplastos viables de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona* en función del tiempo de incubación.

### 3. Fase de obtención de células híbridas de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona* mediante la fusión química de protoplastos.

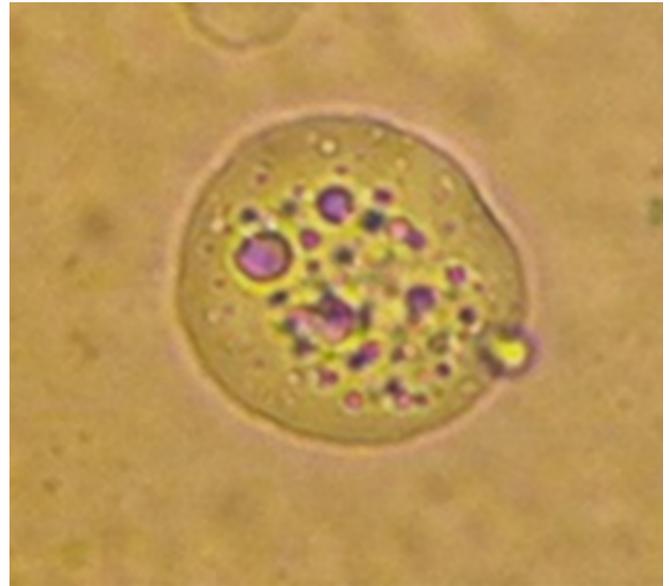
La fusión de los protoplastos de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*, fue progresiva con respecto al tiempo de incubación, ya que el número de protoplastos fusionados aumentó con el transcurso del tiempo, observándose la mayor cantidad de células fusionadas a las 8 horas de incubación, obteniéndose  $3.16 \times 10^5$  protoplastos fusionados que representa el 15,6% de los protoplastos aislados en el dos mejor tratamiento enzimático aplicados a cada una de las especies en estudio (Tabla 5).

**Tabla 5.** Protoplastos fusionados en función del tiempo de incubación

Tiempo de incubación (Horas)	Protoplastos fusionados
2	$2.45 \times 10^5$
4	$2.91 \times 10^5$
6	$3.13 \times 10^5$
8	$3.16 \times 10^5$

Los protoplastos fusionados se identificaron mediante microscopía óptica observando los protoplastos teñidos con anterioridad, con el fin de verificar las fusiones; teniendo en cuenta que las sales de tetrazolio se utilizan para diferenciar tejidos metabólicamente activos, los que se colorean en tonos rosa. Así, los protoplastos aislados de *Vanilla planifolia* no se tiñe-

ron, permaneciendo sus estructuras con su coloración natural (verde). Por lo tanto, en las células híbridas se observaron las dos tonalidades (verde y rosa) lo cual indicó la efectiva fusión de los protoplastos de las dos especies, formándose posibles heterocariontes, es decir, células híbridas cuyo material intracelular proviene de dos parentales diferentes (12,14,15) (Fig. 2).



**Figura 2.** Protoplastos fusionados. Componentes citoplasmáticos de *Vanilla pompona*: color rosa-cr, y de *Vanilla planifolia* y: color verde-cv.

### DISCUSION

La obtención de un gran número de protoplastos depende de ciertos factores importantes que determinan la eficiencia de los tratamientos durante el aislamiento; principalmente, el tejido de origen, las enzimas utilizadas, la fuente del material vegetal (16) y de las características vegetativas propias de la especie (17,18).

El aislamiento de protoplastos a partir de las hojas de plántulas *in vitro*, fue eficiente de acuerdo con los referentes bibliográficos consultados; ya que algunos autores como Divakaran *et al.*(11) en el aislamiento de protoplastos de *Vanilla planifolia* y *Vanilla andamanica* reportaron que tratamientos de celulasa (1%) con macerozima (1,5%), les dieron óptimos resultados, al obtener  $2.5 \times 10^5$  protoplastos/gr de hoja; valores que están por debajo de los obtenidos en el presente trabajo.

Para otras especies de orquídeas como *Dendrobium sonia* *cvar* "BOM 17", se reportaron (18) el aislamiento de protoplastos con rendimientos de  $5.33 \times 10^5$  protoplastos/gr de hoja en una combinación de 1% celula-

sa y 0.2% macerozima. Para la orquídea *Dendrobium pompadour* (13), lograron aislar  $22 \times 10^5$  protoplastos por gramo de hoja fresca con 1% Celulasa, 1% de Macerozima y 0.5% Driselasa. Estudios recientes (19), realizados en *Dendrobium*, cultivar *Queen pink*, aislaron  $15.7 \times 10^4$  protoplastos/gr de hojas jóvenes, utilizando una combinación de celulasa, pectinasa y macerozima. Entonces, y de acuerdo con los reportes anteriormente mencionados, los resultados presentados en éste trabajo muestran valores superiores en el número de protoplastos aislados, tanto para *V. planifolia* como para *V. pompona*.

Teóricamente se ha propuesto que el periodo de incubación de los tratamientos enzimáticos, deben ser los adecuados para la efectiva degradación de la pared celular, que oscilarían entre las 8 y 16 horas, tal como se reportó (11) al aislar protoplastos de *V. planifolia* y *V. andamaniaca* exactamente en 8 horas.

Probablemente, estos resultados se deben a que en este procedimiento se presenta un mayor área de exposición del tejido a las enzimas, y la penetración de éstas; proceso facilitado por la agitación durante la incubación, en condiciones de oscuridad, para mantener condiciones más homogéneas durante el aislamiento de los protoplastos.

Un largo periodo de contacto de las enzimas con el tejido vegetal puede dar lugar a la ruptura de los protoplastos recién aislados tal como lo reportan algunos autores (19,20), al observar la disminución en protoplastos aislados en *Dendrobium* cvar *Queen pink*, en tiempos mayores a las 6 horas de incubación. Adicionalmente, se dice que esto puede ocurrir por los daños que puede sufrir la membrana celular, a causa de las enzimas cuando se utilizan tiempos prolongados de incubación, provocando la liberación de otras enzimas proteolíticas, sustancias fenólicas y cristales de calcio como los rafidios, que pueden dañar y romper los protoplastos, afectando su viabilidad (13,14,20).

Así, la viabilidad de los protoplastos recién aislados, es el factor fundamental y decisivo para llevar cabo la fusión de protoplastos o hibridación somática, teniendo en cuenta que una gran población de protoplastos viables asegura su efectiva fusión, la regeneración de la pared celular, la formación de microcolonias, y la regeneración de nuevas plantas.

Para especies del género *Vanilla* específicamente *V. pla-*

*nifolia* y *V. andamaniaca* se reportaron (11), viabilidades del 55% y 72% respectivamente para cada especie, resultados que al analizarse con los obtenidos en el presente trabajo, muestran valores inferiores. Para algunas especies de orquídeas como *Dendrobium sonia* (19), obtuvieron una viabilidad del 90.79% de protoplastos viables, lo cual corrobora que para algunas especies de orquídeas la viabilidad de los protoplastos también ha sido bastante alta.

En otros estudios (21) realizados para especies no relacionadas, se reporta una viabilidad entre el 80% y 90% en aislamientos realizados en *Solanum habrochaites* y *Solanum lycopersicum*, confirmando que la viabilidad de los protoplastos recién aislados depende de la concentración de las enzimas y de los tiempos de incubación.

Con respecto al efecto del tiempo de incubación sobre la viabilidad de los protoplastos aislados, estudios (22) muestran que el tiempo óptimo de incubación para aislar protoplastos viables de *Dendrobium sonia* es de 4 horas, en condición de oscuridad. Adicionalmente, estos autores sugieren que posterior al tiempo máximo de incubación, el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos suelen disminuir (19), situación que también pudo observarse que para *V. planifolia* y *V. pompona*, la viabilidad de los protoplastos disminuyó posterior a las 8 y 10 horas, respectivamente.

La verificación de los protoplastos fusionados se llevó a cabo mediante la identificación manual de heterocariontes o micromanipulación, con esta técnica se corroboraron las fusiones entre las células de ambas especies de *Vanilla*, otros realizaron la identificación de protoplastos fusionados de *Vanilla planifolia* y *Vanilla andamaniaca* mediante la selección de heterocariontes, usando tinciones para verificar los productos de fusión (11).

Autores como Lindsay *et al.* (22) plantean que la tasa de fusión de protoplastos, en un evento típico es muy baja, donde aproximadamente solo 1-2% de fusiones pueden darse; las cuales en condiciones de selección apropiadas, pueden ser identificados y seleccionados. Xu y Jia (23) mencionan que al utilizar un sistema eficiente de identificación y selección de células híbridas, como producto de fusión química de protoplastos, pueden alcanzarse valores de selección de hasta el 10% de los heterocariontes.

Según Mendis *et al.* (24), el ejemplo típico de este procedimiento es la fusión entre protoplastos de mesófilo de hoja (de coloración verde por la presencia de clorofila) con protoplastos obtenidos de suspensiones celulares cultivadas en oscuridad (incolores, debido a la presencia de leucoplastos). Ésta técnica ha sido utilizada desde hace mucho tiempo con el fin de identificar las células híbridas productos de la fusión de protoplastos. Científicos chinos (23,25) realizaron la identificación de híbridos somáticos mediante la selección de heterocariontes, utilizando colorantes fluorescentes, como diacetato de fluoresceína, como indicador de fusión con células no teñidas, obteniendo altos porcentajes de células fusionadas identificables.

En años más recientes, diferentes autores (11,15,26) sostienen que la selección manual de heterocariontes es el sistema más directo, confiable y de más amplio espectro de aplicación, para identificar células híbridas obtenidas por fusión química de protoplastos, teniendo en cuenta que la técnica suele ser sencilla, de bajo costo y por ende es más accesible que otras técnicas, como por ejemplo la citometría de flujo.

Al analizar la eficiencia del polietilenglicol (PEG) en la fusión de protoplastos, se puede decir que, la concentración adecuada para lograr la fusión de los protoplastos aislados depende de la especie vegetal. Otros (11),

reportaron la fusión química de protoplastos de *Vanilla planifolia* y *Vanilla andamaniaca* utilizando PEG a una concentración de 4%, concentración utilizada en el presente estudio, como agente inductor de fusión, lográndose, igualmente, resultados positivos, con altos porcentajes de protoplastos fusionados.

## CONCLUSIONES

El aislamiento de protoplastos viables de *V. planifolia* y *V. pompona* se logró de forma satisfactoria. La alta viabilidad de protoplastos en ambas especies permitió la obtención de un porcentaje significativo de células híbridas de estas dos especies.

Igualmente, y de acuerdo a estos resultados preliminares, se puede definir la posibilidad de regenerar plantas híbridas para valorar su potencial de tolerancia a patógenos como fusarium.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al Instituto de Biotecnología de la Universidad Veracruzana de Méjico, donde se realizó el presente trabajo de investigación, y al grupo de investigación en Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre (BIOVUS) por acompañar y contribuir a la culminación del éste trabajo investigativo.

## REFERENCIAS

1. Augstburger F, Berger J, Censkowsky U, Heid P, Milz J, Streit C. (2000). Agricultura orgánica en el trópico y subtropico. Guía De. 2000; 18.
2. Anilkumar A. (2004). *Vanilla* cultivation: A profitable agri-based enterprise. Kerala Call. 2004; 1:26–30.
3. Duval M, Bory S, Grisoni M, Besse P. (2008). Biodiversity and preservation of *Vanilla*: present state of knowledge. Genet Retour Crop Evol. 2008; 55(4):551–571.
4. Soto-Arenas M, Dressler R. (2010). A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* Plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. Lankesteriana [Internet]. 2010 [citado el 5 de julio de 2016]; Disponible en: <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/12065>
5. Hernández-Hernández J. (2011). Mexican *Vanilla* production. Handb *Vanilla* Sci Technol. 2011; 1–25.
6. Soto-Arenas M. (1999). Conservation of the genetic resources of *Vanilla*. En: Journal of the Canadian Orchid Congress 11. 1999.
7. Soto-Arenas M, Cribb P. (2010). A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. Ex Mill. (Orchidaceae: Vanillinae). Una nueva clasificación infragenérica y resumen del género *Vanilla* Plum. Ex Mill. (Orchidaceae: Vanillinae). Lankesteriana. 2010; 9(3):355–398.
8. Castro-Bobadilla G, Martínez A, Martínez M, García-Franco J. (2011). Aplicación de riego localizado para aumentar la retención de frutos de *Vanilla planifolia* en el Totonacapan, Veracruz, México. Agro-

- ciencia. 2011; 45(3):281–291.
9. Pinaria A, Liew E, Burgess L. (2010). *Fusarium* species associated with *vanilla* stem rot in Indonesia. *Australas Plant Pathol.* 2010; 39(2):176–183.
  10. Menchaca García R, Lozano Rodríguez M, Sánchez Morales L. (2012). Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. *Rev Mex Cienc For.* 2012; 3(13):9–16.
  11. Divakaran M, Pillai G, Babu K, Peter K. (2008). Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species. *Curr Sci* 00113891 [Internet]. 2008 [citado el 5 de julio de 2016]; 94(1). Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=00113891&AN=31291383&h=OH8%2B36Xo2hOWMKkc2Fe6hU%2Fc%2B6X11y791oTH4NZ1ZDie714FfTZA9Mx00ywxDG%2FXMMcXORqGyelgdOIocXSOGA%3D%3D&cr=c>
  12. Gleba Y, Sytnik K, others. (1984). Protoplast fusion-genetic engineering in higher plants. [Internet]. Springer-Verlag. Monographs on Theoretical and Applied Genetics, No. 8; 1984 [citado el 5 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19841635946.html>
  13. Kanchanapoom K, Jantaro S, Rakchad D. (2001). Isolation and fusion of protoplasts from mesophyll cells of *Dendrobium Pompadour*. *Sci Asia.* 2001; 27(1):29–34.
  14. Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. *Inst Nac Tecnol Agropecu Argent* [Internet]. 2010 [citado el 5 de julio de 2016]; Disponible en: [http://argenbio.org/adc/uploads/Libro\\_INTA\\_II/Indice\\_e\\_introduccion.pdf](http://argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Indice_e_introduccion.pdf)
  15. Montero Carmona W, Jiménez V. (2009). Identificación y selección de híbridos somáticos obtenidos mediante fusión de protoplastos. *Biotechnol Veg.* 2009; 9(2):67–90.
  16. Assani A, Haicour R, Wenzel G, Cote F, Bakry F, Foroughi-Wehr B, *et al.* (2001). Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa spp.*, Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 2001; 20(6):482–488.
  17. Davey M, Marchant R, Power J. (2003). Protoplasts of grain and forage legumes: their exploitation in genetic manipulation, physiological investigations and plant-pathogen interactions. En: *Improvement Strategies of Leguminosae Biotechnology* [Internet]. Springer; 2003 [citado el 5 de julio de 2016]. p. 133–153. Disponible en: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-0109-9\\_5](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-0109-9_5)
  18. Pindel A, others. (2007). Optimization of isolation conditions of *Cymbidium* protoplasts. *Folia Hort.* 2007; 19(2):79–88.
  19. Aqeel R, Zehra M, Kazmi S, Khan S, Kayani H, Mirbahar A. (2016). A study on the isolation of protoplasts from mesophyll cells of *Dendrobium* queen pink. *Pak J Bot.* 2016; 48(2):693–697.
  20. Babaoğlu M. (2000). Protoplast isolation in lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): determination of optimum explant sources and isolation conditions. *Turk J Bot.* 2000; 24(3):177–186.
  21. Botero-Giraldo C, Restrepo-Osorio C, Urrea-Trujillo A. (2011). Respuesta de tres genotipos de tomate al cultivo in vitro y aislamiento de protoplastos. *Actual Biológicas.* 2011; 33(94):35–49.
  22. Lindsay G, Hopping M, Binding H, Burge G. (1995). Graft chimeras and somatic hybrids for new cultivars. *N Z J Bot.* 1995; 33(1):79–92.
  23. Xu Z, Jia J. (1997). Regeneration of intergeneric somatic hybrids by protoplast fusion between *Onobrychis viciaefolia* and *Medicago sativa*. *Sci China C Life Sci.* 1997; 40(4):363–370.
  24. Mendis M, Power J, Davey M. (1991). Somatic Hybrids of the Forage Legumes *Medicago sativa* L. and *M. falcata* L. *J Exp Bot.* 1991; 42(12):1565–1574.
  25. Yan Z, Tian Z, Huang R, Huang B, Meng J. (1999). Production of somatic hybrids between Brassica oleracea and the C3–C4 intermediate species *Moricandia nitens*. *Theor Appl Genet.* 1999; 99(7–8):1281–1286.
  26. Navrátilová B. (2004). Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae—a review. *Hort Sci Prague.* 2004; 31(4):140–157.