

## **RESUMEN**

El tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) es una planta alimenticia de amplio contenido nutricional, que ha adquirido gran importancia debido a su creciente demanda. La producción de este cultivo en el país es de las menores de Sudamérica y en ocasiones no satisface la demanda interna, haciendo notar la necesidad de mejorar los rendimientos de este cultivo. Una de las alternativas para ello es la obtención y cultivo de protoplastos, que pueden generar nuevos híbridos somáticos con alta capacidad de producción y multiplicación masiva. En esta tesis se presenta la estandarización de un protocolo de obtención de protoplastos del mesófilo de hojas de tomate, para su futuro uso en técnicas de fito-mejoramiento. El aislamiento consistió en realizar dos digestiones enzimáticas consecutivas en el tejido. Primero con una solución de pectinasa al 0.25% por tres horas y luego con una solución de celulasa al 0.25% y pectoliasa al 0.20% durante 15 horas. Se utilizó el medio de aislamiento I10 con manitol al 11%, hojas de 6-12 semanas de edad e incubación a 60 RPMs en oscuridad. El rendimiento final del aislamiento fue de  $1.07 \times 10^5$  protoplastos/ml. La purificación se realizó centrifugando los protoplastos a 700RPMs por 5 minutos y realizando una flotación en una solución CPW- Sacarosa 21%, obteniendo una viabilidad promedio del 81.30%. Finalmente las células fueron cultivadas en un medio TM2 con 0.5 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0.5 mgL<sup>-1</sup> de Kin y 1mgL<sup>-1</sup> de AIA, observándose las primeras divisiones celulares a partir del día 12 del cultivo con una eficiencia del 3.96%.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **TOMATE**
- **PROTOPLASTOS**
- **MESÓFILO**
- **AISLAMIENTO**
- **CULTIVO**

## **ABSTRACT**

Tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) is a food plant with a wide nutritional content which has acquired great importance due to its increasing demand. The production of this crop in the country is one of the smallest in South America and sometimes does not cover the domestic demand, highlighting the need to improve the crop yields. One alternative for this is the protoplasts production and culture, which can generate new somatic hybrids with high production capacity and ease massive multiplication. This thesis presents a protocol standardization to obtain mesophyll protoplasts from tomato leaves, for their future use in phyto-improvement techniques. The isolation consisted in performing two consecutive enzymatic digestions in the tissue. First with a 0.25% pectinase solution for three hours and then with a 0.25% cellulase and 0.20% pectolyase solution for 15 hours. Furthermore, isolation medium I10 with 11% mannitol, leaves with 6-12 weeks old and incubation in the dark at 60 RPMs were used. The final isolation yield obtained was  $1.07 \times 10^5$  protoplasts/ml. The purification was carry out by centrifuging the protoplasts at 700RPMs for 5 minutes and performing a flotation in a CPW-Sucrose21% solution, obtaining an average viability of 81.30%. Finally the cells were plated in a TM2 medium with  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  of 2,4-D,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  of Kin and  $1 \text{ mgL}^{-1}$  of AIA, with the first cell divisions being observed 12 days after plating with a maximum efficiency of 3.96%.

### **KEYWORDS:**

- **TOMATO**
- **PROTOPLASTS**
- **MESOPHYLL**
- **ISOLATION**
- **CULTURE**