



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN Y FUSIÓN DE
PROTOPLASTOS DE *Solanum tuberosum* (PAPA) Y *Solanum lycopersicum*
(TOMATE)**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
Ingeniero/a en Biotecnología.**

AUTORES: JULIO SEBASTIAN ANDRADE GUAITA

INGRITH STEFANY ASUMASA REYES

TUTOR: MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito-Ecuador

2024

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Julio Sebastian Andrade Guaita con documento de identificación N°. 1726623372 y Ingrith Stefany Asumasa Reyes con documento de identificación N°. 1750152421; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 18 de septiembre del año 2024

Atentamente,



Julio Sebastian Andrade Guaita
1726623372



Ingrith Stefany Asumasa Reyes
1750152421

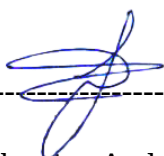
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Julio Sebastian Andrade Guaita con documento de identificación No. 1726623372 y Ingrith Stefany Asumasa Reyes con documento de identificación No. 1750152421, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: " Desarrollo de un protocolo para extracción y fusión de protoplastos de *Solanum tuberosum* (papa) y *Solanum lycopersicum* (tomate)", el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería en biotecnología , en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

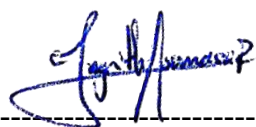
Quito, 18 de septiembre del año 2024

Atentamente,



Julio Sebastian Andrade Guaita

1726623372



Ingrith Stefany Asumasa Reyes

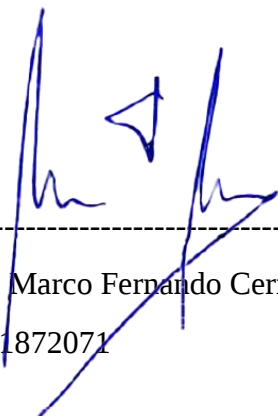
1750152421

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos con documento de identificación N° 0501872071, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN Y FUSIÓN DE PROTOPLASTOS DE *SOLANUM TUBEROSUM* (PAPA) Y *SOLANUM LYCOPERSICUM* (TOMATE), realizado por Julio Sebastian Andrade Guaita con documento de identificación N° 1726623372 y por Ingrith Stefany Asumasa Reyes con documento de identificación N° 1750152421, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 18 de septiembre del año 2024

Atentamente,



Ing. Marco Fernando Cerna Cevallos PhD,
0501872071

RESUMEN

La fusión de protoplastos es una técnica biotecnológica esencial que permite la combinación de características de diferentes células, facilitando la investigación y el desarrollo de nuevas variedades de plantas. Este estudio evalúa el impacto de diferentes concentraciones de polietilenglicol (PEG) y niveles de pH en la eficiencia de fusión de protoplastos. Se aplicaron cinco tratamientos: 40% PEG a pH 8, 40% PEG a pH 9, 50% PEG a pH 8, 50% PEG a pH 9, y un control con agua, cada uno con tres repeticiones. El conteo de protoplastos fusionados y no fusionados/muertos se realizó utilizando una cámara de Neubauer. La identificación de las células fusionadas permitió determinar, a través del microscopio, si son homocariontes o heterocariontes, basándose en las diferencias morfológicas entre los protoplastos de las especies.

Los resultados mostraron que tanto la concentración de PEG como el pH tienen un impacto significativo en la fusión de protoplastos. En particular, el tratamiento con 50% PEG y pH 9 fue el más efectivo, presentando el mayor número de protoplastos fusionados. El análisis factorial $2 \times 2 + 1$ confirmó la interacción significativa entre la concentración de PEG y el pH. El tratamiento control, sin PEG, demostró la menor eficiencia, subrayando la importancia del PEG en la promoción de la fusión celular. Estos hallazgos proporcionan una base sólida para la optimización de procesos de fusión de protoplastos en aplicaciones biotecnológicas, recomendándose la utilización de 50% PEG y pH 9 para maximizar la eficiencia de fusión.

ABSTRACT

Protoplast fusion is a crucial biotechnological technique that enables the combination of characteristics from different cells, advancing research and the development of new plant varieties. This study evaluates the impact of varying concentrations of polyethylene glycol (PEG) and pH levels on protoplast fusion efficiency. Five treatments were applied: 40% PEG at pH 8, 40% PEG at pH 9, 50% PEG at pH 8, 50% PEG at pH 9, and a control with water, each with three repetitions. Protoplast fusion and non-fusion/dead counts were conducted using a Neubauer chamber, allowing clear identification of fused cells due to morphological differences between the species involved.

Results indicated that both PEG concentration and pH significantly impact protoplast fusion. Notably, the 50% PEG at pH 9 treatment was the most effective, yielding the highest number of fused protoplasts. A $2 \times 2 + 1$ factorial analysis confirmed the significant interaction between PEG concentration and pH. The control treatment, without PEG, demonstrated the lowest efficiency, highlighting the critical role of PEG in promoting cell fusion. These findings provide a solid foundation for optimizing protoplast fusion processes in biotechnological applications, with a recommendation to use 50% PEG and pH 9 to maximize fusion efficiency.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	1
2. Fundamentación teórica	4
2.1 <i>Solanum tuberosum</i>.....	4
2.1.1 Taxonomía de <i>Solanum tuberosum</i>	5
2.1.2 Distribución	6
2.1.3 Descripción	7
2.2 <i>Solanum lycopersicum</i>.....	7
2.2.1 Taxonomía de <i>Solanum lycopersicum</i>	8
2.2.2 Distribución	9
2.2.3 Descripción	9
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	10
2.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> <i>Solanum tuberosum</i>	10
2.3.2 Cultivo <i>in vitro</i> <i>Solanum lycopersicum</i>	13
2.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> <i>Solanum lycopersicum</i>	14
2.3.4. Contaminación y fenolización	16
2.3.5. Importancia del cultivo <i>in vitro</i> previo a la extracción de protoplastos	16
2.4 Obtención de protoplastos.....	17
2.4.1 Purificación de protoplastos.....	19
2.4.2 Viabilidad de protoplastos	19
2.4.3 Métodos para el conteo de protoplastos.....	20
2.5 Fusión de protoplastos.....	21
2.5.1 Relación taxonómica en la Fusión de protoplastos.....	22
2.5.2. Evaluación de la fusión.....	23
3. Materiales y métodos.....	25
3.1 Cultivo <i>in vitro</i>.....	25
3.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i>	25

3.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> <i>Solanum lycopersicum</i>	28
3.2 Selección del tejido foliar de <i>Solanum tuberosum</i> y <i>Solanum lycopersicum</i> previo al tratamiento	29
3.2.1 Plantas <i>in vitro</i>	29
3.3 Extracción de protoplastos.....	29
3.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de hojas pre-fusión.....	29
3.3.2 Digestión Enzimática de plantas <i>in vitro</i>	30
3.3.3 Aislamiento y observación de protoplastos	31
3.4 Fusión de protoplastos.....	34
3.5 Análisis estadístico y diseño experimental.....	37
4. Resultados y discusión.....	40
4.1 Cultivo <i>in vitro</i>	40
4.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i>	40
4.2 Extracción de protoplastos de <i>Solanum tuberosum</i>	46
4.2.1 Porcentaje de Células Vivas y Muertas en Protoplastos de <i>Solanum tuberosum</i>	47
4.2.3 Rendimiento de la Extracción de Protoplastos de <i>Solanum tuberosum</i>	48
4.2.4 Características morfológicas observadas en protoplastos extraídos de <i>Solanum tuberosum</i>	50
4.3 Extracción de protoplastos de <i>Solanum lycopersicum</i>	53
4.3.1 Porcentaje de células vivas y muertas en protoplastos de <i>Solanum lycopersicum</i>	53
4.3.2 Rendimiento de la Extracción de Protoplastos de <i>Solanum lycopersicum</i>	55
4.2.3 Características Morfológicas Observadas en Protoplastos Extraídos de <i>Solanum lycopersicum</i>	56
4.3 Fusión de protoplastos.....	58
4.3.1 Conteo	62
4.3.2 Frecuencia de fusión.....	62
5. Conclusiones y Recomendaciones	67

6. Recomendaciones..... 69

6. Recomendaciones..... 70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Solanum tuberosum</i>	6
Tabla 2. Taxonomía de <i>Solanum lycopersicum</i>	9
Tabla 3. Composición del medio de cultivo in vitro	30
Tabla 4. <i>Composición de solución para extracción de protoplastos</i>	31
Tabla 5. Elementos químicos utilizados para la fusión de protoplastos.	36
Tabla 6. Composición del medio de formación de callo	37
Tabla 7. Variables independientes.....	38
Tabla 8. Tratamientos	39
Tabla 9 Conteo de plantas pérdidas por contaminación y viables.....	40
Tabla 10 Pérdidas de plantas por contaminación y fenolización.....	44
Tabla 11 Conteo de protoplastos <i>Solanum tuberosum</i>	47
Tabla 12 Rendimiento de protoplastos de <i>Solanum lycopersicum</i>	53
Tabla 13 Conteo de protoplastos en los diferentes tratamientos con tres repeticiones ..	62
Tabla 14 Comparación ortogonal de los tratamientos vs el testigo.	64
Tabla 15 Análisis de los factores de los tratamientos.....	64
Tabla 16 Análisis del pH en los tratamientos	65
Tabla 17 Análisis de la interacción de los factores en los tratamientos.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Desinfección e introducción de material vegetal	27
Figura 2. Aislamiento de protoplastos.....	32
Figura 3 Conteo de protoplastos no viables de <i>Solanum tuberosum</i> herramienta informática ImageJ.	33
Figura 4 Protoplastos sometidos a tratamientos de fusión.	36
Figura 5 Plántulas in vitro de <i>Solanum tuberosum</i> sembradas en el laboratorio de Neoforest.	43
Figura 6 Plántulas in vitro de <i>Solanum lycopersicum</i> sembradas en el laboratorio de Neoforest.	46
Figura 7 % de células vivas y muertas de <i>Solanum tuberosum</i>	48
Figura 8 Rendimiento de extracción de <i>Solanum tuberosum</i>	50
Figura 9. Protoplastos de plántulas in vitro de <i>Solanum tuberosum</i>	52
Figura 10 Protoplastos de Plántulas in vitro de <i>Solanum tuberosum</i>	52
Figura 11 % de células vivas y muertas de <i>Solanum lycopersicum</i>	54
Figura 12 Rendimiento de extracción de <i>Solanum lycopersicum</i>	56
Figura 13 Protoplastos de Plántulas in vitro de <i>Solanum lycopersicum</i>	58
Figura 14 Fusión Homocariótica de Membranas de Protoplastos de <i>Solanum tuberosum</i>	59
Figura 15 Fusión Heterocariótica de Membranas de Protoplastos de <i>Solanum tuberosum</i> y <i>Solanum lycopersicum</i>	61
Figura 16 Diagrama de barras de la frecuencia de fusión	63

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Frecuencia de fusión de protoplastos 22

Ecuación 2. Rendimiento total de protoplastos..... 33

1. Introducción

La fusión de protoplastos es una técnica de ingeniería genética que permite la combinación de material genético de diferentes especies vegetales mediante la unión de sus células vegetales desprovistas de su pared celular, además de que proporciona plantas mejoradas al combinar características deseadas con el potencial de formar un nuevo individuo que exprese dichas características (Pensabene, 2009).

Por otra parte, la seguridad alimentaria y la sostenibilidad se vuelven cada vez más urgentes debido al crecimiento de la población según la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2009) se estima que se tendrá que producir un 70% más de alimentos desde 2005 para el año 2050, por lo que generar plantas con mayor valor nutricional, resistentes a enfermedades y que mejoren el rendimiento, en términos de kilogramos por hectárea (Kg/Ha), será un paso crucial para mejorar las condiciones de vida de las personas y satisfacer las demandas.

Por tal motivo, es imprescindible conocer la importancia de la fusión de protoplastos ya que radica en su potencial para generar variedades vegetales con características mejoradas, como la resistencia a enfermedades y la reducción de la dependencia de pesticidas, lo que a su vez podría mejorar el rendimiento nutricional y la calidad de los frutos, generando plantas que posean propiedades beneficiosas de ambas especies (Aparecida, 2001).

A todo esto, se realizaron investigaciones previas que consideraron que la fusión de protoplastos sirve como estrategia para superar las barreras de las tecnologías de reproducción entre especies, injertos y selección artificial como el tiempo requerido por estas tecnologías y que enriquezcan el pool genético disponible para mejorar cultivos de especies de interés (Olivares et al., 2005).

La efectividad de la fusión de protoplastos se puede evidenciar en diversas especies vegetales. Por ejemplo, el cruzamiento interespecífico entre *V. pompona* y *V. planifolia* realizados en el Centro de Investigaciones Tropicales (CITRO) de la Universidad Veracruzana, la cual observó el 85% de regeneración y mayor vigor en comparación con las plántulas obtenidas por hibridación sexual (Villareal et al., 2022). Además, investigaciones sobre el aceite de palma demostraron que el híbrido *E. oleifera* x *E. guineensis* no solo duplica el rendimiento de la especie *Elaeis guineensis* Jacq, sino que también presenta beneficios nutricionales adicionales, además las investigaciones sobre el aceite de palma demostraron que el híbrido *E. oleifera* x *E. guineensis* no solo duplica el rendimiento de la especie *Elaeis guineensis* Jacq, sino que también presenta beneficios nutricionales adicionales (Villareal et al., 2022).

La fusión de protoplastos entre especies de la familia Solanaceae ha explorado diferentes aspectos técnicos como la eficiencia de fusión, la regeneración de plantas a partir de protoplastos fusionados y la estabilidad genética de las plantas resultantes, proporcionando información valiosa sobre el comportamiento de los híbridos generados (Hanan & Mondragón, 2009). Sin embargo, la optimización de las condiciones para la fusión de protoplastos sigue siendo un desafío, especialmente en especies como *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum* (Gaikwad et al., 2020).

Este estudio se realizó en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador, sede Quito, campus El Girón, en el año 2023-2024. El proyecto se enfocó en la biotecnología y la mejora genética vegetal, bajo el auspicio del grupo de investigación NUNKUI WAKAN.

La investigación se centra en determinar la mejor condición de fusión de protoplastos de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum*, a través de la variación de

concentraciones de PEG y niveles de pH que afectan significativamente la fusión de protoplastos (Márquez, 2019). En particular, siendo el 50 % PEG y pH9, se obtuvo una mayor fusión con alta viabilidad celular y los resultados se evaluaron con análisis estadísticos de datos.

La presente investigación proporciona información valiosa sobre las condiciones para la fusión de protoplastos, contribuyendo así a la mejora genética de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum*, y ofreciendo potenciales aplicaciones en la agricultura y la industria alimentaria.

2. Fundamentación teórica

La biotecnología vegetal ofrece herramientas para superar desafíos globales relacionados con industrias como la seguridad alimentaria, sostenibilidad ambiental y la salud humana mediante fitorremediación, conservación del germoplasma, producción de metabolitos secundarios y mejoramiento genético, aplicando uno de los métodos de regeneración y propagación de plantas conocido como cultivo *in vitro*, que permite estudiar especies vegetales en condiciones controladas, además de poder desarrollar nuevas variedades de interés, ahorrando tiempo, espacio y recursos (Pineda et al., 2021).

El cultivo *in vitro* ayuda a la propagación masiva de especies vegetales, aumentando el número de plantas libres de enfermedades, ya que agrega factores de selección y otros nutrientes que garantizan el éxito en el medio.

Por otro lado, en cuanto a los tejidos vegetales *in vitro*, estos proporcionan la multiplicación homogénea de plántulas de mayor rendimiento, que a su vez preserva el germoplasma el cual es crucial para la conservación de la biodiversidad, la sostenibilidad agrícola y la investigación científica para el mejoramiento de cultivos (Pineda et al., 2021). Por ende, el cultivo *in vitro* consiste en crear ambientes asépticos y controlar factores físicos y químicos para el cultivo de plantas, la propagación de material vegetal deseable mediante explantes originados de una planta madre basándose en la totipotencia de las células vegetales (Perea et al., 2009).

2.1 *Solanum tuberosum*

El género *Solanum* incluye una vasta diversidad de especies, siendo *Solanum tuberosum* una de las más destacadas, ya que es utilizada en una amplia variedad de productos alimenticios debido a que es una fuente importante de carbohidratos, vitaminas y minerales en la dieta humana (Birch et al., 2012). Además, es fundamental

en la industria de producción de bioplásticos y bioetanol. Por consiguiente, no solo facilita la propagación rápida de variedades mejoradas genéticamente y la conservación de germoplasma, sino que también es fundamental para la investigación básica y aplicada en biotecnología vegetal (Perea et al., 2009).

Tras lo mencionado, se destaca que la variedad utilizada fue la papa Chola de *Solanum tuberosum*, la cual se caracteriza por su rápido desarrollo, alta adaptabilidad, genes de resistencia a enfermedades, bajo costo de producción, alto contenido nutricional y excelente calidad culinaria (Fuentes, 1992).

No obstante, la papa Chola enfrenta desafíos significativos, como la baja productividad y la heterogeneidad en las cosechas. Además de su importancia alimentaria, algunos estudios han explorado su potencial en la industria farmacéutica debido a la presencia de compuestos bioactivos en sus tubérculos, tales como antioxidantes y compuestos fenólicos (Velásquez-Barreto & Velezmoro, 2018).

Sin embargo, se conocen cerca de 200 especies dentro del género *Solanum*, ya que la cantidad total de variedades cultivadas y silvestres podría ser considerablemente mayor, dado que las poblaciones híbridas y las formas silvestres continúan siendo objeto de estudio y clasificación (Pineda et al., 2021).

2.1.1 Taxonomía de *Solanum tuberosum*

La taxonomía de *Solanum tuberosum* se sitúa dentro del reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Solanales y familia Solanaceae el género específico *Solanum* y la especie *Solanum tuberosum* identifican de manera precisa a la papa cultivada originaria de Sudamérica especialmente en el altiplano peruano-boliviano *Solanum tuberosum* se ha diversificado primariamente en la región andina

extendiéndose secundariamente a Mesoamérica y otras áreas influyendo su evolución genética y adaptación a diferentes climas y suelos (Ríos, 2007). En la **Tabla 1.** se observa la clasificación taxonómica del género *Solanum tuberosum*, proporcionando un esquema detallado de su posición en el sistema de clasificación.

Esta especie muestra una notable capacidad de fusión con diversas variedades cultivadas y silvestres, así como con otras especies relacionadas dentro del género *Solanum* esto ha contribuido a su amplia variabilidad genética reflejada en su número cromosómico variable y alta heterocigosidad características que han facilitado su adaptación y cultivo en diferentes partes del mundo (Lim, 2016).

Tabla 1. *Taxonomía de Solanum tuberosum*

Reino	Plantae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum Tuberosum</i>
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	<i>Solanaceae</i>

Fuente: (Morales, 2016)

2.1.2 Distribución

Esta planta se domesticó en Sudamérica, específicamente en Bolivia, entre los lagos Titicaca y Poopó, aunque los primeros vestigios se encontraron en el cañón de Chilca, al sur de Lima en Perú que datan de una antigüedad desde hace 10.500 años. Hay una gran controversia y opiniones diversas sobre el origen de la papa, donde se

estima que el altiplano peruano-boliviano es el centro de origen de este importante cultivo (Andre et al., 2007).

2.1.3 Descripción

Todas las hojas están cerca de la base de tallos cortos y están próximas al suelo, lo que indica que la planta crece a partir de una semilla y que pueden desarrollarse a partir de una semilla o de un tubérculo, y forman una delicada raíz axonomorfa con ramificaciones laterales (Lim, 2016).

2.2 *Solanum lycopersicum*

El género *Solanum* comprende numerosas especies entre las cuales *Solanum lycopersicum* se destaca como una de las más cultivadas y estudiadas a nivel mundial originario de América del Sur el tomate ha sido objeto de domesticación y mejora genética durante milenios resultando en una amplia diversidad de variedades adaptadas a diferentes condiciones climáticas y usos culinarios (Hanan & Mondragón, 2009).

El tomate no solo es apreciado por su valor alimentario, siendo una fuente importante de vitaminas (como la vitamina C y el licopeno) y antioxidantes, sino que también desempeña un papel crucial en la agricultura y la economía global como uno de los cultivos hortícolas más importantes (Gerszberg et al., 2015). Además de su uso fresco en ensaladas y como ingrediente culinario, el tomate se procesa en una variedad de productos como salsas, jugos y conservas, lo que amplía su utilidad y demanda en el mercado mundial (Burbano & Vallejo, 2017).

Solanum lycopersicum exhibe una diversidad fenotípica significativa en términos de tamaño, forma, color y sabor de los frutos, lo que refleja adaptaciones a diferentes preferencias de consumo y condiciones ambientales (Peralta et al., 2024). Además, estudios recientes han explorado el potencial del tomate como fuente de

compuestos bioactivos con beneficios potenciales para la salud, incluidos los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de sus componentes (León-García et al., 2017).

2.2.1 Taxonomía de *Solanum lycopersicum*

La taxonomía de *Solanum lycopersicum* se sitúa dentro del reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Solanales y familia Solanaceae (El-Gazzar & Moustafa, 2021)

El género *Solanum* y la especie *Solanum lycopersicum* identifican de manera precisa al tomate de mesa o jitomate, una planta originaria de la región andina de Sudamérica que, tras su diversificación y expansión global, ha demostrado una notable adaptación a diversos climas y tipos de suelo, lo que ha influido significativamente en su desarrollo y variabilidad genética (Shukla et al., 2013).

Solanum es el género más grande de la familia *Solanaceae*, cuya clasificación taxonómica de *Solanum lycopersicum* ha sido revisada durante más de 150 años (El-Gazzar & Moustafa, 2021)

En la **Tabla 2.** se observa la Taxonomía de *Solanum lycopersicum*

Tabla 2. *Taxonomía de Solanum lycopersicum*

Fuente: Mondragón,	Reino	Plantae	(Hanan & 2009)
	Género	<i>Solanum</i>	
	Especie	<i>Solanum Lycopersicum</i>	
	División	Magnoliophyta	
	Clase	Magnoliopsida	
	Orden	Solanales	
	Familia	<i>Solanaceae</i>	

2.2.2 Distribución

Esta se distribuye desde América del Sur en países como: Perú, Ecuador, Chile, y Galápagos, continuando por toda América Central hasta México. Actualmente, estas zonas se consideran el centro de domesticación de las especies, ya que las condiciones climáticas de las áreas favorecen en su crecimiento (Holguín-Peña et al., 2010).

2.2.3 Descripción

Solanum lycopersicum es una de las principales hortalizas de mayor demanda en el mundo, ya que es una planta herbácea con un ciclo de vida que puede superar un año (Holguín-Peña et al., 2010). Es una planta que puede alcanzar hasta 1,5 metros de altura y se presenta en un porte erecto con ramas verdes cubiertas de tricomas; sus hojas son imparipinnadas de 15-45 cm de largo con foliolos ovados u oblongos y bordes dentados, mientras que las flores, amarillas y con pedicelos de 9-12 mm, tienen un cáliz 5-lobulado; los frutos, bayas rojas, rosadas o amarillentas, son oblongos o globosos, de más de 2 cm de diámetro, lampiños y pluriloculares con numerosas semillas aplanadas,

y la capacidad de esta planta para adaptarse a diversos climas y tipos de suelo ha favorecido su amplia distribución global (Villareal et al., 2022).

2.3 Cultivo *in vitro* de plantas

El cultivo *in vitro* de plantas significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial, indicando dos características fundamentales: La asepsia, y el control de los factores que afectan en el crecimiento de las plantas. Por otro lado, el término genérico "Cultivo de tejidos vegetales" involucra diferentes técnicas de material vegetal diverso incluyendo a los protoplastos, células, tejidos, órganos, y plantas completas (Perea et al., 2009).

2.3.1 Cultivo *in vitro* *Solanum tuberosum*

En el cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum*, se pueden utilizar yemas terrestres, nudos y esquejes tanto para la multiplicación como para la conservación de germoplasma. Durante la fase de multiplicación, los medios de cultivo para *Solanum tuberosum* incluyen concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG3) en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Coria et al., 2004).

Para la fase de reducción del crecimiento, se emplean distintos porcentajes de manitol en el medio MS para evaluar su efecto en los explantes. Los requerimientos específicos indican que durante la multiplicación no se observan diferencias significativas en la altura de las plantas ni en el número de nudos por explante, sugiriendo que las concentraciones de BAP y AG3 son efectivas para la multiplicación sin inducir variaciones notables (Coria et al., 2004).

En cuanto a la reducción del crecimiento, el tratamiento con la mayor concentración de manitol muestra el menor crecimiento y número de nudos, demostrando que el manitol es eficaz para controlar el crecimiento de los explantes.

Estos requerimientos resaltan la viabilidad del uso de reguladores de crecimiento y agentes osmóticos para optimizar la producción y conservación de *Solanum tuberosum* *in vitro* (Hernández et al., 1999).

2.3.1.1 Condiciones de desinfección de introducción para *Solanum tuberosum*

La desinfección asegura la bioseguridad durante la introducción de *Solanum tuberosum*, también para preservar la salud de las plántulas en un medio estéril y evitar la competencia por los recursos. Por ello, se recomienda una desinfección adecuada que incluya tratamientos químicos, como aplicar alcohol al 70 % en las plántulas, tensoactivos como detergentes y fungicidas y cloro al 3 %. Las concentraciones y tiempos de exposición deben ser adecuados para eliminar patógenos superficiales sin comprometer la viabilidad de las plantas (Díaz-García et al., 2023).

En cuanto a los tratamientos térmicos, se recomienda aplicar calor controlado mediante métodos como inmersión en agua caliente o vapor, la temperatura y el tiempo de exposición deben ajustarse según las especificaciones para asegurar la eliminación efectiva de organismos patógenos presentes en los tubérculos de papa. En cuanto a los tratamientos térmicos, se recomienda aplicar calor controlado mediante métodos como inmersión en agua caliente o vapor, la temperatura y el tiempo de exposición deben ajustarse según las especificaciones para asegurar la eliminación efectiva de organismos patógenos presentes en los tubérculos de papa (Coria et al., 2004).

Además de estos métodos directos, es crucial realizar certificaciones del material vegetal con certificaciones en caso de semillas o en el caso de la papa obtener el material vegetal de invernaderos donde se cuide la esterilidad y los procesos (López, 2019). Estas pruebas verifican la ausencia de enfermedades o plagas en los tubérculos

de papa antes de su introducción o distribución, garantizando así la bioseguridad y la salud de los cultivos en las regiones de cultivo (Cobos et al., 2022).

2.3.1.2 Condiciones del establecimiento *in vitro* de *Solanum tuberosum*

El cultivo de *Solanum tuberosum* o papa, requiere condiciones controladas para el establecimiento *in vitro* de *Solanum tuberosum*. Las condiciones ambientales deben ser estrictamente controladas para el establecimiento *in vitro* de *Solanum tuberosum*, manteniendo una temperatura óptima de 22-25°C, un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con una intensidad luminosa de 40-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y una humedad relativa del 60-70% para prevenir la desecación de los explantes; además, es crucial mantener condiciones estériles en el laboratorio para evitar contaminaciones, utilizando campanas de flujo laminar, esterilizando herramientas y medios de cultivo, y manipulando con técnicas asépticas estándar (López, 2019).

Los explantes deben ser subcultivados periódicamente para proporcionarles nutrientes frescos y evitar la acumulación de compuestos tóxicos. Generalmente, el subcultivo se realiza cada 4-6 semanas (Cobos et al., 2022).

2.3.1.3 Material vegetal de *Solanum tuberosum* para introducción

El cultivo *in vitro* de papa se basa en el uso de segmentos de tejidos como el ápice, hojas, tallos o meristemos, que se colocan en un medio nutritivo estéril, generalmente gelificado y semisólido, con los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo. Entre las condiciones críticas se incluyen un ambiente controlado de luz, temperatura y humedad, y los reguladores de crecimiento como las citoquininas y las auxinas (Fuentes, 1992). Por ejemplo, la benzilaminopurina (BAP) y el ácido indolacético (AIA) se utilizan en concentraciones específicas para promover la organogénesis y la embriogénesis (Navarro et al., 2003).

Para la práctica se prefieren los segmentos de hojas y meristemos por su alta capacidad de regeneración y bajo riesgo de contaminación, estos tejidos responden mejor a los reguladores de crecimiento facilitando la diferenciación celular necesarias para la formación de nuevos órganos o embriones, la elección del material vegetal depende de la variedad de papa y de los objetivos específicos del cultivo como la producción de plantas libres de enfermedades o la generación de variantes genéticas (López, 2019).

2.3.2 Cultivo *in vitro* *Solanum lycopersicum*

El cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum*, comúnmente conocido como tomate, se realiza utilizando segmentos de tejido como el ápice, hojas, tallos o meristemos, los cuales se colocan en un medio de cultivo estéril gelificado (Ochoa-Jiménez et al., 2019). Este medio nutritivo contiene una combinación específica de sales minerales, vitaminas y carbohidratos, con sacarosa como fuente de carbono proporcionando las condiciones ideales para el crecimiento y desarrollo de los explantes, la luz, temperatura y humedad son controladas para optimizar la respuesta del cultivo.

Los reguladores de crecimiento, como las citoquininas (BAP) y las auxinas (AIA), juegan un papel crucial en la inducción de respuestas morfogénicas, siendo crucial ajustar la concentración y combinación adecuadas de estos según el tipo de explantes y los objetivos específicos del cultivo (Linares, 2018). Los segmentos de meristemos y nudos se prefieren por su alta tasa de regeneración y menor riesgo de contaminación, lo que permite una mayor eficiencia en la producción de plantas *in vitro* asegurando la conservación de la identidad genética y la obtención de plantas libres de

patógenos, aspectos cruciales para la propagación masiva y la conservación del germoplasma de *Solanum lycopersicum* (Maestu, 2018).

2.3.3 Cultivo *in vitro* *Solanum lycopersicum*

El cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum*, comúnmente conocido como tomate, se realiza utilizando segmentos de tejido como el ápice, hojas, tallos o meristemos, los cuales se colocan en un medio de cultivo estéril gelificado (Montoya, 2020). Este medio nutritivo contiene una combinación específica de sales minerales, vitaminas y carbohidratos, con sacarosa como fuente de carbono proporcionando las condiciones ideales para el crecimiento y desarrollo de los explantes, la luz, temperatura y humedad son controladas para optimizar la respuesta del cultivo (Linares, 2018).

Los reguladores de crecimiento, como las citoquininas (BAP) y las auxinas (AIA), juegan un papel crucial en la inducción de respuestas morfogénicas, siendo crucial ajustar la concentración y combinación adecuadas de estos según el tipo de explantes y los objetivos específicos del cultivo (Montoya, 2020). Los segmentos de meristemos y nudos se prefieren por su alta tasa de regeneración y menor riesgo de contaminación, lo que permite una mayor eficiencia en la producción de plantas *in vitro* asegurando la conservación de la identidad genética y la obtención de plantas libres de patógenos, aspectos cruciales para la propagación masiva y la conservación del germoplasma de *Solanum lycopersicum* (Maestu, 2018).

2.3.2.1 Condiciones de desinfección de introducción para *Solanum lycopersicum*

Según Hanur & Krishnareddy (2016) la metodología de las semillas de tomate pueden ser tratadas con 0,1% CAP-50 (fungicida), después del tratamiento con este compuesto el material vegetal se lava con agua corriente y se deja secar al aire libre,

después, se realiza una fase de esterilización de la superficie en la que se aplica etanol al 70% por un tiempo de alrededor de 30 a 45 segundos, seguido de dos lavados con agua destilada esterilizada, dado esto, se aplica hipoclorito de sodio al 4% por 6 u 8 minutos y se realiza un último lavado.

Para tener mejores resultados en la desinfección exitosa, se recomienda utilizar varios fungicidas, como el carbendazim o el fenbendazol. En cuanto a los esterilizantes para la superficie de los explantes, los compuestos más comunes incluyen el cloruro de mercurio, el hipoclorito de sodio y el etanol, entre otros (Bharti et al., 2018).

2.3.2.2 Condiciones del establecimiento de *Solanum lycopersicum*

Según la metodología de Linares (2018) se ha desarrollado un protocolo para el establecimiento de plantas *in vitro* para *Solanum lycopersicum*, en cual se demostró que la aplicación de un medio MS suplementado con $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP y $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA, sin embargo, según la metodología de (Almeida, 2021), utilizaron medios MS que fueron fortificados con $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA y $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BA. En adición, el medio debe ser ajustado a un pH de 5,5 y suplementado con 30 mgL^{-1} de sacarosa y 8 mgL^{-1} de Agar (Jamous & Abu-Oaud, 2015).

Para las condiciones de crecimiento, se recomienda mantener una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, con una iluminación de al menos 1500 lúmenes durante 16 horas diarias. La humedad relativa debe oscilar entre el 60% y el 70%. Además, se ha observado que el cultivo de semillas en condiciones de oscuridad inicialmente presenta un mayor porcentaje de germinación y desarrollo, si posteriormente son transferidas a condiciones de luz (Raza et al., 2020).

2.3.2.3 Material vegetal de *Solanum lycopersicum* para introducción

El material vegetal que más se ha utilizado para la siembra *in vitro* de *Solanum lycopersicum* son hojas, meristemas, hipocótilo y semillas debido a que estas poseen un riesgo bajo de contaminación y una mayor capacidad de regeneración en un tiempo corto (Longoria et al., 2022).

2.3.4. Contaminación y fenolización

Uno de los problemas más comunes en la micropropagación es la contaminación microbiana la cual, puede causar pérdidas en cuanto a material, ya sea en trabajos de investigación o en micropropagación de tipo comercial, esto puede deberse a dos fuentes de origen: microorganismos endófitos que se encuentran dentro de los tejidos vegetales o desinfección ineficiente a la hora de manipular el material de laboratorio (Hernández & González, 2010), así mismo se sabe que a menudo estos inconvenientes en la siembra *in vitro* son causados principalmente por la contaminación de bacterias, levaduras u hongos, quienes pueden llegar a provocar la muerte del explante, es por ello que se han empleado medidas como el uso de fungicidas y antibióticos (Sánchez & Salaverría, 2004).

La fenolización es un proceso que implica la oxidación de los fenoles exudados por la planta, lo cual puede representar una desventaja significativa para el cultivo *in vitro*. Esta oxidación puede inhibir el desarrollo del material vegetal e incluso causar su muerte total. Para mitigar estos efectos negativos, se recomienda utilizar ácido ascórbico (López, 2019).

2.3.5. Importancia del cultivo *in vitro* previo a la extracción de protoplastos

El cultivo *in vitro* previo a la extracción de protoplastos es fundamental, debido a que permite mantener un ambiente controlado, libre de contaminación y en

condiciones óptimas de luz, temperatura y nutrientes, asegurando así la viabilidad y salud de los explantes. Además, las plantas cultivadas *in vitro* exhiben una mayor uniformidad genética y fisiológica, lo cual es crucial para la obtención de protoplastos homogéneos y de alta calidad (Mota, 2018)

Esta uniformidad facilita también la manipulación genética, haciendo más accesible la introducción de modificaciones genéticas como la inserción de genes de interés, lo que aumenta significativamente la eficiencia de las técnicas de mejoramiento genético (Salazar, 2020).

2.4 Obtención de protoplastos

Los protoplastos son células vegetales esféricas a las que se les ha eliminado la pared celular, lo que les hace interesantes en biotecnología por su capacidad de multiplicación y facilidad de aplicar técnicas de ingeniería genética (Mota, 2018). Además, permite realizar modificaciones genéticas y selecciones de características deseadas en una etapa muy temprana del desarrollo celular, además tienen la habilidad de fusionarse con otros protoplastos para compartir material intracelular y potencial para ser aplicados como vectores con fines de mejora genética (Holguín-Peña et al., 2010).

Durante la fase de protoplasto, se pueden analizar y manipular características morfológicas y moleculares de las células, como la forma esférica, la ausencia de la pared celular y la capacidad de dividirse y fusionarse, permitiendo realizar modificaciones genéticas y seleccionar células con propiedades específicas antes de regenerarse en plántulas completas, que pueden evaluarse con características fenotípicas, como el crecimiento, la resistencia a enfermedades y la productividad, permitiendo evaluar las mejoras introducidas a nivel genético (Raman et al., 2021).

El primer protoplasto extraído con éxito fue obtenido a partir de una cebolla en 1982, descrito por Klercker, quien utilizó un método mecánico. Años más tarde, se usó un método enzimático para remover la pared celular de células de levadura, empleó jugo gástrico del caracol *Helix pomatia*. Y hasta el año 1960, Cocking utilizó degradantes de celulasas del hongo *Myrothecium varuucaria* para aislar protoplastos de raíces de tomate (Roca & Mroginski, 1991).

El método mecánico consiste en aplicar un choque osmótico para producir plasmólisis, seguido de la restauración del nivel osmótico adecuado. Por otro lado, el método enzimático implica la incubación de las células en un medio con enzimas capaces de degradar la pared celular (Roca & Mroginski, 1991).

Aunque el método mecánico fue fundamental para el descubrimiento del aislamiento de protoplastos, se considera complejo y poco eficiente (Vasil & Vasil, 1961). Por esta razón, en esta investigación se ha seleccionado el método enzimático para la degradación de la pared celular.

Según el protocolo descrito por Kumar et al. (2020), indica una metodología generalizada para la extracción de protoplastos de un medio que contenga manitol 0,45 M, 1.0% celulasa, y ajustar el pH a 5,8. Por otro lado, según el artículo descrito por Osorio et al. (2016) observó excelentes resultados de aislamiento de protoplastos con una solución 0,3 M KCl para la estabilidad osmótica y la inclusión de CaCl₂ (25 mM) disminuyó la lisis del protoplasto. Mientras que Riofrío et al. (2009) se observó una mayor degradación de las paredes celulares durante el aislamiento de protoplastos de *Solanum betaceum* cuando el pH se ajustó a 5.6.

Debido a la bibliografía revisada y citada, se decidió combinar las condiciones que mostraron los mejores resultados en el aislamiento de protoplastos para establecer el

protocolo. En base a Bracho et al., (2008) obtuvieron resultados de digestión enzimática de la pared celular cercana a los que ofrecen los kits comerciales, dando un añadido de costos más bajos, en su metodología se aplicó la incubación en la solución enzimática a 22°C, en oscuridad a 40 rpm. Además, en la tesis descrita por Castro (2017) el tratamiento que obtuvo los mejores resultados para la extracción de protoplastos de *Solanum lycopersicum* fue la incubación de 18 horas, por lo que se mantiene este tiempo de incubación debido a los resultados favorables observados en la misma especie y en condiciones similares.

2.4.1 Purificación de protoplastos

Fowke (1985) sugiere realizar una combinación de centrifugación, filtrado y lavado con el fin de eliminar tejidos no digeridos y restos celulares que no son de interés. Sugiere realizar la centrifugación logrando que los protoplastos floten, sin embargo, estos aún se encuentran empapados de la enzima, por lo que se realiza un lavado, resuspendiendo en soluciones osmóticas compuestas por manitol, sorbitol o sales, siendo suficientes 3 lavados, también se recomienda usar CaCl_2 para estabilizar la membrana de los protoplastos.

En base a la metodología Castro (2017) se optimizó el protocolo de purificación alcanzando su concentración máxima a 700RPMs por 5 minutos y realizando una flotación en una solución con sacarosa al 21%, razón por la que se opta por replicar esta metodología.

2.4.2 Viabilidad de protoplastos

Ortega et al. (2016) afirma que un protoplasto es viable cuando es metabólicamente activa, capaz de dividirse y regenerar una nueva pared celular para determinar la viabilidad se suele usar colorante de modo que se pueda evaluar sus

características a través de un microscopio, en donde los protoplastos que se encuentran rotos o muertos son permeables, mientras que los viables no incluyen las tinciones en su interior, para las tinciones según Torres (2019) suelen utilizarse diacetato de fluoresceína, azul de metileno, orceína aceto-clorhídrica, colorante Evans Blue o azul de tripano.

2.4.3 Métodos para el conteo de protoplastos

Cámara de Neubauer:

El método de conteo de protoplastos utilizando la cámara de Neubauer Improved es un procedimiento estándar en la biología celular para determinar la concentración de células en una suspensión. Esta cámara cuenta con una cuadrícula que permite calcular con precisión el número de células presentes en una muestra. Utilizando objetivos de microscopio de 10X y 40X, se localiza primero el área de recuento en uno de los cuadrados grandes, ya sea en el central o en las esquinas, dependiendo del tamaño de los protoplastos. Después, se cuentan las células que están dentro de los cuadrados medianos y las que tocan los bordes superior y derecho, siguiendo criterios específicos para incluir células en el recuento (Mota, 2018).

Una vez contadas las células en los 25 cuadrados medianos del cuadrado grande central, se calcula la concentración de la muestra multiplicando el número total de células por $10^4 \text{ cell ml}^{-1}$. Es importante considerar cualquier factor de concentración o dilución que se haya aplicado durante el proceso de preparación de la muestra, ajustando el resultado final según el factor utilizado. Este método proporciona una medida precisa y reproducible de la densidad celular, crucial para experimentos que requieren una carga celular específica para su éxito (Riofrío et al., 2009).

2.5 Fusión de protoplastos

La fusión de protoplastos en el género *Solanum*, se describe en la investigación de Rivera (2010) se basa principalmente en el método de electro fusión. Este proceso implica la fusión física de membranas celulares utilizando campos eléctricos para inducir la fusión de protoplastos aislados de diferentes especies de *Solanum*. El protocolo específico incluye la preparación de protoplastos a partir de genotipos diploides de *Solanum tuberosum* y especies silvestres como *S. verrucosum*, *S. brevidens* y *S. chacoense*.

Los protoplastos se purifican y luego se mezclan en una solución de polietilenglicol (PEG), facilita la fusión a través de la unión de las membranas celulares. La eficiencia del proceso de fusión está influenciada por diversos factores, entre ellos, el pH óptimo de la solución y la concentración adecuada de PEG, también promueve la formación de heterocariontes, u homocariontes los cuales son observados por microscopia (Osorio et al., 2016).

Los protocolos específicos de fusión de protoplastos en *Solanum* se basan en la combinación de enzimas para el aislamiento eficiente de protoplastos, como la celulasa y la pecto liasa en concentraciones óptimas. La técnica de electrofusión se elige debido a su capacidad para superar las barreras de incompatibilidad sexual entre especies, permitiendo la fusión de protoplastos que posteriormente se regeneran en plantas completas mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Este enfoque no solo facilita el estudio de caracteres de interés en genotipos diploides, sino que también contribuye a ampliar la variabilidad genética disponible para programas de mejora genética en cultivos de *Solanum* (Castro, 2017).

Se determinará la frecuencia de la fusión de los protoplastos a través de la Ecuación 1.

Ecuación 1 Frecuencia de fusión de protoplastos

$$FF = \frac{N^{\circ} \text{ de protoplastos fusionados} \times 100}{N^{\circ} \text{ de protoplastos}}$$

Fuente: (Espejo et al., 2008)

2.5.1 Relación taxonómica en la Fusión de protoplastos

La familia *Solanaceae*, que incluye especies como el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la papa (*Solanum tuberosum*), comparte características morfológicas como características genéticas, que debido a esta relación la fusión de protoplastos puede tener un buen porcentaje de eficacia y de expresión cuando nos referimos al mejoramiento genética de estas plantas (Márquez, 2019).

En términos taxonómicos, la familia *Solanaceae* incluyen la presencia de alcaloides como la solanina y la nicotina, la disposición de las flores en inflorescencias racimosas, y la presencia de hojas simples y alternas. Cuando se lleva a cabo la fusión de protoplastos entre especies de la familia *Solanaceae*, es importante considerar la relación taxonómica entre las especies involucradas. Esto se debe a que las especies que están más estrechamente relacionadas taxonómicamente tienen una mayor probabilidad de ser compatibles para la fusión de células somáticas y el desarrollo de híbridos viables (Thieme et al., 2008). La fusión entre dos especies del mismo género dentro de la familia *Solanaceae*, como *Solanum*, tiene más probabilidades de ser exitoso que el cruzamiento entre especies de géneros diferentes (Rivera, 2010).

En un estudio realizado por Thieme et al (2008), se exploró la fusión de protoplastos entre diferentes especies de *Solanum*. Los resultados de este estudio

sugirieron que la fusión de protoplastos entre especies del mismo género (*Solanum*) dentro de la familia Solanaceae era más exitosa que entre especies de géneros diferentes. Esto resalta la importancia de considerar la relación taxonómica al realizar la fusión de protoplastos en plantas de la familia *Solanaceae*, véase la Tabla 1. y Tabla 2. Taxonomía de *Solanum lycopersicum* **Tabla 2.** Taxonomía de *Solanum lycopersicum*

2.5.2. Evaluación de la fusión

La evaluación de la fusión de protoplastos en el género *Solanum* se lleva a cabo mediante varios métodos para confirmar la fusión exitosa de células. Entre estos métodos se incluyen la observación microscópica, donde se visualizan los heterocariontes formados por la fusión de protoplastos de diferentes especies o genotipos. Esta observación permite distinguir células fusionadas, que muestran características morfológicas y fenotípicas derivadas de ambas células parentales; en términos morfológicos, las células fusionadas tienen una estructura celular híbrida que incluye características de ambas células originales, como variaciones en el tamaño, forma y organización interna de los organelos (Szabados, 1991). Además, se utilizan técnicas de marcado celular con colorantes vitales o marcadores fluorescentes específicos para identificar células fusionadas bajo el microscopio, facilitando así la cuantificación precisa del éxito de la fusión (Raman, Jang, Oh, et al., 2021).

Fenotípicamente, las células fusionadas pueden manifestar propiedades combinadas que reflejan la influencia de los genotipos parentales, lo cual puede incluir la expresión de proteínas específicas o marcadores genéticos de ambos progenitores, cambios en la coloración celular o la manifestación de nuevos rasgos funcionales o metabólicos que no existían en las células individuales, permitiendo así la identificación clara y el análisis de la fusión celular y sus resultados (Márquez, 2019).

Los procedimientos para contar células fusionadas implican el examen de morfología microscópicas, donde se registran y cuantifican los heterocariones formados. En la evaluación de la fusión celular es crucial diferenciar entre homocariones, que son células fusionadas con núcleos idénticos provenientes de células parentales genéticamente iguales, y heterocariones, que contienen núcleos diferentes provenientes de células parentales genéticamente distintas, lo cual se puede lograr mediante técnicas de tinción diferencial, análisis de marcadores genéticos específicos y observación de características fenotípicas únicas presentes solo en los heterocariones (Kao & Michayluk, 1974).

La identificación precisa de homocariones y heterocariones es fundamental para entender la dinámica de la fusión celular y las implicaciones genéticas y funcionales que resultan de este proceso, lo cual puede incluir el uso de cuadrículas de recuento en el microscopio para estimar el porcentaje de células fusionadas respecto al total de protoplastos observados (Szabados, 1991). Estos métodos no solo permiten confirmar la fusión efectiva de protoplastos, sino que también son fundamentales para evaluar la eficiencia de las técnicas de fusión utilizadas y optimizar los protocolos para futuros experimentos de fusión de protoplastos en *Solanum*.

3. Materiales y métodos

3.1 Cultivo *in vitro*

Basado en la metodología de Almeida (2021) se realizó un cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum* sembradas en los laboratorios de Neoforest. Para la siembra de *Solanum tuberosum* (variedad papa chola), se emplearon yemas subterráneas brotadas del tubérculo, mientras que, para la siembra de *Solanum lycopersicum* (tomate), se utilizaron semillas. Se siguió un protocolo estandarizado proporcionado por la empresa en el que las plántulas se mantuvieron en medio cultivo a base de sales Murashige y Skoog (MS), Agar 0,7%, bajo condiciones de fotoperiodo de 14/24 horas luz con una intensidad lumínica de 1600 lúmenes y a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.1.1 Cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum*

Se seleccionaron tubérculos de *Solanum tuberosum* de tamaño considerable con una longitud mínima de 8 cm, con presencia de yemas prominentes, además, se verificó que los mismos se encuentren libres de enfermedades, asegurando la ausencia de hongos, parásitos y bacterias. La selección se basó en una inspección minuciosa, garantizando que los tubérculos presentaran una forma adecuada y no mostraran ninguna anomalía visible. Dado esto, se sumergieron en agua destilada durante una semana para que las yemas comiencen a brotar.

3.1.1.1 Desinfección

En base a la metodología de Bedoya et al. (2016) y a los protocolos de la empresa Neoforest, para la desinfección de los tubérculos se empleó una metodología estandarizada. Para empezar, los tubérculos fueron lavados con agua corriente con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de tierra. Posteriormente, se cortaron las

yemas subterráneas en forma piramidal según lo descrito por Bedoya et al. (2016) y se procuró dejar una amplia área de corte para maximizar la exposición a los desinfectantes.

Basado en el protocolo estandarizado de la empresa para la desinfección de explantes de tubérculos, los tubérculos cortados se colocaron en un frasco estéril, al cual se añadieron 50 ml de fungicida (carbendazim a 1ppm), el mismo que se agitó vigorosamente durante 7 minutos para asegurar una cobertura completa pasado el tiempo estimado, se realizaron tres lavados con agua destilada autoclavada desechando el agua de lavado tras cada enjuague a continuación los tubérculos fueron transferidos a una cámara de flujo laminar, donde se les añadió una solución de cloro al 3% y se agitó durante 8 minutos, después se realizaron tres lavados con agua destilada autoclavada para eliminar cualquier residuo de cloro, finalmente, se añadió etanol al 70% durante 8 minutos, agitando constantemente para asegurar la desinfección completa del material vegetal, después de este tratamiento, se realizaron tres lavados adicionales con agua destilada autoclavada. Una vez completados estos pasos, las yemas desinfectadas se reservaron para su uso en el cultivo *in vitro*.

3.1.1.2 Introducción *in vitro*

Después de la desinfección inicial de los explantes, estos fueron manipulados individualmente utilizando pinzas estériles, en donde se procedió a cortar cuidadosamente los bordes de los mismos, procurando mantener la yema lo más intacta posible para preservar su integridad y viabilidad.

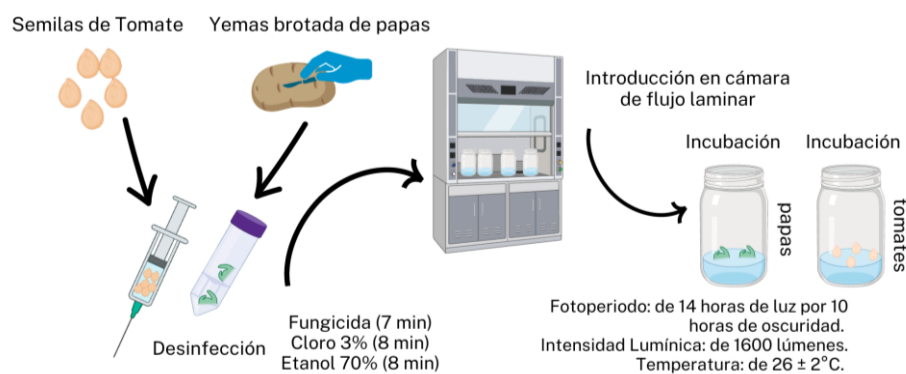
Una vez completado el proceso de corte, se sembraron 3 yemas en cada frasco estéril, los cuales contenían un medio de cultivo base adecuado para su crecimiento y

fueron llevados a incubación bajo condiciones controladas, siguiendo el protocolo estandarizado de la empresa y sus instalaciones.

En cuanto a las condiciones específicas de incubación, se empleó lo siguiente: un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad con una intensidad lumínica de 1600 lúmenes y una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ (Almeida, 2021), como se muestra en la **Figura 1**.

Esta metodología se realizó en tres repeticiones a lo largo de tres semanas, con una repetición por semana. Durante este periodo, se recopilaron datos sobre la fenolización y la contaminación por hongos y bacterias.

Figura 1 Desinfección e introducción de material vegetal



Realizado por: (Los autores, 2024)

3.1.1.2 Propagación

En base a la metodología de Coria et al. (2004) los explantes se mantuvieron en incubación. Pasados dos meses, se observó la generación de brotes, que se transfirieron a una cámara de flujo laminar. Para esta etapa, se realizaron cortes en los entrenudos de los brotes para sembrarlos en un nuevo medio de cultivo base, según el protocolo

estandarizado de la empresa. Este proceso se llevó a cabo con todos los brotes, colocándose de entre 10 a 12 explantes en cada frasco.

3.1.2 Cultivo *in vitro* *Solanum lycopersicum*

Para *Solanum lycopersicum*, se adquirieron semillas de tomate variedad jitomate o tomate de mesa que tiene estas características de la marca Agripac en presentación de 1 gramo.

3.1.2.1 Desinfección

Basado en la metodología de Ochoa-Jiménez et al (2019), se empleó una jeringa sellada para llevar a cabo el proceso de desinfección, siguiendo los estándares establecidos por la empresa. El proceso se aplicó dentro de una campana de flujo laminar, para esto se usó una jeringa que fue utilizada secuencialmente de la siguiente manera: se aplicó un fungicida durante 7 minutos, asegurándose de mezclar cuidadosamente el contenido antes de desecharlo, posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada autoclavada.

Luego de este procedimiento inicial, se procedió a absorber cloro al 3% durante 8 minutos, nuevamente mezclando con cuidado y seguido por tres lavados con agua destilada autoclavada. Finalmente, se absorbió etanol al 70% durante 8 minutos y se realizaron tres lavados adicionales con agua destilada autoclavada. Por último, los materiales se reservaron para introducirlos en el siguiente paso del proceso experimental.

3.1.2.1 Introducción *in vitro*

Siguiendo la metodología de Perea et al (2009), una vez desinfectadas las semillas, se utilizó pinzas pequeñas estériles para tomar cada semilla y colocarlas dentro

de frascos con medio de cultivo. Se sembraron 3 semillas por frasco y se dejaron en incubación bajo condiciones controladas de fotoperiodo de 14 horas de luz por 10 horas de oscuridad, con una intensidad lumínica de 1600 lúmenes y a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Almeida, 2021), conforme al protocolo estandarizado por la empresa.

Este proceso experimental se repitió tres veces a lo largo de tres semanas, realizando una repetición por semana.

3.2 Selección del tejido foliar de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum* previo al tratamiento

3.2.1 Plantas *in vitro*

Basado en la metodología de Mota (2018), en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar, se procedió a pesar 1 gramo de tejido foliar de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum* utilizando una balanza previamente desinfectada con cloro al 3% y luego con alcohol al 70%. Después, colocaron los tejidos en una caja Petri estéril donde se cortaron en fragmentos pequeños con un bisturí y pinzas estériles para transferirse a tubos Falcon de 25 ml.

3.3 Extracción de protoplastos

3.3.1 Cultivo *in vitro* de hojas pre-fusión

Las hojas se colocaron en un medio de cultivo líquido MS enriquecido con Tiamina y BAP, permitiendo un periodo de incubación de 24 horas tal como se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo *in vitro*

Medio de Cultivo <i>in vitro</i> líquido, para 1L			PH=
			5,8
Stock MS	I	100 ml	
Stock MS	II	10 ml	
Vitamina		1 ml	
Tiamina		0,3ml	
BAP		1ml	
AIA		0,5ml	
INOSITOL		0,1g	
AZUCAR		30g	

Elaborado por: (Los autores, 2024)

3.3.2 Digestión Enzimática de plantas *in vitro*

Los fragmentos se sumergieron en una solución plasmolizante de manitol 0,5M durante 1 hora, siguiendo la metodología de Gamarra (2018). Después de pasado 1 hora, se desechó la solución plasmolizante y se agregó 10 ml de la solución de extracción (celulasas) así como, 10 ml de medio de cultivo líquido Murashige y Skoog a un pH de 5,6; con una temperatura de 27 °C. A continuación, se dejó en incubación en un Shaker con un periodo de 24 horas, cubiertos en papel de aluminio (Raman, Jang, Oh, et al., 2021). La composición de la solución para extracción de protoplastos se puede ver en la **Tabla 4.**

Tabla 4. Composición de solución para extracción de protoplastos

Extracción de protoplastos			PH=
			5,6
Manitol		0,5M	
Celulasa		2%	
Cloruro de calcio		0,5M	
Cloruro de Potasio		0,5M	

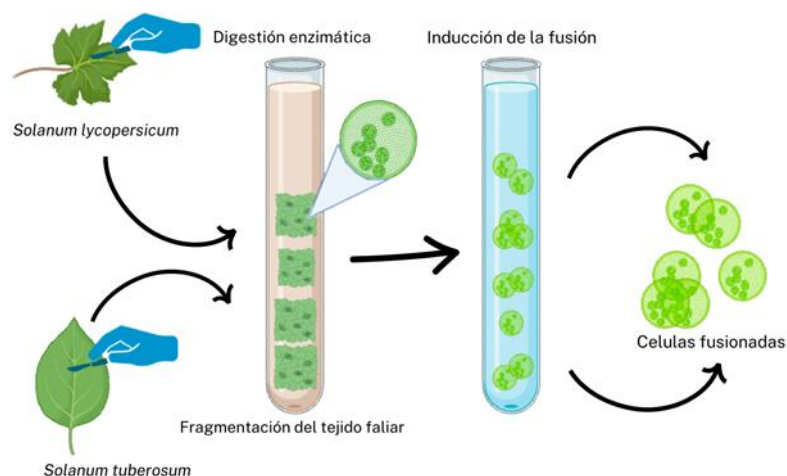
Elaborado por: (Los autores)

3.3.3 Aislamiento y observación de protoplastos

Transcurrido el periodo de incubación, se centrifugó en tubos falcón a 18000 rpm por 30 min, después se desechó el sobrenadante y se agregó 10 ml de buffer lisis (Cloruro de calcio, Cloruro de potasio) (Chico, 2011). Después, se filtró el sobrenadante en una gasa fina, se realizó una toma de muestra de ambos filtrados en un porta y cubreobjetos, y se observó en un microscopio óptico las células vegetales sin pared celular.

Para su aislamiento se centrifugó a 1000 rpm durante 30 minutos. Se desechó el sobrenadante y los pellets resultantes se mezclaron con 5 ml de medio de cultivo *in vitro* líquido. Seguido de esto, los protoplastos se purificaron mediante flotación en una solución de sacarosa al 21%. Una vez se formó una banda de color verdoso que contenía los protoplastos, se recogió y se colocó en un medio de cultivo líquido. Luego, se procedió a contar los protoplastos que tienen una apariencia esférica y retención de organelos utilizando una cámara de Neubauer (Márquez, 2019).

Figura 2. Aislamiento de protoplastos.



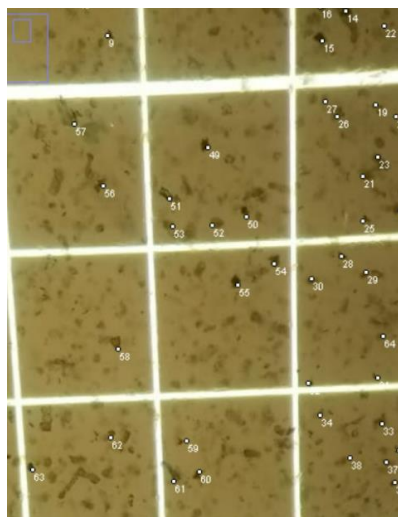
Elaborado por: (Los autores, 2024).

En la Figura 2. Aislamiento de protoplastos. ilustra el proceso de extracción de protoplastos, presentando cada etapa de forma gráfica y simplificada.

3.3.4 Rendimiento de protoplastos de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum*.

El rendimiento se determinó con el uso de una cámara Neubauer, bajo un microscopio óptico, siguiendo la metodología de (Márquez, 2019). Para esto, se realizó el conteo de células que no presentaban pared celular como se ve en la Figura 3, las cuales se observaron a un aumento de 40X y se registró el número de protoplastos observados.

Figura 3 Conteo de protoplastos no viables de *Solanum tuberosum* herramienta informática ImageJ.



Nota. Protoplastos observados a 10X.

Elaborado por: (Los autores, 2024).

En base a la metodología de Mota (2018) el rendimiento de protoplastos se refiere a la eficiencia con la que se obtienen protoplastos a partir de una cantidad específica de tejido fresco. Este rendimiento se puede calcular utilizando en la Ecuación 1, donde el número total de células es el conteo total de protoplastos obtenidos después del proceso de extracción; el volumen total de las células en suspensión es el volumen del medio en el que los protoplastos están suspendidos; y el peso de los tejidos frescos (g) es el peso del material vegetal fresco utilizado para la extracción. El factor de 4 en el denominador normaliza el resultado, posiblemente reflejando una corrección basada en la metodología específica empleada.

Ecuación 2. Rendimiento total de protoplastos

Producción de protoplastos

$$= \frac{\text{Número total de células} \times \text{vol. total de las células en suspensión}}{4 \times \text{peso de los tejidos frescos (g)}}$$

Fuente: (Mota, 2018)

3.4 Fusión de protoplastos

Para la fusión de protoplastos se tomó en cuenta un diseño experimental factorial 2x2+1, para evaluar la acción de los tratamientos con respecto a la fusión de protoplastos. Se realizaron cinco tratamientos, definiendo nuestras variables independientes como concentraciones de polietilenglicol al 40% y 50%, además de la evaluación de pH a niveles de 8 y 9. También, se realizó un grupo control, representado por agua pura.

Una vez que los protoplastos hayan sido aislados y se haya obtenido una proporción de 1:1 (Márquez, 2019), se decidió utilizar una densidad celular aproximada en 2,2E+04 cel/mL en base a la metodología de Riofrío et al. (2009), dentro de la cámara de flujo laminar se reservó 80 uL de protoplastos, tanto de *Solanum tuberosum* como de *Solanum lycopersicum*, y se depositó en tubos Eppendorf de 2ml para posteriormente, agregar 240 µL de un medio de cultivo líquido que contiene un 50% de polietilenglicol, Cloruro de calcio 2%, Cloruro de potasio 2,5 %, Nitrato de calcio 0,1M, manitol a 0,3M; ajustado a niveles de pH elevados (8-9), como se ve en la

Tabla 5. Elementos químicos utilizados para la fusión de protoplastos.

Fusión de protoplastos		PH= 6,9-8
Cloruro de calcio	2%	
cloruro de potasio	2,5%	
PEG	50%, 60%	
Ca(NO ₃) ₂	0,1M	
Manitol	0,3M	

(Ortega et al., 2016)

Posteriormente se llevó a incubar en un Shaker de 5 a 10 días a 27 °C, según lo descrito por Raman, Jang, Oh, et al. (2021).

Luego, se agregó 100 µL de la solución que contiene las células vegetales a una gota del medio de formación de callo de protoplastos y se dejó incubar durante la noche a una temperatura controlada de 25-28°C, conforme a los procedimientos detallados por, los tubos Eppendorf de 2ml con los tratamientos se pueden observar en la Figura 4. Este enfoque sistemático asegura la uniformidad en la aplicación de los tratamientos y garantiza condiciones óptimas para el proceso de fusión de protoplastos.

Figura 4 Protoplastos sometidos a tratamientos de fusión.



Fuente: (Los Autores, 2024)

Tabla 5. Elementos químicos utilizados para la fusión de protoplastos.

Fusión de protoplastos		PH= 6,9-8
Cloruro de calcio	2%	
cloruro de potasio	2,5%	
PEG	50%, 60%	
Ca(NO ₃) ₂	0,1M	
Manitol	0,3M	

(Ortega et al., 2016)

Pasadas las 24h las células se colocan en un medio Murashige y skoog de callos, con combinaciones de reguladores de crecimiento como: Tiamina, AIA y BAP, véase los volúmenes específicos en la Figura 6. Se realizó el cultivo en condiciones de luz indirecta y se incubaron a 22-24 °C (Arciniegas, 2019).

Tabla 6. *Composición del medio de formación de callo*

Medio de formación de callo, para 1L			pH= 5,8
Stock MS	I	100 ml	
Stock MS	II	10 ml	
Vitamina		1 ml	
Tiamina		0,3ml	
BAP		1ml	
AIA		1ml	
INOSITOL		0,1g	
AZUCAR		30g	

(Arciniegas, 2019).

3.5 Análisis estadístico y diseño experimental

Los datos se recolectaron y se sometieron a un análisis utilizando un diseño factorial. En este diseño, los factores a evaluar se centrarán en el número de híbridos, se identificó morfológicamente, debido a que los protoplastos de *Solanum tuberosum* son redondos, mientras que los de *Solanum lycopersicum* son más alargados y tienen forma de bastoncillos. En el caso los híbridos heterocariontes, debido a la fusión de protoplastos con diferentes morfologías, los híbridos muestran alteraciones en su forma normal y presentan características de ambos protoplastos, mientras que los híbridos

homocariontes se ve una fusión entre células que presentan la misma morfología, y o agrandan su tamaño en el caso de la fusión entre las *Solanum tuberosum*. Las células fusionadas se observaron a través de cámara Neubauer. Este análisis se llevó a cabo mediante el modelo estadístico ANOVA (Análisis de Varianza), y se complementó con la prueba de Tukey. Todas estas evaluaciones se realizaron utilizando software especializado de análisis estadístico, en este caso, InfoStat.

Los factores previstos fueron la concentración del polietilenglicol al 40% y 50%, además de la evaluación de pH a niveles de 8 y 9 y un testigo de agua como se visualiza en la **Tabla 7** y **Tabla 8**

Diseño experimental: Análisis factorial 2x2+1

Variable dependiente: Cantidad de híbridos obtenidos.

Variable independiente: Polietilenglicol y pH.

Tabla 7. *Variables independientes.*

Polientilenglicol	50%
	40%
pH	8
	9

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Hipótesis:

- Ho: Todos los tratamientos son iguales
- Ha: Al menos un tratamiento es diferente

- Ho: Las concentraciones de polietilenglicol son iguales
- Ha: Al menos una concentración es diferente
- Ho: Los pH son iguales
- Ha: Al menos un pH es diferente
- Ho: No existe interacción entre el polietilenglicol y el pH
- Ha: Existe interacción entre el polietilenglicol y el pH.

Tabla 8. Tratamientos

Tratamientos	PEG	pH
1	50%	8
2	50%	9
3	40%	8
4	40%	9
5	0%	7

Elaborados por: (Los autores, 2024)

4. Resultados y discusión

4.1 Cultivo *in vitro*

4.1.1 Cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum*

En el cultivo *in vitro*, se seleccionaron y cultivaron 60 yemas subterráneas de *Solanum tuberosum*. Estas yemas produjeron de dos a tres brotes, los cuales fueron reintroducidos en un nuevo medio de cultivo durante un período de tres semanas. Este proceso se repitió tres veces en intervalos de tres semanas diferentes, resultando en un total de 180 plántulas cultivadas *in vitro*. Estas plántulas se distribuyeron en 60 frascos, cada uno albergando tres plántulas de *Solanum tuberosum*.

A través de estadística descriptiva básica se determinó los porcentajes de plantas contaminadas con técnica de conteo y se analiza la influencia porcentual de los factores de contaminación como se muestra en la **Tabla 9** Conteo de plantas pérdidas por contaminación y viables.

Tabla 9 Conteo de plantas pérdidas por contaminación y viables

Pérdidas de plantas de <i>Solanum tuberosum</i> por contaminación y fenolización						
Repetición	Fenolización	Bacterias	Hongos	% pérdidas	% viables	N plantas viables
1	8	9	6	38,33	61,67	37
2	7	9	3	31,67	68,33	41
3	4	6	3	21,67	78,33	47
					Total plantas viables	125

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Durante el proceso de cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* a partir de yemas, se realizaron varias repeticiones del experimento, lo que permitió identificar problemas

y aplicar mejoras progresivas para reducir significativamente las pérdidas debidas a contaminación y otros factores adversos. En base los resultados de Hanur & Krishnareddy (2016) cabe destacar que el tratamiento de desinfección empleado fue constante a lo largo de todas las repeticiones; por tanto, las mejoras se centraron en la técnica y precisión con la que se ejecutaron estos procedimientos. Revisamos y reforzamos los protocolos de esterilización de materiales y medios de cultivo, implementamos un monitoreo más estricto del entorno de trabajo con filtros HEPA y realizamos esterilización periódica del equipo y superficies. Estas medidas resultaron en una reducción significativa de la contaminación bacteriana y fúngica en las repeticiones posteriores (Bedoya et al., 2016). Además, optimizamos la preparación y manipulación del medio de cultivo, introducimos fungicidas específicos, ajustamos las concentraciones de los componentes del medio para minimizar el riesgo de contaminación sin comprometer el crecimiento de las plántulas, y ajustamos la composición del medio de cultivo, específicamente el pH y la concentración de ciertos nutrientes (Coria et al., 2004). También exploramos aditivos para neutralizar los compuestos fenólicos tóxicos, lo que mejoró significativamente la viabilidad de las plántulas.

Según Jiménez-Terry & Agramonte (2013), en el cultivo in vitro, el porcentaje de contaminación puede aumentar dependiendo de la técnica y metodología de desinfección o descuidos en la cámara de flujo. Aunque los valores obtenidos para *Solanum lycopersicum* y *Solanum tuberosum* son aceptables para la extracción de protoplastos, es esencial mantener un cuidado riguroso en la cámara de flujo. En este estudio, se observaron pérdidas de plantas debido a bacterias (38.33% en la primera repetición, 31.67% en la segunda y 21.67% en la tercera), y hongos (6 en la primera repetición, 3 en la segunda y 3 en la tercera).

Al final del proceso de propagación, obtuvimos un total de 125 plántulas de *Solanum tuberosum* listas para la extracción. No obstante, se observó que algunas plántulas no mostraron una buena expansión de las hojas, como se puede apreciar en la Figura 5.

Se observó que la longitud de las hojas en algunos ejemplares comenzó a verse afectada, presentando hojas pequeñas, como se ve en la figura Figura 5. En ciertas hojas se documentó este problema de desarrollo subóptimo del follaje. Para abordar este problema, se realizaron ajustes adicionales en las condiciones de cultivo. Introdujimos variaciones controladas en la iluminación, temperatura y humedad, así como en la suplementación con nutrientes específicos que podrían haber estado limitando el crecimiento adecuado de las hojas.

La deficiencia de nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, potasio y micronutrientes, así como las concentraciones inadecuadas de hormonas vegetales como auxinas y citoquininas, pueden afectar significativamente el crecimiento de las hojas en cultivos in vitro (Jiménez-Terry & Agramonte, 2013). Un desequilibrio en estos factores puede resultar en hojas pequeñas y menos vigorosas. Al ajustar la composición del medio de cultivo, específicamente el pH y la concentración de ciertos nutrientes, y explorar aditivos para neutralizar los compuestos fenólicos tóxicos, se mejoró significativamente la viabilidad de las plántulas (Bedoya et al., 2016).

La mejora progresiva a través de estas iteraciones no solo redujo las pérdidas por contaminación y fenolización, sino que también resultó en un crecimiento más uniforme y saludable de las plántulas. Las plantas con un follaje bien desarrollado y una estructura robusta demostraron ser más viables para trasplantes y estudios posteriores.

Figura 5 Plántulas in vitro de Solanum tuberosum sembradas en el laboratorio de Neoforest.



Elaborado por: (Los Autores, 2024)

Cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum*

Durante las tres semanas de introducción de semillas, se logró obtener un total de 360 plántulas de *Solanum lycopersicum* cultivadas *in vitro*. Estas plántulas se distribuyeron en 120 frascos, con cada frasco con tres en un medio de cultivo adecuado.

La distribución equitativa de las plántulas en los frascos permite un manejo eficiente del espacio y asegura que cada planta tenga acceso suficiente a los nutrientes y al espacio necesarios para su crecimiento. Este método de cultivo también facilita el monitoreo y la evaluación del desarrollo de las plántulas, permitiendo identificar y abordar rápidamente cualquier problema que pueda surgir, como la contaminación o el crecimiento subóptimo.

Según la **Tabla 10**, se registró una pérdida significativa de 157 plántulas de las semillas introducidas. Esta pérdida se distribuyó de la siguiente manera: 37 plántulas fueron afectadas por fenolización, 30 por contaminación bacteriana y 35 por contaminación fúngica. La mayor causa de pérdida fue la no germinación de las semillas introducidas in vitro, con 55 plántulas perdidas. Esta situación se evidencia claramente en el gráfico correspondiente, donde se destaca la proporción de pérdidas atribuibles a cada factor.

<i>Tabla 10 Pérdidas de plantas por contaminación y fenolización</i>				
<i>Perdidas de plantas por contaminación, Fenolización y germinación</i>				
	<i>fenolización</i>	<i>Bacterias</i>	<i>Hongos</i>	<i>No germinación</i>
Repetición 1	12	18	12	20
Repetición 2	14	9	11	12
Repetición 3	11	3	12	23

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Según Jiménez-Terry & Agramonte (2013), la fenolización puede ser una respuesta a condiciones de estrés en el cultivo in vitro, sugiriendo la necesidad de ajustar la composición del medio y las condiciones ambientales para minimizar este problema.

La contaminación bacteriana afectó a 30 plántulas, y la contaminación fúngica afectó a 35 plántulas. Estos problemas comunes en el cultivo in vitro pueden ser mitigados mediante la mejora de las prácticas de esterilización y manejo de los cultivos, como se ha indicado en estudios previos (Bedoya et al., 2016). La implementación de técnicas avanzadas de esterilización y el uso de fungicidas específicos han demostrado ser efectivos para reducir la incidencia de contaminantes en los cultivos (Hanur & Krishnareddy, 2016).

La mayor causa de pérdida fue la no germinación de las semillas introducidas in vitro, con 55 plántulas perdidas. Esto sugiere la necesidad de optimizar las condiciones de germinación, incluyendo la calidad de las semillas, la composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales. Investigaciones de (Hanur & Krishnareddy, 2016), afirma que la calidad de las semillas y la composición del medio son cruciales para una germinación exitosa. Además, el control preciso de factores ambientales como la temperatura y la humedad puede mejorar significativamente las tasas de germinación (Jamous & Abu-Oaud, 2015).

Es importante destacar que las plantas que lograron germinar crecieron hasta alcanzar aproximadamente 2 cm de longitud y desarrollaron hojas con buena envergadura como se ven en la Figura 6.

Figura 6 Plántulas in vitro de Solanum lycopersicum sembradas en el laboratorio de Neoforest.



Fuente: (Los Autores, 2024)

Estas características las hacen adecuadas para el proceso de extracción de protoplastos. Estudios de Castro (2017) han demostrado que las plantas con estas características presentan un alto potencial para la extracción de protoplastos debido a su vigor y salud general.

4.2 Extracción de protoplastos de *Solanum tuberosum*

Durante la extracción de protoplastos de *Solanum tuberosum*, se observaron los siguientes resultados en tres repeticiones. En la primera repetición, se cuantificaron 2.45×10^4 células/mL, de las cuales 2.80×10^3 eran células muertas y 2.17×10^4 eran células vivas, representando un 89% de células vivas y un 11% de células muertas, con un rendimiento de 6.12×10^4 . En la segunda repetición, se cuantificaron 2.23×10^4 células/mL, de las cuales 3.58×10^3 eran células muertas y 1.87×10^4 eran células

vivas, representando un 84% de células vivas y un 16% de células muertas, con un rendimiento de 5.58×10^4 . En la tercera repetición, se cuantificaron 2.80×10^4 células/mL, de las cuales 4.88×10^3 eran células muertas y 2.31×10^4 eran células vivas, representando un 83% de células vivas y un 17% de células muertas, con un rendimiento de 7.00×10^4 , como se presenta en la **Tabla 11**.

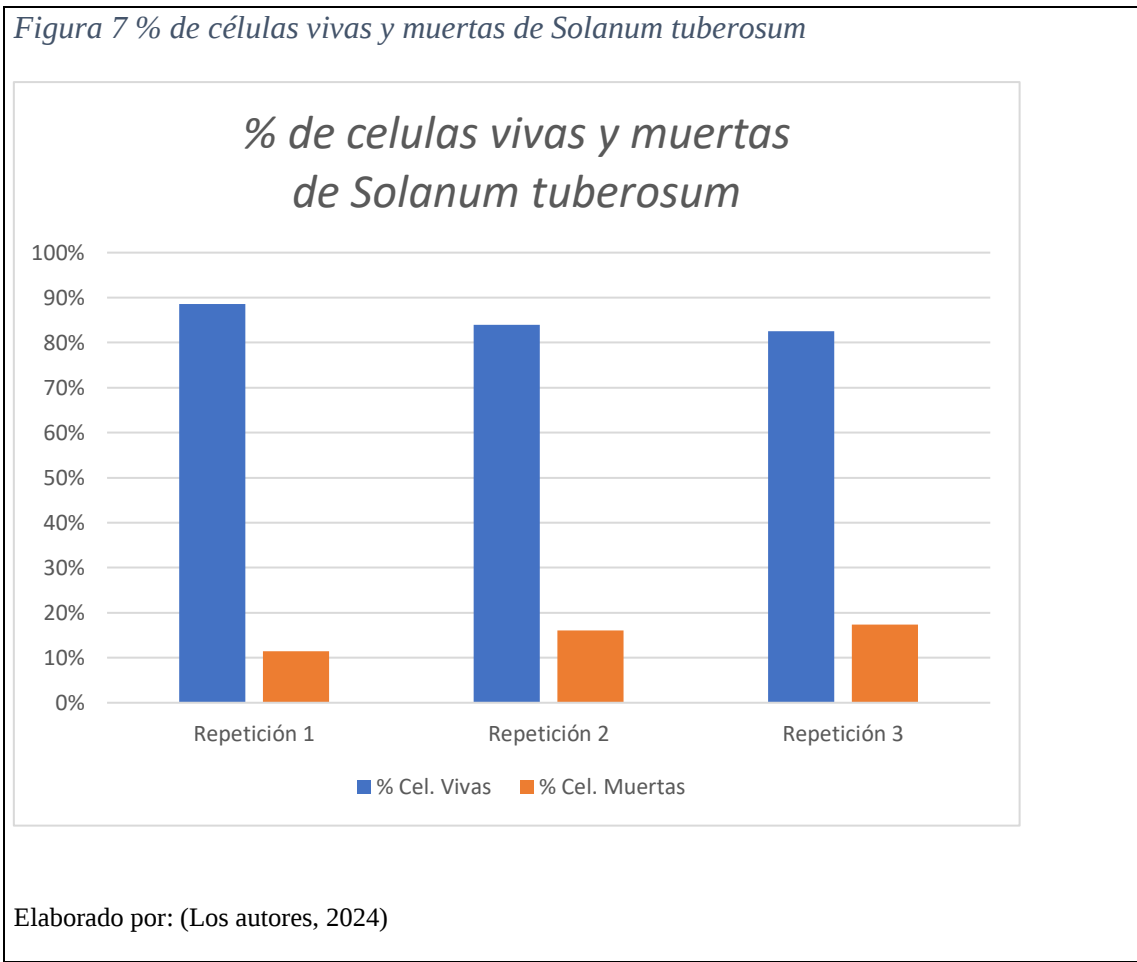
<i>Tabla 11 Conteo de protoplastos Solanum tuberosum</i>						
	<i>Solanum tuberosum</i>					
	Cel/mL	Cel. Muertas	Cel. Vivas	% Cel. Vivas	% Cel. Muertas	Rendimiento
Repetición 1	2,45E+04	2,80E+03	2,17E+04	89%	11%	6,12E+04
Repetición 2	2,23E+04	3,58E+03	1,87E+04	84%	16%	5,58E+04
Repetición 3	2,80E+04	4,88E+03	2,31E+04	83%	17%	7,00E+04

Elaborado por: (Los autores, 2024).

4.2.1 Porcentaje de Células Vivas y Muertas en Protoplastos de *Solanum tuberosum*

Las células muertas se identificaron mediante tinción con azul de tripano, una técnica que permite distinguirlas debido a que estas se tiñen de azul, indicando una pérdida de integridad de la membrana celular. El azul de tripán es un colorante azoico que permite diferenciar células vivas de células muertas, ya que las células vivas con la membrana celular intacta no se colorean debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla (Niubó et al., 2005). En la primera repetición, se obtuvo una densidad de células muertas de 2.80×10^3 células/mL, mientras que en la segunda repetición esta densidad aumentó a 3.58×10^3 células/mL, y en la tercera repetición se alcanzó una densidad de 4.88×10^3 células/mL, con un promedio de 3.75×10^3 células/mL a lo largo de las tres repeticiones. En cuanto a las

células vivas, en la primera repetición se observó una concentración de 2.17×10^4 células/mL, en la segunda repetición de 1.87×10^4 células/mL, y en la tercera repetición de 2.31×10^4 células/mL, siendo la primera repetición la que presentó la mayor cantidad de células vivas. Estos resultados se ilustran de forma gráfica en la Figura 7, donde se pueden apreciar claramente las diferencias en las densidades de células vivas y muertas a lo largo de las tres repeticiones del experimento. de células vivas y muertas a lo largo de las tres repeticiones del experimento.



4.2.3 Rendimiento de la Extracción de Protoplastos de *Solanum tuberosum*

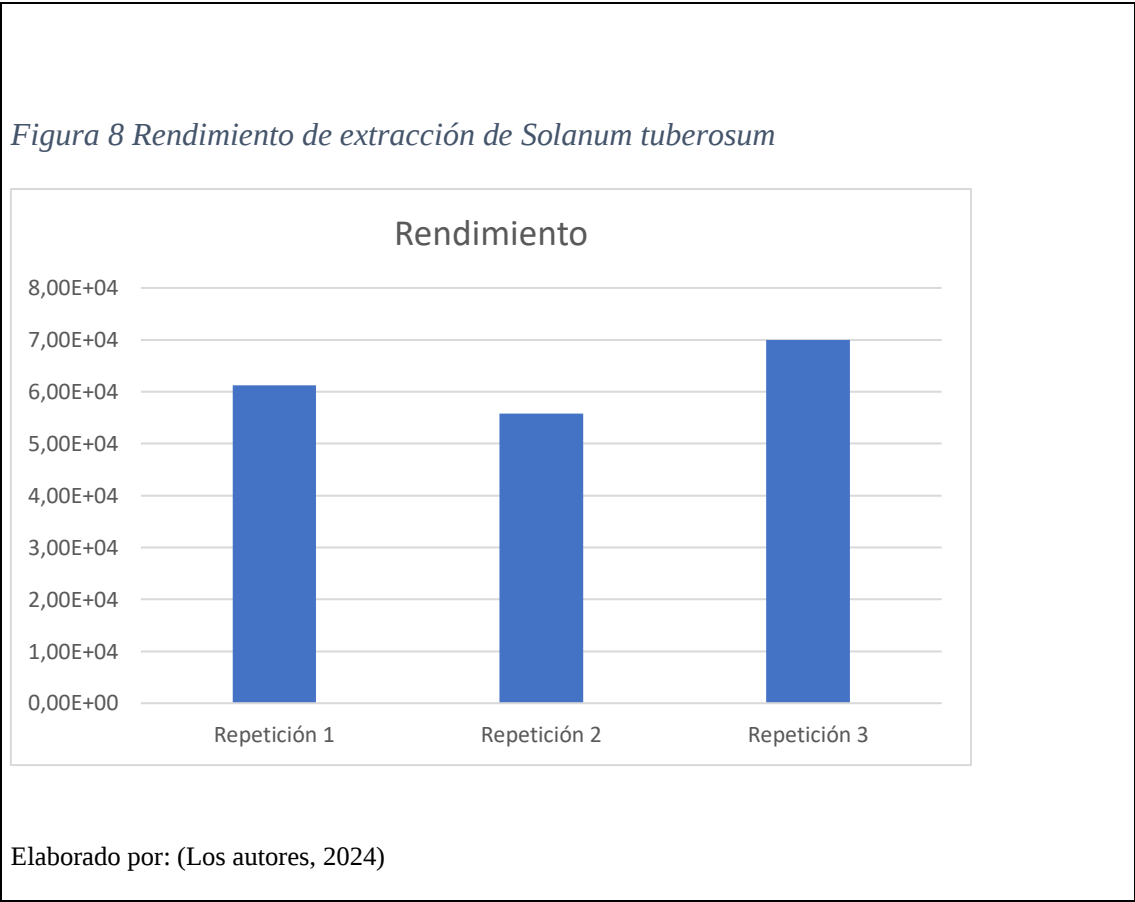
En la Figura 8 se presenta el rendimiento de extracción de *Solanum tuberosum* utilizando la fórmula obtenida de la metodología de Mota (2018).

En la primera repetición, el rendimiento fue de $6,12 \times 10^4$ cel/mL. En la segunda repetición, el rendimiento fue de $5,58 \times 10^4$ cel/mL. En la tercera repetición, se obtuvo el mejor rendimiento con $7,00 \times 10^4$ cel/mL. Los resultados obtenidos en la extracción de protoplastos de *Solanum tuberosum* muestran densidades celulares que están significativamente por debajo de los parámetros establecidos por investigaciones previas. Según Riofrío et al. (2009), las densidades óptimas en especies de *Solanum* oscilan entre $2,76 \times 10^5$ y $9,8610^5$ cél/mL. En contraste, nuestras mediciones no alcanzaron estos niveles, lo que podría estar relacionado con el uso exclusivo de celulasas en nuestro protocolo, en lugar de una combinación de celulasas y macerozimas, como se emplea en otros estudios. Rivera (2010) destaca que la combinación de ambas enzimas mejora notablemente la eficiencia de extracción, sugiriendo que la falta de macerozimas en nuestro protocolo podría ser un factor limitante.

La diferencia en los rendimientos también puede estar influenciada por la concentración y la pureza de las enzimas utilizadas. Los estudios previos, como los de Rivera (2010), han demostrado que las variaciones en estos parámetros afectan significativamente los resultados. La calidad y actividad específica de las enzimas comerciales pueden variar entre lotes, lo que puede influir en la reproducibilidad y eficacia del proceso de extracción. En consecuencia, para mejorar la densidad de protoplastos obtenidos y acercarse a los valores reportados en la literatura, es crucial considerar la inclusión de macerozimas y optimizar la calidad de las enzimas utilizadas en el protocolo de extracción.

Comparando estos resultados, el mejor rendimiento sugiere que la tercera repetición fue la mejor debido a mejorar la experiencia y las técnicas de los retistas,

para la extracción de *Solanum tuberosum*, según la ecuación proporcionada por la metodología de Mota (2018).



4.2.4 Características morfológicas observadas en protoplastos extraídos de *Solanum tuberosum*

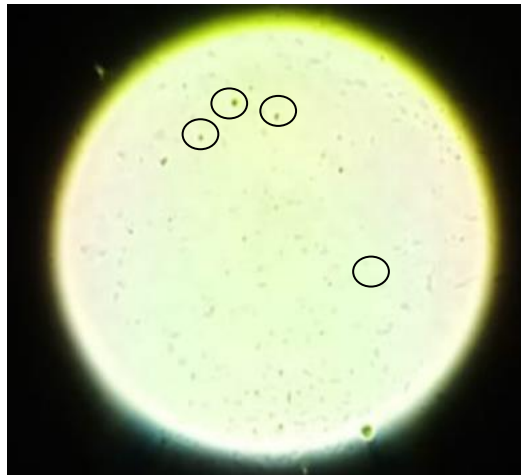
Después de 24 horas de incubación tras la extracción, los protoplastos mostraron una morfología principalmente ovalada, con algunos ejemplares adoptando ocasionalmente una forma esférica (Figura 9). Esta variabilidad morfológica ilustra la capacidad de adaptación de las células vegetales al perder su pared celular mediante la acción de celulasas en el medio de extracción. Aunque la membrana celular aparentaba estar intacta, se observó que era notablemente más delgada, lo que podría aumentar su

susceptibilidad a estímulos osmóticos y mecánicos durante el proceso de aislamiento y fusión. Además, se observó una abundante presencia de cloroplastos, evidenciados por su estructura esférica y un intenso color verde visible a través de la membrana celular, como se muestra en la Fig.10 **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, imagen A, sin embargo, al prolongar el tiempo de incubación en un medio básico, los cloroplastos mostraron una pérdida progresiva de pigmentación y una reducción en su tamaño, como se observa en la Fig 10 **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, imagen B.

Morfológicamente, los protoplastos presentaron una forma predominantemente ovalada, con cloroplastos visibles de estructura esférica y color verde intenso, aunque se observaron rupturas de membrana y células amorfas, diferenciándose de otros estudios (Arciniegas, 2019).

Esta variabilidad morfológica podría ser atribuida a desequilibrios osmóticos que provocan plasmólisis o turgencia debido a fluctuaciones en las concentraciones de sales del medio de cultivo (Palacios et al., 2011), lo que sugiere ajustar las condiciones de extracción reduciendo las concentraciones de sales. La membrana celular, inicialmente intacta, mostró ser más frágil y delgada con incubaciones prolongadas, indicando una mayor susceptibilidad a estímulos osmóticos y mecánicos (Szabados, 1991).

Figura 9. Protoplastos de plántulas in vitro de Solanum tuberosum



Nota. Protoplastos observados a 10X.

Elaborado por: (Los autores, 2024).

Figura 10 Protoplastos de Plántulas in vitro de Solanum tuberosum



Nota. Protoplastos observados a 100X

Fuente: (Los Autores, 2024)

4.3 Extracción de protoplastos de *Solanum lycopersicum*

En el estudio de *Solanum lycopersicum*, se llevaron a cabo tres repeticiones independientes. En la primera repetición, se logró una densidad celular de $1,96 \times 10^4$ cel/mL, con un 87% de células vivas y un 13% de células muertas, resultando en un rendimiento total de $4,89 \times 10^4$. En la segunda repetición, la densidad celular alcanzó $2,31 \times 10^4$ cel/mL, con un 78% de células vivas y un 22% de células muertas, obteniendo un rendimiento de $5,77 \times 10^4$. Finalmente, en la tercera repetición, se registró una densidad celular de $2,46 \times 10^4$ cel/mL, con un 75% de células vivas y un 25% de células muertas, resultando en un rendimiento de $6,15 \times 10^4$ cel/mL, como se ve en la **Tabla 12**.

*Tabla 12 Rendimiento de protoplastos de *Solanum lycopersicum**

	<i>Solanum lycopersicum</i>					
	Cel/mL	Cel. Muertas	Cel. Vivas	% Cel. Vivas	Cel. Muertas	Rendimiento
Repetición 1	1,96E+04	2,55E+03	1,70E+04	87%	13%	4,89E+04
Repetición 2	2,31E+04	5,08E+03	1,80E+04	78%	22%	5,77E+04
Repetición 3	2,46E+04	6,08E+03	1,85E+04	75%	25%	6,15E+04

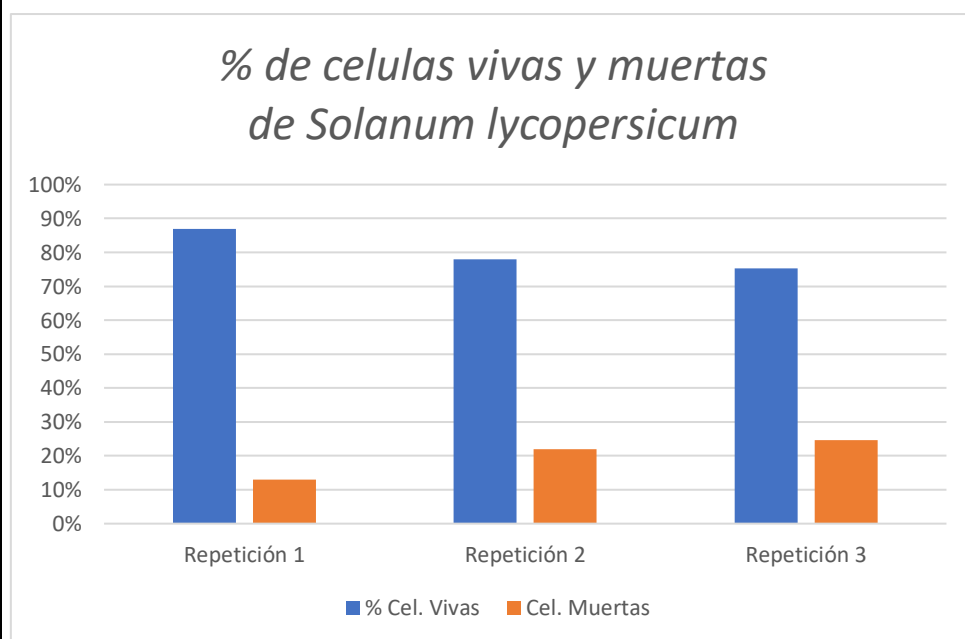
Elaborado por: (Los autores, 2024)

4.3.1 Porcentaje de células vivas y muertas en protoplastos de *Solanum lycopersicum*

Los datos presentados en la Figura 11 % de células vivas y muertas de *Solanum lycopersicum* muestran la densidad de células vivas y muertas en las tres repeticiones del experimento con *Solanum lycopersicum*. En la primera repetición, la densidad de células

muertas fue de $2,55 \times 10^3$ cél/mL y la de células vivas $1,70 \times 10^3$ cel/mL, lo que representa un 87% de células vivas y un 13% de células muertas, con un rendimiento de $4,89 \times 10^3$. En la segunda repetición, la densidad de células muertas fue de $5,08 \times 10^3$ cel/mL, con una concentración de células vivas de $1,80 \times 10^4$ cel/mL, resultando en un 78% de células vivas y un 22% de células muertas, y un rendimiento de $5,77 \times 10^4$. La tercera repetición mostró una densidad de células muertas de $6,08 \times 10^3$ cél/mL y una concentración de células vivas de $1,85 \times 10^3$ cel/mL, con un 75% de células vivas y un 25% de células muertas, alcanzando un rendimiento de $6,15 \times 10^3$. Promediando los resultados, se obtuvo una densidad de células muertas de $4,57 \times 10^3$ cel/mL y una de células vivas de $1,79 \times 10^3$ cel/mL, con un promedio de 80% de células vivas y 20% de células muertas. Estos datos destacan la variabilidad en la viabilidad celular entre las repeticiones de la extracción.

Figura 11 % de células vivas y muertas de Solanum lycopersicum



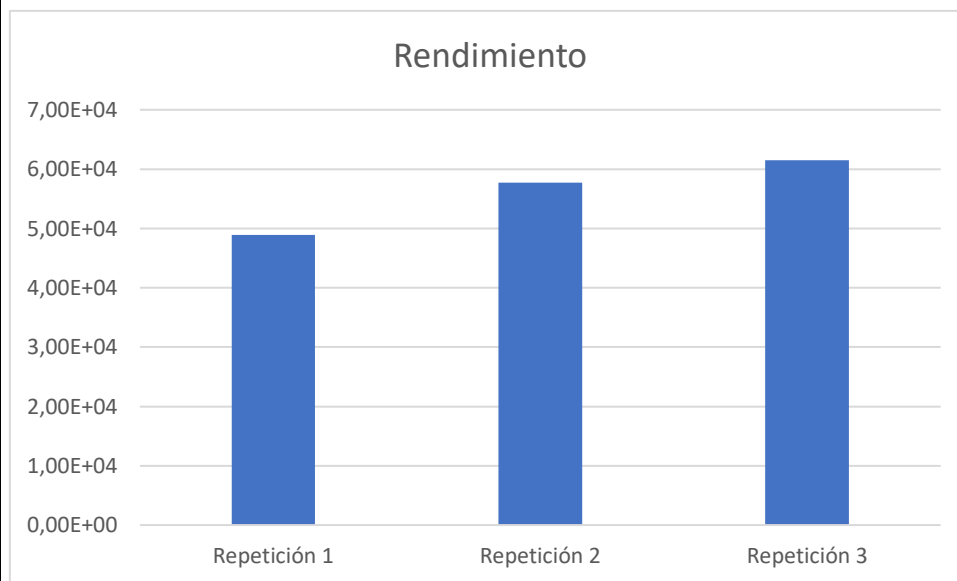
Elaborado por: (Los autores, 2024)

4.3.2 Rendimiento de la Extracción de Protoplastos de *Solanum lycopersicum*

En la Figura 12 Rendimiento de extracción de *Solanum lycopersicum* se presenta el rendimiento de extracción de *Solanum tuberosum* utilizando la fórmula derivada de la metodología de Mota (2018). Se observa una variabilidad en el rendimiento obtenido entre las repeticiones del experimento. En la primera repetición, se alcanzó un rendimiento de $4,89 \times 10^4$ unidades. La segunda repetición mostró un rendimiento de $5,77 \times 10^4$ unidades, mientras que la tercera repetición destacó con el mejor rendimiento de $6,15 \times 10^4$ unidades. El promedio de rendimiento a lo largo de las tres repeticiones fue de $5,60 \times 10^4$ unidades. Estos resultados subrayan que las condiciones empleadas en la tercera repetición fueron las más favorables para la extracción de *Solanum tuberosum*, según la fórmula establecida por la metodología de Mota (2018).

Aunque los rendimientos obtenidos muestran una tendencia de mejora a lo largo de las repeticiones, se mantienen significativamente por debajo de los parámetros óptimos establecidos en estudios previos. Según Riofrío et al (2009), las densidades ideales para especies de *Solanum* deberían oscilar entre $2,76 \times 10^5$ y $9,86 \times 10^5$ cel/mL, lo que indica que nuestros resultados son considerablemente inferiores a estos valores. Esta discrepancia puede estar relacionada con la metodología empleada en nuestro protocolo de extracción, que utiliza exclusivamente celulasas. En contraste, Rivera (2010) ha demostrado que la combinación de celulasas con macerozimas mejora notablemente la eficiencia de extracción, optimizando la liberación de protoplastos y el rendimiento de extracción. Por lo tanto, la falta de macerozimas en nuestro protocolo podría estar limitando la densidad celular obtenida. La incorporación de una combinación de enzimas en futuros protocolos podría ser esencial para alcanzar los rendimientos óptimos y aproximarse a los valores reportados en investigaciones anteriores.

Figura 12 Rendimiento de extracción de Solanum lycopersicum



Elaborado por: (Los autores, 2024)

4.2.3 Características Morfológicas Observadas en Protoplastos Extraídos de *Solanum lycopersicum*

Tras 24 horas de incubación postextracción, los protoplastos de *Solanum lycopersicum* presentaron una morfología predominantemente elongada, con polos ovalados y lados aplanados, adoptando ocasionalmente una forma alargada similar a bastoncillos. Se observó que los protoplastos de *Solanum lycopersicum* eran más frágiles, lo cual se evidenció en las primeras pruebas de extracción, donde la mayoría de las células exhibían ruptura de la membrana celular. Además, el cambio a un medio de fusión exacerbaba esta fragilidad en comparación con los protoplastos de *Solanum tuberosum*.

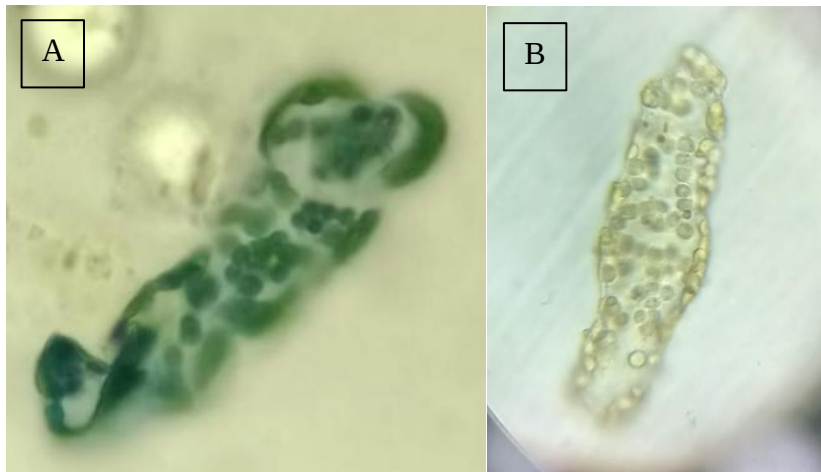
Aunque la membrana celular de *Solanum lycopersicum* parecía estar intacta, se determinó que era delgada (Figura 13, imagen B), lo que podría incrementar su susceptibilidad a estímulos osmóticos y mecánicos durante el proceso de aislamiento y fusión, de manera similar a lo observado en *Solanum tuberosum*. Asimismo, se observó una abundante presencia de cloroplastos, identificados por su estructura esférica y un intenso color verde visible a través de la membrana celular (Figura 13, imagen A). No obstante, al prolongar el tiempo de incubación en un medio básico, los cloroplastos mostraron una pérdida progresiva de pigmentación y una reducción en su tamaño (Figura 13, imagen B).

La variabilidad morfológica observada en *Solanum lycopersicum* puede ser atribuida a desequilibrios osmóticos que causan plasmólisis o turgencia debido a fluctuaciones en las concentraciones de sales en el medio de cultivo (Palacios et al., 2011). Esta variabilidad sugiere que es necesario ajustar las condiciones de extracción, particularmente reduciendo las concentraciones de sales para evitar daños osmóticos. Además, la membrana celular, aunque inicialmente intacta, mostró ser más frágil y delgada con incubaciones prolongadas, aumentando su susceptibilidad a estímulos osmóticos y mecánicos (Szabados, 1991). Esto se refleja en la morfología elongada y delicada de los protoplastos, y en la presencia abundante de cloroplastos que, con el tiempo, experimentaron una pérdida progresiva de pigmentación, afectando potencialmente su funcionalidad.

En comparación, *Solanum tuberosum* mostró una membrana celular similarmente frágil y propensa a daños bajo condiciones prolongadas, indicando una susceptibilidad comparable a estímulos osmóticos y mecánicos (Szabados, 1991). La observación de cloroplastos en ambas especies, inicialmente intensamente pigmentados, mostró una reducción en la pigmentación con el tiempo de incubación. Este hallazgo sugiere que,

para ambas especies, es crucial utilizar protoplastos que aún conserven una alta intensidad de color verde, indicando mayor viabilidad. La preservación de la pigmentación y funcionalidad óptima de los protoplastos podría lograrse realizando extracciones uno o dos días después del proceso inicial para minimizar la pérdida de pigmentación (Davey et al., 2005). Por lo tanto, ajustar las condiciones de cultivo y el tiempo de incubación es fundamental para mejorar la calidad y rendimiento de los protoplastos en futuros estudios.

Figura 13 Protoplastos de Plántulas in vitro de Solanum lycopersicum.



Nota. Protoplastos observados a 100X

Fuente: (Los Autores, 2024)

4.3 Fusión de protoplastos

La fusión de protoplastos de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum* se indujo en el medio descrito en la

Tabla 5. Elementos químicos utilizados para la fusión de protoplastos.

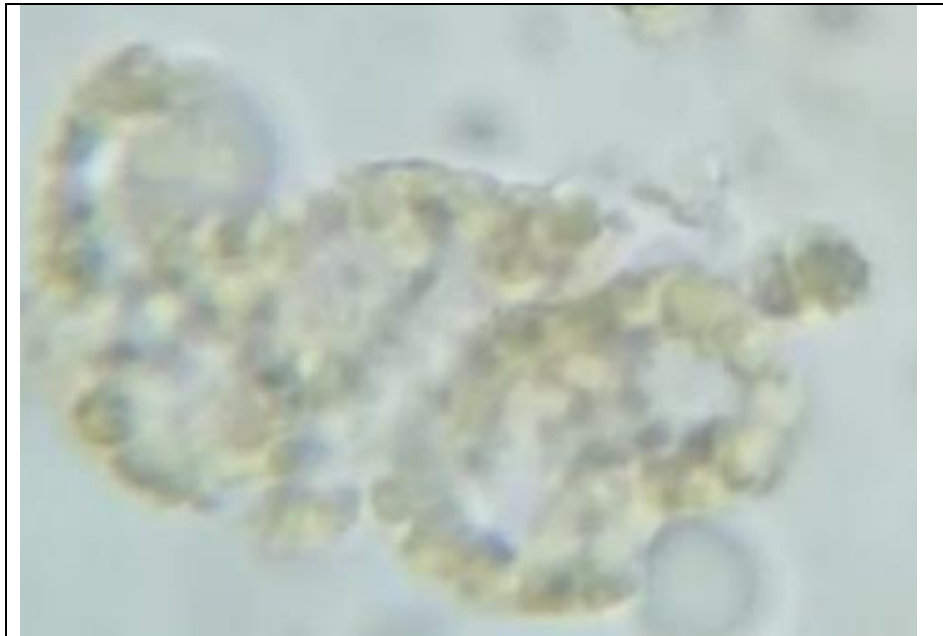
Fusión de protoplastos		PH= 6,9-8
Cloruro de calcio	2%	
cloruro de potasio	2,5%	
PEG	50%, 60%	
Ca(NO ₃) ₂	0,1M	
Manitol	0,3M	

(Ortega et al., 2016)

y se realizaron cinco tratamientos para evaluar la fusión de protoplastos, cada uno replicado tres veces. Los tratamientos se muestran en la **Tabla 8**. Tratamientos

Con ayuda del microscopio en la Figura 14 se logran ver células de morfología similar fusionándose lo que sugiere ser fusión homocariote de membranas de *Solanum tuberosum* de protoplastos la misma especie fusionándose sus membranas celulares por su morfología esta célula en su mayoría le *Solanum tuberosum* que al ser de una misma especie este generaría un híbrido homocariote.

Figura 14 Fusión Homocariótica de Membranas de Protoplastos de *Solanum tuberosum*



Elaborado por: (Los autores, 2024)

En la Figura 15 se identifican dos células diferentes que están combinando sus membranas celulares, siendo posiblemente una fusión heterocariontes entre estas células.

Figura 15 Fusión Heterocariótica de Membranas de Protoplastos de Solanum tuberosum y Solanum lycopersicum



Elaborado por: (Los autores, 2024)

Según (Kao & Michayluk, 1974), la técnica de fusión aplicada no es selectiva, por tanto, da lugar a fusiones heterocariontes como homocariontes, sin embargo, se han identificado modos de favorecer fusiones heterocariontes a través de conocer la tendencia de fusión de las especies, las cuales dependen de varios factores como genotipo y tamaño; y colocarse en menor proporción. Logrando así que los de mayor tendencia se rodeen de los de menor tendencia y se fusionen, ya que en caso contrario tenderán a fusionarse entre los de mayor tendencia.

4.3.1 Conteo

El conteo de protoplastos fusionados y no fusionados/muertos se realizó utilizando una cámara de Neubauer. La identificación de la fusión fue visualmente posible debido a la morfología distinta de las dos especies utilizadas: *S. lycopersicum* con protoplastos alargados y *S. tuberosum* con protoplastos redondos.

Este tratamiento mostró 414 protoplastos fusionados, lo que sugiere la influencia del PEG y pH en la fusión celular.

La cantidad de células no fusionadas/muertas proporciona una perspectiva sobre la viabilidad celular en estas condiciones específicas.

Los resultados obtenidos del conteo en la cámara de Neubauer de cada tratamiento y en las tres repeticiones se presentan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Tabla 13 Conteo de protoplastos en los diferentes tratamientos con tres repeticiones

	1			2			3			
Tratamientos	Fusionadas	No fusio	FF	Fusionadas	No fusio	FF	Fusionadas	No fusio	FF	PROM FF
1	414	394	51,24	509	475	51,728	463	487	48,74	50,57
2	383	268	58,83	564	398	58,628	564	398	58,63	58,70
3	287	234	55,09	392	312	55,682	489	428	53,33	54,70
4	452	376	54,59	463	365	55,918	573	487	54,06	54,85
5	214	652	24,71	302	757	28,517	213	594	26,39	26,54

Elaborado por: (Los autores, 2024)

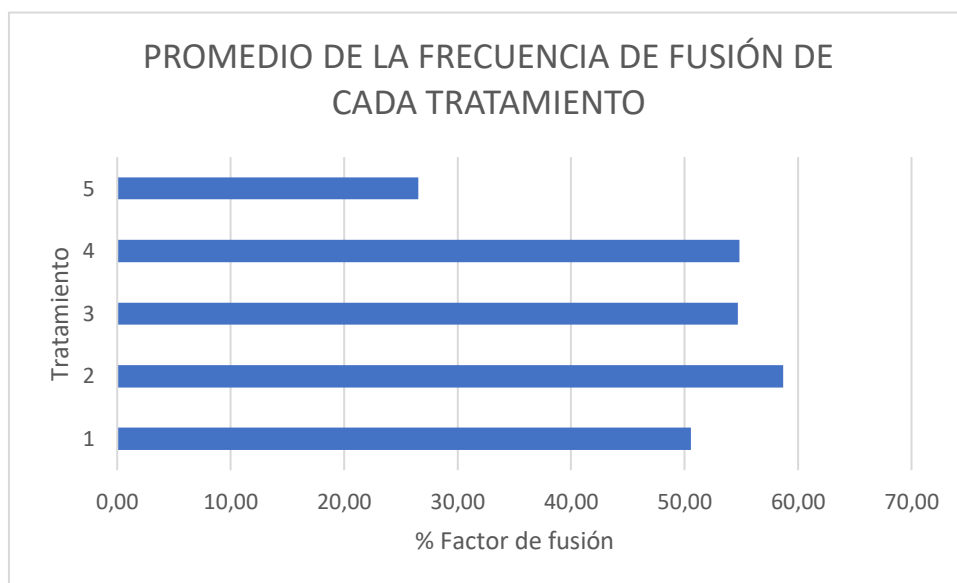
4.3.2 Frecuencia de fusión

Para calcular la frecuencia de fusión se utilizó la Ecuación 1 Frecuencia de fusión de protoplastos y los resultados se muestran en la **¡Error! No se encuentra el**

origen de la referencia., también se calculó los promedios de las frecuencias de fusión de cada tratamiento y se presentan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

A continuación, en la Figura 16 se presenta un diagrama de barras con los promedios de los factores de fusión para cada tratamiento:

Figura 16 Diagrama de barras de la frecuencia de fusión



Elaborado por: (Los autores, 2024)

El análisis factorial 2x2+1 realizado en Infostat permite evaluar los efectos principales de las concentraciones de PEG y los niveles de pH, así como la interacción entre estos factores, comparándolos también con el tratamiento control. La interpretación de los resultados se realiza a partir de las tablas generadas en Infostat. El resultado de la comparación ortogonal se muestra en la Tabla 14 Comparación ortogonal de los tratamientos vs el testigo..

Tabla 14 Comparación ortogonal de los tratamientos vs el testigo.

Tratamientos	E.E	p-valor
Contraste 1	0,85	<0,0001
Total		<0,0001

Elaborado por: (Los autores, 2024)

Estadísticamente por el p-valor determinamos que los tratamientos son diferentes del testigo. Además, se observó una diferencia significativa en la frecuencia de fusión del testigo en comparación con los tratamientos que contenían concentración de PEG, lo que sugiere que un aumento en la concentración de PEG favorece la fusión de protoplastos, probablemente debido a una mayor deshidratación y agregación de los protoplastos, lo que permite la fusión de sus membranas (Osorio et al., 2016).

Por otro lado, se analiza la influencia de las variables en los resultados de fusión de protoplastos, se muestra el análisis estadístico en la Tabla 15 Análisis de los factores de los tratamientos.

Tabla 15 Análisis de los factores de los tratamientos.

Tabla 15 Análisis de los factores de los tratamientos.

F.V	CM	P-valor
PEG	0,06	0,8279
pH	51,46	0,0002
PEG*pH	47,64	0,0003

Elaborado por: (Los autores,

2024)

Por otro lado, el factor pH es altamente significativo, por tanto, al menos una concentración de pH es diferente, a través de la prueba posthoc que se muestra en la Tabla 19, se define que las mejores condiciones son H2, es decir, pH de 9, por que

consiguen el mayor factor de fusión. También se observa que la interacción de los factores es significativa, para lo cual se analizó en la tabla Tabla 16 Análisis del pH en los tratamientos y Tabla 17 Análisis de la interacción de los factores en los tratamientos..

<i>Tabla 16 Análisis del pH en los tratamientos</i>			
pH	Medias	E.E	
H1	52,64	0,46	a
H2	56,78	0,46	b
Elaborado por: (Los autores, 2024)			

<i>Tabla 17 Análisis de la interacción de los factores en los tratamientos.</i>				
PEG	pH	Medias	E.E	
G1	H1	50,57	0,65	a
G2	H1	54,7	0,65	b
G2	H2	54,86	0,65	b
G1	H2	58,7	0,65	c
Elaborado por: (Los autores, 2024)				

Por otro lado, el factor pH es altamente significativo, por tanto, al menos una concentración de pH es diferente, a través de una prueba posthoc se define que las mejores condiciones son H2, es decir, pH de 9, por que consiguen el mayor factor de fusión.

Analizando el factor PEG, determinamos que no es altamente significativo, por tanto, no se analizan sus datos.

Además, analizamos las interacciones:

Existe interacción entre la concentración de PEG y el grado de pH, siendo la mejor interacción G1 y H2, correspondientes al tratamiento 2, o sea 50% de concentración de PEG y pH de 9.

El nivel de pH también tuvo un efecto significativo en la eficiencia de la fusión, los tratamientos de pH elevado son los que presentaron mejores resultados. Este resultado puede estar relacionado con la estabilidad y carga superficial de los protoplastos, que pueden variar con el pH, afectando la interacción y fusión de las membranas celulares (Raman et al., 2021).

El análisis de interacción mostró que los efectos de PEG y pH interaccionan significativamente, teniendo el mejor efecto de fusión el tratamiento 2.

Los resultados obtenidos tienen importantes implicaciones para la mejora de las técnicas de fusión de protoplastos. La optimización de la concentración de PEG y del pH puede conducir a una mayor eficacia de la fusión, lo que resulta crucial para las aplicaciones en biotecnología y mejora vegetal.

5. Conclusiones y Recomendaciones

1. En el cultivo in vitro de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum*, se obtuvo un total de 540 plántulas, pero se registró una pérdida significativa debido a contaminaciones bacterianas (43.6%), fúngicas (21.8%) y fenómenos de fenolización, lo que destaca la necesidad de mejorar las condiciones de desinfección y técnica de cultivo. Además, el desarrollo subóptimo del follaje en algunas plántulas sugiere que las condiciones de cultivo y la disponibilidad de nutrientes impactan el crecimiento foliar en el caso de *Solanum tuberosum*, por lo que ajustes en el medio y en las condiciones ambientales podrían optimizar el desarrollo foliar. A pesar de estos desafíos, el cultivo in vitro mostró ser prometedor, con 125 plántulas de *Solanum tuberosum* listas para extracción, indicando que, aunque se requiere optimización, la técnica es efectiva.
2. En el diseño del tratamiento de extracción de protoplastos, se observó una notable variabilidad en la eficiencia de extracción, con la tercera repetición tanto para *Solanum tuberosum* como para *Solanum lycopersicum* alcanzando los buenos rendimientos. Esto sugiere que las ya se obtuvo más experiencia y los procesos de extracción se realizaron más eficiente y los resultados fueron cercanos a los hallazgos de (Riofrío et al., 2009). La exclusión de macerozimas y peptinasas en nuestro protocolo puede ser una causa importante de los rendimientos inferiores observados en comparación con estudios previos, ya que la combinación de celulasas y macerozimas ha demostrado mejorar la eficiencia de extracción (Rivera, 2010).

3. En la prueba de diferentes tratamientos para la fusión de protoplastos, se identificó que la combinación de PEG al 50% y un pH de 9 resultó ser la más efectiva para facilitar la fusión, superando significativamente a otras concentraciones de PEG y niveles de pH (Szabados, 1991). Este protocolo permitió observar tanto fusiones de células homocariotas como heterocariotas en su etapa de fusión, lo que confirma la capacidad del método para promover una amplia variedad de interacciones celulares. En contraste, el tratamiento control, que no incluyó PEG ni ajustes en el pH, mostró una eficiencia mucho menor, subrayando la importancia crucial de estas variables en el proceso de fusión (Palacios et al., 2011). Estos hallazgos establecen una base sólida para la optimización de protocolos de fusión de protoplastos, sugiriendo que futuros estudios deben centrarse en estas condiciones para mejorar la eficiencia de fusión en aplicaciones biotecnológicas y en investigación agronómica, promoviendo así técnicas más eficientes y efectivas (Riofrío et al., 2009).

6. Recomendaciones

1. Se recomienda utilizar medios especializados para la germinación de *Solanum lycopersicum* y *Solanum tuberosum*, como los medios MS (Murashige y Skoog) o B5 (Gamborg). Estos medios están formulados para proporcionar una nutrición balanceada y óptima, favoreciendo un desarrollo saludable de las plántulas y mejorando el éxito del cultivo in vitro.
2. Se recomienda ajustar el protocolo de extracción de protoplastos para incluir una combinación de celulasas, pectinasas y hemicelulosas. La incorporación de estas enzimas adicionales mejorará la eficiencia del proceso, optimizando la tasa de extracción y la viabilidad de los protoplastos.
3. Se recomienda utilizar la tinción de Evans en combinación con PCR y qPCR para lograr una evaluación más precisa de la viabilidad y la fusión de protoplastos. Estas técnicas proporcionarán datos detallados y fiables, mejorando la precisión de los análisis fenotípicos y moleculares.

6. Recomendaciones

- Almeida, G. (2021). *Cultivo in vitro como técnica de mejora para el cultivo de plantas Solanáceas y Herbáceas*.
https://www.researchgate.net/profile/Grace_Almeida3/publication/350709737_Cultivo_in_vitro_como_tecnica_de_mejora_para_el_cultivo_de_plantas_Solanaceas_y_HerbaceasRevisión_Sistemática_de_la_LiteraturaIn_vitro_culture_as_an_improvement_technique_for_the_cu
- Andre, C., Ghislain, M., Bertin, P., Oufir, M., Del Rosario, M., Hoffmann, L., Hausman, J.-F., Larondelle, Y., & Evers, D. (2007). Andean Potato Cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a Source of Antioxidant and Mineral Micronutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 366–378. <https://doi.org/10.1021/jf062740i>
- Aparecida, M. (2001). Una sumatoria de calidad. *Revista Pesquisa FAPESP*, 70. <https://revistapesquisa.fapesp.br/es/una-sumatoria-de-calidad/>
- Arciniegas, J. (2019). *Desarrollo de un Protocolo para la Regeneración de Plantas a Partir de Protoplastos Aislados de Estructuras Embriogénicas Organizadas de Yuca (Manihot esculenta Crantz)*.
[https://repositorio.unillanos.edu.co/bitstream/handle/001/1644/DESARROLLO%20DE%20UN%20PROTOCOLO%20PARA%20LA%20REGENERACI%C3%93N%20DE%20PLANTAS%20A%20PARTIR%20DE%20PROTOPLASTOS%20AISLADOS%20DE%20ESTRUCTURAS%20EMBRIOGENICAS%20ORGANIZADAS%20DE%20YUCA%20\(MANI](https://repositorio.unillanos.edu.co/bitstream/handle/001/1644/DESARROLLO%20DE%20UN%20PROTOCOLO%20PARA%20LA%20REGENERACI%C3%93N%20DE%20PLANTAS%20A%20PARTIR%20DE%20PROTOPLASTOS%20AISLADOS%20DE%20ESTRUCTURAS%20EMBRIOGENICAS%20ORGANIZADAS%20DE%20YUCA%20(MANI)

- Bedoya, J., Sánchez, C., Bermudez, S., & Ramirez, S. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo in vitro de *Aloysia tryphilla*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 38. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)38-46](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)38-46)
- Bharti, N., Kapoor, B., Shaunak, I., Sharma, P., & Sharma, R. (2018). Effect of sterilization treatments on in vitro culture establishment of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Chemical Studies*, 6(5), 1165–1168. https://www.researchgate.net/publication/327919104_Effect_of_sterilization_treatments_on_in_vitro_culture_establishment_of_tomato_Solanum_lycopersicum_L
- Birch, P. R. J., Bryan, G., Fenton, B., Gilroy, E. M., Hein, I., Jones, J. T., Prashar, A., Taylor, M. A., Torrance, L., & Toth, I. K. (2012). Crops that feed the world 8: Potato: are the trends of increased global production sustainable? *Food Security*, 4(4), 477–508. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0220-1>
- Bracho, M., García, M., Marcano, L., Rodríguez, S., Guíñez, J., & Campo, A. (2008). Obtención y aislamiento de protoplastos de tejido radicular de *Allium cepa*, L. *Portal de Revistas Científicas y Humanísticas de La Universidad de Zulia*, 16, 141–147. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/download/9844/9831/>
- Burbano, E., & Vallejo, F. (2017). Production of “chonto” tomato lines, *Solanum lycopersicum* Mill., with expression of the sp gene responsible

- of determinate growth. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(1), 63–71. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5786>
- Castro, C. (2017). *Obtención de protoplastos del mesófilo de hojas de tomate (Solanum lycopersicum Mill.) mediante digestión enzimática* [Tesis de Grado, Universidad de las Fuerzas Armadas]. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13773/1/T-ESPE-057496.pdf>
- Chico, J. (2011). *Obtención y caracterización molecular del híbrido somático Solanum tuberosum x Solanum mochiquense* [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Trujillo]. <https://hdl.handle.net/20.500.14414/5921>
- Cobos, F., Hasang, E., Medina, R., & Orellana, E. (2022). El cultivo de papa, recursos genéticos y retos para el futuro. *Science and Research*, 7. <https://revistas.utb.edu.ec/index.php/sr/article/view/2748>
- Coria, N., Pérez, A., Sarquís, J., Cantú, I., González, H., & Gómez, M. (2004). Regeneración de la planta de papa (*Solanum Tuberosum* L.) in vitro a partir de Estolón. *Ciencia UANL*, 7(3), 361–370. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/1382>
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., & Lowe, K. C. (2005). Plant protoplasts: Status and biotechnological perspectives. In *Biotechnology Advances* (Vol. 23, Issue 2, pp. 131–171). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>
- Díaz-García, G., Enciso-Maldonado, G. A., & Lozoya-Saldaña, H. (2023). *Solanum demissum* Lindl. en el mejoramiento genético de la papa. *Revista*

Chapingo Serie Horticultura, 29(3), 131–148.
<https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2023.01.001>

El-Gazzar, A., & Moustafa, N. (2021). The Taxonomic Significance of Gross Morphology, Indumentum and Cellular Inclusions in *Solanum* L. (Solanaceae). *Egyptian Journal of Botany*, 61(3), 759–771.
<https://doi.org/10.21608/ejbo.2021.35429.1519>

Espejo, R., Cipriani, G., Rosel, G., Golmirzaie, A., & Roca, W. (2008). Híbridos somáticos obtenidos por fusión de protoplastos entre *Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum* y la especie silvestre *Solanum circaefolium* Bitter. *Revista Peruana de Biología*, 15(1), 73–78.
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/1678>

FAO. (2009). La agricultura mundial en perspectiva del año 2050. . *Cómo Alimentar al Mundo 2050: Foro de Expertos de Alto Nivel*.
https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf

Fowke, C. (1985). *Plant Protoplasts* (1st ed.). Boca Raton.
<https://doi.org/10.1201/9781351075770>

Fuentes, S. (1992). *Identificación, características y distribución de un virus baciliforme aislado de papa (Solanum tuberosum L.)* [Tesis de Maestría, Universidad Agraria La Molina]. <https://hdl.handle.net/10568/125171>

Gaikwad, K., Rani, S., Kumar, M., Gupta, V., Babu, P., Bainsla, N., & Yadav, R. (2020). Enhancing the nutritional quality of major food crops through

- conventional and genomics-assisted breeding. *Frontiers in Nutrition*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2020.533453>
- Gamarra, L. (2018). *Regeneración in vitro vía organogénesis y aislamiento de protoplastos de Gmelina arborea a partir de plantas in vitro* [Tesis de Grado, Universidad del Tolima].
<https://repository.ut.edu.co/server/api/core/bitstreams/238f1df3-615f-4597-ac81-c3fc78d281ca/content>
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881–902. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4>
- Hanan, A., & Mondragón, J. (2009). *Solanaceae Lycopersicon esculentum* P. Mill. (*Solanum lycopersicum* L.) Jitomate silvestre. CONABIO.
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/lycopersicon-esculentum/fichas/ficha.htm>
- Hanur, V., & Krishnareddy, B. (2016). In-Vitro organogenesis in tomato (*Solanum Lycopersicum*) using kinetin. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 4(6), 347–401. <https://doi.org/10.15406/apar.2016.04.00158>
- Hernández, M., Moré, O., & Nuñez, M. (1999). Empleo de análogos de brasinoesteroides en el cultivo in vitro de papa (*Solanum tuberosum*, L.). *Cultivos Tropicales*, 20(4), 41–44.
<https://ediciones.inca.edu.cu/files/anteriores/1999/4/CT20415.pdf>
- Hernández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales

perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 58–69.

<https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/78/pdf>

Holguín-Peña, R., Hernández, L., & Lastinere-Barragán, H. (2010).

Identificación y distribución geográfica de *Bemisia tabaci* Gennadius y su relación con enfermedades begomovirales en Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de Baja California, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(1), 58–60.

<https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a6.pdf>

Jamous, F., & Abu-Oaud, H. (2015). In vitro regeneration of tomato

(*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 16(3 & 4), 181–190.

https://staff.najah.edu/media/sites/default/files/ABUQAUD16_342015PCBMB2597.pdf

Jiménez-Terry, F., Agramonte, D., & para correspondencia, A. (2013a). Cultivo

in vitro y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. In *Reseña Bibliográfica Biotecnología Vegetal* (Vol. 13, Issue 1).

Jiménez-Terry, F., Agramonte, D., & para correspondencia, A. (2013b).

Cultivo in vitro y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. In *Reseña Bibliográfica Biotecnología Vegetal* (Vol. 13, Issue 1).

Kao, K. N., & Michayluk, M. R. (1974). A method for high-frequency

intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115(4), 355–367.

<https://doi.org/10.1007/BF00388618>

- Kumar, M., Kumar, V., & Prasad, R. (2020). *Phyto-Microbiome in Stress Regulation*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6>
- León-García, E., Del Ángel, O., Vela-Gutiérrez, G., De la Cruz, J., & García, H. (2017). Tomato (*Solanum lycopersicum*). In E. Yahia (Ed.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health* (2nd ed., Vol. 2, pp. 1259–1278). <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch68>
- Lim, T. (2016). *Solanum tuberosum*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (Vol. 12, pp. 12–93). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26065-5_2
- Linares, Y. A. (2018). *Estudio de la micropropagación de Solanum lycopersicum L considerando el análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos* [Tesis de Grado, Universidad Central de Venezuela]. <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/19670/1/TRABAJO%20ESPECIAL%20DE%20GRADO%20YANETZA%20LINARES.pdf>
- Longoria, R., Rubén, F., Lizarraga, G., & Beltrán, H. (2022). Establishment of tomato plants (*Solanum Lycopersicum*) under in vitro conditions. *Archives of Agriculture Research and Technology (AART)*, 3(1), 1–3. <https://doi.org/10.54026/AART/1031>
- López, G. (2019). Establecimiento in vitro de papa (*Solanum tuberosum* L.)-variedad Purén-a partir de meristemos [Tesis de Grado, Escuela Agrícola Panamericana]. In *Escuela Agrícola Panamericana*. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/85d1488e-5d04-46b5-9655-c9c6eb6b1206/content>

Maestu, E. (2018). *Regeneración de plantas en cultivo in vitro de tomate (Solanum lycopersicum L.)* [Tesis de Grado, Universitat Politècnica de València].

[https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/107255/MAESTU%20-%20Regeneraci%C3%B3n%20de%20plantas%20en%20cultivo%20in%20vitro%20de%20tomate%20\(Solanum%20lycopersicum%20L.\).pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/107255/MAESTU%20-%20Regeneraci%C3%B3n%20de%20plantas%20en%20cultivo%20in%20vitro%20de%20tomate%20(Solanum%20lycopersicum%20L.).pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Márquez, F. (2019). *El cultivo de protoplastos como herramienta biotecnológica aplicable a las plantas medicinales* [Tesis de Grado, Universidad Complutense].

<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/FELIX%20MARQUEZ%20GONZALEZ.pdf>

Montoya, K. (2020). *Producción de brotes de genotipos de tomate (Solanum lycopersicum) a partir de la micropropagación de meristemas tropicales* [Tesis de Grado, Universidad Estatal Península de Santa Elena].

<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/5820/1/UPSE-TIA-2021-0022.pdf>

Morales, F. (2016). Sociedades precolombinas asociadas a la domesticación y cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) en Sudamérica. *Revista Latinoamericana de La Papa*, 14(1), 1–9.
<https://doi.org/10.37066/ralap.v14i1.139>

Mota, L. (2018). *Establecimiento de las condiciones para la obtención de protoplastos y regeneración de Rhyncholebia digbyana* [Tesis de Grado, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado]

de Jalisco, A.C.].
<https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/546/1/Luis%20Mota%20Narvaez%20.pdf>

Navarro, L., Juárez, J., Olivares, O., Aleza, P., Pina, J., & Ballestes, J. (2003). Aplicaciones de la biotecnología para la mejora de los cítricos. *Vida Rural*, 42–45.

https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/7450/2003_Navarro_Aplicaciones.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Niubó, E., López-Casanova, L., Riverón, A. M., Canales, E., Coto, E., Ramos, M., & Noa, M. (2005). Un procedimiento simple para la preparación de ADN cromosomal intacto e inmovilizado de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Revista de Ciencias Biológicas CENIC*, 36(2), 90–92.
<https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220438004.pdf>

Ochoa-Jiménez, V., Berumen-Varela, G., Domínguez, M., Báez, R., Troncoso-Rojas, R., & Tiznado-Hernandez, M. (2019). Development of a regeneration and genetic transformation Protocol for tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rutgers. *Agrociencia*, 53(5), 725–740.
https://www.researchgate.net/publication/335276900_DEVELOPMENT_OF_A_REGENERATION_AND_GENETIC_TRANSFORMATION_PROTOCOL_FOR_TOMATO_Solanum_lycopersicum_L_cv_Rutgers_DESARROLLO_DE_UN_PROTOCOLO_DE_REGENERACION_Y_TRANSFORMACION_GENETICA_PARA_TOMATE_Solanum_

Olivares, O., Pensabene, G., Durán, N., & Navarro, L. (2005). La hibridación somática en la mejora de los cítricos. *Phytoma*, 170, 27–31.

https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/8092/2005_Olivares_La%20Hibridaci%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ortega, L., Iglesias, L., Beltrán, J., & Ramírez, M. (2016). Aislamiento y fusión de protoplastos de *Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews y *Vanilla pompona* Schiede. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(28), 16–24.

<https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/121>

Osorio, J., Bustamante, E., Macareno, M., Hernandez, E., & Beltrán, J. (2016). Aislamiento enzimático de protoplastos a partir de mesófilo de *Dioscorea alata* cultivar “Pico de Botella.” *Temas Agrarios*, 15(1), 58–70.

<https://doi.org/10.21897/rta.v15i1.812>

Palacios, N., Peiró, R., Yuste, A., Olmos, A., & Gisbert, C. (2011). Aislamiento y purificación de protoplastos de VID cv. Monastrell. *Mejora Genética de Especies Leñosas, Frutales y Forestales*, 211–212.

<https://www.sech.info/ACTAS/Acta%20nº%2062.%20VI%20Congreso%20de%20mejora%20Genética%20de%20Plantas/Capítulo%207.%20Mejora%20Genética%20de%20especies%20leñosas,%20frutales%20y%20forestales/AISLAMIENTO%20Y%20PURIFICACIÓN%20DE%20PROTOPLASTOS%20DE%20VID%20cv.%20MONASTRELL.pdf>

Peralta, G., Carrillo, J., Chávez, J., Vera, A., & Pérez, I. (2024). Variación de caracteres agronómicos y licopeno en líneas avanzadas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *PYTON International Journal of Experimental Botany*, 81, 15–22.

https://www.researchgate.net/publication/233992725_Variacion_de_cara

cteres_agronomicos_y_licopeno_en_lineas_avanzadas_de_tomate_Lycopersicon_esculentum_Mill

Perea, M., González, T., Campos, H., Guillot, G., & Cogua, J. (2009). *Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro: Manual de prácticas de laboratorio* (1st ed.). Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79882>

Pérez, J., Sánchez, C., Bermudez, S., & Restrepo, S. (2016). ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO In vitro DE *Aloysia tryphilla*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 38. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)38-46](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)38-46)

Pineda, A., Hernández, A., & Díaz, H. (2021). Multiplication and reduction growth in vitro of potato chaucha (*Solanum tuberosum* L. Phureja group). *Manglar*, 18(2), 123–128. <https://doi.org/10.17268/manglar.2021.016>

Raman, J., Jang, K.-Y., Oh, Y.-L., Oh, M., Im, J.-H., Lakshmanan, H., & Kong, W.-S. (2021). Interspecific hybridization between *Ganoderma lingzhi* and *G. applanatum* through protoplast fusion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(7). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03084-5>

Raza, M., Nawaz, A., Ali, M., Zaynab, M., Muntha, S., Zaidi, S., Khan, A., & Zheng, X. (2020). In-vitro regeneration and development for the conservation and propagation of tomato plant (*Solanum lycopersicum*) and currant tomato (*S. Pimpinellifolium*) from two different explants.

- Applied Ecology and Environmental Research*, 18(1), 879–888.
https://doi.org/10.15666/aeer/1801_879888
- Riofrío, L., Arias, A., Arahana, V., & Torres, M. (2009). Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) a partir de protoplastos. *USFQ PRESS*, 1(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v1i1.14>
- Ríos, G. (2007). *Distribución y variabilidad de Ralstonia solanacearum E.F. Smith, Agente causal de marchitez bacteriana en el cultivo de papa (Solanum tuberosum L), en tres departamentos del norte de Nicaragua (Estelí, Matagalpa y Jinotega)* [Tesis de Grado, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/1366>
- Rivera, M. (2010). Aislamiento, purificación y fusión de protoplastos de babaco (*V. heilbornii*) y jigacho (*V. stipulata*). *Eidos*, 3, 3–7. <https://doi.org/10.29019/eidos.v0i3.64>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejido vegetales. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Salazar, K. (2020). *Establecimiento de un Protocolo de Propagación in vitro a partir de dos explantes de papa* [Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18955/1/UPS-TTQ064.pdf>
- Sánchez, M., & Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.).

Revista Científica UDO Agrícola, 4(1), 21–26.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221549>

Shukla, P., Bajpai, K., Tripathi, S., Kumar, S., & Kumar Gautam, G. (2013). A review on the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of *Solanum Lycopersicum* Linn. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 1(8), 521–527.

Szabados, L. (1991). Protoplastos: aislamientos, cultivo y regeneración de plantas. In *Centro Internacional de Agricultura Tropical* (pp. 239–254). https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo10_parte1.pdf

Thieme, R., Rakosy-Tican, E., Gavrilenko, T., Antonova, O., Schubert, J., Nachtigall, M., Heimbach, U., & Thieme, T. (2008). Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *Solanum tarnii*) and their fertile BC1 progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(5), 691–700. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0702-2>

Torres, G. (2019). *Evaluación y optimización de variables significativas en el aislamiento de protoplastos a partir de hojas de Kalanchoe spp.* [Tesis de Grado, Universidad de las Américas]. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/11450/1/UDLA-EC-TIB-2019-29.pdf>

Vasil, I., & Vasil, V. (1961). Isolation and Culture of Protoplasts. In *International Review of Cytology* (Vol. 11, pp. 1–19). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60323-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60323-X)

Velásquez-Barreto, F., & Velezmoro, C. (2018). Rheological and viscoelastic properties of Andean tubers starches. *Scientia Agropecuaria*, 9(2), 189–197. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.02.03>

Villareal, L., Celi, A., Centeno, J., & Bravo, V. (2022). Una mirada fisiológica a la polinización artificial con ácido α -naftalenacético a la producción de palma aceitera. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(2), 1963–1978. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i2.2004