

## Micropropagación del tomatillo (*Physalis ixocarpa* L.)

IDEL CONTRERAS Y JHONATA ALMEIDA PUENTES

Laboratorio de Cultivos in vitro. Centro de Ingeniería Genética (CIGEN). Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. E-mails: idelcg91@hotmail.com, gmeu-s31@hotmail.com.

### RESUMEN

El tomatillo es una Solanaceae originaria de México y de amplia distribución en el continente americano. Su crecimiento es rápido y sus frutos son comestibles y comerciables. Para inducir su propagación in vitro fueron cultivados cotiledones e hipocotilos, provenientes de plántulas germinadas asépticamente, en medio nutritivo sólido de Murashige y Skoog complementado con (mg/l): inositol 100, ácido nicotínico 0,5, glicina 2,0, piridoxina 0,5, tiaminaHCl 0,1, y sacarosa 30000. Los inductores de morfogénesis añadidos: Zeatina (Z) sola: 0,0-2,0, y Bencil Adenina(BA) 0,0-2,0 + Ácido Indol Acético(AIA):0,0-0,5. Se incubó a temperatura e intensidad lumínica controladas. Después de ocho días, de ambos explantes emergieron pequeños callos blanco-verdosos, los cuales se diferenciaron como yemas. Los cotiledones con Z produjeron unas 54 yemas/explante y en el medio con BA+AIA hasta 36. Los hipocotilos regeneraron 66 yemas en el medio con Z y en BA+AIA hasta 44. En los subcultivos en medio libre de hormonas, la propagación continuó y allí mismo las plantas enraizaron. Posteriormente fueron transferidas a recipientes con tierra negra y arena(1:1) y llevadas al invernadero donde crecieron, florecieron y produjeron frutos(entre 9 y 14 por planta) con semillas fértiles.

### ABSTRACT

The tomatillo, originated from México belongs to the Solanaceae Family. It grows fast and produces edible fruits which are commercialized. In order to start its micropropagation, cotyledons and hypocotyls were used as explants and cultured on Murashige and Skoog solid medium. It was complemented with (mg/l): inositol 100, nicotinic acid 0,5, glycine 2,0, piridoxine 0,5, thiamineHCl 0,1, and sucrose 30000. Inductors of

morphogenesis added: Zeatin (Z) alone:0,0-2,0, Benzil-Adenine (BA): 0,0-2,0 + Indol-Acetic Acid(IAA):0,0-0,5. Cultures were incubated under controlled conditions of temperature and light intensity. After 8 days of incubation from both types of explants, small white-greenish calli emerged. After a few days they differentiated as buds. Cotyledons on Z medium produced 54 buds/explant and 36 buds on BA+IAA medium. Hypocotyls generated 66 buds/explant on Z medium and 44 buds on BA+IAA medium. Subcultures on a medium free hormones propagation continued, and rooting was induced on the same medium. Tomatillo plants were transferred at definitive substrate ( ground:sand 1:1), under green-house conditions. There, these plants reached a reproductive stage and generated fruits (9-14/plant), and fertile seeds.

### PALABRAS CLAVE

Tomatillo, micropropagación, fitohormonas, semillas fértiles.

### INTRODUCCIÓN

El tomatillo (*Physalis ixocarpa* L.) es una Solanaceae de origen mexicano y actualmente en dicha región se encuentran poblaciones arvenses y domesticadas. Diversos hallazgos arqueológicos prueban que su uso en la alimentación de la población mexicana se remonta a tiempos precolombinos (Hernández, 1992). Ha sido introducida en los Estados Unidos y crece en muchas partes del Hemisferio Occidental. Es un fruto envuelto en un cáliz acrescente, es comestible y a la planta se le atribuyen propiedades medicinales. De igual manera, el tomatillo es buena fuente de vitamina C (Hernández, 1992, <http://aggiehorticulture.tamu.edu/plantanswers/vegetables/>

tomatill.html,2001). Tanto en México como en Guatemala el fruto del tomatillo arvense ocupa un lugar preponderante en la alimentación, por lo cual en algunas regiones es parte importante del grupo de productos que se recolectan en el medio rural para autoconsumo y venta. Asimismo, se estima que la siembra de esta planta en México está por las 15000 ha y el 80% de la producción es exportada a California (Hernández,1992).

Dadas las características de la planta de tomatillo, se creyó conveniente realizar algunos ensayos con el fin de ver su comportamiento in vitro, en términos de propagación masiva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para establecer los ensayos se procedió a germinar semillas de tomatillo. Luego de esterilizarlas superficialmente con Hipoclorito de Sodio (2,5%) y lavarlas con agua destilada estéril, fueron colocadas en frascos de vidrio conteniendo Medio Mínimo Orgánico de Murashige y Skoog (MS) (1962), sólido, con inositol 100 mg/l y sacarosa 30000 mg/l. Se incubó a  $27 \pm 2$  °C y luz tenue continua.

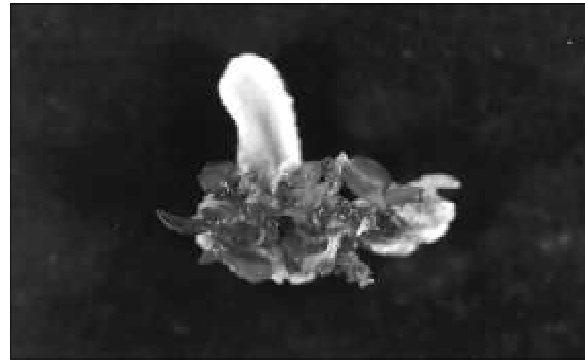
Entre los 8 y 12 días después de la germinación, de las plántulas en crecimiento activo fueron escindidos sus cotiledones e hipocotilos, para ser cultivados individualmente en tubos de ensayo que contenían 10 ml del medio básico MS con (mg/l): inositol 100; ácido nicotínico 0,5; glicina 2,0; piridoxina 0,5; tiamina HCl 0,1; sacarosa 30000 y para solidificar el medio, agar (B&T) 0,9%. Los fitorreguladores añadidos a los medios fueron: Zeatina(Z) sola 0,0-2,0 y Bencil-Adenina(BA) 0,0-2,0 + Ácido Indol Acético (AIA) 0,0-0,5. El pH fue ajustado a 5,6 antes de esterilizar el medio.

Los cultivos fueron incubados a igual temperatura y luz continua de 800-900 lux. Los subcultivos, después de la inducción organogénica, se realizaron cada 4 semanas en medio fresco de igual composición, pero libre de hormonas.

Una vez que las plantas completas obtenidas se alargaron, fueron individualizadas y trasplantadas a recipientes plásticos con sustrato estéril, conformado por tierra negra y arena en proporciones iguales. Fueron aclimatizadas en condiciones de laboratorio y luego fueron llevadas al invernadero, sembradas en bolsas plásticas de mayor capacidad, con el mismo sustrato, no estéril, para que completaran su crecimiento vegetativo y reproductivo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de 8 días de incubación, se comenzaron a generar de ambos tipos de explantes, pequeños callos blanco-verdosos en ambos tipos de medios nutritivos con los fitorreguladores. Estos callos surgieron, por un lado, de la base cortada del cotiledón y por el otro, del extremo superior del hipocotilo. ( Figuras 1 y 2).



**Figura 1. Vástagos de tomatillo neo-generados a partir de cotiledón.**



**Figura 2. Yemas y vástagos diferenciados a partir de hipocotilo de tomatillo.**

A los 28 días aproximadamente, las yemas estaban visiblemente diferenciadas y posteriormente se alargaron. Pudo cuantificarse el número de estructuras neo-regeneradas: los cotiledones en el medio con Z (2,0 mg/l) produjeron hasta 54 yemas y en el medio con BA (2,0 mg/l) + AIA (0,5 mg/l) originaron hasta 36 yemas. Por su parte, los hipocotilos en el medio de cultivo con Z produjeron hasta 66 yemas y en el medio con BA + AIA hasta 44 yemas. Después de realizados los subcultivos a medio fresco sin hormonas, los explantes continuaron la producción de yemas, las cuales devinieron en pequeñas plantas, éstas enraizaron rápidamente, sin auxina adicional.

Una vez que las plantas de tomatillo fueron individualizadas, se trasplantaron a recipientes plásticos que contenían tierra negra y arena estériles en proporciones iguales, posteriormente fueron

llevadas al invernadero y transferidas a bolsas plásticas de mayor capacidad, con el mismo sustrato, no estéril. Las plantas alcanzaron un promedio de 20 cm de altura, florecieron y produjeron entre 9 y 14 frutos / planta con semillas fértiles. ( Figuras 3 y 4 ).



**Figura 3. Planta de Tomatillo obtenida in vitro, en fase de floración.**



**Figura 4. Planta del tomatillo generada in vitro, crecida en invernadero, en etapas vegetativa y reproductiva, puede verse los frutos acrescentes.**

Diferentes especies del género *Physalis* han sido cultivadas in vitro con respuestas variadas. Así se tiene que *P. alkekengi* Tourn. ex Hall, produjo yemas adventicias cuando hojas de plántulas fueron cultivadas por Zenkteler (1972). *P. peruviana* L. fue cultivada in vitro por Abou- Mandour (1977) y de esta especie solo logró obtener callos cuando usó explantes foliares. De igual forma *P. minima* L. fue cultivada por Bapat y Rao (1977) y George y Rao (1979). Estos autores obtuvieron vástagos múltiples cuando cultivaron segmentos de tallos y de hojas a partir de plántulas en medios nutritivos de MS con BA y Ácido Naftalén Acético (ANA), a concentraciones variadas, solas o en combinaciones específicas.

En el mismo sentido, otros géneros y especies de la Familia Solanaceae son cultivadas in vitro exitosamente y con fines diversos, tales son entre otros, los trabajos reportados por diversos autores: López et al. (1998) indujeron la embriogénesis somática del

tamarillo (tomate de árbol), usando como explantes segmentos foliares de plantas de 6 a 8 semanas de edad y como agentes inductores, el 2,4-D y el ácido piclorámico a concentraciones que iban entre 0,1 y 10 mg/l. Por su parte, Zagorska et al. (1998), produjeron androgénicos haploides del tomate, cuando cultivaron in vitro granos de polen de variedades de esta solanácea, en medio de cultivo con 2ip + AIA, y Zeatina + AIA a concentraciones variadas. De manera similar, Fontes et al. (1998), aislaron protoplastos de cotiledones del pimentón, introdujeron y lograron la expresión genética del gen nptII a través del *Agrobacterium tumefaciens*.

En el caso presente, no han sido encontrados reportes sobre la micropropagación del tomatillo, sin embargo, su comportamiento en los ensayos realizados, puede compararse con el de las especies arriba mencionadas, específicamente con *P. alkekengi* Tourn. ex Hall y *P. minima* L. las cuales regeneraron yemas cuando diferentes explantes fueron cultivados en presencia de BA y/o ANA.

Las solanáceas, en un sentido amplio, responden bien desde el punto de vista de la morfogénesis, cuando diferentes partes de ellas, vegetativas o reproductivas, jóvenes, adultas o en etapa embrionaria son cultivadas in vitro con determinados reguladores del crecimiento, solos o en combinación, son añadidos al medio nutritivo.

## **CONCLUSIONES**

Tanto los cotiledones como los hipocotilos del tomatillo generan respuestas morfogénicas cuando se les cultiva in vitro, bajo condiciones controladas.

Los reguladores del crecimiento vegetal: Zeatina sola y Bencil-Adenina en combinación con Acido Indol Acético, a las concentraciones usadas, son buenos inductores de la morfogénesis.

El número de plantas neo - regeneradas a partir de los explantes mencionados, indica que esta técnica in vitro puede ser usada para complementar la propagación tradicional.

La rápida respuesta para la producción de vástagos in vitro, representa otra ventaja al momento de planificar un programa de multiplicación masiva del tomatillo.

La aclimatación ex vitro y precocidad para el florecimiento y fructificación del tomatillo, también son factores importantes para implementar un plan agrícola extensivo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Mandour, A. 1977. **Ein Standardnahrmedium für die Anzucht von Kalluskulturen einiger Arzneipflanzen.** Z. Pflanzenphysiol. 85: 273-277.

Bapat, V A y PS, Rao. 1977. **Experimental control of growth and differentiation in organ culture of *Physalis minima* L.** Z. Pflanzenphysiol. 85: 403-416.

Fontes, M. A., FC. Alvim, VS Maia, SMB, Carolino, RP. Louro, SH. Brommonschenkel, EPB, Fontes y WC, Otoni. 1998. **Morphogenesis in vitro, protoplast isolation and culture and genetic transformation in pepper.** IX International congress on plant tissue and cell culture. Abstracts. Jerusalem, Israel. p.98.

George, L. y PS. Rao. 1979. **Experimental induction of triploid plants of *Physalis* through of their culture.** Ptoplasma. 100: 13-19.

Hernández B, y J. León (Editores) 1992. **Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492.** Colección FAO. Producción y protección vegetal. N° 26, Roma. 339 p.

\_\_\_\_\_ <http://aggie-horticulture.tamu.edu/plantanswers/vegetables/tomatill.html> 19/06/2001

Lópes, ML., MR.Ferreira, JM. Canhoto y GS. Cruz. 1998. **Effects of picloram, 2, 4-D and sucrose on somatic embryogenesis induction in tamarillo leaves.** IX International congress on plant tissue and cell culture. Abstracts. Jerusalem, Israel. p.92.

Murashige, T y F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures.** Physiol. Plant. 15:473-497.

Zagorska N., L. Shtereva, M. Kruleva y B. Dimitrov. 1998. **In vitro induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.).** IX International congress on plant tissue and cell culture. Abstracts. Jerusalem, Israel. p.122.

Zenktele, M. 1972. **In vitro formation of plants from leaves of several species of the Solanaceae Family.** Biochem. Physiol. Pflanz. 163: 509-512.