



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE
LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS DEL MESÓFILO DE
HOJAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* Mill.) MEDIANTE
DIGESTIÓN ENZIMÁTICA.**

AUTOR: CASTRO HINOJOSA, CHRISTIAN WLADIMIR

DIRECTOR: PROAÑO TUMA, KARINA ISABEL PhD

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Que el trabajo titulado “**Obtención de Protoplastos del mesófilo de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) mediante digestión enzimática**”, realizado por **Christian Wladimir Castro Hinojosa**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **CASTRO HINOJOSA, CHRISTIAN WLADIMIR** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, Agosto 2017



PROAÑO TUMA, KARINA ISABEL Ph.D

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, CHRISTIAN WLADIMIR CASTRO HINOJOSA

Declaro que:

El proyecto denominado “**Obtención de Protoplastos del mesófilo de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) mediante digestión enzimática**” ha sido desarrollado en base a una investigación científica exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente, este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración me responsabilizo de su contenido, veracidad y alcance científico.

Sangolquí, Agosto 2017.

CASTRO HINOJOSA, CHRISTIAN WLADIMIR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, CHRISTIAN WLADIMIR CASTRO HINOJOSA

Autorizo que:

El proyecto de grado denominado “Obtención de Protoplastos del mesófilo de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) mediante digestión enzimática” sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Sangolquí, Agosto 2017.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Christian Wladimir Castro Hinojosa', is written over a horizontal line.

CASTRO HINOJOSA, CHRISTIAN WLADIMIR

DEDICATORIA

A mis papás y mamás: Fausto, Marlene, Hortencia, Juan y Ciro

*Por haberme apoyado de forma incondicional a lo largo de mi vida,
Por brindarme su paciencia, consejos y la motivación para llegar aquí,
Por su ejemplo de perseverancia y lucha diaria,
Por los valores que me inculcaron y me definieron como una persona de bien,
Pero por sobre todo, por el gran amor que me brindan cada día.*

Christian

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Marlene por haberme dado la vida, por regalarme su infinito amor materno, por brindarme su apoyo incondicional en todas mis decisiones incluso cuando no parecían tan buenas y por ayudarme a superar todos los retos y dificultades que he tenido en el camino.

A mi abuelita Hortencia por haber sido siempre mi segunda madre, por cuidarme, haberme regalado sus valiosos consejos inculcándome los mejores valores y por darme su amor y paciencia toda mi vida.

A mi abuelito Fausto porque sin él no estaría escribiendo este agradecimiento, por el total apoyo que he recibido de usted no solo en la universidad sino también en los demás proyectos que he emprendido.

A Juan por ser como un padre y un amigo excepcional, por ayudarme a entender que la vida va más allá de los estudios, por ayudarme a crecer y madurar con los mejores consejos y bromas.

A mi papá Ciro por enseñarme que la vida puede ser muy dura pero que uno puede seguir siendo una persona buena, bondadosa pero sobre todo luchadora. También por ser un apoyo durante todo este tiempo.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, los Laboratorios de Biotecnología Vegetal y Cultivo de Tejidos Vegetales, por haber brindado todas las facilidades para la realización de este trabajo.

A la Doctora Karina Proaño directora de tesis por abrirme las puertas del laboratorio de Biotecnología Vegetal para poder realizar este proyecto y sobre todo por ser un excelente ejemplo profesional y humano para mí, sin duda aunque ha sido poco el tiempo compartido, me ha enseñado mucho.

A la Master Mónica Jadán directora del laboratorio de Cultivo de Tejidos, por haberme permitido utilizar el laboratorio siempre que lo necesité, facilitándome en todo momento su asesoramiento y todos los materiales disponibles, este proyecto no habría sido posible sin su colaboración.

A ti Lilo por ser tan buena hermana y soportarme en los peores días, por quererme siempre, escucharme y compartir conmigo todos los buenos momentos que tenemos. Verito y Noelia que aunque no nos veamos y estemos lejos siempre me han hecho sentir su cariño y que sepan que cuentan con mí apoyo en todo momento.

Por todos los momentos que vivimos desde que nos juntamos por allá hace tres años, los acolites, las motivaciones, risas, tristezas, viajes y ocurrencias que pasamos, gracias Fiama y Eve por ser las mejores compañeras y amigas, siempre podrán contar conmigo.

A Jimmy por habernos aventurado en ir más allá de las aulas a emprender en biotecnología y por permitirme entender nuestra realidad sin dejar de soñar en todo lo que queda por hacer, sin duda esto apenas está empezando.

A los chicos del lab, Shir si estás leyendo esto lo logre por ti jaja y más salados que el mar, pero lo logramos, Cris hagámonos ese negocio, Carlita, Jen, Joss y todos los que en algún momento pasaron por el labo, simplemente gracias por haber estado junto a mí en esta etapa.

INDICE

CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
INDICE	viii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del Problema	2
1.3. Objetivos de la Investigación.....	3
1.3.1. Objetivo General	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Marco Teórico.....	4
1.4.1. Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.).....	4
1.4.1.1. Taxonomía	4
1.4.1.2. Origen y Distribución.....	4
1.4.1.3. Características Morfológicas.....	5
1.4.1.4. Uso del tomate como planta modelo.....	6
1.4.2. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	6
1.4.2.1. Establecimiento del cultivo in vitro	7
1.4.2.2. Medio de Cultivo	7
1.4.2.3. Aplicaciones del cultivo de tejidos	8
1.4.3. Protoplastos Vegetales	8
1.4.3.1. Aislamiento de Protoplastos.....	9
1.4.3.2. Purificación de Protoplastos.....	11
1.4.3.3. Factores que afectan al proceso de obtención de protoplastos.....	12
1.4.3.4. Viabilidad de Protoplastos	16
1.4.3.5. Cultivo de Protoplastos	17
1.4.3.6. Usos y aplicaciones de los protoplastos	21

CAPÍTULO 2	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1. Material Vegetal.....	23
2.2. Aislamiento de Protoplastos.....	24
2.3. Conteo de protoplastos.....	27
2.4. Purificación de Protoplastos.....	28
2.5. Evaluación de la viabilidad de los Protoplastos	29
2.6. Cultivo de Protoplastos	30
CAPÍTULO 3	32
RESULTADOS	32
3.1. Aislamiento de Protoplastos.....	32
3.1.1. Tiempo de digestión y concentración de las Enzimas	32
3.1.2. Determinación del medio de aislamiento.....	36
3.1.3. Efecto del tratamiento de pre-plasmólisis	39
3.1.4. Edad del Material vegetal	41
3.1.5. Determinación de la cantidad de tejido y agitación óptimos	43
3.1.6. Evaluación de la concentración del regulador osmótico	45
3.1.7. Comparación de los métodos de aislamiento 'One-step' y 'Two-step'.....	48
3.2. Purificación de Protoplastos.....	51
3.3. Cultivo de Protoplastos	54
3.3.1. Viabilidad en el Cultivo	54
3.3.2. Eficiencia del Cultivo.....	56
CAPITULO 4	59
DISCUSIÓN	59
4.1. Aislamiento de Protoplastos.....	59
4.2. Purificación de Protoplastos.....	64
4.3. Cultivo de Protoplastos	64
CAPÍTULO 5	67
CONCLUSIONES	67
CAPÍTULO 6	68
RECOMENDACIONES	68
CAPÍTULO 7	69
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de los Principales componentes de la Pared Celular Vegetal.	10
Figura 2: Esquema de un corte transversal de tejido foliar vegetal.....	13
Figura 3: Plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.) mantenidas en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8. A: 3 semanas de edad; B: 12 semanas de edad; C: 6 semanas de edad.	23
Figura 4: Protoplastos aislados del mesófilo de hojas de <i>Solanum lycopersicum</i> Mill observados al microscopio óptico con un aumento de 80x (A) y 40x (B).	33
Figura 5: Número promedio (n=4) de protoplastos aislados del mesófilo de hojas de <i>Solanum lycopersicum</i> Mill. tratados durante 24 horas por seis diferentes cocteles enzimáticos (C = Celulasa; P = Pectinasa; Pt = pectoliasa).	34
Figura 6: Número medio (n=4) de protoplastos de <i>Solanum lycopersicum</i> Mill. obtenidos a las 18 horas de digestión usando cuatro diferentes medios de aislamiento BH3, I10, CPW, K3.....	37
Figura 7: Número medio (n=4) de protoplastos de <i>Solanum lycopersicum</i> Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando cinco tratamientos de pre-plasmólisis (Sin Trat. = Sin pre-plasmólisis; 11%M= manitol al 11%; 13%M= manitol al 13%; 1h= una hora; 3h= tres horas).	39
Figura 8: Número medio (n=4) de protoplastos de <i>Solanum lycopersicum</i> Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando dos edades y dos tipos de corte del tejido (6S = seis semanas de edad; 12S = doce semanas de edad; CF = corte fino; CG = corte grueso).	41
Figura 9: Número medio (n=4) de protoplastos de <i>Solanum lycopersicum</i> Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando dos cantidades de tejido (0.5 y 1 gramo) y tres velocidades de agitación diferentes (RPM = revoluciones por minuto).	43

- Figura 10:** Número medio (n=4) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando dos tipos de regulador osmótico (M = manitol; I= inositol)..... 46
- Figura 11:** Protoplastos aislados del mesófilo de hojas de *Solanum lycopersicum* Mill en medio de aislamiento con manitol al 11% observados al microscopio óptico (40x). 48
- Figura 12:** Número medio (n=4) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando dos métodos de aislamiento (OS = 'One-step'; TS = 'Two-step'; C = celulasa; P = pectinasa; Pt = pectoliasa)..... 49
- Figura 13:** Protoplastos aislados del mesófilo de hojas de *Solanum lycopersicum* Mill mediante el método 'Two-step' usando 0.25% de celulasa, 0.25% de pectinasa y 0.20% de pectoliasa, observados al microscopio óptico (A: 40x y B: 80x)..... 51
- Figura 14:** Número medio (n=4) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos luego del proceso de purificación usando cuatro diferentes condiciones de centrifugación (1°C = primera centrifugación; 2°C= segunda centrifugación; RPM = revoluciones por minuto; min = minutos)..... 52
- Figura 15:** A: Halo de protoplastos formado durante el proceso de purificación. B: Protoplastos purificados del mesófilo de hojas de *Solanum lycopersicum* Mill. usando 0.25% de celulasa, 0.25% de pectinasa y 0.20% de pectoliasa, observados al microscopio óptico (40x) en cámara Neubauer. 54
- Figura 16:** Viabilidad media (n=3) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. cultivados en seis diferentes medios durante los cinco primeros días después de las siembra. 55
- Figura 17:** Eficiencia media (n=3) del cultivo de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. durante los 15 primeros días de cultivo en seis diferentes medios. 57
- Figura 18:** Protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. durante la primera división mitótica a los 12 días de cultivo en medio TM2 con 2,4-

D (1.0 mgL-1) y Kinetina (0.1 mgL-1), observados al microscopio óptico (80x).....	58
--	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición de la solución ‘Cell and Protoplast Washing’ (CPW).	25
Tabla 2	Tratamientos de soluciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos de hojas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.)	25
Tabla 3	Tratamientos de condiciones de centrifugación para la purificación de protoplastos de hojas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.)	29
Tabla 4	Medios para el cultivo de protoplastos aislados y purificados de hojas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.).....	30
Tabla 5	Resumen de la prueba ANOVA inter-sujetos para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados usando seis diferentes cocteles enzimáticos.....	35
Tabla 6	Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados mediante seis diferentes cocteles enzimáticos.	35
Tabla 7	Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados usando cuatro diferentes medios de aislamiento.	37
Tabla 8	Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados mediante cuatro diferentes medios de aislamiento.....	38
Tabla 9	Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados usando cuatro diferentes tratamientos de pre-plasmólisis.....	40
Tabla 10	Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados mediante cuatro diferentes tratamientos de pre-plasmólisis.....	40
Tabla 11	Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados utilizando dos diferentes edades y tipos de corte de tejido.....	42

Tabla 12	Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre cuatro tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados con dos diferentes edades y tipos de corte de tejido.	42
Tabla 13	Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados utilizando dos diferentes cantidades de tejido y tres velocidades de agitación.	44
Tabla 14	Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre seis tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados con dos diferentes cantidades de tejido y tres velocidades de agitación.	44
Tabla 15	Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados utilizando dos reguladores osmóticos.	46
Tabla 16	Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre cinco tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados con dos diferentes reguladores osmóticos.	47
Tabla 17	Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados utilizando dos diferentes métodos de aislamiento.	49
Tabla 18	Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre cuatro tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados con dos métodos diferentes.	50
Tabla 19	Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos purificados utilizando cuatro condiciones de centrifugación.	53
Tabla 20	Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias del número de protoplastos purificados con cuatro condiciones de centrifugación diferentes.	53
Tabla 21	Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias de viabilidad de protoplastos cultivados durante los cinco primeros días.	55

Tabla 22 Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias de viabilidad de protoplastos cultivados durante los cinco primeros días.	56
--	----

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 1.07×10^5 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⁻¹ de 2,4-D, 0.5 mgL⁻¹ de Kin y 1mgL⁻¹ 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 1.07×10^5 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 mgL^{-1} of 2,4-D, 0.5 mgL^{-1} of Kin and 1 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

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

En el Ecuador el tomate es un alimento de consumo diario en la dieta de la población, siendo la cuarta hortaliza más sembrada a nivel nacional con un rendimiento de 20,46 Tn/Ha (SINAGAP, 2016). La producción de 62956 Tn por año de este cultivo en el país es una de las menores en la región de América del Sur por debajo de países como Brasil, Chile, Argentina y Colombia (FAOSTAT, 2016). Durante varios años el rendimiento de los cultivos se ha visto limitado en gran parte por la susceptibilidad que tienen las plantas de ser afectadas por diferentes enfermedades y plagas, las cuales pueden ser bastante agresivas y causar grandes pérdidas (Sandoval & Lomas, 2007).

La producción de tomate en el país varía constantemente cada año, registrando valores entre 14000 y 84400 Tn anuales (SINAGAP, 2015). Estas variaciones hacen que en ocasiones el Ecuador no pueda satisfacer las necesidades de consumo interno de la población ni de la industria (SINAGAP, 2015). Los esfuerzos para lograr un aumento en el rendimiento de esta hortaliza han sido enfocados únicamente al uso de tecnologías convencionales como las siembras bajo cubierta, las fertilizaciones y las fumigaciones químicas constantes (Sandoval & Lomas, 2007). Debido a esto se ha dejado de lado el uso de alternativas biotecnológicas como el biocontrol y el desarrollo de nuevas variedades resistentes a enfermedades y plagas que tengan menor impacto al ambiente.

Hasta el momento no se ha reportado la generación de una variedad mejorada en el país (INEC, 2013), que podría mostrar un mejor rendimiento que otras variedades importadas al estar mejor adaptada a los factores bióticos y abióticos que están presentes en el Ecuador. Aunque en el mercado nacional constantemente se ofertan semillas de variedades tanto naturales como mejoradas (INEC, 2015), siendo estas últimas importadas.

La investigación en el país se ha visto limitada únicamente a estudiar el comportamiento y rendimiento de diferentes variedades introducidas. Esta realidad evidencia una clara necesidad de realizar trabajos de investigación en relación al mejoramiento del cultivo de tomate, utilizando herramientas como la biotecnología que han brindado excelentes resultados en otros países. Las técnicas como el cultivo de tejidos presentan una alternativa útil para este fin.

1.2. Justificación del Problema

El cultivo de tomate ha tenido una creciente importancia a nivel mundial en los últimos 10 años, tanto por sus propiedades nutricionales como por su alta demanda (Gerszberg *et al.*, 2015). Los datos de rendimiento actuales relacionados al cultivo de esta hortaliza y el constante crecimiento del consumo (FAOSTAT, 2016), sugieren una necesidad de mejorar las tasas de producción, a través de métodos convencionales o mediante herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos.

Una de las alternativas para la mejora del cultivo de tomate es la generación de nuevas variedades, ya sea a través de enfoques convencionales o utilizando herramientas biotecnológicas para lograrlo. La obtención y cultivo de protoplastos es una tecnología útil para la generación de nuevos híbridos somáticos con alta capacidad de producción que pueden ser multiplicados de manera masiva (Roca & Mroginski, 1993). Los protoplastos pueden ser aprovechados para la obtención de nuevas líneas celulares que puedan ser capaces de producir compuestos bioactivos de interés para posteriores aplicaciones (Niedz *et al.*, 2003).

Hasta el momento en el país, se han estandarizado técnicas de obtención de protoplastos de algunas especies de importancia como trigo (Arcos, 2010), babaco, jigacho (Brito, 2011) e incluso de tomate de árbol (Riofrío, 2010). Sin embargo, aún no existen reportes de obtención de protoplastos de tomate riñón, planta que necesita mejorar el rendimiento debido a la creciente demanda a nivel nutricional, económico y científico. Por lo que es necesario generar un protocolo para la obtención de

protoplastos de tomate que permita explorar nuevas alternativas para mejorar el rendimiento del cultivo de esta hortaliza.

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

- Obtener protoplastos del mesófilo de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) mediante digestión enzimática.

1.3.2. Objetivos específicos

- Establecer el mejor método de aislamiento de protoplastos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) evaluando el efecto de diferentes concentraciones de cocteles enzimáticos en la digestión del tejido.
- Definir el mejor tiempo y revoluciones de centrifugación necesarias para lograr una óptima purificación de protoplastos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.).
- Determinar el porcentaje de viabilidad de los protoplastos purificados mediante tinción química y conteo celular.
- Identificar el medio de cultivo óptimo para la regeneración de la pared celular y división mitótica de protoplastos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.).

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.)

1.4.1.1. Taxonomía

El tomate es una planta diploide ($2n=24$ cromosomas) gimnosperma y perenne (Shuckla *et al.*, 2013), cultivada de manera anual alrededor de todo el mundo con un constante crecimiento en la producción (FAOSTAT, 2016). Es la segunda especie más importante en términos económicos dentro del género *Solanum*, únicamente después de la papa (Gebhardt, 2015). Según Shuckla *et al.* (2013) el tomate se clasifica de la siguiente manera:

- Reino: Plantae
- Subreino: Tracheobionta / Planta vascular
- División: Magnoliophyta / Planta con flores
- Clase: Magnoliopsida / Dicotiledónea
- Subclase: Asteridae
- Orden: Solanales
- Familia: Solanaceae
- Género: *Solanum*
- Especie: *Solanum lycopersicum* Mill.

1.4.1.2. Origen y Distribución

Existen algunas teorías aceptadas acerca del origen del tomate, entre las cuales la más extendida y aceptada es la que afirma que esta hortaliza proviene de la región Andina de América del Sur de países como Ecuador y Perú (Bebeli & Mazzucato, 2009). A partir de esta zona se cree que se extendió a lo largo del continente Americano hasta llegar a la zona del actual México. El tomate fue domesticado en la época pre-colombina, pero no aprovechado como un producto alimenticio (Gebhardt, 2015).

Una vez en México a causa de la conquista española en el siglo XVI, este cultivo es introducido a Europa inicialmente como planta ornamental y

posteriormente alimenticia (Prohens & Nuez, 2008). Para finales del siglo XVII su consumo y distribución se extendió en toda Europa y parte de Asia, empezando a ser consumida en América (Bebeli & Mazzucato, 2009). Actualmente se han generado una gran cantidad de variedades que se encuentran distribuidas en todo el mundo y han sido adaptadas a diversos pisos climáticos para su producción (Gerszberg *et al.*, 2015).

1.4.1.3. Características Morfológicas

El tomate es un arbusto que puede medir entre 1-3 m de altura. Posee un tallo principal herbáceo y de naturaleza pubescente, que puede crecer de manera erecta o como enredadera dependiendo la variedad de la especie (GBIF, 2016). La planta posee una serie de ramificaciones de forma simpoidal, que dan origen a nuevos primordios foliares y florales (Ramirez, 2013).

Las hojas son generalmente compuestas (más comunes), imparipinnadas, con foliolos peciolados, margen aserrado, tienen entre 5-9 foliolos por cada peciolo (Burgos, 2014) y pueden alcanzar hasta los 25 cm de largo (Hanan, 2009). Según la variedad pueden existir hojas con diferentes características de tamaño, forma, rugosidad e incluso colores (GBIF, 2016).

Las flores tienen 5 lóbulos de color amarillo unidos en la base y presentan generalmente 6 anteras fundidas al estilo (GBIF, 2016), las cuales aparecen en el meristemo apical o en los nudos formando racimos de hasta 12 individuos capaces de auto-fecundarse (Hanan, 2009). Luego de la fecundación el fruto se desarrolla a partir del ovario, convirtiéndose en una baya carnosa de formas, tamaños colores y composición muy variables, compuesta por dos o más espacios huecos y húmedos denominados cavidades loculares que contienen las semillas (Burgos, 2014). El fruto puede pesar desde unos pocos miligramos hasta 600 g dependiendo la variedad y condiciones de cultivo (Ramirez, 2013).

El fruto es el propósito del cultivo de esta hortaliza y constituye la base de todo tipo de platos en todo el mundo, no solo por su sabor sino por el aporte nutricional en la dieta de muchos países (Prohens & Nuez, 2008). Es fuente de

vitaminas como la A, B1, B2, B3, B6, C, E y de minerales como fósforo, manganeso, magnesio, potasio, sodio, zinc, hierro, cobre y calcio (Burgos, 2014). Además contiene hidratos de carbono y otras vitaminas como el ácido fólico, tartárico, succínico y salicílico (Das *et al.*, 2005). El tomate se caracteriza por ser un fruto rico en carotenoides principalmente el licopeno que es el más abundante, los cuales poseen potentes propiedades antioxidantes capaces de prevenir algunos tipos de cáncer (Prohenz & Nuez, 2008).

1.4.1.4. Uso del tomate como planta modelo

El tomate se ha convertido en un modelo cada vez más utilizado en diversos programas de investigación tanto básica como aplicada a lo largo del siglo XX, debido a su importancia económica y nutricional. Además cuenta con otras características como gran adaptabilidad y facilidad de cultivo en diversos ambientes, su capacidad de auto-fertilización, homocigocidad, producción de semillas, un ciclo de vida corto, un genoma relativamente pequeño (950 Mb) y su facilidad de propagación asexual (Gerszberg *et al.*, 2015).

La planta es capaz de generar frutos frescos con propiedades nutritivas que son de interés en la dieta humana (Gerszberg *et al.*, 2015), por lo que se ha prestado especial atención en su proceso de formación y composición, haciendo énfasis en el entendimiento de las bases moleculares del proceso de fructificación y con ello el desarrollo de nuevas variedades con características específicas (Gebhardt, 2015).

1.4.2. Cultivo de tejidos *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede definirse como un conjunto heterogéneo de técnicas utilizadas para cultivar en condiciones asépticas células, tejidos, órganos o plantas completas en medios nutricionales de composición definida y condiciones ambientales controladas, que permitan a las células la expresión del potencial intrínseco o inducido (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.2.1. Establecimiento del cultivo *in vitro*

El establecimiento del cultivo *in vitro* de una planta depende de numerosos factores, que determinan el éxito del proceso, entre ellos los más importantes son el material vegetal inicial, la asepsia, el medio nutritivo y los reguladores de crecimiento (Roca & Mroginski, 1993). El material vegetal inicial también conocido como explante es cualquier parte de la planta (hojas, yemas, raíz, polen, anteras, entre otros) desde la cual se puede partir, para su introducción a condiciones *in vitro*. La selección del explante ideal dependerá de la especie con la que se esté trabajando y del estado fisiológico de la planta pudiendo variar dependiendo de los objetivos del estudio (Pérez *et al.*, 2000).

La asepsia en el establecimiento del cultivo, asegura la introducción de plantas libres de hongos y bacterias al medio *in vitro*, se logra a través de procedimientos como el control fitosanitario previo de las plantas y explantes de interés, la limpieza constante del área de trabajo y el adecuado protocolo de desinfección de los explantes que permita eliminar la contaminación, a través del uso de agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio o el cloruro de mercurio (Pérez *et al.*, 2000).

1.4.2.2. Medio de Cultivo

El medio nutritivo será seleccionado en base a la especie y los objetivos de estudio, pero de manera general todo medio debe contener como mínimo dos componentes importantes que son una fuente de carbono y las sales minerales. Entre las principales fuentes de carbono tenemos a la sacarosa, maltosa, fructosa, entre otras y dentro de las sales minerales se encuentran todos los compuestos que actúan como macro y micro-elementos necesarios para mantener un correcto funcionamiento de los tejidos (Puchea & Rodriguez, 2000). Además de estos dos componentes dependiendo de la especie también puede ser necesaria la presencia de vitaminas en el medio (Roca & Mroginski, 1993).

Es importante además determinar la presencia y cantidades de las sustancias reguladoras de crecimiento en el medio, tales como auxinas, citoquinas, giberelinas o brasinosteroides, así como de agentes gelificantes entre los que se encuentran el agar, phytigel, entre otros (Pérez *et al.*, 2000).

1.4.2.3. Aplicaciones del cultivo de tejidos

En la actualidad la tecnología del cultivo de tejidos *in vitro* es utilizada en numerosas investigaciones de manera cotidiana y se ha vuelto una herramienta fundamental y necesaria en el desarrollo de la biotecnología vegetal. Es útil en áreas como la fisiología, genética, bioquímica, biología molecular entre otras afines, e incluso ha permitido la generación de nuevos enfoques para la conservación de germoplasma (Roca & Mroginski, 1993).

Esta tecnología se ha vuelto de gran interés económico y comercial, debido a que permite obtener y propagar de manera masiva plantas que estén libres de enfermedades y a la vez conserven determinadas características deseables (Roca & Mroginski, 1993). Este tipo de plantas a menudo suelen ser denominadas como plantas élite. El cultivo de tejidos además puede servir como una herramienta para la obtención de nuevas variedades de plantas resultantes de técnicas de transformación genética así como también para la producción de metabolitos secundarios a través del cultivo celular (Fromm *et al.*, 1986).

1.4.3. Protoplastos Vegetales

Los protoplastos son células vegetales individuales que conservan únicamente su membrana celular intacta y han sido desprovistas de su pared celular mediante métodos mecánicos o enzimáticos (Smith, 1977). Estas células se caracterizan por ser capaces de conservar la mayoría de sus respuestas fisiológicas a estímulos externos e internos similares a las de las células del tejido intacto (Smith, 2013). Pueden conservar respuestas activas ante varios tipos de señales como hormonas, metabolitos, señales ambientales, inductores derivados de patógenos, entre otros.

Esta condición ha vuelto atractivos a los protoplastos para ser usados como objeto de estudios en temas de regeneración de la pared celular, división celular, embriogénesis, procesos de diferenciación, transducción de señales, comportamiento de la membrana, funcionalidad de genes, entre otros (Sheen, 2001).

Aunque los protoplastos conservan numerosas respuestas fisiológicas, existen autores que aseguran que estas células no pueden ser consideradas iguales a las del tejido, debido al estrés profundo que sufren durante su aislamiento (Smith, 1977). En este escenario, el proceso de obtención de los protoplastos puede provocar alteraciones citológicas y fisiológicas a nivel celular, estas alteraciones cambian las respuestas celulares iniciales y pueden generar diferencias con las células del tejido (Sheen, 2001).

Los protoplastos pueden ser obtenidos a partir de diferentes tipos de tejidos como hojas, flores, frutos, raíces, callo o suspensiones celulares. En dependencia del tipo de explante, la especie y el método de aislamiento, las células obtenidas pueden ser de colores y tamaños variables (Smith, 1977). Por ejemplo los protoplastos del mesófilo de la hoja generalmente son de color verde mientras que los protoplastos de suspensiones celulares son de tonos amarillo claro y de mayor tamaño (Smith, 2013). Los protoplastos pueden ser fácilmente reconocidos por la forma esférica que adquieren cuando se encuentran en un medio iso-osmótico, aunque por otra parte, el obtenerlos puede ser un proceso laborioso y demorado debido a la delicadeza de estas células desnudas (Davey *et al.*, 2005).

1.4.3.1. Aislamiento de Protoplastos

Existen dos métodos de aislamiento de protoplastos vegetales. El primero más antiguo y menos usado debido a sus limitaciones en el rendimiento, es el denominado método mecánico (Smith, 1977). El segundo método actualmente más usado se conoce como método enzimático, en el cual se utiliza un coctel de enzimas capaces de degradar la pared celular y separar las células del tejido, permitiendo liberar los protoplastos con un mayor rendimiento y reproducibilidad (Sheen, 2001).

1.4.3.2.1. Aislamiento enzimático

La pared celular es una compleja estructura que está constituida principalmente por tres componentes mayoritarios que son la celulosa, hemi-celulosa y pectinas, las cuales son las encargadas de brindarle la rigidez necesaria a la pared para proteger a la célula vegetal del medio externo (Smith, 1977). Esta estructura puede presentar también otros componentes en pequeñas cantidades tales como algunos lípidos, proteínas, minerales y carbohidratos. A continuación en la Figura 1 se puede observar un esquema general de la estructura de la pared celular.

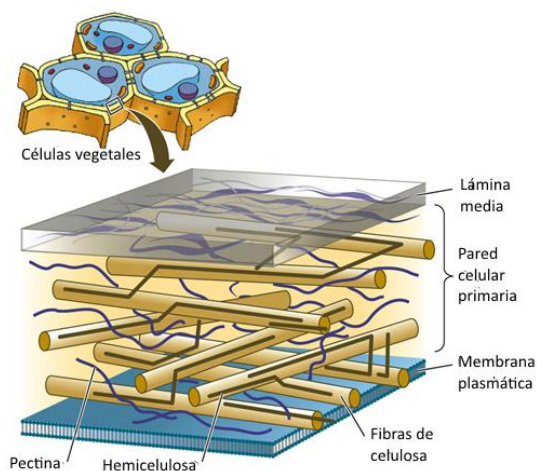


Figura 1: Esquema de los Principales componentes de la Pared Celular Vegetal.

Fuente: (Alda, 2014).

La composición de la pared celular ha hecho necesario el uso de enzimas que presenten actividades celulolítica, hemi-celulolítica y pectinolítica para lograr un aislamiento exitoso (Smith, 2013). Actualmente en el mercado, existen numerosas enzimas digestivas de este tipo, una de las más utilizadas son las celulasas que son una mezcla de hemi-celulasas, β -1,4-glucanasas, quitinasas, lipasas y nucleasas (SigmaAldrich, 2017). Este tipo de cocteles están encargados de catalizar el proceso de degradación de la celulosa y hemi-celulosa de la pared celular, permitiendo liberar células con la membrana relativamente intacta (Smith, 1977).

Las pectinasas por otra parte, son una mezcla de enzimas hemi-celulasas y pectinasas (SigmaAldrich, 2017), que tienen una fuerte actividad poligalacturólítica, y son las responsables de la digestión de lamela media y de la matriz de la pared primaria. Estos cocteles son utilizados principalmente para cortar los enlaces existentes entre células y poder individualizarlas (Smith, 1977). Además de las celulasas y pectinasas también existen disponibles otras enzimas como driselasas, pectoliasas o hemi-celulasas que también pueden ser usadas en el aislamiento de protoplastos, dependiendo de la especie y explante con que se esté trabajando (SigmaAldrich, 2017).

Las enzimas digestivas pueden ser aisladas y purificadas a partir de diferentes especies de hongos como *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus japonicus*, entre otros (SigmaAldrich, 2017). Según la especie de origen de las enzimas y su grado de purificación, estas pueden presentar variaciones en su composición y eficiencia que deben ser tomadas en cuenta al momento de aislar los protoplastos (Smith, 1977). Cuando el tejido es expuesto a enzimas en concentraciones muy altas o durante demasiado tiempo, estas pueden dañar el plasmalema de las células, por lo que es necesario determinar sus condiciones óptimas de trabajo durante el aislamiento (Davey *et al.*, 2005).

El aislamiento enzimático puede ser de dos formas diferentes, la primera denominada 'One-step' consiste en sumergir el tejido de la planta en una solución que contenga tanto las enzimas celulasa como pectinasa al mismo tiempo. Esta mezcla permite romper la pared celular y separar las células del tejido de manera simultánea (Bengochea & Dodds, 1987). El segundo enfoque llamado método secuencial o 'Two-step', en primer lugar separa las células del tejido realizando una digestión inicial en una solución de pectinasa, para luego aplicar la enzima celulasa en las células individualizadas para digerir su pared y obtener los protoplastos (Smith, 1977).

1.4.3.2. Purificación de Protoplastos

Una vez que el tejido ha sido digerido por las enzimas, los protoplastos son liberados en el medio de aislamiento junto con gran cantidad de restos celulares y

organelas (Pérez, *et al.*, 2000). Es necesario separar las células intactas de los restos, ya que pueden interferir en la división celular durante el cultivo. Existen algunos métodos disponibles para realizar esta separación como el método de sedimentación y lavados, el de flotación y mediante tamizado (Bengochea & Dodds, 1987).

El método de sedimentación y lavado consiste en centrifugar la solución digerida a 50-100 g por periodos de tiempo cortos (5-10 min) para formar un suave precipitado. Se retira el sobrenadante que contiene los restos con cuidado y se resuspende el precipitado en nuevo medio, se repite este proceso al menos una vez más y finalmente se resuspende en la cantidad de medio deseada antes de realizar el cultivo (Davey, 2010).

El método de flotación consiste en realizar la separación de los protoplastos teniendo en cuenta que tienen una menor densidad comparados con las organelas vegetales (Bengochea & Dodds, 1987). La purificación se realiza colocando sobre la solución de protoplastos, una solución concentrada de un azúcar que comúnmente es sacarosa, la cual tiene una densidad relativa elevada que permite la flotación de los protoplastos. La separación ocurre al realizar una centrifugación leve a una determinada velocidad, lo cual provoca la precipitación de los restos celulares (Davey, 2010). Este método disminuye los daños causados durante la sedimentación, aunque puede causar estrés osmótico en los protoplastos y disminuir su viabilidad (Bengochea & Dodds, 1987).

1.4.3.3. Factores que afectan al proceso de obtención de protoplastos

La obtención de protoplastos vegetales depende de numerosos factores, que van a afectar no solo al rendimiento y la viabilidad de las células desnudas, sino también a su capacidad de regeneración de la pared celular y su posterior división (Smith, 2013). Entre los factores más importantes a considerar están: las condiciones de crecimiento de la planta, el estado del material vegetal de partida (Cassells & Barlass, 1977), el tipo y concentración de las enzimas usadas, el tiempo de digestión del material vegetal y la composición del medio de digestión (Bellini *et al.*, 1990).

1.4.3.4.1. Material Vegetal de Partida

El material de partida como hojas, raíces, frutos o polen en numerosas ocasiones marcan la pauta para seleccionar una combinación específica de enzimas que permitan obtener protoplastos sin dañar la membrana plasmática de las células (Davey, 2010). Un ejemplo de ello son los granos de polen, cuya estructura de la pared celular requiere el uso de un coctel enzimático rico en actividad β -1,3-glucanasa (enzima del jugo digestivo del caracol) para poder liberar protoplastos (Smith, 1977).

Los protoplastos del mesófilo de la hoja, son una de las fuentes más comunes para el aislamiento, debido a la facilidad de obtención de las hojas y a que no utiliza muestras destructivos. A menudo los protoplastos son obtenidos en mejor estado y mayor cantidad cuando provienen de plantas sanas y folíolos jóvenes (Cassells & Barlass, 1977). En la figura 2 se puede observar un esquema de la parte del tejido foliar en la que se albergan las células del mesófilo.

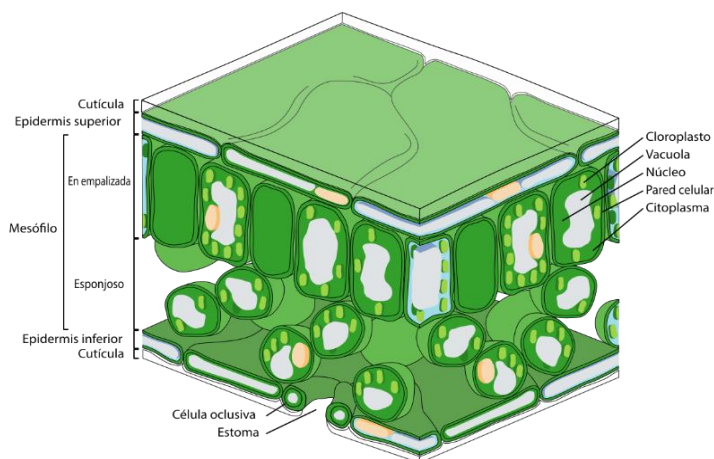


Figura 2: Esquema de un corte transversal de tejido foliar vegetal.

Fuente: (Wikipedia, 2017)

La edad del material vegetal puede ser un factor que determine el éxito o fracaso de un aislamiento (Bengochea & Dodds, 1987). Por una parte el rendimiento puede ser bajo al utilizar tejido demasiado joven, debido que en esta etapa la pared

de las células contienen una delgada capa de celulosa y pectina que se degrada fácilmente. Por otro lado las hojas muy maduras, tienen una cutícula más gruesa, una mayor cantidad de lignina acumulada y de metabolitos que disminuyen la viabilidad celular. Es por esto que la edad del tejido debe ser ajustada para mejorar el aislamiento (Taiwo, 2015).

En ocasiones el buen estado del tejido no es suficiente para obtener un buen conteo de protoplastos, por lo que en varias especies se pueden hacer algunos acondicionamientos a la planta que mejoren el rendimiento del aislamiento (Smith, 1977). Estos acondicionamientos son hechos antes del aislamiento y se denominan pre-tratamientos, los cuales pueden ser usados solos o en conjunto y contribuyen a la obtención de un mayor número de protoplastos con una mejor estabilidad (Davey *et al.*, 2005).

Uno de los acondicionamientos consiste en colocar a las plantas en un ambiente con baja luminosidad u oscuridad durante un periodo de 24 a 48 h antes del aislamiento, para disminuir su producción de almidones y aumentar la estabilidad de los protoplastos aislados (Bellini *et al.*, 1990). Otro pre-tratamiento bastante utilizado consiste en colocar a las plantas en un ambiente a bajas temperaturas (4-8°C) durante al menos 12 h antes del aislamiento (Montagno *et al.*, 1991).

Entre los pre-tratamientos más usados en numerosas especies encontramos a la pre-plasmólisis. Este acondicionamiento disminuye el choque osmótico que sufren las células del tejido foliar al ponerse en contacto con el medio de digestión. La pre-plasmólisis consiste en sumergir las hojas trozadas en una solución concentrada de alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol, que amortigüen el cambio de presión osmótica en las células (Smith, 1977).

Otro material vegetal de partida bastante común es el callo, en el cual uno de los factores más determinantes para lograr un aislamiento exitoso es su edad, ya que al igual que en el tejido foliar las células más antiguas tienden a ser menos estables. La edad deseable de las células del callo para el aislamiento es de preferencia durante la fase log de su curva de crecimiento (Smith, 1977). La friabilidad del callo es otro factor que debe ser tomado en cuenta para el aislamiento. Un tejido más friable es más disgregable y facilita el aislamiento de las células, mientras que un tejido menos

friable tiene mayor concentración de lamela media y necesita más cantidad de enzimas digestivas durante mayor tiempo para poderse separar (Shahin, 1987).

1.4.3.4.2. Coctel de enzimas digestivas

La digestión del tejido vegetal se realiza en un medio de aislamiento que contiene las enzimas necesarias para obtener los protoplastos (Bengochea & Dodds, 1987). Las enzimas deben ser seleccionadas cuidadosamente teniendo en cuenta su concentración, pureza y el tiempo que van a ser usadas para digerir el tejido, debido a que pueden influir de manera significativa en el número de protoplastos viables obtenidos (Shahin, 1987).

Las enzimas digestivas usadas en el aislamiento a concentraciones y tiempos de digestión demasiado elevados pueden ser tóxicas para las células (De Wit, 1976). Estos cocteles enzimáticos dependiendo de la casa comercial de la que provengan, en muchas ocasiones pueden contener trazas de otras proteínas como proteasas, lipasas y nucleasas que alteran la estructura de la membrana celular y pueden provocar su rompimiento, disminuyendo el rendimiento de los aislamientos (Smith, 1977).

1.4.3.4.3. Medio de Aislamiento

El medio de aislamiento puede ser de composición compleja similar al medio utilizado para el cultivo de protoplastos o bastante simple conteniendo únicamente algunos compuestos estabilizadores. La composición a menudo depende de la especie de la planta pero existen algunos compuestos que son indispensables como el calcio y el fosfato que sirven como estabilizadores celulares y un osmótico, que regule la presión osmótica de los protoplastos. Los medios más complejos además contienen minerales y vitaminas esenciales para algunas especies que evitan la muerte de las células (Bengochea & Dodds, 1987).

El osmótico es una molécula que no puede ser absorbida ni asimilada por la célula vegetal y que por tanto mantiene constante su concentración en el medio durante todo el aislamiento. Esta molécula es utilizada para alcanzar una concentración isosmótica en el medio, que mantenga la forma esférica característica de los protoplastos (Smith, 1977). Entre los reguladores de presión más comunes tenemos al manitol, sorbitol e inositol (Smith, 2013). La concentración del osmótico debe ser fijada de manera empírica, mediante observación teniendo en cuenta la forma de los protoplastos. Un exceso en la concentración de osmótico hará que el medio sea hipertónico y que los protoplastos se deformen, mientras que un medio hipotónico causará la lisis celular y disminuirá el rendimiento del aislamiento, (Bellini *et al.* 1990).

1.4.3.4. Viabilidad de Protoplastos

Un protoplasto se considera viable cuando ha mantenido intacta la estructura de su membrana celular y es capaz de regenerar su pared mientras que es no viable cuando su membrana ha sufrido algún tipo de daño grave que no le permita auto-repararse (Huang *et al.* 1986). El aislamiento de protoplastos mediante digestión enzimática es un proceso que a menudo genera este tipo de daños en la membrana de las células desnudas, por lo que es importante mantener un control de la viabilidad en los aislamientos. Un alto número de protoplastos aislados no necesariamente significa una alta viabilidad, muchos pueden tener daños importantes en su membrana por lo que posteriormente no pueden ser cultivados exitosamente (De Wit, 1976).

El control de la viabilidad promedio de los protoplastos aislados, puede lograrse a través de un conteo celular, realizando previamente una tinción que puede ser fluorescente o no fluorescente (Huang *et al.*, 1986).

Entre las tinciones no fluorescentes más utilizadas en la evaluación de viabilidad de protoplastos tenemos el azul de Evans, azul de metileno y el blanco de calcofluor (Huang *et al.*, 1986). El azul de Evans es un isómero del azul tripano y debido a su estructura molecular es excluido de las células vivas por la membrana

plasmática, mientras que puede penetrar y teñir células muertas y sus restos (Hudson & Hay, 1980). El azul de metileno por otra parte es captado tanto por células vivas como muertas, pero solo aquellas que aún conservan un poder reductor y pueden disminuir la intensidad de la tinción son consideradas viables. Las células viables se muestran en un color amarillento (Hooley & Mc Carthy, 1980).

La tinción fluorescente más utilizada, es sin duda la coloración con di-acetato de fluoresceína (FDA), que puede ser usada sola o en conjunto con otras como el yoduro de propidio (PI). El FDA, es una molécula de naturaleza hidrofóbica capaz de movilizarse a través de la membrana celular e ingresar al citoplasma (Huang *et al.*, 1986). En el medio intracelular el FDA es hidrolizado por esterasas liberando moléculas hidrofílicas de fluoresceína que no pueden salir al medio externo si las células están intactas. Estas moléculas se caracterizan por exhibir una fluorescencia amarillo-verde que permite clasificar una célula como viable o no viable (Larkin, 1976). Por otra parte el PI, es un intercalador del ADN que genera fluorocromasia, tanto en el núcleo como el citoplasma, pero que únicamente puede penetrar las células muertas, así como una tinción de contraste en el caso de ser usado junto con el FDA (Huang *et al.*, 1986).

1.4.3.5. Cultivo de Protoplastos

El cultivo de protoplastos consiste en colocar células estables y viables en un medio adecuado para que estas activen su proceso de regeneración de la pared celular y puedan dividirse constantemente hasta llegar a generar callo e individuos completos (Shahin, 1987). La regeneración de la pared y la división celular son procesos secuenciales. El tiempo que tarda el proceso de regeneración de la pared es muy variable, y depende de la especie pudiendo ir desde unas pocas horas a varios días. La multiplicación celular, sin embargo, requiere de periodos más largos de tiempo que generalmente son mayores a los 10 días y pueden extenderse hasta los 30 días (Meyer, 1985).

1.4.3.6.1. Regeneración de la Pared

En algunas especies la regeneración de la pared celular empieza casi inmediatamente después del aislamiento de los protoplastos, pues la célula interpreta como un daño a su estructura la destrucción de la pared y activa toda la maquinaria celular necesaria para reparar el daño (Sheen, 2001). La síntesis de la pared celular requiere principalmente de un aumento del tamaño de las células, la formación de los filamentos citoplasmáticos y un importante incremento de la actividad metabólica (Smith, 1977).

1.4.3.6.2. División celular

La multiplicación celular por otra parte es un proceso más complejo que requiere toda una reprogramación de los patrones de expresión génica del protoplasto. La célula necesita la síntesis de un gran número de nuevas proteínas que permitan reiniciar el ciclo de división (Pasternak *et al.*, 2000). En el caso de las células foliares, estas pierden toda su capacidad fotosintética y silencian una gran cantidad de genes relacionados a su función como parte del tejido. En esencia este proceso no es muy distinto de la inducción a la formación de callo en células maduras, aunque tiene la ventaja de que los protoplastos pueden ser considerados una población homogénea (Meyer, 1985).

1.4.3.6.3. Medio de Cultivo

Los protoplastos aislados, requieren un medio de cultivo complejo para ser cultivados. Este medio a menudo es similar en composición a los usados para suspensiones celulares y debe contener todos los nutrientes, vitaminas y fitohormonas necesarios para que la célula regenere por completo su pared celular y empiece su proceso de división mitótica (Davey *et al.*, 2005). La composición del medio varía en dependencia de la especie de trabajo debido a que existen compuestos que pueden ser necesarios en algunas especies y prescindibles en otras (Pasternak *et al.*, 2000). La concentración de los componentes del medio también puede afectar a

la eficiencia en el cultivo, ya que algunos compuestos son tóxicos a ciertas concentraciones como el cloruro de calcio, la sacarosa o el nitrato de amonio (Bellini *et al.* 1990).

El uso de fitohormonas en el cultivo de protoplastos, también es de vital importancia para lograr toda la reprogramación celular requerida para que la célula active exitosamente su proceso de mitosis (Davey *et al.*, 2005). Las dos principales hormonas que sirven para este fin son las auxinas y citoquinas. En ciertas especies como el tabaco y la petunia es necesario el uso tanto de citoquinas como auxinas en el medio para que las células puedan empezar el proceso de división celular. En otras plantas como la alfalfa solo son necesarias las auxinas, mientras que los cítricos no necesitan ninguna de estas fitohormonas para empezar a dividirse (Pasternak *et al.*, 2000). En el caso del tomate se ha visto que son necesarias ambas para lograr la división (Bellini *et al.*, 1990)

1.4.3.6.4. Densidad de Siembra de Protoplastos

La densidad de siembra o 'plating density' de los protoplastos, también es otra variable de importancia al momento del cultivo que sirve para asegurar la regeneración de la pared celular y una división mitótica sostenida. Las células deben ser depositadas en el medio en un rango de concentración que puede ir de 1×10^4 - 1×10^6 células/ml dependiendo de la especie (Davey, 2010). Una densidad de siembra muy elevada hará que los nutrientes se terminen en menor tiempo a medida que los protoplastos compiten entre sí, mientras que una densidad muy baja, puede causar una mayor pérdida de metabolitos de los protoplastos y consecuentemente en ambos casos los protoplastos no se dividirán (Taiwo, 2015).

Una vez que las colonias celulares han alcanzado un tamaño aceptable, estas pueden ser mantenidas como tejido indiferenciado o ser transferidas a medios específicos que produzcan la regeneración de plantas completas (Shahin, 1987). En dependencia de la especie con la que se trabaje la eficiencia de regeneración de plantas puede ser baja, (Roca y Mroginski, 1993), aunque para tomate se han

registrado métodos de obtención de nuevas plantas con eficiencias superiores al 40% en periodos no superiores a los 5 meses (Shahin, 1987).

1.4.3.6.5. Métodos para el Cultivo de Protoplastos

Muchos métodos de cultivo de protoplastos aislados, han sido desarrollados con el paso del tiempo para diferentes especies vegetales. Estos métodos influyen de manera importante en la capacidad de las células de poderse multiplicar y generar callo. Los principales y más utilizados son el método líquido o de suspensiones, el de medio semi-sólido y el de capa fina (Taiwo, 2015). También existen métodos combinados como el de cama de agarosa que consiste en embeber los protoplastos en agarosa y sumergir estos bloques de gel en un medio líquido (Bengochea & Dodds, 1987).

El método más sencillo de todos es el de medio líquido, el cual consiste en depositar una determinada cantidad del medio de cultivo que contiene los protoplastos aislados en una placa petri sellada con Parafilm® a temperatura ambiente y baja luminosidad (Davey, 2010). Este método difunde de manera más rápida los nutrientes hacia los protoplastos, así como los productos de desecho. Además este método permite controlar más fácilmente la reducción de la presión osmótica en la célula, para no afectar el crecimiento de los protoplastos (Bengochea & Dodds, 1987). La principal desventaja de esta metodología es el hecho de que los protoplastos tienden a aglutinarse en medio líquido, lo que los puede deformar y causar efectos adversos en el proceso de división (Taiwo, 2015).

Existe otra variante del cultivo en medio líquido denominada el método de gotas colgantes. Este método consiste en colocar en la tapa de una placa petri pequeñas gotas (50 µL) del medio con los protoplastos que se queden colgando, permitiendo que las células se hundan en los meniscos de la gota, y exista una mayor aireación. Este método es útil cuando se trabaja con bajas densidades de protoplastos y se está evaluando la composición de varios medios, aunque es laborioso preparar las gotas (Bengochea & Dodds, 1987).

El método semi-sólido por otra parte consiste en mezclar un volumen de la solución de protoplastos con un agente gelificante disuelto en agua caliente (40°C). Es necesario usar volúmenes iguales y depositar la mezcla en una placa petri para dejar gelificar. El medio gelificado puede ser cortado y depositado en otra placa con medio líquido, en este caso el método se conoce como cama de agarosa (Davey, 2010).

El cultivo en medios semi-sólidos requiere una densidad de células que sea por lo menos el doble de la usada en el método del medio líquido (Davey, 2010). Los agentes gelificantes usados generalmente son agar, alginato o agarosa que evitan la aglutinación de los protoplastos (Taiwo, 2015) y aumentan el soporte para las células, lo que estimula el desarrollo de su pared celular y también favorece el proceso de división celular y formación de callo. Generalmente las agarosas de temperatura de gelificación baja (SeaPlaque, Sigma type VII, IX) o el alginato son utilizados para esta metodología (Davey, 2010).

El método de capa fina consiste en gelificar una delgada capa de medio semi-sólido al fondo de una placa petri, sobre esta se coloca una membrana fina que puede ser papel filtro y finalmente sobre la membrana, se coloca la solución que contiene los protoplastos. Los protoplastos son sembrados a una concentración del doble de la densidad deseada en la placa y utilizando un volumen de la solución igual al del medio semi-sólido. Esta técnica también ayuda a estimular la regeneración de la pared celular y la división mitótica sostenida (Davey, 2010).

1.4.3.6. Usos y aplicaciones de los protoplastos

Los protoplastos vegetales a partir de los años 70s han sido utilizados en el mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades de plantas, en especial la hibridación somática que se logra con la técnica llamada fusión de protoplastos (Smith, 2013). De esta técnica se han logrado generar variedades importantes del cruce entre especies que de otra manera serían incompatibles como, un híbrido con potencial económico resultante de la fusión de una variedad de menta

resistente a *Verticillium* con otra de mayor concentración de aceites (Davey *et al.*, 2005).

Es posible también transformar los protoplastos introduciendo en ellos un material genético de interés a través de métodos de transformación físicos (electroporación) o químicos (PEG) (Cermak *et al.*, 2015), pudiendo generar ya sea, transformaciones transitorias útiles en investigaciones de funcionalidad de genes, transducción de señales, comportamiento de membrana y ´molecular farming´ (Shi *et al.*, 2011); o también transformaciones estables, que pueden originar nuevas líneas celulares que resulten de gran utilidad en la producción de metabolitos secundarios (Fromm *et al.*, 1986).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

El material vegetal necesario para llevar a cabo los ensayos, se obtuvo a partir de siembras semanales de semillas de tomate en un sustrato conformado de tierra negra, turba y pomina en proporciones 2:1:1 (López *et al.*, 2015). Las plantas fueron mantenidas en una cámara de crecimiento con riego constante, un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y una temperatura de 25°C (Bellini *et al.*, 1990). Utilizando las primeras dos o cuatro hojas verdaderas de 6 a 12 semanas de edad, se cortó el peciolo con un bisturí, seleccionando aquellas hojas de mayor tamaño y sin daño en el tejido (Cassells & Barlass, 1977).

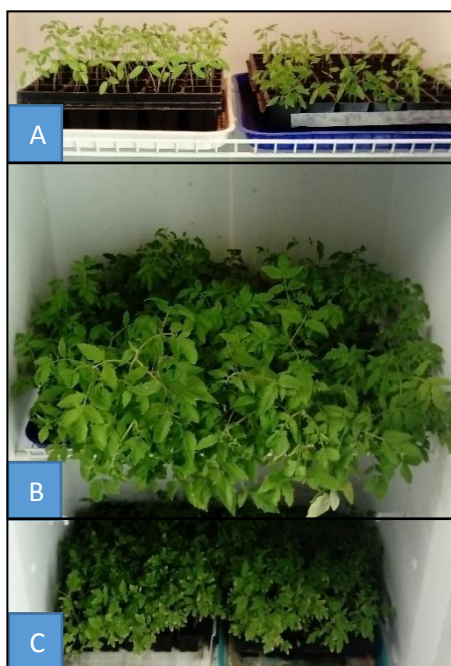


Figura 3: Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) mantenidas en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8. A: 3 semanas de edad; B: 12 semanas de edad; C: 6 semanas de edad.

El proceso de desinfección se mantuvo constante durante toda la investigación. Una vez cortadas las hojas se sometieron a un proceso de desinfección basado en el trabajo de López *et al.* (2015). Se realizó un lavado, dejando caer un chorro constante de agua corriente sobre ellas durante 20 minutos. A continuación se sumergió el material vegetal en una solución al 0.2% del fungicida sistémico Phyton (Skul-27) por 3 minutos, se enjuagó los explantes con agua destilada y se los sumergió durante 8 minutos en una solución de detergente al 1.5%. Al finalizar este tiempo el material vegetal se enjuagó por tres veces con agua destilada estéril, para luego sumergirlo en una solución de extracto de toronja al 2% por 5 minutos y después en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5% durante 3 minutos. Finalmente en cámara de flujo y condiciones de asepsia se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril.

2.2. Aislamiento de Protoplastos

El proceso de aislamiento de protoplastos fue llevado a cabo en condiciones de asepsia en una cámara de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación (Roca & Mroginski, 1993).

En primer lugar se realizó un tratamiento del material vegetal previo a la digestión enzimática, para lo cual las hojas desinfectadas de tomate se cortaron en pequeños trozos de aproximadamente 1 mm², y fueron sumergidas en una placa petri que contenía solución de pre-plasmólisis CPW descrita a continuación en la tabla 1 con una concentración de manitol al 13% y un pH de 5.8 durante una hora, (Bellini *et al.*, 1990).

Tabla 1
Composición de la solución 'Cell and Protoplast Washing' (CPW).

Sales CPW	
Compuesto	Concentración (mg/L)
KH ₂ PO ₄	27.2
KNO ₃	100,1
CaCl ₂	150
MgSO ₄	250
Fe ₃ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	2.5
KI	0.16
CuSO ₂	0.00025

Fuente: (Brito, 2011)

Inicialmente las condiciones para el aislamiento de protoplastos fueron fijadas a priori, en base a la bibliografía y experiencias previas del laboratorio. Se utilizó como punto de partida el procedimiento 'One-step', en el cual la celulasa y pectinasa son colocadas juntas en el medio de aislamiento (Horváth, 2009).

La optimización de la concentración de enzimas digestivas se realizó con el fin de determinar el número de protoplastos obtenidos con varios cocteles enzimáticos a diferentes tiempos de incubación detallados en la Tabla 2. Se realizó tres repeticiones por cada tratamiento, en donde un matraz que contenía un gramo de tejido foliar fue considerado como una unidad experimental.

Tabla 2
Tratamientos de soluciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.)

Tratamiento	Concentración de Celulasa	Concentración de Macerozima	Concentración de Pectoliasa
T1	0.25%	0.25%	0.20%
T2		0.10%	
T3	0.50%	0.50%	
T4		0.25%	
T5	1.00%	0.50%	
T6		0.25%	

En un Erlenmeyer se colocó 6 mL de medio BH3 0,7M (Anexo A) y 1 g de hojas troceadas a una concentración de 1 g de hoja/10 mL de medio de digestión. Se agregó 4 mL de Sales CPW que contenían las soluciones enzimáticas de la Tabla 2, procurando ajustar la concentración final de manitol en el medio al 13% (Cassells & Barlass, 1977). Se colocó los erlenmeyers sellados con Parafilm® en incubación a temperatura ambiente, en oscuridad total y agitación constante a 60 RPMs (Henriques, 2015). Todos los tratamientos fueron monitoreados constantemente mediante conteos celulares en intervalos de dos horas entre las 8 y 24 h de digestión para determinar el tiempo con mayor número de protoplastos liberados (Davey, 2010).

Al finalizar, el tratamiento con mejores resultados fue utilizado para optimizar el proceso de aislamiento, evaluando varios parámetros importantes que también afectan el rendimiento final. Dentro de los parámetros que se evaluó tenemos:

- El tipo de medio de aislamiento entre cuatro composiciones distintas: CPW, BH3, I10, y K3 cuya composición está detalladas en el Anexo A (Bellini *et al.*, 1990; Brito, 2011).
- El uso o ausencia de un tratamiento de pre-plasmólisis previo al aislamiento, evaluando cinco tratamientos diferentes. P1: sin pre-plasmólisis; P2: una hora en una solución CPW11%M; P3: una hora en una solución CPW13%M; P4: tres horas en una solución CPW11%M; P5: tres horas en una solución CPW13%M (Bellini *et al.*, 1990).
- La edad del tejido foliar y el tipo de corte de la hoja combinándolos en cuatro tratamientos C1: hojas de 6 semanas y trozos cortados de 1x1mm; C2: hojas de 12 semanas y trozos de 1x1mm; C3: hojas de 6 semanas y trozos de 1x5 mm; C4: hojas de 12 semanas y trozos de 1x5 mm.
- El tipo y concentración del regulador osmótico usando cinco tratamientos: O1: manitol al 9%; O2: manitol al 11%; O3 manitol al 13%; O4: inositol al 8% y O5: inositol al 10% (Davey, 2010).

- La cantidad de tejido por mililitro de solución digestiva y las revoluciones de agitación durante el aislamiento, evaluando seis tratamientos: A1: 500mg/10mL a 30 RPMs; A2: 500mg/10mL a 60 RPMs; A3 500mg/10mL a 90 RPMs; A4: 1g/10mL a 30 RPMs; A5: 1g/10mL a 60 RPMs; A6: 1g/10mL a 90 RPMs (Henriques, 2015).

En todos los casos el medio, tejido y soluciones digestivas fueron mezclados de manera similar a la descrita en el ensayo anterior. Se utilizó cuatro repeticiones por cada tratamiento.

Adoptando los mejores parámetros obtenidos en el método 'One-step' y las dos mejores combinaciones enzimáticas, se comparó este protocolo con un procedimiento 'Two-Step' para determinar si existía alguna mejora en el número de protoplastos obtenidos (De Wit, 1976). La variación de este procedimiento consistió en adicionar una a la vez las enzimas digestivas en el medio de aislamiento.

En un Erlenmeyer se colocó 6 mL de medio I10 y 1 g de hojas troceadas a una concentración de 1 g de hoja/10 mL de medio de digestión, se agregó 4 mL de solución CPW que contenía la enzima pectinasa en la concentración descrita en la Tabla 2 y se dejó incubar durante tres horas. Al cabo de este tiempo se descartó el medio de digestión y se reemplazó con 6 mL de nuevo medio y 4 mL de solución CPW que contenía las enzimas celulasa y pectoliasa sin pectinasa a las concentraciones de la Tabla 2 (De Wit, 1976). Los erlenmeyers fueron sellados con Parafilm® y se incubaron a temperatura ambiente, en oscuridad total y agitación constante a 60 RPMs, durante 18 horas (Henriques, 2015).

2.3. Conteo de protoplastos

El conteo de protoplastos se llevó a cabo tanto en las etapas de aislamiento como purificación para determinar los mejores tratamientos. En todos los casos se tomó una muestra de 10 uL del medio que contenía los protoplastos y se los colocó cuidadosamente en una cámara Neubauer. Se contó el número total de células encontradas en los cuatro recuadros laterales y el recuadro central de la cámara para

determinar la concentración de células por mililitro usando la siguiente fórmula (Henriques, 2015):

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células viables} \times 10000}{\text{Número de cuadros}}$$

2.4. Purificación de Protoplastos

El mejor tratamiento enzimático y tiempo de digestión obtenidos del aislamiento fue utilizado a partir de este punto para realizar la purificación. Al cabo del tiempo de digestión, se tomará el medio con las células y se lo pasará a través de un tamiz metálico de 80um para retirar el tejido no digerido, el líquido obtenido se colocará en un tubo falcon, se centrifugará por 7 min a 500 RPMs y se eliminará el sobrenadante con una pipeta estéril (Brito, 2011). Posteriormente se colocarán gota a gota 5 mL de una solución CPW-21% sacarosa y 3 mL de CPW-13% manitol (Henriques, 2015), y se probará dos diferentes tiempos de centrifugación detallados en la Tabla 2.

Se retiró el halo formado por los protoplastos entre las dos soluciones en un nuevo tubo con 5 mL de medio BH3 0,7M y se realizó una nueva centrifugación probando dos tratamientos diferentes (Tabla 2). Finalmente el sobrenadante y resuspendiendo los protoplastos en 10 veces su volumen de medio BH3 0,7M (Brito, 2011). Para cada tratamiento se realizarán 3 repeticiones.

Tabla 3

Tratamientos de condiciones de centrifugación para la purificación de protoplastos de hojas de tomate (Solanum lycopersicum Mill.)

Tratamiento	Condiciones de centrifugación 1	Condiciones de centrifugación 2
T1	700 RPMs, 5 minutos	700 RPMs, 5 minutos
T2		700 RPMs, 10 minutos
T3	700 RPMs, 10 minutos	700 RPMs, 5 minutos
T4		700 RPMs, 10 minutos

2.5. Evaluación de la viabilidad de los Protoplastos

La viabilidad celular únicamente se determinó en el mejor tratamiento de purificación. Luego de purificados los protoplastos, se procederá a realizar una tinción con Azul de metileno para conocer su viabilidad, para esto se colocó por 10 minutos a temperatura ambiente 100 µl Azul de lactofenol (1%) en un mL del medio que contiene los protoplastos, seguidamente se centrifugó 5 min a 500 RPMs para recuperar los protoplastos, finalmente se retirará el sobrenadante, se volvió a suspender las células en 10 veces su volumen de medio BH3 0,7M y se realizó un conteo en cámara Neubauer (Huang *et al.*, 1986).

Se realizaron seis purificaciones para evaluar la viabilidad. El conteo se llevó a cabo de manera similar al conteo realizado en el aislamiento y se utilizará la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de viabilidad de los protoplastos (Henriques, 2015):

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número de células totales}} \times 100$$

2.6. Cultivo de Protoplastos

Una vez purificados, los protoplastos se sembraron en dos diferentes medios de cultivo cuya composición se encuentra detallada en el Anexo A, utilizando tres concentraciones diferentes de reguladores de crecimiento para cada medio, descritas a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4

Medios para el cultivo de protoplastos aislados y purificados de hojas de tomate (Solanum lycopersicum Mill.).

Tratamiento	Medio	Reguladores de Crecimiento
M1		Sin Reguladores
M2	BH3	2,4-D (1 mgL-1), Kinetina (0,1 mgL-1)
M3		2,4-D (0.5 mgL-1), Kin (0.5 mgL-1), AIA (1 mgL-1)
M4		Sin Reguladores
M5	TM2	2,4-D (1 mgL-1), Kinetina (0,1 mgL-1)
M6		2,4-D (0.5 mgL-1), Kin (0.5 mgL-1), AIA (1 mgL-1)

La siembra se realizó colocando dos gotas (150 µL) de medio a una concentración de 7.6×10^4 protoplastos/ml en una placa petri, seguidamente se colocó 12 gotas de medio nutritivo en el borde de la caja petri y 30 gotas en la periferia de las células, finalmente se selló la caja Petri con Parafilm® y se incubó en oscuridad a 26°C (Brito, 2011).

Inicialmente se evaluó la viabilidad de los protoplastos cultivados en los diferentes medios durante los tres primeros días luego de la siembra y a los 5 días, tomando una alícuota del medio y realizando un conteo en cámara Neubauer. Se utilizó tres repeticiones para cada medio de cultivo (Grzebelus *et al.*, 2012).

Utilizando los medios con mejores resultados se repitió la siembra para evaluar la regeneración de la pared y el inicio de la división celular. Se tomó una muestra del medio con las células a los 5, 7, 9, 12 y 15 días luego de la siembra y se

realizó un conteo del número de células totales y de las células que presentaban al menos una división (Grzebelus *et al.*, 2012). De igual manera se utilizó tres repeticiones para cada medio.

Para determinar la eficiencia del cultivo de protoplastos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia del cultivo} = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número de células totales}} \times 100$$

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Aislamiento de Protoplastos

La optimización del protocolo de aislamiento de protoplastos se logró fijando uno por uno varios parámetros importantes que fueron: el tiempo de digestión del tejido, la concentración de enzimas usadas, el medio de aislamiento, la concentración del regulador osmótico, la necesidad de un tratamiento de pre-plasmólisis, la edad de las hojas, el tipo de corte del tejido, la cantidad de material vegetal, la agitación durante la digestión y el método de aislamiento, a continuación se detalla los resultados obtenidos en cada ensayo.

3.1.1. Tiempo de digestión y concentración de las Enzimas

En un primer experimento se probó el efecto de diferentes combinaciones de enzimas en la liberación de protoplastos, así como el tiempo idóneo de digestión para obtener un mayor número de células libres. Se utilizó seis diferentes tratamientos resultantes de la combinación de las enzimas celulasa, pectinasa y pectoliasa (Tabla 2).

El tiempo evaluado en todos los tratamientos fue de ocho a 24 horas de digestión. Cabe recalcar que antes de las ocho horas de digestión no se evidenció la liberación de protoplastos, ya que el medio de aislamiento no presentó ninguna coloración. Se comprobó además mediante observación al microscopio que no existían células en el medio sino únicamente algunos restos celulares. A partir de las ocho horas en todos los tratamientos se logró divisar protoplastos en la solución, aunque inicialmente en poca cantidad (Fig.4).

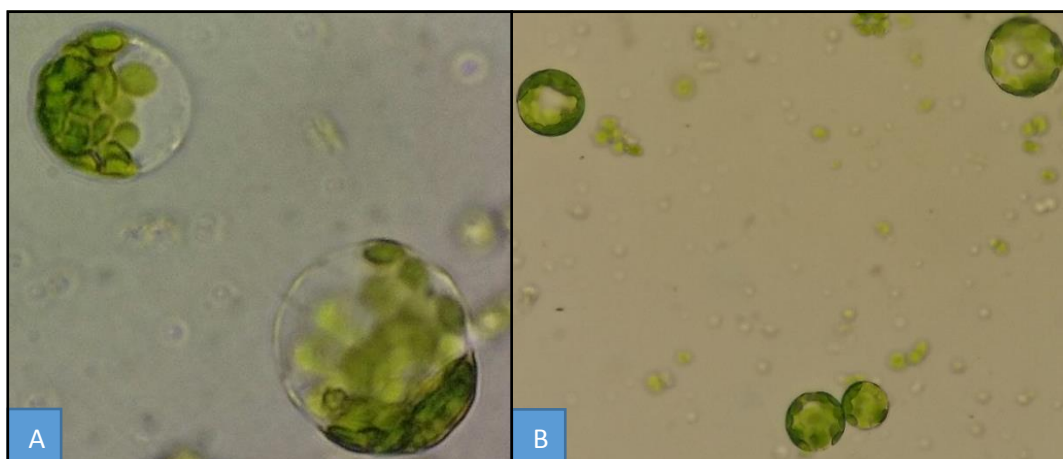


Figura 4: Protoplastos aislados del mesófilo de hojas de *Solanum lycopersicum* Mill observados al microscopio óptico con un aumento de 80x (A) y 40x (B).

Al cabo de 24 horas, de digestión, el número de protoplasto/mL de medio disminuyó paulatinamente en todos los tratamientos. A partir de las 30 horas del ensayo se logró observar al microscopio únicamente restos celulares sin la presencia de protoplastos en todos los tratamientos.

En la figura 5 se muestran los datos resultantes del aislamiento de protoplastos usando los diferentes cocteles enzimáticos, donde podemos observar que los mejores tres tratamientos fueron T1, T2 y T4.

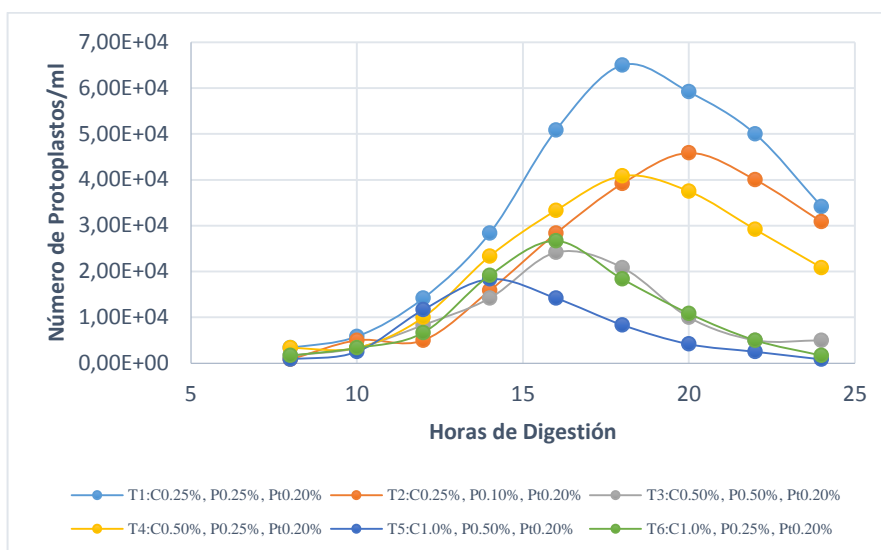


Figura 5: Número promedio ($n=4$) de protoplastos aislados del mesófilo de hojas de *Solanum lycopersicum* Mill. tratados durante 24 horas por seis diferentes cocteles enzimáticos (C = Celulasa; P = Pectinasa; Pt = pectoliasa).

El tratamiento T1 alcanzó un número de 6.5×10^4 protoplastos/ml a las 18 horas de digestión. T2 aisló un promedio de 4.6×10^4 protoplastos/ml a las 20 horas y T4 2.4×10^4 protoplastos/ml a las 18 horas. El tratamiento T5 en cambio, fue el que menor número de protoplastos aisló con una media de 1.4×10^4 protoplastos/ml a las 16 horas de digestión.

Para determinar si existía una diferencia significativa entre los seis tratamientos, se comparó la media del número de protoplastos obtenidos mediante un análisis de varianza de medidas repetidas inter-sujetos. En la Tabla 5 se presenta el resumen de la prueba de ANOVA donde se observa las medias del número de protoplastos aislados.

Tabla 5

Resumen de la prueba ANOVA inter-sujetos para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados usando seis diferentes cocteles enzimáticos.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	52542013888,889	1	52542013888,889	1251,736	,000
Tratamiento	15129976851,852	5	3025995370,370	72,090	,000
Error	503703703,704	12	41975308,642		

En este análisis se obtuvo un valor $F=72.09$ mayor a F_0 con un nivel de significancia del 95% lo que comprueba la diferencia que existe entre los tratamientos.

Posteriormente se realizó una prueba no paramétrica Tukey. Este análisis se llevó a cabo para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados como se puede observar en la Tabla 6.

Tabla 6

Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados mediante seis diferentes cocteles enzimáticos.

Tratamiento	Subconjunto		
	1	2	3
T5	7037,0370		
T3	10277,7778		
T6	10370,3704		
T4		22407,4074	
T2		23425,9259	
T1			34537,0370
Sig.	,451	,991	1,000

En esta tabla se evidencia la separación de los tratamientos en tres subgrupos homogéneos. El grupo con la media más alta incluyó a T1 y el subgrupo con las medias más bajas a T3, T5 y T6.

De los seis cocteles enzimáticos evaluados, los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos T1 y T2 que contenían una baja concentración de celulasa y pectinasa en comparación con el resto de tratamientos. Los demás cocteles con concentraciones enzimáticas mayores mostraron una disminución considerable del número de células liberadas. Estos datos sugieren que se puede obtener un mayor número de protoplastos de tomate usando bajas concentraciones de enzimas en el medio, por lo que se fijó como concentración enzimática de trabajo al tratamiento T1. Además se adoptó el tiempo de 18 horas de digestión para la evaluación de posteriores aislamientos.

3.1.2. Determinación del medio de aislamiento

Cuatro diferentes medios nutritivos (I10, BH3, K3 y CPW) fueron evaluados para el aislamiento de protoplastos. El mayor número de células liberadas se logró con el medio I10 el cual aisló aproximadamente 6.4×10^4 protoplastos/ml, seguido del medio BH3 que alcanzó los 6.1×10^4 protoplastos/ml y de K3 con 5.7×10^4 protoplastos/ml (Fig. 6).

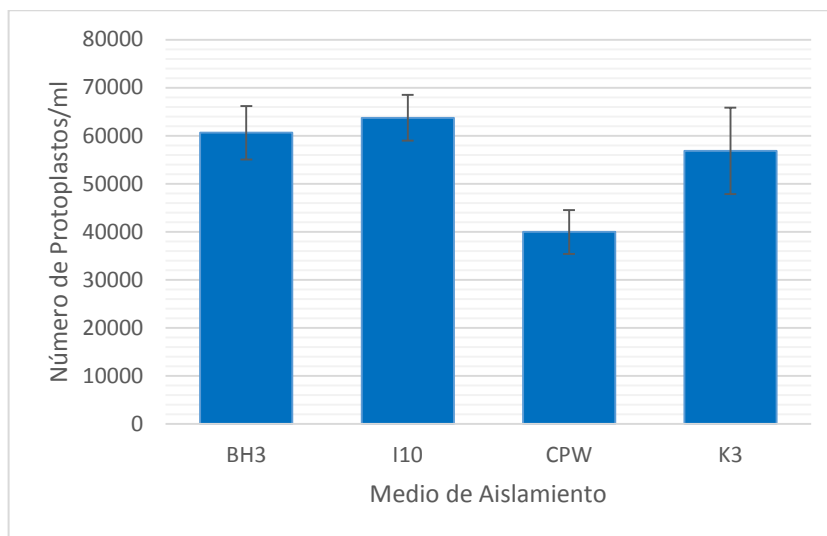


Figura 6: Número medio (n=4) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos a las 18 horas de digestión usando cuatro diferentes medios de aislamiento BH3, I10, CPW, K3.

Con el objeto de determinar si existía una diferencia significativa entre los cuatro medios de aislamiento se comparó la media del número de protoplastos obtenidos mediante una prueba de ANOVA, los datos se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7

Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados usando cuatro diferentes medios de aislamiento.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1440625000,000	3	480208333,333	8,823	,002
Dentro de grupos	653125000,000	12	54427083,333		
Total	2093750000,000	15			

Mediante este análisis se obtuvo un estadístico de prueba $F = 8.8$ mayor que F_0 , comprobando la existencia de una diferencia significativa entre los cuatro medios de aislamiento probados.

Posteriormente, mediante la prueba Tukey se determinó qué tratamientos eran estadísticamente diferentes comparando las medias de protoplastos aislados. La Tabla 8 presenta el resumen de los datos obtenidos.

Tabla 8

Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados mediante cuatro diferentes medios de aislamiento

Tratamiento	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
CPW	47500,0000	
K3		63750,0000
BH3		69375,0000
I10		71875,0000
Sig.	1,000	,436

En la tabla superior se muestra la separación de los tratamientos en dos subgrupos homogéneos. El primero que incluyó a los medios complejos BH3, I10 y K3 entre los cuales no se encontró una diferencia significativa del número medio de protoplastos. El segundo está formado únicamente por el medio sencillo CPW, el cual resultó ser menos efectivo para el aislamiento.

Estos resultados indican que los protoplastos de tomate son liberados en mayor cantidad utilizando un medio de aislamiento rico en nutrientes, ya que el número de células liberadas en el medio más sencillo (CPW) fue menor. Por otra parte aunque el rendimiento en los medios complejos resultó mayor, el número medio de protoplastos aislados es casi constante entre estos tres tratamientos, lo que nos indica que las células parecen ser flexibles en cuanto a la composición del medio de aislamiento. Con base en estos resultados se fijó a I10 como el nuevo medio de aislamiento predeterminado.

3.1.3. Efecto del tratamiento de pre-plasmólisis

En este ensayo se evaluó el efecto de cinco tratamientos de pre-plasmólisis en el rendimiento de los aislamientos. En la figura 7 podemos observar los valores medios del número de protoplastos aislados con cada pre-tratamiento. Los dos tratamientos con los mejores resultados fueron P3 con un promedio de 6.8×10^4 protoplastos/ml, seguido de P2 con una media de 6.4×10^4 protoplastos/ml.

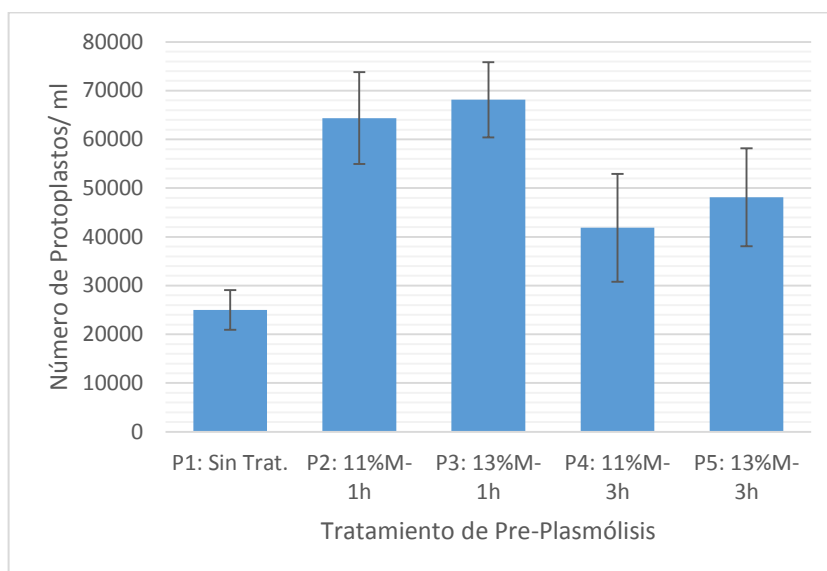


Figura 7: Número medio ($n=4$) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando cinco tratamientos de pre-plasmólisis (Sin Trat. = Sin pre-plasmólisis; 11%M= manitol al 11%; 13%M= manitol al 13%; 1h= una hora; 3h= tres horas).

En vista de la similitud observada entre los tratamientos, se realizó una prueba de ANOVA para determinar si existía una diferencia significativa entre los cinco tratamientos de pre-plasmólisis utilizados. En la Tabla 9 se puede observar el valor estadístico de prueba $F = 15.8$ calculado, el cual evidencia que existe diferencia significativa en los tratamientos.

Tabla 9

Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados usando cuatro diferentes tratamientos de pre-plasmólisis.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4913750000,000	4	1228437500,000	15,766	,000
Dentro de grupos	1168750000,000	15	77916666,667		
Total	6082500000,000	19			

Al realizar la prueba Tukey se observó que los tratamientos se dividían en cuatro subconjuntos homogéneos. El subgrupo conformado por P3 y P2 contenía los valores medios más altos, mientras que el grupo formado por P1 presentó el menor número medio de protoplastos aislados (Tabla 10).

Tabla 10

Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados mediante cuatro diferentes tratamientos de pre-plasmólisis.

Tratamiento	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
P1	25000,0000			
P4		41875,0000		
P5		48125,0000	48125,0000	
P2			64375,0000	64375,0000
P3				68125,0000
Sig.	,101	,851	,120	,973

Usando cualquiera de las dos concentraciones de manitol evaluadas en la solución de pre-plasmólisis, se observó que el mejor tiempo de inmersión del tejido en la solución fue de una hora. Estos resultados sugieren que cualquier tratamiento de pre-plasmólisis que se haga al tejido foliar de tomate durante un corto periodo de tiempo, puede incrementar el rendimiento de los aislamientos.

Se fijó el tratamiento P3 como el mejor acondicionamiento previo para aislar protoplastos de tomate, debido a que presenta resultados ligeramente mayores que el resto de tratamientos.

3.1.4. Edad del Material vegetal

En este experimento se evaluó el efecto de dos edades y dos tipos de corte del tejido en el rendimiento de los aislamientos. En la figura 8 se presenta el número medio de protoplastos aislados con cada uno de los cuatro tratamientos utilizados.

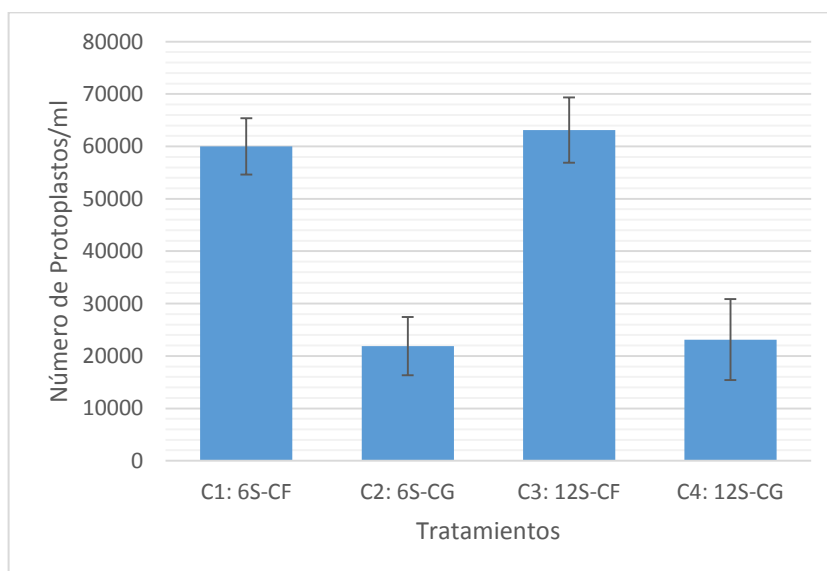


Figura 8: Número medio (n=4) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando dos edades y dos tipos de corte del tejido (6S = seis semanas de edad; 12S = doce semanas de edad; CF = corte fino; CG = corte grueso).

En esta figura se puede observar que el tratamiento con mejores resultados fue C3 con un número promedio de 6.3×10^4 protoplastos/ml, seguido de C1 con una media de 6.0×10^4 protoplastos/ml. Por otro lado los tratamientos C2 y C4 mostraron los más bajos rendimientos de 2.1×10^4 y 2.3×10^4 protoplastos/ml respectivamente.

Al realizar la prueba de ANOVA correspondiente se obtuvo un valor de $F=51.4$, que a un nivel de significancia del 95% evidenció una diferencia significativa entre los tratamientos evaluados (Tabla 11).

Tabla 11

Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados utilizando dos diferentes edades y tipos de corte de tejido.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6126171875,000	3	2042057291,667	51,420	,000
Dentro de grupos	476562500,000	12	39713541,667		
Total	6602734375,000	15			

En base a esta diferencia se realizó la prueba Tukey, la cual determinó que los cuatro tratamientos eran divididos en dos subgrupos homogéneos como se observa en la Tabla 12.

Tabla 12

Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre cuatro tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados con dos diferentes edades y tipos de corte de tejido.

Tratamiento	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
C2	21875,0000	
C4	23125,0000	
C1		60000,0000
C3		63125,0000
Sig.	,992	,895

En esta tabla se puede observar que el primer subgrupo presenta la mayor media de protoplastos aislados, el cual incluye a los tratamientos C1 y C3 en los que el tejido se cortó en trozos finos. Mientras que el grupo con los menores rendimientos incluyó a C2 y C4, tratamientos en los que el tejido se cortó en trozos

gruesos. Estos resultados sugieren que al realizar cortes finos en el tejido foliar de tomate se puede obtener un mayor número de protoplastos en el aislamiento. Por otra parte en este ensayo la edad del tejido resultó no ser un factor determinante en el rendimiento del aislamiento, pudiendo ser de seis o 12 semanas sin cambios significativos en el posible número de protoplastos aislados.

3.1.5. Determinación de la cantidad de tejido y agitación óptimos

Para definir la mejor cantidad de tejido y agitaciones usadas durante el aislamiento de protoplastos se utilizó seis tratamientos diferentes. Los promedios del número de protoplastos aislados usando estos tratamientos se encuentran graficados en la Figura 9.

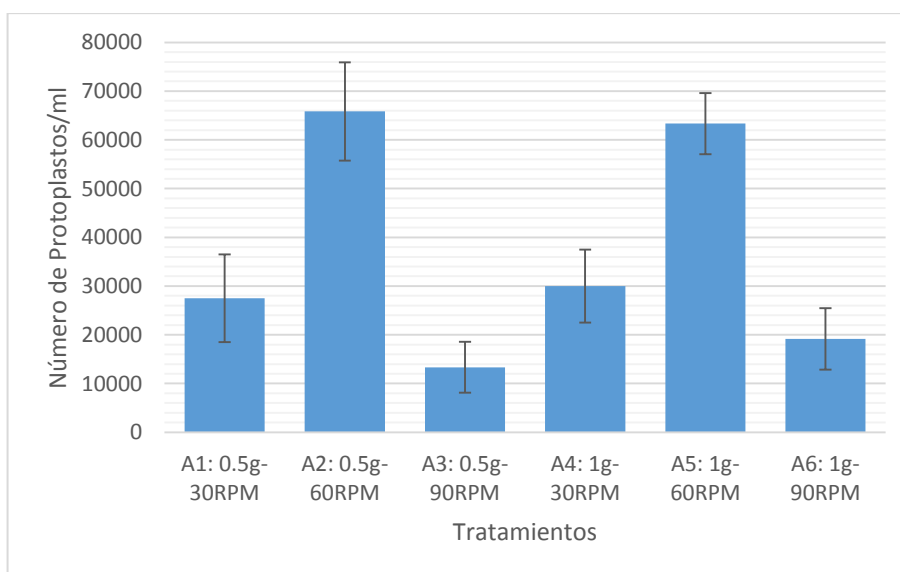


Figura 9: Número medio (n=4) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando dos cantidades de tejido (0.5 y 1 gramo) y tres velocidades de agitación diferentes (RPM = revoluciones por minuto).

En la figura se observa que el tratamiento que obtuvo el mayor número de protoplastos aislados fue A2 con una media de 6.6×10^4 protoplastos/ml seguido de

A5 con un promedio de 6.3×10^4 protoplastos/ml. Mientras que los dos tratamientos con el menor rendimiento fueron A3 y A6.

Al analizar las medias de los tratamientos mediante una prueba de ANOVA, se obtuvo un valor de $F = 26.4$ que confirmó la existencia de una diferencia significativa entre tratamientos (Tabla 13).

Tabla 13

Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados utilizando dos diferentes cantidades de tejido y tres velocidades de agitación.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7622569444,444	5	1524513888,889	26,449	,000
Dentro de grupos	691666666,667	12	57638888,889		
Total	8314236111,111	17			

Existiendo una diferencia significativa, se realizó a continuación una prueba Tukey que separó a los tratamientos en dos subgrupos homogéneos. Uno formado por los tratamientos A2 y A5 y el otro por los cuatro tratamientos restantes como se muestra en el resumen de la Tabla 14.

Tabla 14

Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre seis tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados con dos diferentes cantidades de tejido y tres velocidades de agitación.

Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
A3	13333,3333	
A6	19166,6667	
A1	27500,0000	
A4	30000,0000	
A5		63333,3333
A2		65833,3333
Sig.	,149	,998

Estos resultados indican que el número de revoluciones de agitación durante el aislamiento de protoplastos de tomate puede influir de manera significativa en el rendimiento. Obteniendo los mejores resultados con los tratamientos que mantuvieron una velocidad de agitación de 60 RPMs durante el aislamiento. Por otra parte la cantidad de tejido usada por mililitro de solución enzimática parece no influir de manera significativa en la cantidad de protoplastos aislados, pudiendo utilizar uno ó 0.5 g de tejido/10 ml de medio con rendimientos similares (Fig. 9).

Con los resultados obtenidos en este ensayo, se ratificó los 60 RPMs usados inicialmente como la mejor agitación para el aislamiento y se fijó a 0.5 g de hoja/ 10 ml de medio como la mejor concentración de tejido para el aislamiento, permitiendo trabajar con una menor cantidad de tejido en cada repetición.

3.1.6. Evaluación de la concentración del regulador osmótico

El efecto de dos reguladores osmóticos en el rendimiento del aislamiento de protoplastos fue evaluado utilizando cinco tratamientos diferentes. En la Figura 10 se puede observar los promedios del número de protoplastos aislados con cada tratamiento utilizado.

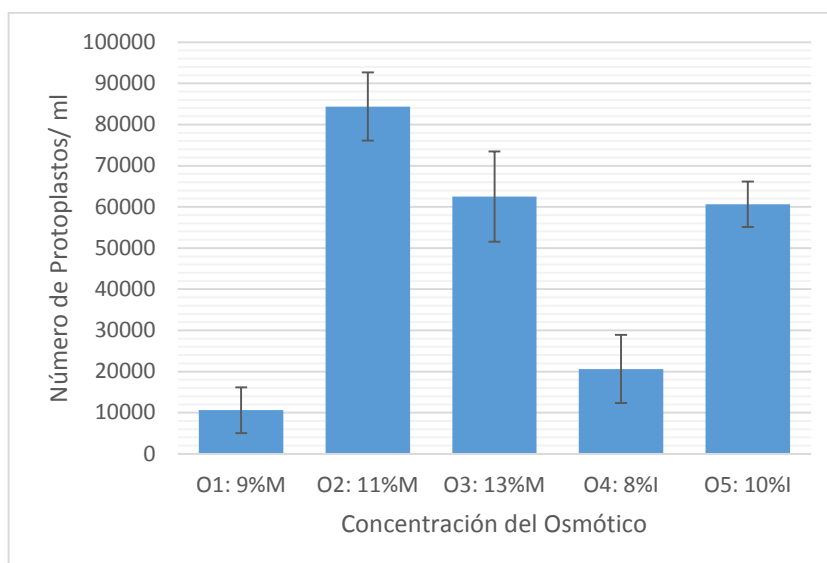


Figura 10: Número medio (n=4) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando dos tipos de regulador osmótico (M = manitol; I= inositol).

El tratamiento que obtuvo el mayor número de protoplastos aislados fue O2 con un promedio de 8.4×10^4 protoplastos/ml seguido de O3 con 6.3×10^4 protoplastos/ml y O5 con 6.1×10^4 protoplastos/ml. Por otro lado el tratamiento con el menor rendimiento fue O1 con un número de 1.0×10^4 protoplastos/ml.

Al realizar una prueba de ANOVA, se obtuvo un valor de $F= 60.2$, que con un nivel de significancia del 95% confirmó que existía una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos utilizados (Tabla 15).

Tabla 15

Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados utilizando dos reguladores osmóticos.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1535500000,000	4	3838750000,000	60,216	,000
Dentro de grupos	956250000,000	15	63750000,000		
Total	16311250000,000	19			

La prueba Tukey hecha a continuación separó a los tratamientos en tres subgrupos homogéneos. El subgrupo que tenía el mayor rendimiento incluyó únicamente al tratamiento O2, y el grupo de menor rendimiento se conformó por los tratamientos O1 y O4. Estos datos se observan a continuación en la Tabla 16.

Tabla 16

Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre cinco tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados con dos diferentes reguladores osmóticos.

Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
O1	10625,0000		
O4	20625,0000		
O5		60625,0000	
O3		62500,0000	
O2			84375,0000
Sig.	,424	,997	1,000

Los dos mejores resultados de este ensayo O2 y O3 se obtuvieron utilizando como regulador osmótico al manitol. El inositol al 10% también alcanzó un número importante de protoplastos aislados aunque obteniendo valores menores a O2 y O3. Por otra parte los tratamientos O1 y O4 dejan ver que concentraciones muy bajas de ambos azúcares disminuyen significativamente el rendimiento del aislamiento.

Estos resultados sugieren que se puede obtener un mayor número de protoplastos de tomate utilizando como regulador osmótico manitol a una concentración del 11% en el medio de aislamiento. Esta concentración resultó ser menor a la utilizada hasta el momento y mejoró en un 30% el número de protoplastos obtenidos hasta el momento. A continuación en la figura 11 se puede observar los protoplastos aislados usando manitol al 11%.

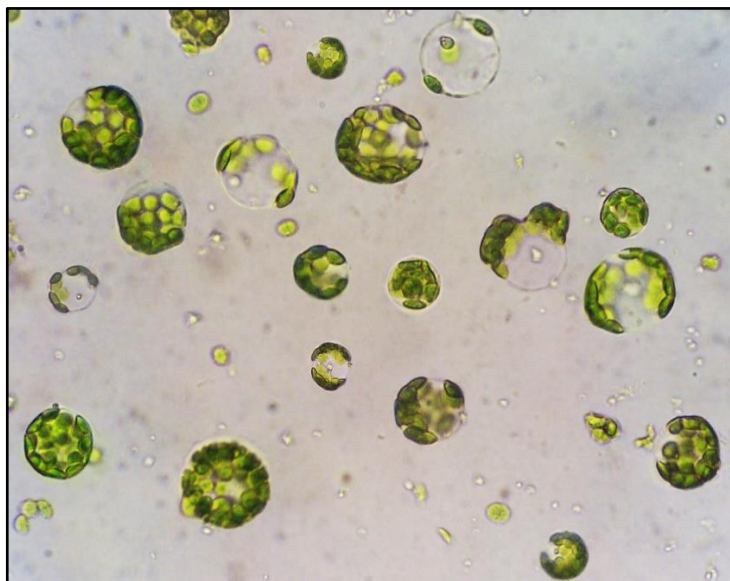


Figura 11: Protoplastos aislados del mesófilo de hojas de *Solanum lycopersicum* Mill en medio de aislamiento con manitol al 11% observados al microscopio óptico (40x).

3.1.7. Comparación de los métodos de aislamiento 'One-step' y 'Two-step'

Se comparó dos métodos diferentes de aislamiento utilizando las dos mejores combinaciones enzimáticas obtenidas en el primer experimento. La primera 0.25% de celulasa, 0,25% de pectinasa y 0.20% de pectoliasa, y la segunda de 0.25% de celulasa, 0.10% de pectinasa y 0.20% de pectoliasa. En la figura 12 se muestra el número medio de protoplastos aislados utilizando los cuatro tratamientos evaluados.

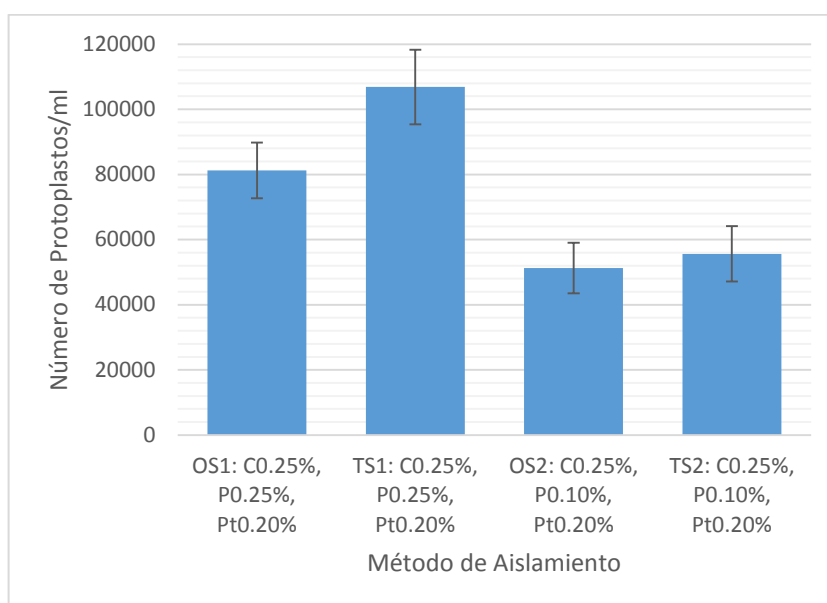


Figura 12: Número medio ($n=4$) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos a las 18 h de digestión usando dos métodos de aislamiento (OS = 'One-step'; TS = 'Two-step'; C = celulasa; P = pectinasa; Pt = pectoliasa).

En esta figura se puede observar que el tratamiento que obtuvo el mayor número medio de protoplastos aislados fue TS1 con 1.07×10^5 protoplastos/ml, seguido de OS1 con 8.1×10^4 protoplastos/ml. Por otra parte los tratamientos OS2 y TS2 fueron los que presentaron los rendimientos más bajos.

Al comparar las medias de los tratamientos mediante un ANOVA se obtuvo un valor $F=31.5$ que demuestra la existencia de una diferencia significativa entre tratamientos (Tabla 17).

Tabla 17

Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos aislados utilizando dos diferentes métodos de aislamiento.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7953125000,000	3	2651041666,667	31,517	,000

Dentro de grupos	1009375000,000	12	84114583,333
Total	8962500000,000	15	

Teniendo en cuenta esta diferencia se realizó una prueba Tukey para determinar que tratamientos son diferentes, dividiéndolos en tres subgrupos homogéneos como se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18

Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre cuatro tratamientos usando las medias del número de protoplastos aislados con dos métodos diferentes.

Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
OS2	51250,0000		
TS2	55625,0000		
OS1		81250,0000	
TS1			106875,0000
Sig.	,905	1,000	1,000

Los resultados de esta tabla confirman que las concentraciones enzimáticas utilizadas hasta el momento, resultan ser las más óptimas para el aislamiento de protoplastos de tomate mediante los métodos evaluados. Se puede apreciar además que el tratamiento TS1 fue el que alcanzó el mayor conteo de protoplastos para este ensayo. Estos resultados sugieren que utilizando el método 'Two-step' es posible obtener una mayor cantidad de protoplastos de tomate adoptando las mismas condiciones óptimas fijadas para el método 'One-step' (Fig. 13).

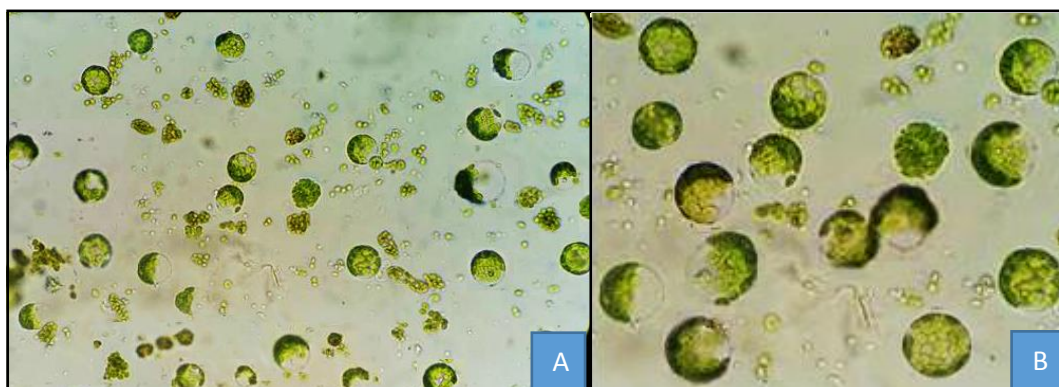


Figura 13: Protoplastos aislados del mesófilo de hojas de *Solanum lycopersicum* Mill mediante el método 'Two-step' usando 0.25% de celulasa, 0.25% de pectinasa y 0.20% de pectoliasa, observados al microscopio óptico (A: 40x y B: 80x).

El tratamiento TS1 con un número medio de 1.07×10^5 protoplastos/ml resultó ser el aislamiento con el mayor número de protoplastos obtenidos de entre todos los ensayos realizados. Debido a este hecho se decidió fijar al método 'Two-step' como la metodología estándar del aislamiento para los posteriores ensayos de purificación y cultivo de protoplastos.

En resumen, los mejores parámetros para llevar a cabo el aislamiento de protoplastos fueron, utilizar un pre-tratamiento del material vegetal con una solución de manitol al 11% durante una hora, mantener a I10 como medio de aislamiento, realizar cortes finos de aproximadamente 1x1 mm al tejido, utilizar un coctel enzimático conformado por celulasa al 0.25%, pectinasa al 0.25% y pectoliasa al 0.20%, mantener como regulador osmótico al manitol con una concentración del 11%, realizar el aislamiento con tejido de entre seis a 12 semanas de edad con una concentración de 0.5 g de tejido/10 ml de medio de aislamiento y mantener agitada la digestión durante 18 horas a 60 RPM.

3.2. Purificación de Protoplastos

Para la purificación de los protoplastos, se evaluó el efecto de cuatro diferentes condiciones de centrifugación en el número de células purificadas. En la

figura 15 se pueden apreciar los números medios de protoplastos purificados mediante las cuatro condiciones de centrifugación evaluadas.

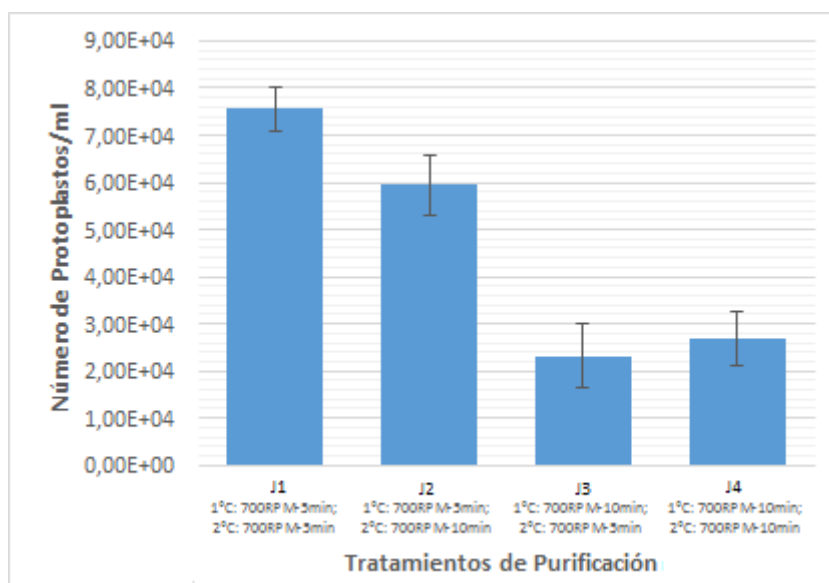


Figura 14: Número medio (n=4) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. obtenidos luego del proceso de purificación usando cuatro diferentes condiciones de centrifugación (1°C = primera centrifugación; 2°C= segunda centrifugación; RPM = revoluciones por minuto; min = minutos).

En esta gráfica se puede apreciar que el tratamiento que obtuvo los mejores resultados fue J1 con una concentración de 7.6×10^4 protoplastos/ml, seguido de J2 con 5.9×10^4 protoplastos/ml. Los tratamientos J4 y J3 por otra parte presentaron conteos más bajos de protoplastos purificados.

Para determinar si existía una diferencia significativa entre los cuatro tratamientos, se comparó la media del número de protoplastos purificados mediante la prueba de ANOVA. En la Tabla 19 se presenta el resumen de los resultados de este análisis, donde se puede apreciar un valor de $F=72.17$, que demuestra una diferencia significativa entre las cuatro condiciones de centrifugación evaluadas.

Tabla 19

Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias del número de protoplastos purificados utilizando cuatro condiciones de centrifugación.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7781250000,000	3	2593750000,000	72,174	,000
Dentro de grupos	431250000,000	12	35937500,000		
Total	8212500000,000	15			

En relación a los resultados obtenidos de la prueba ANOVA, se realizó una prueba Tukey que separó a los tratamientos en tres subgrupos homogéneos, de los cuales el que obtuvo los mejores resultados fue el conformado por el tratamiento J1. En la Tabla 20 se puede observar cómo se encuentran divididos estos tres subgrupos, así como también cuál presenta la media más alta del número de protoplastos purificados.

Tabla 20

Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias del número de protoplastos purificados con cuatro condiciones de centrifugación diferentes.

Tratamientos	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
3,00	23125,0000		
4,00	26875,0000		
2,00		59375,0000	
1,00			75625,0000
Sig.	,813	1,000	1,000

Los resultados obtenidos, sugieren que al utilizar tiempos cortos de centrifugación de 5 min a bajas revoluciones (700 RPMs) tanto para la precipitación de los protoplastos como para su separación, se puede purificar una mayor cantidad de protoplastos de tomate intactos (Fig. 16).

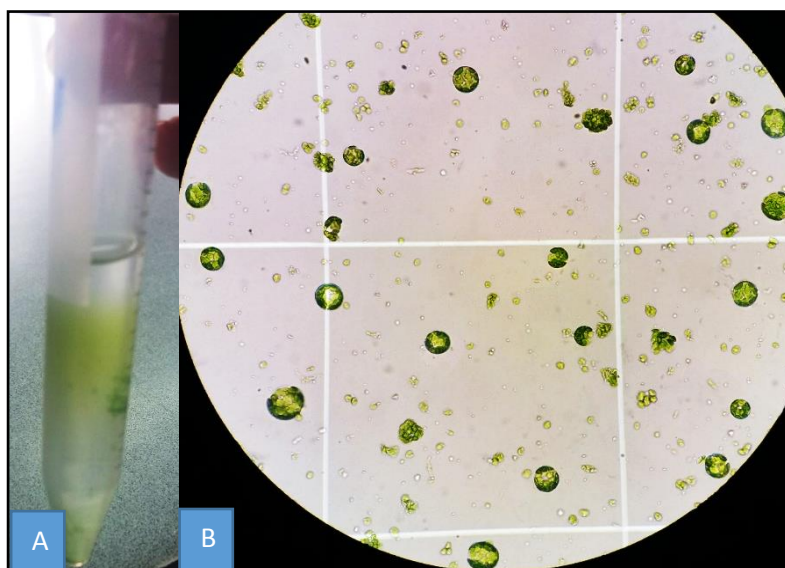


Figura 15: **A:** Halo de protoplastos formado durante el proceso de purificación. **B:** Protoplastos purificados del mesófilo de hojas de *Solanum lycopersicum* Mill. usando 0.25% de celulasa, 0.25% de pectinasa y 0.20% de pectoliasa, observados al microscopio óptico (40x) en cámara

En base al tratamiento de purificación J1 con el que se obtuvo los mejores resultados, se realizó una tinción de los protoplastos con azul de metileno para determinar su viabilidad, obteniendo de cinco repeticiones un promedio de viabilidad celular del 81.30%.

3.3. Cultivo de Protoplastos

3.3.1. Viabilidad en el Cultivo

Al evaluar la viabilidad de los protoplastos en el cultivo se observó que esta disminuía durante los tres primeros días luego de la siembra, estabilizándose al quinto día. De entre los seis medios que se utilizaron, tres mantuvieron la viabilidad más alta con un patrón similar durante los cinco días de evaluación M4, M5 y M6. Los medios M2 y M3 mantuvieron una menor cantidad de células viables mientras que M1 disminuyó su viabilidad de forma significativa al cabo del tercer y quinto día (Fig. 17).

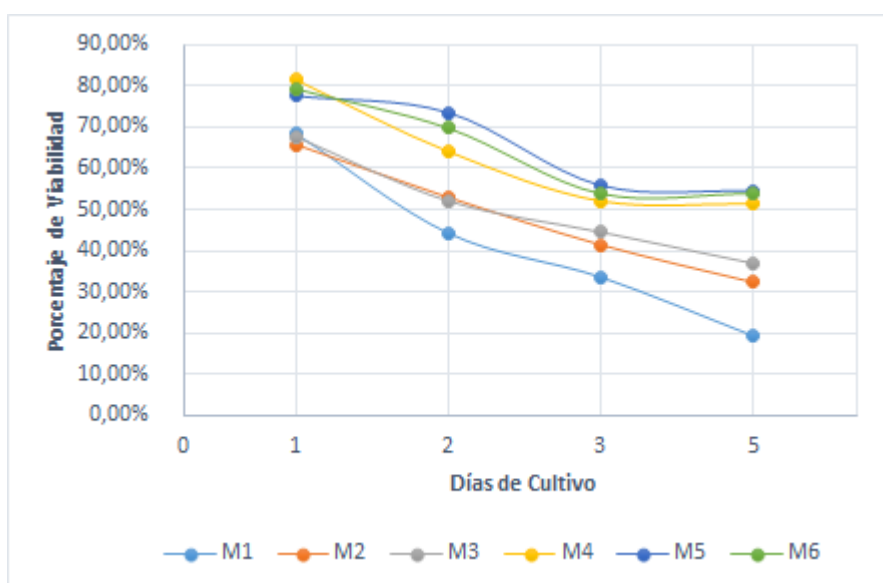


Figura 16: Viabilidad media (n=3) de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. cultivados en seis diferentes medios durante los cinco primeros días después de las siembra.

En esta figura se puede observar que la viabilidad de los protoplastos se estabilizó luego de los tres primeros días de cultivo en los tratamientos M4, M5 y M6. En cambio en los tratamientos M2 y M3 la viabilidad de las células disminuía aunque con menor intensidad comparada con los primeros dos días. El tratamiento M1 por otra parte continuó disminuyendo su viabilidad con el paso de los días, hasta volverse prácticamente nula (Fig. 17).

Al realizar un ANOVA de medidas repetidas con un $F=8.1$, se determinó que existía una diferencia significativa entre los seis tratamientos (Tabla 21).

Tabla 21

Resumen de la prueba ANOVA para evaluar diferencias entre las medias de viabilidad de protoplastos cultivados durante los cinco primeros días.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	220006,661	1	220006,661	1500,868	,000
Medio_Cultivo	5955,155	5	1191,031	8,125	,001
Error	1759,035	12	146,586		

En la prueba Tukey se separó a los tratamientos en tres subgrupos homogéneos. El primero conformado por M3, M4, M5 y M6 con los valores más altos de viabilidad, el segundo que incluyó a M2, M3, M4 y M6 y el último formado por M1, M2 y M3 con el porcentaje de viabilidad más bajo de entre todos los tratamientos (Tabla 22).

Tabla 22

Resumen de la prueba Tukey para determinar diferencias entre tratamientos usando las medias de viabilidad de protoplastos cultivados durante los cinco primeros días.

Medio_Cultivo	Subconjunto		
	1	2	3
M1	41,4358		
M2	48,1492	48,1492	
M3	50,3108	50,3108	50,3108
M4		62,2492	62,2492
M6		64,1683	64,1683
M5			65,3542
Sig.	,503	,061	,084

Estos resultados sugieren que existe un porcentaje de viabilidad mayor en los tratamientos que utilizan el medio TM-2 para el cultivo de los protoplastos.

3.3.2. Eficiencia del Cultivo

Con el objeto de evaluar la regeneración de la pared y el inicio de la división celular se realizaron nuevos cultivos empleando los medios nutritivos analizados anteriormente. En estos cultivos se observó una disminución del número de protoplastos en todos los medios conforme avanzaba el tiempo de incubación. En los tratamientos M1, M2 y M3 las células desaparecieron por completo del medio a partir de los 9 días de cultivo. En M4 se pudo observar protoplastos hasta el día doce, luego del cual todas las células murieron. En los tratamientos M5 y M6 por otro lado se mantuvo un número de células estable hasta los 15 días de cultivo (Fig. 18).

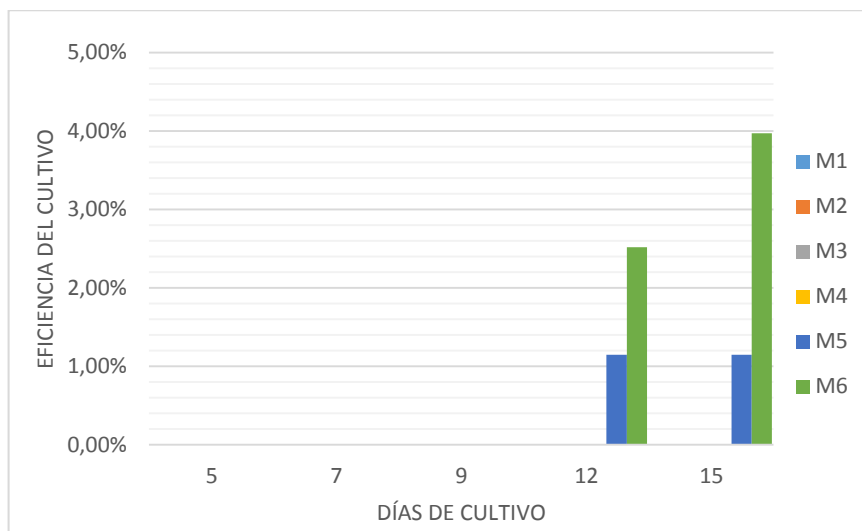


Figura 17: Eficiencia media (n=3) del cultivo de protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. durante los 15 primeros días de cultivo en seis diferentes medios.

En el tratamiento M5 a los 12 días se logró observar la primera división celular, sin embargo la eficiencia del cultivo no fue superior al 1.15%. Por otra parte en M6 se evidenció divisiones celulares con una eficiencia del 2.52% en el día 12 y del 3.96% en el día 15. Se logró divisar cúmulos celulares de dos y cuatro células a los 15 días de cultivo en el tratamiento T6 y cúmulos de dos células en T5 a los 12 días de cultivo (Fig. 18).

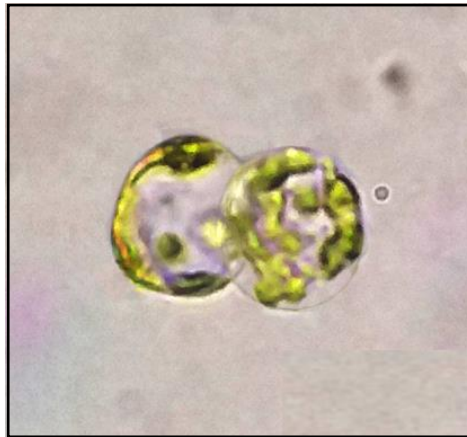


Figura 18: Protoplastos de *Solanum lycopersicum* Mill. durante la primera división mitótica, 12 días de cultivo en medio TM2 con 2,4-D (1.0 mgL⁻¹) y Kinetina (0.1 mgL⁻¹), 80x.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de Protoplastos

Numerosos estudios del aislamiento y cultivo de protoplastos de tomate han sido reportados en todo el mundo. Sin embargo debido a la gran cantidad de variables que influyen en el éxito de la obtención y cultivo de estas células, esta técnica es poco reproducible y debe ser estandarizada acorde a las condiciones propias de cada laboratorio (Davey *et al.*, 2005).

En este trabajo los protoplastos fueron aislados a partir del mesófilo de las hojas de tomate. Este tejido fue seleccionado debido a que puede ser obtenido en cortos periodos de tiempo, en grandes cantidades y mediante muestreos no destructivos de las plantas donadoras (Grzebelus *et al.*, 2012). Además la cantidad de tejido necesaria para realizar un aislamiento es poca comparada con el número de células que se pueden obtener en condiciones óptimas (Cassells & Barlass, 1977).

Luego de realizar la prueba de Tukey, se observó que los cocteles enzimáticos con los mejores resultados fueron los que contenían una baja concentración de celulasa y pectinasa. Estos resultados concuerdan con los de Bellini *et al.* (1990) que asegura que la degradación de la pared celular en el tomate es muy acelerada incluso usando bajas concentraciones enzimáticas. Esto significa que cantidades elevadas de enzima pueden ocasionar daños en la membrana plasmática y disminuir la cantidad de protoplastos liberados. Según Botero & Osorio (2011) la cantidad de enzimas es fijada en dependencia del grosor de la pared celular, de manera que una pared más gruesa requiere mayor cantidad de enzimas para ser digerida.

Autores como Cassells & Barlass (1977), De Wit (1976) y Horváth (2009), utilizaron en sus aislamientos concentraciones de pectinasa en un rango entre 0.1 y 0.5% similares a las empleadas en este trabajo. Por otra parte la cantidad de celulasa que estos autores utilizaron fue mayor comparada con el mejor tratamiento de este trabajo, T1. Según Cassells & Barlass (1977) las concentraciones de las enzimas digestivas usadas a menudo varían dentro de una misma especie. Estas variaciones se

deben a las diferencias en la composición de la pared celular que existe entre los diferentes genotipos y también a las condiciones de crecimiento de la planta.

El mayor número de protoplastos fue aislado con T1, alcanzando un valor de 6.5×10^4 protoplastos/ml. Esta cantidad fue mucho menor a la obtenida por De Wit (1976) o Horváth (2009) que alcanzaron un conteo de 1×10^6 protoplastos/ml usando un método similar de aislamiento. Esta diferencia en el rendimiento, según Botero & Osorio (2011), se debe a que no solo es necesario estandarizar las concentraciones enzimáticas en el aislamiento si no que a menudo se debe variar una o más condiciones del aislamiento para mejorar el rendimiento final.

Al evaluar el efecto de los medios de aislamiento mediante la prueba Tukey, se observó que los protoplastos de tomate son liberados en mayor cantidad en un medio de aislamiento rico en nutrientes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Brito (2011), Horváth (2009) y Bellini *et al.* (1990), los cuales obtuvieron un conteo de protoplastos de 10^6 células/ml utilizando los medios BH3, K3 e I10 respectivamente. Por otra parte, Tan y sus colaboradores (1986) aislaron satisfactoriamente protoplastos utilizando el medio sencillo CPW. Según Davey (2010) las necesidades internas de las células durante el aislamiento, pueden jugar un papel importante en la estabilidad y viabilidad de los protoplastos aislados. Horváth (2009), afirma que pueden existir células que requieran más cantidad de nutrientes que otras para poder mantenerse viables. Esta diferencia depende de algunos factores como el genotipo y las condiciones de crecimiento del material vegetal.

En cuanto a los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos de pre-plasmólisis, se observó que los aislamientos en los que se realizó este pre-tratamiento obtuvieron un número mayor de protoplastos comparados con el tratamiento sin pre-acondicionamiento P1. (Davey *et al.*, 2005), afirman que el pre-tratamiento del material vegetal puede mejorar considerablemente el rendimiento y estabilidad de los protoplastos obtenidos. Según Bellini *et al.* (1990), la pre-plasmólisis incrementa este rendimiento cuando es aplicada en plantas que han crecido en un ambiente sin una elevada humedad ($\leq 90\%$). En estas condiciones la presión osmótica del medio intracelular de los protoplastos se eleva, y requiere ser disminuida para evitar un shock osmótico durante el aislamiento.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los trabajos de Tan (1986) y Montagno *et al.* (1991), que utilizaron la pre-plasmólisis en plantas de tomate para maximizar el número de protoplastos aislados, obteniendo un rendimiento final de 2.3×10^5 y 2.0×10^6 protoplastos/ml respectivamente. Por otra parte Bellini *et al.* (1990) probó diferentes tratamientos de pre-plasmólisis sin obtener una diferencia significativa en el rendimiento final, posiblemente debido a que mantuvo su material vegetal creciendo en un ambiente con una elevada humedad ambiental.

La edad del material vegetal a menudo juega un papel importante en el rendimiento de un aislamiento. En este trabajo la edad no representó una diferencia significativa en el número de células obtenidas usando hojas ya sea de seis o 12 semanas. Estos resultados difieren del estudio realizado por Taiwo (2015) en plantas de berenjena, en el cual se evaluó el rendimiento de hojas de cuatro, seis, ocho y 10 semanas del aislamiento, determinando que el tejido más joven brindaba los mejores resultados. En otro estudio realizado por Botero & Osorio (2011) en plantas de tomate se utilizó tejido de cuatro y ocho semanas obteniendo de igual forma los mejores resultados con el tejido de menor edad.

Según Taiwo (2015) los protoplastos pueden ser aislados satisfactoriamente a diferentes edades siempre y cuando el tejido de partida se encuentre en una etapa media de desarrollo. En este estadio el tejido foliar aún no ha desarrollado la pared secundaria, tiene una cutícula fina y generalmente contiene bajas cantidades de lignina que permiten aumentar el rendimiento en el aislamiento.

Al evaluar el efecto de dos tipos de corte, en el aislamiento, se observó que se liberaba un mayor número de protoplastos al cortar el tejido en trozos finos de aproximadamente 1x1mm. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Bengochea & Dodds (1987), que menciona que al realizar este tipo de corte en las hojas se puede aumentar el área de contacto de las células del mesófilo con el medio de aislamiento. Según Fraiture *et al.*, (2014), los cortes finos son de utilidad en las hojas en las que no se ha retirado la cutícula para el aislamiento.

En este trabajo la cantidad de tejido utilizada por mililitro de medio, ya sea uno o 0.5g de tejido en 10 mililitros de medio no fue influyente en el número final de protoplastos aislados. Esta cantidad fue similar a la utilizada por Tan *et al.* (1986) y

mayor a la de la metodología usada por Hossain *et al.*, (1995). Los resultados de este autor mostraron mejores rendimientos con una concentración de un gramo de tejido por cada 25 ml de medio. Según Bengochea & Dodds (1987), el incremento de la concentración de tejido en el medio de aislamiento significa también un aumento del número de sitios activos sobre los cuales actúan las enzimas. Este hecho provoca la disminución de la actividad enzimática en la digestión de la pared celular y por lo tanto limita el rendimiento del aislamiento.

La mejor velocidad de agitación obtenida para el aislamiento de protoplastos de tomate, fue de 60 RPMs durante todo el aislamiento. Estos resultados difieren de autores como Bellini *et al.* (1990) o Shahin (1985) los cuales no utilizan agitación para lograr el aislamiento usando hojas de tomate. Por otro lado De Wit (1976) si utiliza una agitación de 60 RPMs similar a la de este estudio, obteniendo buenos resultados. Según Montagno *et al.* (1991), agitar el tejido durante el aislamiento promueve la liberación de los protoplastos del tejido, aunque en algunas especies puede no ser necesario. Además afirma que una velocidad de revoluciones demasiado excesiva puede causar daños mecánicos en la membrana celular de los protoplastos disminuyendo el rendimiento como ocurrió con los tratamientos A3 y A6.

En cuanto al efecto de los diferentes reguladores osmóticos en el aislamiento, el mejor rendimiento se obtuvo utilizando un medio con una concentración de manitol al 11%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Hossain *et al.* (1995) que también utilizó el manitol como regulador osmótico en el aislamiento, aunque a diferente concentración (9%). Según Smith (1977), la concentración del regulador se ajusta para mantener las células en un medio iso-osmótico, por lo que la cantidad de manitol puede variar en dependencia de la especie y la variedad con la que se trabaje. Autores como Bellini *et al.* (1990), utilizan un osmómetro para fijar la presión iso-osmótica en el medio que en el caso del tomate resultó ser de 650 +/- 10mOsmkg⁻¹.

Al evaluar el efecto de los dos tipos de aislamiento diferentes, se obtuvo el mejor resultado con el método 'Two-step' (TS1). Este rendimiento fue mejor que el alcanzado por el método 'One-step' y resultó ser el máximo obtenido durante todos

los ensayos de aislamiento realizados. Estos resultados difieren de lo mencionado por Davey (2010), que afirma que se pueden lograr mejores rendimientos colocando todas las enzimas en un solo paso. Cassells & Barlass (1976), aseguran que el método 'Two-step' resulta ser el preferido cuando los cocteles enzimáticos con los que se está trabajando contienen trazas de proteasas, lipasas u otras proteínas que puedan dañar la membrana celular. En este caso, una exposición más corta del tejido a estas enzimas puede disminuir el daño de la membrana y aumentar el número de protoplastos.

El mejor rendimiento obtenido en este trabajo fue de 1.07×10^5 protoplastos/ml, este resultado es menor al obtenido por De Wit (1976) que logró aislar 1×10^6 células/ml utilizando el mismo método de dos pasos. De igual manera, al comparar este rendimiento con los aislamientos 'One-step' realizados por Cassells & Barlass (1977) que obtuvieron valores de 10^6 protoplastos/ml, se puede observar que el rendimiento también resultó menor, aunque fue similar a los conteos de 0.96×10^5 protoplastos/ml obtenidos por Botero & Orozco (2011).

El rendimiento obtenido, según Tan *et al.* (1986) es suficiente para realizar satisfactoriamente el cultivo de protoplastos, el cual requiere una concentración mínima de $3-5 \times 10^4$ protoplastos/ml para poder llevarse a cabo. La limitación del rendimiento en el aislamiento puede deberse a la influencia de varios factores. Una de las posibles causas, puede ser la ausencia de control de la humedad recibida por las plantas durante su crecimiento, que según Bellini *et al.* (1990), es un factor que contribuye a un mejor resultado.

Otro de los probables factores causantes puede ser el tipo de enzimas utilizadas para el aislamiento, ya que según Cassells & Barlass (1976) es importante probar varios tipos de celulasas y pectinasas durante la estandarización. Esto debido a que según Smith (1977), las enzimas pueden contener diferentes niveles de impureza entre una marca y otra e incluso entre lotes dentro de una misma marca. (Davey *et al.*, 2005), afirman que estas impurezas pueden incluir varios tipos de lipasas, proteasas u otras enzimas que pueden afectar al material vegetal de diferente manera dependiendo de la especie utilizada.

4.2. Purificación de Protoplastos

Al evaluar el efecto de los diferentes tratamientos de purificación, se observó que el mejor resultado obtenido fue en que se utilizó los tiempos más cortos y las revoluciones de centrifugación más bajas tanto en la precipitación inicial como en la purificación mediante el gradiente de densidades.

Estos resultados según Ray *et al.* (2015), se deben a que los protoplastos de tomate pueden resultar ser bastante sensibles al proceso de centrifugación a velocidades y tiempos muy elevados, prefiriendo usarse siempre las revoluciones más bajas disponibles. Al precipitar los protoplastos mediante centrifugación, Bengochea & Dodds (1987) afirman que las células pueden sufrir un importante daño mecánico al presionarse contra la base del recipiente que las contiene. Es por esto que esta primera centrifugación, a menudo es la que genera más pérdidas durante la purificación. Por otra parte, al separar los protoplastos mediante un gradiente de densidad, según Davey (2010), los daños mecánicos disminuyen al mantener a los protoplastos suspendidos aunque se puede causar un estrés osmótico que disminuya la viabilidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los obtenidos por Ray *et al.* (2015) que utilizó incluso tiempos y revoluciones de centrifugación menores de tan solo tres minutos y 300RPMs. Por otro lado en los aislamientos realizados por Shahin (1987), las condiciones de centrifugación fueron mayores llegando a usar 1000RPMs durante 5 minutos en ambas centrifugaciones. Según Montagno *et al.* (1991), las condiciones de centrifugación pueden variar en dependencia del genotipo del material vegetal utilizado y la estabilidad de los protoplastos, que a su vez está determinada por las condiciones de crecimiento del material vegetal.

4.3. Cultivo de Protoplastos

Al realizar el cultivo de los protoplastos, se pudo observar que la regeneración de la pared y el inicio de la división celular ocurrieron únicamente en

las células cultivadas en el medio TM2. Este hecho puede deberse a que a diferencia del medio BH3, TM2 fue optimizado para el cultivo específico de protoplastos de tomate tanto por Bellini *et al.* (1990), como por Shahin (1987) con buenos resultados. Según Bellini *et al.* (1990), el medio nutritivo es un factor determinante para el cultivo de protoplastos, ya que puede contener nutrientes esenciales para la célula que le permitan activar su proceso de división celular. Sakata *et al.*, (1987), afirman que la composición óptima del medio puede cambiar en dependencia de la variedad de tomate con la que se trabaje, por lo que un medio puede no siempre resultar útil para el cultivo.

Las eficiencias de cultivo alcanzadas con el medio TM2 fueron de entre el 1 y 4%, a diferencia de las obtenidas por Latif *et al.* (1993) que llegaron incluso al 30 y 40%. Por otra parte en los trabajos de Botero & Orozco (2011) y Cassells & Barlass (1977) se obtuvo eficiencias de cultivo bajas similares a las de este trabajo. Las cuales pueden ser causadas por varios factores como la composición del medio de cultivo mencionada anteriormente.

La concentración de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo también es un factor de vital importancia. En este trabajo los reguladores utilizados por el mejor tratamiento obtenido fueron 2,4-D (0.5 mgL⁻¹), Kinetina (0.5 mgL⁻¹) y AIA (1 mgL⁻¹). Estas concentraciones son similares a las utilizadas por Bellini *et al.* (1990) que obtuvo una eficiencia de hasta el 11% en su cultivo. Sakata *et al.*, (1987), aseguran que al igual que con la composición del medio, la concentración óptima de los reguladores puede cambiar en dependencia de la variedad de tomate con la que se trabaje.

Otro factor que posiblemente afectó la eficiencia, pudo ser la cantidad de protoplastos usada en el cultivo que según Tan *et al.*, (1986) debe ser de 1×10^5 protoplastos/ml, esta cantidad es mayor a la utilizada para los presentes ensayos, que fue de 7.6×10^4 células/ml. Taiwo (2015), asegura que una concentración inicial de protoplastos demasiado baja no permite a las células activar su proceso de división completamente.

Una exposición demasiado larga del tejido a las enzimas durante el aislamiento, según Davey *et al.* (2005) puede disminuir la viabilidad de los

protoplastos durante el cultivo. Por ejemplo en el trabajo de Tan *et al.*, (1986) durante el cultivo de los protoplastos de tomate la adición de la enzima pectoliasa (0.1%) en el coctel enzimático, causó la disminución de la eficiencia del cultivo a menos del 10%. Además autores como Montagno, *et al.* (1991), mencionan que un pre-acondicionamiento del material vegetal colocando las plantas en oscuridad o a bajas temperaturas, puede incrementar la viabilidad y capacidad de división de los protoplastos en el cultivo.

La presente investigación con todos los datos analizados logró obtener protoplastos del mesófilo de hojas de tomate, determinando los mejores parámetros de trabajo para aislar, purificar y cultivar protoplastos satisfactoriamente.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

A continuación se describen las conclusiones obtenidas a partir del presente trabajo de investigación:

- Se logró estandarizar el protocolo de aislamiento de protoplastos del mesófilo de hojas de tomate, alcanzando una concentración máxima de 1.07×10^5 células/ml, suficiente para realizar el cultivo.
- Se optimizó el protocolo de purificación de protoplastos del mesófilo de hojas de tomate mediante dos centrifugaciones consecutivas a 700RPMs por 5 minutos utilizando una solución CPW con sacarosa al 21% para la flotación, alcanzando una concentración máxima de 7.6×10^4 células/ml.
- Se estableció el método 'Two-step' como el mejor método de aislamiento de protoplastos, utilizando un tiempo óptimo de digestión de 18 horas y un medio de aislamiento con una concentración de pectinasa al 0.25%, celulasa al 0.25%, y pectoliasa al 0.20%, que permitieron obtener cantidades significativas de protoplastos en buenas condiciones.
- Se demostró la eficiencia de los métodos estandarizados de aislamiento y purificación de protoplastos al obtener una viabilidad celular del 81.30%, porcentaje que permitió cultivar los protoplastos de manera eficiente.
- Se logró activar la regeneración de la pared celular y la división mitótica de los protoplastos de tomate, en un medio TM2 con una concentración de 0.5 mgL⁻¹ de 2,4-D, 0.5 mgL⁻¹ de Kinetina y 1 mgL⁻¹ de AIA, alcanzando una eficiencia máxima del 3.96% en el cultivo a los 15 días luego de la siembra.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

A continuación se describen las recomendaciones resultantes de este trabajo para ser tomadas en cuenta en futuras investigaciones:

- Se recomienda evaluar el efecto de otros tipos de enzimas celulasas y pectinasas en el rendimiento del aislamiento de protoplastos de tomate, con el fin de poder mejorar la cantidad y estabilidad de las células obtenidas en futuras investigaciones.
- Se sugiere realizar más de un tipo de evaluación de la viabilidad celular en los protoplastos, utilizando de preferencia el método de tinción fluorescente con FDA que resulta menos tóxico para la célula y podría generar resultados más confiables en el conteo celular.
- Se podría optimizar la eficiencia del cultivo de protoplastos de tomate, utilizando para el aislamiento otras variedades de la especie que puedan generar protoplastos más estables y con un mayor potencial de regeneración celular.
- Se sugiere utilizar las metodologías de aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos de tomate desarrolladas en este trabajo, en futuras investigaciones de fito-mejoramiento del cultivo mediante técnicas como la fusión de protoplastos o la introducción directa de material genético.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Alda, F. (2014). Estructura y función celular: los orgánulos. Obtenido de: <http://blog-ia20.blogspot.com/2014/11/estructura-y-funcion-celular-los.html>
- Arcos, A. (2010). Obtención y aislamiento de protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, mediante el establecimiento de hojas y callos *in vitro* provenientes de semillas. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Bebeli, P. & Mazzucato, A. (2009). The Solanaceae A review of Recent Research on Genetic Resources and Advances in the Breeding of Tomato, Pepper and Eggplant. *European Journal of Plant Sciences and Biotechnology*.
- Bellini, C., Chupeau, M., Gervais, M., Vastra, G., & Chupeau, Y. (1990). Importance of myo-inositol, calcium, and ammonium for the viability and division of tomato (*Lycopersicon esculentum*) protoplasts. *Plant Cell tissue and organ culture*.
- Bengochea, T. & Dodds, J. (1987). *Plant Protoplasts A Biotechnological Tool for Plant Improvement*. New York: Chapman and Hall.
- Botero, C. & Osorio, C. (2011). Respuesta de tres genotipos de tomate al cultivo *in vitro* y aislamiento de protoplastos. *Actual Biology*.
- Brito, C. (2011). Obtención de brotes en callo de protoplastos fusionantes de hoja *in vitro* de jigacho (*Vasconcellea stipulata*) y callo friable de babaco (*Vasconcellea x heilbornii*). Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Burgos, D. (2014). Identificación, Caracterización y Control del Agente Causal de la Enfermedad “Mancha Negra del Tallo”, que Ataca al Tomate de Mesa (*Solanum lycopersicum*), Bajo Condiciones de Invernadero, Tumbaco, Pichincha. Quito-Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Cassells, A. & Barlass, M. (1976). Environmentally Induced Changes in the Cell Walls of Tomato Leaves in Relation to Cell and Protoplast Release. *Plant Physiology*.
- Cassells, A. & Barlass, M. (1977). A method for the isolation of stable mesophyll protoplasts from tomato leaves throughout the year under standard conditions. *Plant Physiology*.
- Cermak, T., Baltés, N., Cegan, R., Zhang, Y. & Voytas, D. (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biology*.
- Das, S., Otani, H., & Maulik, N. (2005). Lycopene, tomatoes, and coronary heart disease. *Free Radical Research*.

- Davey, M. (2010). *Plant Protoplasts: Isolation, Culture and Plant Regeneration*. Wiley-BlackWell, 153-171.
- Davey, M., Power, J. & Lowe, K. (2005). *Plant Protoplasts Technology: Status and Applications*. *In vitro Cell. Dev. Biol.*
- De Wit, P. (1976). Isolation and Culture of Tomato Mesophyll Protoplasts. *Acta Botany*.
- FAOSTAT. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Obtenido de: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Fraiture, M., Zheng, X. & Brunner, B. (2014). An Arabidopsis and Tomato Mesophyll Protoplast System for Fast Identification of Early MAMP-Triggered Immunity- Suppressing Effectors. *Plant-Pathogen Interactions*.
- Fromm, M., Taylor, L. & Walbot, V. (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*.
- GBIF. (2016). *Solanum lycopersicum L.* Obtenido de: <http://www.gbif.org/species/2930137>
- Gebhardt, C. (2015). The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theory Applied Genetics*.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konk, K., Kowalczyk, T. & Kononowicz, A. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum L.*) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 881–902 .
- Grzebelus, E., Szklarczyk, M. & Baranski, R. (2012). An improved protocol for plant regeneration from leaf- and hypocotyl-derived protoplasts of carrot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.
- Hanan, A. (2009). *Lycopersicon esculentum P. Mill.* Obtenido de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/lycopersicon-esculentum/fichas/ficha.htm>
- Henriques, D. (2015). Optimizaç o dos processos de isolamento e cultura de protoplastos de tamarilho (*Solanum betaceum Cav.*). Universidad de Coimbra.
- Hooley, R. & Mc Carthy, D. (1980). Extracts from virus infected hypersensitive tobacco leaves are detrimental to protoplast survival. *Physiological Plant Pathology*.
- Horv ath, E. (2009). Protoplast isolation from *Solanum lycopersicum L.* leaf tissues and their response to short-term NaCl treatment. *Acta Biologica Szegediensis*.

- Hossain, M., Imanishi, S. & Egashira, H. (1995). An improvement of tomato protoplast culture for rapid plant regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- Huang, C., Cornejo, M., Bush, D. & Jones, R. (1986). Estimating Viability of Plant Protoplasts Using Double and Single Staining. *Protoplasma*.
- Hudson, L. & Hay, F. (1980). *Practical immunology*. Blackwell Scientific Publications.
- INEC. (2013). Encuesta de Superficie y Producción Agrícola Continua. Tabla 8. Superficie sembrada por tipo de semilla utilizada y práctica de cultivo, según cultivos transitorios.
- INEC. (2015). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua.
- Larkin, P. (1976). *Purification and Viability Determinations of Plant Protoplasts*. Planta by Springer.
- Latif, M., Mumtaz, N., Davey, M. & Power, J. (1993). Plant regeneration from protoplasts isolated from cell suspension cultures of the wild tomato, *Lycopersicon chilense* Dun. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- López, E., Proaño, K., Jadán, M. & Mihai, R. (2015). Callus tissue induction and analysis of GUS reporter gene expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Romanian Biotechnological Letters*.
- Meyer, Y. (1985). Mitotic Cycle of Mesophyll Protoplasts. *The Physiological Properties of Plant Protoplasts*, 153-160.
- Montagno, T., Jourdan, S. & Berry, Z. (1991). Plant regeneration from leaf protoplasts. *Plant Cell Reports*.
- Niedz, R., Mc Kendree, W., & Shatters, R. (2003). Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and regeneration of Transformed Plants. *In vitro Cell*.
- Niedz, R., Rutter, S., Handley, L. & Sink, K. (1985). Plant regeneration from leaf protoplasts of six tomato cultivars. *Plant Science*.
- Pasternak, T., Micolczi, P., Ayaydin, F., Meszaros, T. & Dudits, D. (2000). Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Kluwer Academic Publishers*, 129-141.
- Pérez, M., Ramirez, R. & Nuñez, H. (2000). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Ciudad de México, México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.

- Prohenz, J. & Nuez, F. (2008). Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, Umbelliferae. En M. Díez, & F. Nuez, Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, Umbelliferae. Valencia-España: Springer.
- Puchea, A., & Rodriguez, P. (2000). Componentes del Medio de cultivo. Cultivo de Tejidos Vegetales. México.
- Ramirez, G. (2013). Evaluación Agronómica Bajo Cubierta de Tres Híbridos de Tomate Riñon (*Lycopersicum sculentum* Mill), en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. Santo Domingo de los Tsáchilas: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Ray, S., Lahiri, S., Halder, M., Mondal, M., Ray, T. & Kundu, S. (2015). An Efficient Method of Isolation and Transformation of Protoplasts from Tomato Leaf Mesophyll Tissue using the Binary vector pCambia 1302. International Advanced Research Journal in Science.
- Riofrío, L. (2010). Regeneración de Plantas de Tomate de Árbol (*Solanum betacea*) a partir de protoplastos. Universidad San Francisco de Quito.
- Roca, W., & Mroginski. (1993). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT. Centro Internacional de la Agricultura Tropical.
- Sakata, Y., Nishi, T. & Takayanagi, K. (1987). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of tomato cv. Ponderosa'. Horticultural Sciences.
- Sandoval, A. & Lomas, L. (2007). Incidencia, Severidad, Rango de Hospedero y especie del Nematodo del Rosario de la Raíz (*Nacobbus sp.*) en el Cultivo de Tomate de Mesa (*Lycopersicum esculentum*) en el Valle del Chota y Pimampiro. Ibarra-Ecuador: Universidad Técnica del Norte.
- Shahin, E. (1985). Totipotency of Tomato Protoplasts. Springer-Verlag.
- Shahin, E. (1987). United States Patent Plant regeneration from protoplasts. Obtenido de: <https://www.google.com/patents/US4634674>
- Sheen, J. (2001). Signal Transduction in Maize and Arabidopsis Mesophyll Protoplasts. Plant Physiology.
- Shi, X., Gupta, S. & Rashotte, A. (2011). *Solanum lycopersicum* cytokinin response factor (SICRF) genes: characterization of CRF domain-containing ERF genes in tomato. Journal of experimental Botany.
- Shuckla, P., Bajpai, K., Tripathi, S., Kumar, S. & Kumar, G. (2013). A Review on the Taxonomy, Ethnobotany, Chemistry and Pharmacology of *Solanum Lycopersicum* Linn. International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences.

- SigmaAldrich. (2017). Cellulase from *Aspergillus Niger*. Obtenido de: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1184?lang=en®ion=EC>
- SigmaAldrich. (2017). Pectinase from *Aspergillus Niger*. Obtenido de: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/17389?lang=en®ion=EC>
- SINAGAP. (2015). Informes Anuales de Producción. Obtenido de: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/>
- Smith, H. (1977). Molecular Biology of Plant Cell. University of California Press.
- Smith, R. (2013). Plant Tissue Culture Techniques and Experiments. Elsevier.
- Taiwo, B. (2015). Protoplast Isolation and Plant Regeneration in Bambara Groundnut: A Platform for Transient Gene Transformation. Cape Peninsula University of Technology.
- Tan, M., Boerrigter, H., & Kool, J. (1986). A rapid procedure for plant regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures and leaf mesophyll cells of wild *Solanum* species and *Lycopersicon pennellii*. Plant Science.
- Wijbrandi, L. (1989). Isolation and characterisation of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum*. Plant Breeding and Selection Methods.
- Wikipedia. (2017). Tejido Epidérmico. Obtenido de: https://es.wikipedia.org/wiki/Tejido_epid%C3%A9rmico