

.....
UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Solanum betacea*) a partir
de protoplastos**

Luis Antonio Riofrío

Tesis presentada como requisito para la obtención del título de B.S en Biotecnología

©Derecho de autor

Luis Antonio Riofrio

2010

Dedicatoria

A mis padres por su amor y enseñanza a lo largo de toda mi vida, a mis compañeros y amigos por su apoyo; y por sobre todas las cosas a Dios.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a Lourdes Torres por su infinita paciencia y por su dirección durante la elaboración de este proyecto.

A Venancio Arahana por toda su ayuda y consejos para la elaboración de este trabajo.

A todos los que trabajaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y me ayudaron a la realización del proyecto: Andrea Arias, Andrés Torres, Diana Ayala, Pedro José Gonzáles, Diana Trujillo, Nicolás Bastidas, Nicolás Peñafiel, Betsabé Mantilla, Soledad Ordoñez.

RESUMEN

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es un frutal de origen andino que tiene el potencial necesario para convertirse en un producto de importancia económica dentro de los mercados internacionales de exportación. El objetivo principal de esta investigación fue estandarizar un protocolo para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas y la obtención de plantas viables de tomate de árbol. Se realizaron modificaciones al protocolo original de Reinert et al (1982) que permitieron obtener división de los protoplastos de tomate de árbol. Con la metodología utilizada se obtuvo un promedio de eficacia de aislamiento de protoplastos de $4,21 \times 10^5$ protoplastos por ml. La eficiencia de formación de callos a partir de los protoplastos fue baja con valores promedio de 0,11%. Sin embargo, la regeneración de brotes a partir de los callos obtenidos fue exitosa con un promedio de 57% de eficacia. Este trabajo constituye un paso inicial para estudios posteriores como hibridación somática, transformación genética o inducción de variación somaclonal. Dichas técnicas pueden contribuir al establecimiento de programas de fitomejoramiento que ayuden a incrementar los niveles de producción de esta planta, con interés económico para el Ecuador.

Abstract

The tree tomato (*Solanum betaceum*) is a fruit that has its origin in the Andean region; it has the qualities necessary to make it an export product with economic relevance. The main objective of this research was to standardize a protocol for protoplast isolation from tree tomato leaves, and to obtain viable plants from these protoplasts. The protocol of Reinert et al (1982) with some modifications, allowed us to obtain protoplast isolation with an average of $4,21 \times 10^5$ protoplasts per ml. Callus formation was obtained with an average of 0,11%. Shoot regeneration from callus was successful with an average of 57%. The establishment of a protocol for protoplast isolation and culture is the starting point for many techniques of genetic manipulation, such as somatic hybridization, transformation, and induction of somaclonal variation; by using these tools, we can proceed to develop new varieties of tree tomato that will enable to raise the production of this plant with high economic potential for Ecuador.

Tabla de Contenido

| | |
|---|-----|
| Derechos de Autor | iii |
| Dedicatoria..... | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Resumen..... | vi |
| Abstract..... | vii |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Características generales..... | 1 |
| 1.1.2. Origen y clasificación..... | 1 |
| 1.1.3. Importancia económica del cultivo..... | 3 |
| 1.1.4. Distribución del cultivo y mercado..... | 3 |
| 1.1.5. Problemática del Cultivo..... | 4 |
| 1.2. Protoplastos..... | 5 |
| 1.3. Hibridación somática..... | 7 |
| 2. Objetivo General..... | 9 |
| 3. Objetivos Específicos | 9 |
| 4. Justificación..... | 9 |
| 5. Área de trabajo..... | 10 |
| 6. Materiales..... | 11 |
| 6.1. Cultivo in Vitro..... | 11 |
| 6.2. Aislamiento de protoplastos..... | 11 |
| 6.3. Cultivo de callos..... | 12 |
| 6.4. Enraizamiento de retoños..... | 12 |
| 6.5. Aclimatación de plantas..... | 12 |
| 7. Métodos..... | 13 |
| 7.1. Cultivo invitro de tomate de árbol..... | 12 |
| 7.2. Aislamiento y cultivo de protoplastos..... | 14 |
| 7.2.1. Obtención de protoplastos..... | 14 |
| 7.2.2. Limpieza de los protoplastos..... | 15 |
| 7.2.3. Siembra de protoplastos..... | 15 |
| 7.2.4. Cultivo de protoplastos | 16 |
| 7.3. Transferencia de brotes..... | 16 |
| 7.4. Aclimatación de plántulas de tomate de árbol..... | 16 |
| 8. Resultados..... | 17 |
| 8.1. Eficiencia de extracción de los protoplastos | 17 |
| 8.2. Cultivo de protoplastos..... | 18 |
| 8.3. Formación de callos y brotes..... | 19 |
| 8.4. Enraizamiento de los retoños de tomate de árbol..... | 20 |
| 8.5. Aclimatación de plántulas..... | 20 |
| 9. Discusión..... | 20 |
| 9.1. Análisis de las condiciones para el aislamiento de protoplastos..... | 20 |
| 9.2. Análisis del crecimiento y desarrollo..... | 22 |
| 10. Conclusiones..... | 24 |
| 11. Recomendaciones..... | 25 |
| 12. Citas bibliográficas..... | 27 |
| 13. Tablas..... | 30 |
| 14. Figuras..... | 33 |

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

| | | |
|------------|--|-----------|
| 13. | Tablas..... | 30 |
| | Tabla 1: Eficacia de aislamiento de protoplastos en relación al porcentaje de manitol en la solución CPW utilizada..... | 30 |
| | Tabla 2: Eficacia de aislamiento de protoplastos en relación al pH de la solución CPW..... | 30 |
| | Tabla 3: Eficacia de aislamiento de protoplastos en relación a la edad del material vegetal..... | 30 |
| | Tabla 4: Eficacia de aislamiento en los cuatro ensayos que regeneraron plántulas..... | 30 |
| | Tabla 5: Eficacia de formación de callos en los cuatro ensayos que regeneraron plántulas..... | 31 |
| | Tabla 6: Composición de medio Mprot y CPW..... | 32 |
| 14. | Figuras..... | 33 |
| | Figura 1: División de protoplastos..... | 33 |
| | Figura 2: Desarrollo de los microcallos a los 20 días de cultivo en medio de cultivo sólido Mprot..... | 33 |
| | Figura 3: Callos a las seis semanas de cultivo, en medio MS con hormonas BAP4, NAA 0,05..... | 34 |
| | Figura 4: Regeneración de brotes a partir de callos, a los 6 meses de cultivo. | 34 |
| | Figura 5: Eficacia de formación de retoños en los cuatro ensayos que formaron plántulas..... | 35 |
| | Figura 6: Enraizamiento a las 4 semanas d cultivo en medio MS..... | 35 |
| | Figura 7: Pasos de aclimatación..... | 36 |

1. INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es un frutal de origen andino que está bien adaptado a las condiciones climáticas especiales existentes en las provincias de la serranía del Ecuador. El fruto del tomate de árbol, por su sabor, valor nutritivo y medicinal posee el potencial necesario para convertirse en un producto de importancia económica en los mercados internacionales de exportación.

1.1. Características generales

El tomate de árbol es una planta arbustiva con tallos semi-leñosos que alcanza un tamaño de 2 a 3 metros de altura. El fruto es de forma ovoide o elipsoide puntiagudo; de piel lisa que puede ser de color morado, rojo, amarillo o anaranjado; y su pulpa es de color anaranjada (SICA 2004).

Es una especie originaria de la región andina, pertenece a la familia de las Solanáceas y su crecimiento óptimo se da en climas templados y fríos entre los 1700 y 2400 m.s.n.m, a temperaturas entre 14 a 20° C (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia sf).

El tomate de árbol es una planta tanto alógama como autógena, la propagación de este frutal en el campo puede realizarse por semilla, tallos o raíces, empieza a producir frutos al año de edad, y la vida útil de este cultivo es de hasta 10 años (Lewis 1999).

1.1.2. Origen y clasificación

Se ha identificado a la zona comprendida entre Colombia, Ecuador y Perú como el centro de origen del tomate de árbol. Este cultivo se encuentra todavía en estado silvestre en los tres países considerados como centro de origen. Adicionalmente,

algunos estudios recientes han identificado nuevas especies silvestres emparentadas a *Solanum betaceum* en el sur de Bolivia (Bohs 1997).

El tomate de árbol fue clasificado como *Solanum betaceum* por Cavanilles en 1799. Posteriormente fue clasificado por Sendtner en 1845 dentro del género *Cyphomandra*. En 1995 fue clasificado nuevamente dentro del género *Solanum* (Bohs, 1995).

Este cambio en la clasificación ha creado una confusión; muchos todavía lo clasifican hoy en día como *Cyphomandra betaceae*, y va a ser encontrado con este nombre en textos y referencias bibliográficas, inclusive en algunos de los más recientes.

En el Ecuador se han descrito cinco variedades de tomate de árbol. Esta clasificación se realiza de acuerdo al tamaño y color del fruto y a la forma de su extremo apical. Las cinco variedades reconocidas son:

1.- Tomate Puntón: Tiene un fruto mediano de color anaranjado con el extremo apical en punta.

2.- Negro: Tiene un fruto grande de color púrpura con su extremo apical en punta.

3.- Amarillo: Tiene un fruto pequeño de color amarillo con el extremo apical en punta.

4.- Tomate redondo: Tiene un fruto pequeño de color anaranjado con el extremo apical redondo.

5.- Tomate mora: Tiene un fruto mediano de color púrpura con el extremo apical redondo (Albornoz 1992).

1.1.3. Importancia económica del cultivo

El fruto del tomate de árbol se consume directamente en fresco o se lo utiliza para la preparación de jugos, dulces, mermeladas, salsas y ensaladas ((Federación Nacional de Cafeteros de Colombia sf).

sf). Los principales elementos nutricionales del tomate árbol en 100g de fruto son: proteínas (2g), calcio(9mg), fósforo(41mg), y Ácido Ascórbico (29mg). Además el fruto es rico en niacina (1.07mg) y hierro (0.90 mg) (Orihuela, 1997).

Las cualidades nutritivas del tomate de árbol y la versatilidad de uso en la gastronomía debido a su sabor agridulce distintivo, hacen del tomate de árbol un importante cultivo de exportación. Esto es de gran importancia para el Ecuador, ya que, gracias a su clima, es uno de los pocos países en los que se puede cosechar la fruta durante todo el año.

1.1.4. Distribución del cultivo y mercado

En el Ecuador, el área plantada con tomate de árbol ha llegado en la actualidad a aproximadamente 5900 hectáreas. Se cultiva principalmente en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Azuay y Loja. Esto demuestra su importancia como cultivo para las provincias de la serranía ecuatoriana (SICA 2004).

El tomate de árbol se ha convertido en un cultivo de importancia tanto en su centro de origen (la Región Andina), como en el resto del continente americano. Este puede encontrarse en Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Jamaica, Puerto Rico, Haití, Chile, Brasil y Argentina (Pringle 1991).

El nombre bajo el cual se conoce al tomate de árbol varía en la mayoría de los países. Fuera del Ecuador, se lo conoce como “tamarillo”, “tomate de agua”, “tomate

cimarrón”, “tomate chimango”, “tomate de Lima”, “tomate del monte”, “tomate de palo”, “tomate de Castilla”, “tomate de la paz”, “tomate silvestre” o “tomate en arbre” (SICA, 2004).

Actualmente este frutal se produce también a escala comercial en Nueva Zelanda y Australia a partir de semillas originarias de Colombia. La comercialización del tomate de árbol se realiza principalmente hacia Estados Unidos y Europa con el nombre de “tamarillo” ((Federación Nacional de Cafeteros de Colombia sf).

El Ecuador no ha podido aprovechar la apertura de mercados en la comercialización del fruto del tomate de árbol; las principales causas se deben a la susceptibilidad de la planta a enfermedades que no solo reducen el rendimiento del cultivo, sino que también dañan al fruto, restringiendo la acogida de éste en los mercados internacionales.

1.1.5. Problemática del Cultivo

Las principales enfermedades que afectan al tomate de árbol son:

- Antracnosis (*Colletotrichim gloesporoides*). Esta enfermedad afecta a las hojas y los frutos del tomate de árbol.
- Oidium (*Oiditum sp*). Esta enfermedad afecta a las ramas, hojas y frutos del tomate de árbol.
- Nemátodos (*Meloidogyne spp.*). Estos atacan a las raíces de la planta (SICA 2004).

El tomate de árbol es especialmente susceptible a los nemátodos, los cuales al atacar a las raíces de la planta restringen la absorción de nutrientes, lo que provoca un

limitado desarrollo de la planta y causa grandes pérdidas en la producción (SICA, 2004).

La susceptibilidad del tomate de árbol a estas enfermedades ha causado una disminución en el cultivo de este frutal a partir del 2005; esto ha implicado una importante disminución en las exportaciones del fruto (BCE 2005).

Estudios de variabilidad genética realizados en las variedades de tomate de árbol cultivados en el Ecuador han determinado una reducida diversidad genética (Peñañiel 2007). Este hallazgo plantea una limitación para programas de mejoramiento tradicional mediante cruces entre las diferentes variedades. La limitada variabilidad genética observada en el tomate de árbol sugiere la necesidad de buscar fuentes alternativas de diversidad. Por esta razón, es importante el desarrollo de otras técnicas que permitan el mejoramiento del tomate de árbol rebasando la limitación de la diversidad genética entre las variedades.

1.2. Protoplastos

La obtención de protoplastos es un paso inicial para varias técnicas de manipulación genética de plantas; tales como variación somaclonal, hibridación somática y transformación genética (Dixon 1994). Dada la limitada variabilidad genética del tomate de árbol, las diversas técnicas mencionadas anteriormente tienen el potencial de ser empleados como herramientas para el mejoramiento de este cultivo. De ser este el caso, el establecimiento de un protocolo de regeneración de protoplastos representa una necesidad crucial para el futuro del cultivo.

Los protoplastos son células vegetales a las que se les ha removido la pared celular. Klercker (1892) fue el primero en aislar protoplastos mediante disrupción mecánica de la pared celular. No fue sino hasta 1960 que Cocking obtuvo altas

densidades de protoplastos utilizando el método enzimático (Wagner 1978; Navratilova 2004).

La degradación enzimática es realizada mediante el uso de 2 enzimas, una celulasa y una pectinasa; las celulastas degradan la celulosa y las pectinastas degradan las pectinas. Estas enzimas actúan en un pH de entre 4,7 - 6 y una temperatura de entre 25 y 30°C (Echenique, 2004).

Las soluciones en las cuales se realiza la degradación enzimática tienen que ser hipertónicas, debido a que los protoplastos al no tener la pared celular, que es la protección de la célula vegetal para la turgencia, pueden romperse en condiciones isotónicas o hipotónicas. Los protoplastos en un medio hipertónico adoptan una forma esférica y de esa forma no corren el riesgo de romperse al mantenerse plasmolizados (Gonzales 2008).

Las condiciones de aislamiento varían entre las diferentes especies vegetales. Los procedimientos para obtener protoplastos que se dividan y a partir de los cuales se pueden obtener plantas viables solo se han descrito para un número limitado de especies vegetales.

El material vegetal de partida para la obtención de protoplastos es uno de los principales elementos a ser tomados en cuenta. Los de primera elección son las suspensiones celulares u hojas. Cuando se utilizan hojas, se ha observado que los protoplastos con mayor viabilidad se obtienen a partir de los tejidos más jóvenes (Dixon 1994)

En algunas especies, cuando se utilizan hojas como material vegetal para el aislamiento de protoplastos, los altos contenidos de almidones en los cloroplastos disminuyen la cantidad de protoplastos obtenidos durante la etapa de flotación en solución de sucrosa. Los valores de protoplastos obtenidos aumentan al someter las

plantas a la oscuridad, ya que, la disminución de la luz al igual que la disminución en la temperatura reducen los procesos metabólicos destinados a la acumulación de nutrientes, como los almidones. (Simens 1994)

Después de su aislamiento, los protoplastos son sembrados en un medio de cultivo que puede ser líquido o semi-sólido; siendo los medios semi-sólidos la mejor elección para la mayoría de las especies, ya que el soporte que ofrece el agar o la agarosa estimula el desarrollo de la pared celular. Para obtener una adecuada división de los protoplastos, es importante ajustar la densidad de siembra de los mismos. Esta varía de acuerdo al medio y la especie entre 5×10^2 y 1×10^6 células/ml para medios semi-sólidos (Navratilova 2004, Dixon 1994).

1.3 Hibridación somática

La técnica de fusión de protoplastos se desarrolló en los años 50 pero su auge tuvo lugar en los años 80 con la aparición de métodos químicos y eléctricos (Echenique 2004). En ambos casos, el principio técnico consiste en desestabilizar temporalmente a la membrana celular, obteniéndose la formación de poros en la membrana, con lo cual, se fusionan los citoplasmas de protoplastos adyacentes. La fusión química se realiza con químicos como polyvinyl alcohol (PVA) o polietilén glicol (PEG), siendo este último, el agente químico más utilizado para obtener la fusión. Se obtendrán como productos células heterocariontas, células homocariontas y células no fusionadas. El producto deseado son las células heterocariontas en las que se encuentran los núcleos de las dos células con el producto de los dos citoplasmas fusionados; estas células son las que pueden dar lugar a la formación de una célula híbrida a partir de la cual obtendremos finalmente, vía organogénesis o embriogénesis, una nueva planta (Dixon 1994).

Mediante la fusión de protoplastos se evitan las barreras sexuales que impide la hibridación inter específica, lo que permite obtener, en teoría, cualquier combinación de protoplastos fusionados. Además de permitir la obtención de nuevos híbridos entre dos especies sexualmente incompatibles, la hibridación somática también permite generar modificaciones genéticas en plantas de propagación vegetativa, en plantas estériles o en aquellas plantas cuyo ciclo de reproducción es muy largo (Dixon 1994).

El objetivo principal de la fusión de protoplastos, es la de incorporar genes provenientes de especies vegetales silvestres, a cultivares de importancia en la agricultura. De esta manera, se han realizado experimentos para transferir genes de resistencia a virus, hongos o insectos; genes de resistencia a estrés ambiental, como sequía, heladas, u alta salinidad; o genes para síntesis de proteínas, vitaminas o metabolitos secundarios de relevancia en la industria farmacéutica (Navratilova 2004).

Se han obtenido híbridos somáticos para pocas variedades de especies con importancia económica; se puede agrupar a los híbridos obtenidos dentro de las siguientes familias: *Solanaceae*, *Rutaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae* y *Poaceae*. Sin embargo, en la mayoría de los híbridos obtenidos, no se desarrollaron plantas completas debido a problemas durante la regeneración de los productos híbridos (Olivares 2001).

El éxito de una hibridación somática no se termina con la obtención de una planta regenerada con las propiedades deseadas. Los híbridos somáticos obtenidos tienen que ser capaces de reproducirse sexualmente, y ser sexualmente compatibles con las variedades parentales de interés comercial, para permitir retro cruces y obtener un producto final útil en la agricultura (Navratilova 2004).

En la presente investigación, se estandarizó una metodología efectiva para el aislamiento de protoplastos de tomate de árbol, y la posterior obtención de

plantas viables. Este protocolo se usará como punto de partida para un experimento de hibridación somática entre *Solanum betacea* y *Nicotiana glauca*; una especie silvestre que es utilizada en el Ecuador como patrón de injertos debido a su resistencia a nemátodos. El objetivo final de este emprendimiento sería la incorporación de las resistencias presente en *Nicotiana glauca* a variedades comerciales de tomate de árbol

2. OBJETIVO GENERAL

- Establecer un protocolo de regeneración de plantas de tomate de árbol a partir de protoplastos.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener altas densidades de protoplastos de tomate de árbol viables mediante la utilización de pectinasas y celulasas.
- Identificar medios de cultivo óptimos para la regeneración de la pared celular, división celular, y regeneración de plantas viables a partir de protoplastos.

4. JUSTIFICACIÓN

El tomate de árbol a pesar de su gran potencial como cultivo de exportación, no ha podido cumplir con los estándares que se espera de una fruta con calidad de exportación. La principal causa por la cual el cultivo de este frutal no ha alcanzado los volúmenes ni la calidad necesaria, se debe a su susceptibilidad a enfermedades, que no solo causan grandes pérdidas en la producción, sino que también ocasionan una variabilidad en la calidad de la fruta.

La generación de variedades de tomate de árbol resistentes a nemátodos, que como ya se ha mencionado es el principal mal que afecta a este frutal, se ha visto impedida por la ausencia de genes de resistencia en la especie y parientes cercanos por lo que se tiene que recurrir a otras técnicas que nos permitan incrementar la producción del cultivo (Penfiel 2007).

No se han hecho estudios para la regeneración de plantas de tomate de árbol a partir de protoplastos, el protocolo utilizado en el presente estudio, es un paso fundamental para futuros programas de mejoramiento genético, ya sea, mediante fusión somática, variación somaclonal, o transformación genética; la disponibilidad de un protocolo de regeneración de tomate de árbol a partir protoplastos, nos ofrece un gran número de posibilidades para mejoramiento del cultivo, por este motivo, podemos destacar la importancia de este estudio para el futuro del cultivo de este frutal.

Es así como mediante los resultados obtenidos en la presente investigación se puede proceder a la fusión de protoplastos de tomate de árbol con protoplastos de tabaquillo (*Nicotiana glauca*), una especie silvestre inmune al ataque de los nemátodos que se utiliza como patrón para injertos con tomate de árbol. A futuro, se pretende obtener una variedad de tomate de árbol resistente a nemátodos, y de esta manera, se pretende incrementar la productividad del cultivo de tomate de árbol en el Ecuador.

5. ÁREA DE TRABAJO

El cultivo in Vitro y el aislamiento y cultivo de los protoplastos se realizaron en su totalidad en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, con sede en Cumbayá, Ecuador.

6. MATERIALES

6.1. Cultivo in vitro

Cedazo metálico

Frascos de vidrio de boca ancha

Alcohol al 70%

Alcohol al 96%

Hipoclorito al 2,5%

Medio MS (Murashige and Skoog 1962)

Semillas de tomate de árbol de la variedad amarillo puntón

Cámara de flujo laminar LABCONCO, Modelo 36125

Incubadora (*Clinical Scientific Equipment Co.*) a 28° C

Agitador marca *Lab-Line Rotator*

Potenciómetro

6.2 Aislamiento de Protoplastos

Cultivos in Vitro de tomate de árbol de 1 mes

Cajas petri estériles

Tubos falcon de 10ml

Membrana de nailon estéril

Celulasa (Sigma)

Pectinasa (Sigma)

MES (2[N-morphoilno] ethanesulfonic acid) (Sigma)

Medio Mprot (Reinert, 1982)

Solución de CPW (Frearson et al, 1973)

Cámara de flujo laminar LABCONCO, Modelo 36125

Pipeteador automático marca *Drummand Scientific Co.*

Incubadora (*Clinical Scientific Equipment Co.*) a 28° C

Agitador marca *Lab-Line Rotator*

Centrífuga IEC Centra MP4

Microscopio invertido Radical modelo RTC-8

6.3 Cultivo de callos

Medio MS con hormonas BAP 4 ppm, NAA 0,05 ppm

Alcohol al 96%

Cámara de flujo laminar LABCONCO, Modelo 36125

Estereomicroscopio Ward's

6.4 Enraizamiento de retoños

Frascos de vidrio de boca ancha.

Medio MS (Murashige and Skoog 1962)

Cámara de flujo laminar LABCONCO, Modelo 36125

6.5 Aclimatación de plantas

Recipientes de arcilla

Frascos de vidrio

Agua estéril no destilada

Tierra estéril Agro terra

7. MÉTODOS

7.1. Cultivo invitro de tomate de árbol

Se tomó frutos de tomate de árbol de la variedad comercial “puntón”, adquiridos en el mercado “Supermaxi”, a partir de los cuales se extrajo las semillas. Estas se dejaron secar por una semana en papel absorbente.

Para la desinfección de las semillas se tomó un volumen de 2 ml de semillas en un tubo falcon de 15ml y se los lavó con agua, luego se las traspasó a un vaso de precipitación con alcohol al 70% por 5 minutos. Con la ayuda de un cedazo metálico, esterilizado en alcohol al 96% y flameado, se desechó el alcohol a un vaso de precipitación y se lavaron las semillas con agua estéril. Se traspasó a las semillas a un vaso de precipitación con hipoclorito de sodio al 2,5% + tween 20 por un periodo de 15 minutos. Para asegurar que el hipoclorito llegue a todas las semillas y garantizar una desinfección adecuada, se agitó el vaso de precipitación con las semillas en intervalos regulares. Con la ayuda de un cedazo metálico, se eliminó el hipoclorito en un vaso de precipitación y se lavaron las semillas con agua estéril, el lavado fue realizado 5 veces para garantizar que se elimine todo el hipoclorito.

Una vez finalizada la desinfección de las semillas, se procedió a la siembra de las mismas en el medio de cultivo. Con una pinza esterilizada, se tomaron de 10 a 15 semillas y se las colocó en un frasco de vidrio con medio de cultivo MS (Murashige and Skoog 1962) o AM (MS a la mitad de la concentración de sales), separando las semillas entre si para que estén uniformemente distribuidas dentro del frasco. Una vez colocadas las semillas, el frasco de vidrio fue sellado con papel celofán estéril. Los frascos se cultivaron en un fotoperíodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad a 22°C.

7.2. Aislamiento y cultivo de protoplastos

Se basó en el protocolo de aislamiento y cultivo de protoplastos a partir de hojas de tabaco descrito por Reinert et al (1982). El medio de regeneración a partir de callos fue desarrollado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ.

7.2.1. Obtención de protoplastos

Se utilizó como material de partida, hojas de plántulas cultivadas in-vitro de la variedad comercial “Puntón”, con una edad de 30-60 días de sembradas. Se escogió de 4-5 frascos de plántulas con cotiledones y hojas jóvenes. También se realizaron ensayos con hojas de plántulas provenientes de subcultivos in vitro.

Los frascos con el material vegetal fueron sometidos a la oscuridad por 3 días antes del inicio de la extracción de protoplastos.

Se cortó los cotiledones y hojas jóvenes, con la ayuda de una pinza y una tijera estéril directamente a una caja Petri con una solución CPW + manitol. Los cotiledones fueron cortados transversalmente en segmentos de no más de 2mm de grosor. Se realizaron experimentos con 3 concentraciones diferentes de manitol: 10 %, 13% y 15%. Se incubó a los cotiledones cortados dentro de la solución CPW + manitol por 1 hora (preplasmolisis), luego de lo cual se retiró la solución y se la reemplazó con 10 ml de la misma solución, más las siguientes enzimas: 0.5% celulasa y 0.1% pectinasa (0.05gr de celulasa, 0.01gr de pectinasa) en un pH 5.6 - 5.8. La solución con enzimas fue filtrada a través de un filtro miliporo de 0,22 μm de diámetro de poro, ya que las enzimas son termolábiles y no pueden ser autoclavadas.

La caja petri con el material vegetal y la solución con enzimas fue incubada en oscuridad a aproximadamente 22° por 16-18h.

7.2.2. Limpieza de los protoplastos

La caja petri incubada fue sometida a agitación a 60 rpm por 20 min, para agitar el desprendimiento de los protoplastos. Se observó el aspecto de los protoplastos desprendidos en la caja petri con un microscopio invertido.

La solución de protoplastos fue recogida con una pipeta estéril estándar de 10ml o con una pipeta estéril de 10ml, a la cual se le cortó la punta para evitar la disrupción de los protoplastos. Los protoplastos fueron filtrados a través de una membrana de nylon para separar los protoplastos de los residuos de hojas. Este filtrado fue centrifugado a 100 G por 10 min.; se descartó el sobrenadante y se resuspendió al pellet en una solución CPW + sucrosa al 20%. Esta suspensión fue centrifugada a 100 G por 10 min, luego de lo cual, se transfirió la capa verde oscura ubicada en la parte superior del centrifugado a un nuevo tubo falcon con una solución de CPW + manitol al 10%. Esta última se centrifugó a 50 G por 10 min. para separar los residuos vegetales. Este paso de lavado se repitió 3 veces, al final del cual se obtuvo un pellet de protoplastos suspendido en un volumen de aproximadamente 0.5- 1,5 ml de solución CPW + manitol al 10%. Los protoplastos se resuspendieron y se contaron en una cámara de Neubauer, para evaluar la eficacia del aislamiento.

7.2.3. Siembra de protoplastos

Los protoplastos se cultivaron en una densidad de $2 - 9,18 \times 10^5$ protoplastos/ml, en un medio de cultivo estéril Mprot y sucrosa al 10 %. Se realizó el cultivo tanto en medio sólido con agarosa al 1.2%, como en medio líquido sin agarosa, los protoplastos se sembraron a manera de gotas de aproximadamente 1 cm de diámetro en una caja Petri estéril, y se adicionó con una pipeta pasteur, medio Mprot líquido alrededor de las gotas. Finalmente se selló la caja petri con parafilm.

7.2.4. Cultivo de protoplastos

Inicialmente se sometió a los protoplastos a oscuridad por 4 días a 28° C, esto se realizó en una estufa, luego de lo cual se los expuso a luz durante el resto del experimento, con un fotoperíodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad a 22°C . Al cabo de una semana, se retiró el medio Mprot líquido con sucrosa al 10%, y fue reemplazado por una solución de Mprot líquido con sucrosa al 3% por 2- 3 semanas. A partir de este periodo de tiempo, se observó la aparición de micro callos con la ayuda de un estero microscopio. Las gotas de Mprot con protoplastos fueron divididas en 4 partes, y se transfirieron las secciones a cajas Petri con medio MS sólido más hormonas BAP 4 ppm y NAA 0.05 ppm, y Mprot, en las cuales fueron cultivadas; Se realizó subcultivos cada 15 días durante 6 meses.

7.3. Transferencia de brotes

Cuando los brotes, que regeneraron a partir de los callos, desarrollaron hasta un tamaño mínimo de 2-3 mm, se cortó la base del retoño, eliminando el callo. Se transfirieron los brotes a frascos de vidrio con medio MS sin hormonas. Los retoños de tomate de árbol en medio MS se cultivaron bajo un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad a 22°C , hasta que las plántulas desarrollaron raíz y elongaron el tallo.

7.4. Aclimatación de plántulas de tomate de árbol

Las plántulas fueron extraídas del medio de cultivo, se removió el agar de las raíces y luego se pasaron a tierra estéril en recipientes de barro dentro de un frasco de vidrio tapado con papel celofán. Al cabo de una semana, se realizaron orificios, con un intervalo de 2 días, en la cubierta de papel celofán para aclimatar a las plantas

paulatinamente a la humedad ambiental. Una vez aclimatadas, las plantas fueron transferidas a bolsas de polietileno negro con tierra en las que fueron cultivadas en el cuarto de cultivo a 22°C.

8. RESULTADOS

8.1. Eficiencia de extracción de protoplastos.

En los primeros 6 experimentos, se ensayaron variantes para el aislamiento de los protoplastos. Se obtuvieron concentraciones de entre $2,1 \times 10^5$ - $6,65 \times 10^5$ células/ml, este amplio rango demuestra que las variantes influyen en el número de protoplastos totales que se obtienen al final del proceso. A continuación se describen los diferentes resultados obtenidos de acuerdo a los parámetros analizados.

Efectos de la concentración de sales:

Se observó que los protoplastos obtenidos utilizando una solución CPW + manitol al 10% presentaban mejor aspecto (forma redonda, y protoplastos de mayor tamaño) y una densidad levemente mayor, en relación a los protoplastos obtenidos utilizando una solución CPW+ manitol al 13% (Tabla1).

Efecto del pH de la solución:

Se obtuvieron mayores densidades de protoplastos en una solución con enzimas a un pH 5,6 en relación a una solución de con enzimas a un pH. de 5,8 (Tabla 2).

Edad de explante:

Se obtuvieron más protoplastos y de mejor aspecto al utilizar, como material vegetal para el aislamiento de los protoplastos, cotiledones y hojas con una edad de 30 días de germinadas, en relación a los protoplastos obtenidos a partir de hojas provenientes de plantas de mayor edad. Al utilizar hojas de subcultivos in-vitro de tomate, no se obtuvieron suficientes protoplastos para proceder a la siembra de los mismos. Los valores de protoplastos obtenidos se detallan en la Tabla 3).

Otras observaciones:

Al someter los cultivos de las plántulas in vitro que se seleccionaron para la extracción de los protoplastos a la oscuridad por 3 días previos a la extracción de protoplastos se obtuvo un anillo verde de mayor tamaño en la fase de separación de los protoplastos en la solución de sucrosa al 20 %.

Al utilizar una pipeta cortada en su punta, para realizar el filtrado a través de una membrana de nylon; se redujo el número de protoplastos fragmentados y de cloroplastos libres observados, en relación al número observado en los experimentos en los que se lo realizó el filtrado con una pipeta estandar.

8.2. Cultivo de protoplastos.

Se realizaron 12 experimentos, en los que se cultivaron a los protoplastos a concentraciones siembra de entre $2,76 \times 10^5$ - $9,86 \times 10^5$ protoplastos /ml. En los protoplastos sembrados en medio M prot sin agarosa, no se observó regeneración de la pared celular. Los protoplastos incubados a 28° C en medio M prot con agarosa al 1,2% iniciaron su división celular del 3-4 día, al 6to día se observó divisiones de hasta 4

células, al 8vo día ya se vieron divisiones de hasta 8 células, a los 12 días de cultivo se observó la formación de colonias celulares (Figura 1).

A mayor densidad de siembra de los protoplastos, se obtuvieron divisiones y formaciones de micro callos de manera más rápida.

8.3 Formación de callos y brotes

En los ensayos en los que se cultivó a los protoplastos, en medio Mprot, con concentraciones de siembra más altas ($9,86 \times 10^5$ protoplastos / ml), los callos se tornaron de color café oscuro, estos no desarrollaron brotes (Figura 2).

Se observó una diferencia en la división de los protoplastos y formación de callo; de acuerdo a la ubicación de los mismos dentro del medio de cultivo Mprot. Los protoplastos ubicados más cerca de la superficie, se desarrollaron más que aquellos ubicados hacia el centro del cultivo.

Se obtuvo brotes en cuatro ensayos, con densidades de siembra de protoplastos inferiores a 7×10^5 (Figura 4). Las densidades y valores de regeneración se detallan en la (Tablas 4 y 5).

Los mejores resultados para formación de callos se obtuvieron en un medio MS más hormona BAP 4 ppm y NAA 0,05 ppm, con una densidad de siembra de $2,82 \times 10^5$ protoplastos / ml (Tabla 5).

Los mejores resultados para formación de retoños, en este estudio, se obtuvieron en un medio de cultivo MS más hormona BAP 4 ppm y NAA 0,05 ppm, con una densidad de siembra de $6,125 \times 10^5$. La formación de retoños en promedio fue del 57% (Figura 5).

8.4. Enraizamiento de los retoños de tomate de árbol

Los retoños de mayor tamaño, superior a 3 mm, crecieron y desarrollaron raíces a las 3 semanas de cultivo. Los retoños con un tamaño de 2 mm o menos, se demoraron más de un mes en desarrollar raíces y crecer, y en algunos no se observó formación de raíces. (Figura 6).

8.5. Aclimatación de plántulas

A partir de las 4 semanas, después de haber sido transferidos a medio MS, las plántulas tuvieron un desarrollo adecuado para ser aclimatadas, este proceso tomó de 3-4 semanas y tuvo una efectividad del 85%. No se observaron anomalías en el desarrollo de las plantas (Figura 7).

9. DISCUSIÓN

9.1. Análisis de las condiciones para el aislamiento de protoplastos

Se obtuvo un amplio rango de densidades, $2,1 \times 10^5$ - $9,86 \times 10^5$. Las variaciones corresponden a condiciones que cambiaron dentro del protocolo, hasta determinar las condiciones óptimas para la extracción y el cultivo de protoplastos para el tomate de árbol.

Las condiciones osmóticas de la solución en la cual actúan las enzimas para producir la degradación de las paredes celulares influyen tanto en las cantidades de protoplastos obtenidos como en la viabilidad de los mismos (Albert 1966). En este estudio, esto se evidenció al obtenerse mejores resultados en una solución de CPW con

manitol al 10%, que con la solución de manitol al 13% que estaba estipulada en el protocolo original.

Los protoplastos de origen vegetal debido a su mayor tamaño en relación con los protoplastos bacterianos, son más propensos a sufrir daños durante el lavado, centrifugación, y al ser pipeteados (Albert 1966). Cuando se utiliza una pipeta estándar en el paso de filtración a través de una membrana de nylon para separar los residuos vegetales de los protoplastos y restos celulares, los residuos vegetales obstruyen la punta creando una mayor presión en los protoplastos. En este estudio, se redujo la destrucción de los protoplastos al utilizar una pipeta con su punta cortada.

La selección del tejido a partir del cual se extrajeron los protoplastos, es un aspecto clave para el éxito en el cultivo de protoplastos. La selección del tejido depende de la especie que se utilice; por ejemplo, en granos se prefiere las suspensiones celulares. En la mayoría de las especies se obtienen mejores resultados al utilizar tejidos jóvenes (Dixon 1994, Navratilova 2004). En el caso del tomate de árbol, se obtuvo mayor cantidad de protoplastos al utilizar cotiledones y hojas jóvenes de no más de un mes de germinados en cultivo in-vitro, en comparación con hojas de mayor edad de o proveniente de subcultivos in vitro.

En algunas especies con altos contenidos de almidones, los valores de protoplastos obtenidos aumentaron al someter las plantas a la oscuridad por 3 días (Simens 1994). El tratamiento de las plántulas in vitro en oscuridad por 3 días previos a la extracción de protoplastos, tuvo un efecto positivo en nuestro estudio; se obtuvo un

halo de protoplastos de mayor tamaño en la fase de flotación en la solución de sucrosa al 20 %.

Otro factor que influyó en la eficiencia de aislamiento de protoplastos, fue el pH de la solución enzimática. La celulasa y pectinasa actúan en un pH de entre 4,7 a 6 (Echenique 2004). En este estudio se observó mayor degradación de las paredes celulares de las hojas para un pH 5,6 que con un pH de 5,8.

9.2. Análisis del crecimiento y desarrollo

Los protoplastos incubados a 28° C en medio Mprot con agarosa al 1,2% iniciaron su división normal de acuerdo al comportamiento encontrado en ensayos en la mayoría de los estudios realizados en protoplastos, en los que se observa el inicio de la división del 2-3 día posterior a la siembra de los protoplastos (Merkle 1987, Sotirioua 2007).

En la mayoría de las especies vegetales, se obtienen mejores resultados para el cultivo de protoplastos en medios semi-sólidos con agar o agarosa, que en medios líquidos. Los protoplastos de tomate de árbol cultivados en medio líquido no se dividieron. La agarosa o el agar presentes en los medios semisólidos proveen un soporte a los protoplastos que estimula el desarrollo de la pared celular, agilitando el proceso de división celular (Dixon 1994).

Los protoplastos cultivados en densidades muy altas, superior a 7×10^5 , no desarrollaron brotes, esto se atribuye a un agotamiento más rápido de los nutrientes o a una acumulación de elementos oxidantes que causan estrés e impiden el desarrollo normal de los callos (Dixon 1994; Kapur 1993).

En ensayos realizados en *Brassica nigra* se evidenció un desarrollo más rápido en los microcallos expuestos a la superficie, esto probablemente se debe a que el estar en la superficie, facilita el intercambio de gases y de nutrientes (Phan 1986). Esto explicaría el mayor desarrollo observado en los protoplastos de tomate de árbol localizados en la superficie de las gotas de Mprot con agarosa, la proximidad con el medio líquido que rodea las gotas, permitió un intercambio de nutrientes los cual aceleró el crecimiento de los microcallos.

En un estudio realizado en *Liriodendron tulipifera* que es una planta leñosa, se observó una elevada división celular en protoplastos sembrados en una densidad de $2-4 \times 10^5$ protoplastos por ml (Merkle 1987). Estos valores son similares al rango de densidades para el cual se obtuvo formación de retoños en este estudio, que variaron de $2,76 \times 10^5$ - $6,12 \times 10^5$.

Se obtuvo un valor promedio de formación de retoños de 57%; al ser el primer estudio de este tipo realizado en tomate de árbol, podemos considerar exitosos el valor de regeneración de retoños obtenido, ya que, es similar a los rangos superiores obtenidos en otras especies; como en *Brassica* donde la cantidad de callos que formaron retoños en diferentes variedades varió del 5 al 70 % (Phan 1986), o en estudios realizados en arroz (*Oryza sativa*), en los que se obtuvo un rango de regeneración de retoños del 17 al 50%, estos valores fueron considerados altos para la especie (Junko et al 1987).

La efectividad del proceso de aclimatación fue del 85 %, este valor es similar al obtenido en plantas de tabaquillo (*Nicotiana glauca*) donde el valor obtenido fue del 81% (Ayala 2007). No se observaron anomalías en el desarrollo de las plantas aclimatadas, se puede considerar que el proceso de aclimatación fue exitoso, ya que, se obtuvo un alto porcentaje de plantas viables.

10. CONCLUSIONES

En esta investigación se logró establecer un protocolo de regeneración de plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) a partir de protoplastos. La metodología establecida en esta investigación permitirá la realización de estudios posteriores de hibridación somática.

Para poder tener un protocolo eficaz para el aislamiento de protoplastos hubo que introducir pequeños cambios (pH y concentración de sales de la solución CPW) al protocolo original de Reinert et al (1982).

El mejor material vegetal para la extracción de protoplastos fueron los cotiledones y hojas jóvenes de tomate de árbol de 30 días de germinadas in Vitro.

El desarrollo de callos, a partir de protoplastos de tomate de árbol, se obtuvo con mayor eficacia para densidades de siembra entre $2,7 - 2,9 \times 10^5$ cel/ml.

Los cultivos de protoplastos realizados en medios de cultivo sólidos con concentraciones de siembra muy elevadas, superiores a 7×10^5 cel/ml, no fueron

eficaces para la formación de callos y por ende en ellos la regeneración de plántulas tampoco fue exitosa.

El enraizamiento de las plántulas se dio de forma efectiva a las 3 semanas de cultivo en un medio MS y con un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, a 22°C

El proceso de aclimatación fue efectivo al utilizar plántulas de 4-6 semanas de cultivo en medio MS con raíces y hojas bien desarrolladas.

11. RECOMENDACIONES

Utilizar cultivos in vitro jóvenes (de 30 días) para el aislamiento de los protoplastos de tomate de árbol.

En medios de cultivo sólidos, cultivar a los protoplastos en concentraciones de entre $2,8-6 \times 10^5$ cel/ml para obtener formación de callos y regeneración de plántulas.

Realizar subcultivos de los callos cada 15 días, para evitar el deterioro de los mismos.

No transferir brotes con un tamaño de tallo inferior a 3 mm, a medio de cultivo MS, en los brotes muy pequeños es más difícil remover completamente el callo, lo cual afecta el desarrollo de la plántula.

Para obtener un mayor porcentaje de plantas aclimatadas con éxito se recomienda establecer horarios fijos semanales de riego.

12. Citas Bibliográficas

1. Albert W. Ruesink; Kenneth V. Thimann *Protoplasts: Preparation from Higher Plants Science*, New Series, Vol. 154, No. 3746. (Oct. 14, 1966), pp. 280-281.
2. Albornoz G. P. *El tomate de árbol en el Ecuador* Universidad Central del Ecuador 1992.
3. Ayala Diana. *Regeneración de plantas de tabaquillo a partir de protoplastos*. Universidad San Francisco de Quito 2007.
4. BCE. Banco Central del Ecuador. Estadísticas Nandina-pais. Partida 0819030000. 27 Abril, 2005
5. Dixon R. A. and Gonzales R. A. *Plant Cell Culture A practical Approach*. Oxford University Press. 2^{da} edición 1994.
6. Echenique V. Rubinstein C. Mroginski L. *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal*. INTA 2004.
7. Federación Nacional de cafeteros de Colombia. *El cultivo del tomate de árbol*
8. George J. Wagner; Henry C. Butcher IV; Harold W. Siegelman 1978 *The Plant Protoplast: A Useful Tool for Plant Research and Student Instruction*. BioScience, 28: pp. 95-101
9. González S. Suárez. *Métodos de propagación "in vitro" en plantas*.
10. Junko Kyozyuka, Yasuyuki Hayashi, and Ko Shimamoto. *High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods*. Mol Gen Genet 206: 408-413. 1987.
11. Kapur R., Mohammed Saleem, Bryan L. Harvey and Adrian J. Cutler. Oxidative metabolism and protoplast culture. In Vitro Cell. dev. biol. 29p:200-206, october 1993.

12. Lewis D.H., Considine J.A. Pollination and Fruit set in the tamarillo (*Cyphomandra betacea*) New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science. 27 109-111. 1999
13. Lynn Bohs. Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. *Taxon*, Vol. 44, No. 4 (Nov., 1995), pp. 583-587.
14. Merkle S. A.; Sommer H. E. 1987 Regeneration of *liriodendron tulipifera* (family magnoliaceae) from protoplast culture. *American Journal of Botany*, 76: pp 1317-1321
15. Navratilova B. Protoplast 2004 *cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae*. *Horticulture science (Prague)* 4: pp. 140-157.
16. Olivares-Fuster, L. Peña, N. Duran-Vila and L. Navarro. 2002. *Green Fluorescent Protein as a Visual Marker in Somatic Hybridization* *Annals of Botany* 89: 491-497
17. Ordoñez S. (2007) Diferenciación de variedades en cultivos de Tomate de Árbol, *Solanum betaceum* mediante la técnica molecular de AFLP. Universidad San Francisco de Quito. Quito Ecuador.
18. Orihuela M. Tomate andino, manual practico para su cultivo y uso Centro Bartolomé de Las Casas 1997
19. Penelope Sotirioua, Stephen C. Fryb and Caroline G. Spyropoulos. 2007 Protoplast isolation and culture from carob (*Ceratonia siliqua*) hypocotyls: ability of regenerated protoplasts to produce mannose-containing polysaccharides. *Physiologia Plantarum* 130: pp. 11-22.
20. Peñafiel N. et al 2007. Evaluación de la variabilidad genética del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en los cultivos de tres provincias del Ecuador

- por medio de marcadores microsatélites. Universidad San Francisco de Quito. Quito Ecuador 2007.
21. Phan V. Chuong¹, K. P. Pauls, and W. D. Beversdorf. Plant regeneration from *Brassica nigra* (L.) Koch stem protoplasts. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology* volume 23, number 6, June 1987.
 22. Pringle G.J. Murray B.G. Karyotype Diversity and nuclear DNA Variation in *Ciphomandra*. Solanaceae III. Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London. 1991
 23. Reinert, J. Yeoman, M. *Plant Cell and Tissue Culture*. Springer-Verlag. New York. 1982.
 24. Simens J. and Sacristán M. D. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Matthiola incana*. *Plant cell reports* 446-449 1994

13. TABLAS

Tabla 1. Eficacia de aislamiento de protoplastos en relación al porcentaje de manitol en la solución CPW utilizada.

| | CPW con manitol al 13% | CPW con manitol al 10% |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| densidad de protoplastos | $2,1 \times 10^5$ | $2,33 \times 10^5$ |
| Volumen en ml | 0,5 | 0,5 |
| protoplastos totales | 105000 | 116500 |

Tabla 2. Eficacia de aislamiento de protoplastos en relación al pH de la solución CPW

| | CPW a pH. 5.8 | CPW a pH 5.6 |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| densidad de protoplastos | $2,33 \times 10^5$ | $3,15 \times 10^5$ |
| Volumen en ml | 0,5 | 1,5 |
| protoplastos totales | 116500 | 472500 |

Tabla 3. Eficacia de aislamiento de protoplastos en relación a la edad el material vegetal utilizado.

| | Cotiledones de 30 días | Cotiledones de 40 días | Cotiledones de 60 días |
|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| densidad de protoplastos | $3,15 \times 10^5$ | $6,65 \times 10^5$ | $2,16 \times 10^5$ |
| Volumen en ml | 1,5 | 0,5 | 0,5 |
| protoplastos totales | 472500 | 332500 | 108000 |

Tabla 4. Eficacia de aislamiento de protoplastos en los cuatro ensayos que regeneraron plántulas

| Ensayo | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Volumen de protoplastos obtenidos | 1,5 ml | 1,2 ml | 1 ml | 1 ml |
| Densidad de protoplastos por ml | $6,12 \times 10^5$ | $2,8 \times 10^5$ | $2,82 \times 10^5$ | $2,76 \times 10^5$ |
| Total protoplastos obtenidos (volumen x densidad) | $9,18 \times 10^5$ | $3,36 \times 10^5$ | $2,82 \times 10^5$ | $2,76 \times 10^5$ |

Tabla 5. Eficacia de formación de callos en los cuatro ensayos que regeneraron plántulas.

| Ensayo | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Total Protoplastos sembrados | $9,18 \times 10^5$ | $3,36 \times 10^5$ | $2,82 \times 10^5$ | $2,76 \times 10^5$ |
| Total callos obtenidos | 326 | 99 | 201 | 202 |
| Eficacia de formación de callos % | 0,036% | 0,030% | 0,260% | 0,145% |

Tabla 6. Composición de medio Mprot y CPW

| Macroelementos | Mprot (Mg/L) | CPW(mg/L) |
|---|---------------------|------------------|
| Ca(H ₂ PO ₄) ₂ · H ₂ O | 100 | - |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 450.0 | 1480.0 |
| KH ₂ PO ₄ | - | 27.2 |
| KNO ₃ | 2500.0 | 101.0 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 250.0 | 246 |
| NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O | 170.0 | - |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 134.0 | - |
| Microelementos | | |
| CoCl ₂ · 6 H ₂ O | 0.025 | - |
| CuSO ₄ · 5 H ₂ O | 0.025 | 0.025 |
| H ₃ BO ₃ | 3.0 | - |
| KI | 0.75 | 0.16 |
| MnSO ₄ · 4 H ₂ O | 13.2 | - |
| Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O | 0.25 | - |
| ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 2.0 | - |
| Sucrosa | 1% | - |
| Manitol | 100000.0 | - |
| Inositol | 100.0 | - |
| Acido nicotínico | 1.0 | - |
| Piridoxina | 1.0 | - |
| Tiamina HCl | 10.0 | - |
| 2,4-D | 0.1 | - |
| NAA | 1.0 | - |
| 6BAP | 1.0 | - |
| pH | 5.8 | 5.8 |

14. FIGURAS

Figura 1. División de protoplastos

(a) Protoplastos a los 4 días de cultivo, se observan las primeras divisiones. (b) Protoplastos a los 6 días de cultivo, se observan divisiones de hasta 4 células. (c) Protoplastos a los 8 días de cultivo, se observan divisiones de 8 células. (d) Protoplastos a los 12 días de cultivo se observa la formación de colonias celulares.

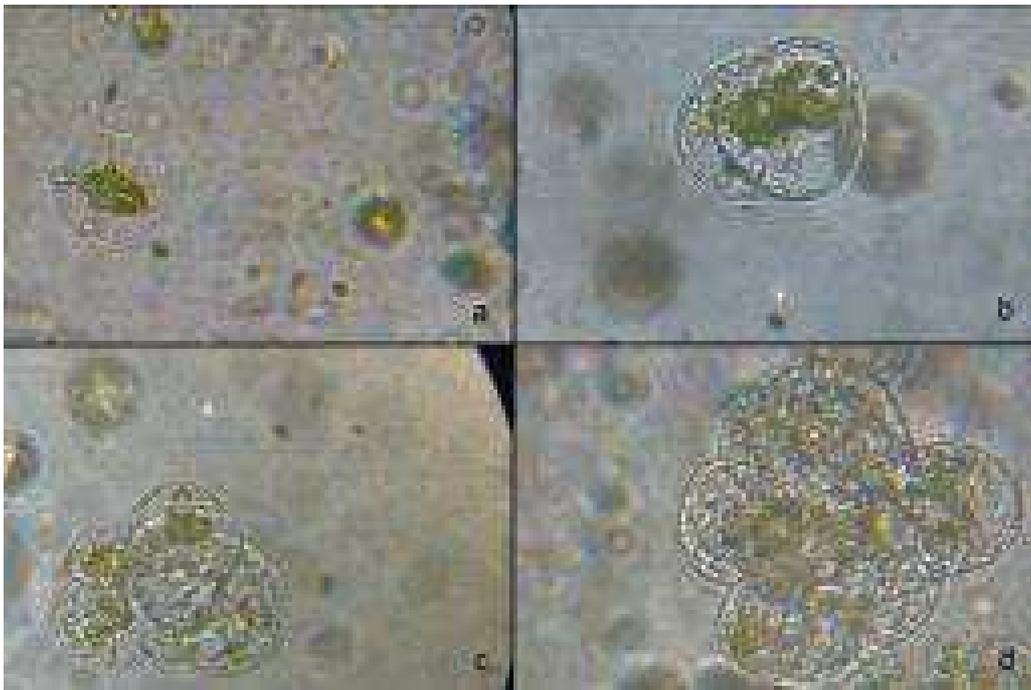


Figura 2. Desarrollo de los microcallos a los 20 días de cultivo en medio de cultivo sólido Mprot.



Figura 3. Callos a las seis semanas de cultivo, en medio MS con hormonas BAP4, NAA0,05.

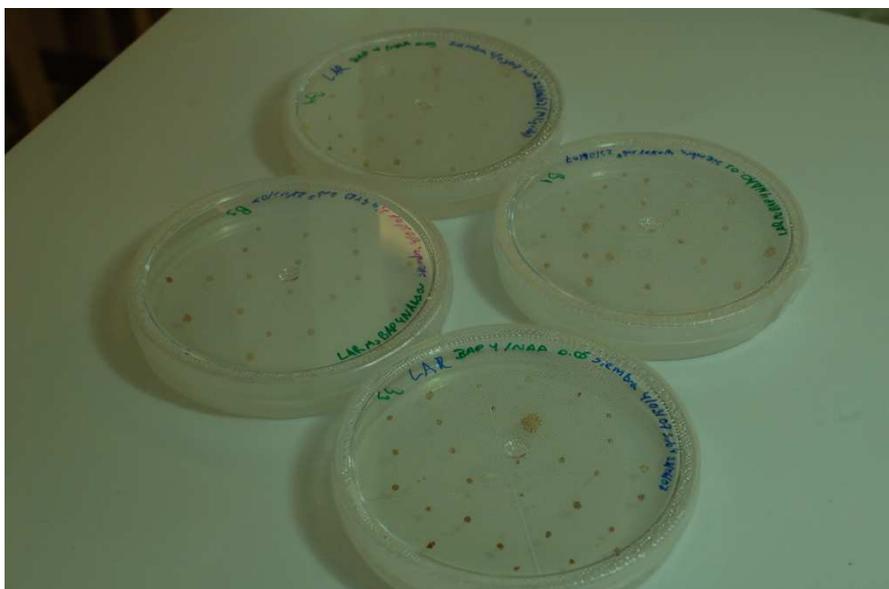


Figura 4. Regeneración de brotes a partir de callos, a los 6 meses de cultivo.



Figura 5. Eficacia de formación de retoños en los cuatro ensayos que formaron plántulas.

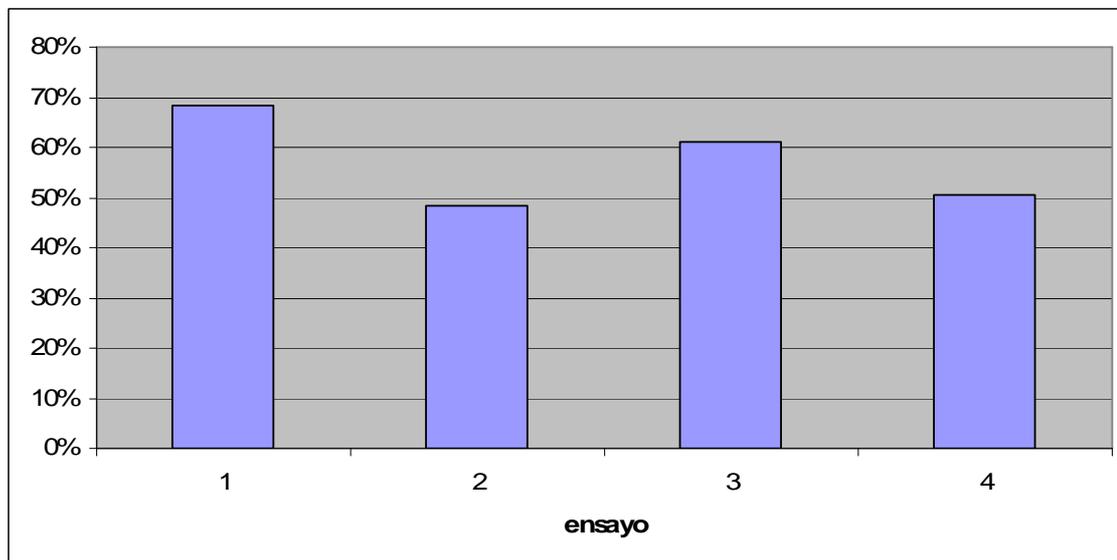


Figura 6. Enraizamiento a las 4 semanas de cultivo en medio MS. La plántula de la izquierda (de mayor tamaño) corresponde a un retoño transferido a medio Ms con un tallo superior a 2 mm, La plántula de la derecha corresponde a un retoño transferido con un tallo menor a 2 mm.



Figura 7. Pasos de aclimatación:

(a) Plantas en medio MS listas para ser aclimatadas. (b) Recipientes para la aclimatación de la plantas. (c) Plantas en recipiente de barro con tierra en proceso de aclimatación. (d) Plantas aclimatadas en bolsas negras con tierra

