

# EFFECTO DEL GENOTIPO EN LA MICROPROPAGACIÓN DE TOMATE DE CÁSCARA

M. Andrade-Rodríguez<sup>1</sup>; M. C. López-Peralta<sup>2</sup>; V. A. González-Hernández<sup>2</sup>; A. García-Velázquez<sup>2</sup>; A. Peña-Lomelí<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. C. P. 62210. MÉXICO. Correo-e: andradem65@hotmail.com (Autor responsable).

<sup>2</sup>Especialidad de Genética, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO. Tel.: 01 (595) 9549926.

<sup>3</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

## RESUMEN

Se investigó la capacidad de inducción y alargamiento *in vitro*, enraizamiento, aclimatación y estabilidad cromosómica de plantas en diez variedades de *Physalis ixocarpa* Brot. Se encontró efecto del genotipo en las cuatro etapas de la micropropagación; en inducción de brotes, la proporción de explantes con brotes varió de 0 a 70 %, el número de brotes por explante fue de 0 a 21.3 y las mejores variedades fueron 'Tamazula', 'CHF1-Chapingo' y 'Rendidora' original. Durante el alargamiento, los brotes presentaron alturas de 2.5 a 3.7 cm, 4 a 5 hojas 104 a 160 mg de peso fresco y 94.7 a 96.1 % de contenido de agua; las variedades CHF1-Chapingo, Milpero y Arandas dieron la mejor respuesta. En enraizamiento, los brotes produjeron de 26.6 a 65.6 raíces con una longitud de 0.7 a 1.5 cm, donde 'Manzano' y 'Puebla' fueron las mejores variedades. El periodo crítico de aclimatación de las plantas fueron los primeros siete días después del trasplante, pero se logró una supervivencia de 100 %. Todas las plantas regeneradas *in vitro* fueron 2n=24, lo que indica estabilidad cromosómica durante el cultivo *in vitro*.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** *Physalis ixocarpa* Brot., inducción de brotes, alargamiento, enraizamiento, genotipo, cromosomas.

## EFFECT OF GENOTYPE ON MICROPROPAGATION OF HUSK TOMATO

### ABSTRACT

The ability of induction and elongation *in vitro*, rooting, acclimation, and chromosome stability of seedlings from ten varieties of *Physalis ixocarpa* Brot. was studied. A genotype effect was found at the four micropropagation stages, shoot induction, proportion of explants with shoots varied from 0 to 70 %, the number of shoots per explant was 0 to 21.3, and the best varieties were 'Tamazula', 'CHF1-Chapingo' and 'Rendidora'. During elongation, shoots presented heights from 2.5 to 3.7 cm, 4 to 5 leaves, 104 to 160 mg of fresh weight, and 94.7 to 96.1 % of moisture content; varieties CHF1-Chapingo, Milpero and Arandas had the best response. For rooting, shoots produces from 26.6 to 65.6 roots with length from 0.7 to 1.5 cm, were 'Manzano' and 'Puebla' were the best varieties. The critical acclimation period for the seedlings consisted of the first seven days after transplant, but a 100 % survival was accomplished. All *in vitro* regenerated plants were 2n=24, indicating chromosome stability during *in vitro* cultivation.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** *Physalis ixocarpa* Brot., tomatillo, shoot induction, elongation, rooting, genotype, chromosomes.

## INTRODUCCIÓN

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) es una de las diez especies hortícolas más cultivadas en México y se propaga con semilla de variedades criollas principalmente. Por ser alógama obligada con autoincompatibilidad gametofítica (Pandey, 1957), su mejoramiento genético debe ser con base en la selección, ya que la producción de líneas puras para generar híbridos

está muy restringida. Este problema se podría superar mediante formación de plantas dihaploides a través del cultivo de anteras, combinando con la micropropagación de las plantas dihaploides seleccionadas por sus características agronómicas tales como resistencia a enfermedades, buen sabor, precocidad y vida postcosecha. Las diversas variedades criollas existentes en México podrían servir para este fin.

Para la inducción de brotes se han empleado varios tipos de explante, como hipocótilos (Ramírez-Malagón y Ochoa, 1991), segmentos de tallo, hoja, pecíolo y yemas axilares (Manzo *et al.*, 1997) y anteras (Ortuño *et al.*, 1997); se han logrado buenas respuestas organogénicas para la obtención de brotes con segmentos de hipocótilo, tallo y hoja, con el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y el N<sub>6</sub> (Chu, 1981) para el cultivo de anteras (Ortuño *et al.*, 1997), complementados con 12.5 a 25 mM de 6-bencilaminopurina (BA) en combinación con 5 mM de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) (Ramírez-Malagón y Ochoa, 1991), 3.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA con 0.1 mg·litro<sup>-1</sup> de AIA, 1.0 a 3.0 mg·litro<sup>-1</sup> de BA sola (Manzo *et al.*, 1997), o con 1.5 mg·litro<sup>-1</sup> de BA y ácido 3-indolacético (AIA) (Andrade, 1998).

La inducción de raíces en los brotes obtenidos *in vitro* se ha logrado con: enraizamiento *in vivo* (Andrade, 1998) y con enraizamiento *in vitro*, al utilizar 1 mM de BA en combinación con 1 mM ANA en el medio MS (Ramírez-Malagón y Ochoa, 1991), o bien sólo con el medio MS al 75 % de las sales inorgánicas (Manzo *et al.*, 1997). La ventaja del enraizamiento *in vivo* es que a la vez que se está llevando a cabo la producción de raíces, los brotes se adaptan a las condiciones ambientales en las que crecerán y se desarrollarán las plantas.

La aclimatación de las plántulas producidas *in vitro* a las condiciones de invernadero es una fase crítica porque pueden morir por deshidratación, debido a la falta de funcionalidad de los estomas y a la cutícula delgada (Granada, 1985; Pierik, 1990). En esta especie, la sobrevivencia ha fluctuado de 50 a 95 % (Manzo *et al.*, 1997), variación que depende del control de las condiciones ambientales durante este periodo.

Es importante evaluar la mayor variabilidad genética disponible, para conocer su respuesta organogénica *in vitro*. La organogénesis está controlada genéticamente (Deglene *et al.*, 1997), como se ha mostrado en especies herbáceas de *Capsicum annuum* (Ezura *et al.*, 1993), *Cucumis melo* (Ficcadenti y Rotino, 1995; Molina y Nuez, 1995) y en leñosas como *Morus alba* (Bhau y Wakhlu, 2001).

Además de la capacidad organogénica o embriogénica, es importante la estabilidad genética de las plantas de tomate de cáscara regeneradas y propagadas *in vitro*, para poder conservar las características de interés agronómico. En la regeneración de brotes *in vitro*, mediante la producción de brotes adventicios, existe el riesgo de que ocurra variación en el número cromosómico como la observada en *Petunia hybrida* (Kamo y Griesbach, 1993), *Capsicum* spp. (Christopher y Rajam, 1994) y *Chrysanthemum morifolium* (Fei y Zhou, 1994), *Cucumis melo* (Yadav *et al.*, 1996) y *Physalis ixocarpa* (Ortuño *et al.*, 1997).

Los objetivos de esta investigación fueron: 1) Determinar la capacidad de regeneración *in vitro* de diez

variedades de tomate de cáscara, que incluye las etapas de alargamiento y enraizamiento de brotes; 2) Evaluar la capacidad de aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro*, a condiciones de invernadero; y 3) Cuantificar la estabilidad cromosómica de las plántulas propagadas *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en los Laboratorios de Biotecnología, Citogenética y Fisiotecnia Vegetal, y en el Invernadero de Biotecnología de la Especialidad de Genética, pertenecientes al Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Se evaluaron dos razas silvestres de tomate de cáscara (Silvestre autocompatible y Silvestre autoincompatible) y ocho variedades 'Milpero', 'Arandas', 'Tamazula', 'Manzano', 'Rendidora' original, 'CHF1-Chapingo', 'Salamanca' y 'Puebla'), proporcionadas por el Programa de Mejoramiento Genético de Tomate de Cáscara del Departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo.

### Fase de inducción de brotes

Se utilizaron semillas de las 10 razas de tomate de cáscara cuya desinfestación se hizo con agua jabonosa y enjuagando con agua de la llave por cinco minutos; posteriormente, en la campana de flujo laminar horizontal (VECO), se aplicó hipoclorito de sodio comercial [Cloralex® 25 %, (v:v)] durante cinco minutos y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. El medio de cultivo usado fue el MS sin adicionar reguladores del crecimiento y con 30 g·litro<sup>-1</sup> de sacarosa. Se sembraron 10 semillas de cada variedad en frascos tipo gerber (de 125 ml) que contenían 20 ml del medio de cultivo, se utilizaron cinco frascos para cada variedad.

En todos los casos de esta investigación, el medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.7 y la esterilización se efectuó en una autoclave vertical a 121 °C a una presión de 1.5 kg·cm<sup>-2</sup> durante 19 minutos. La incubación de los cultivos *in vitro* se hizo en un cuarto de ambiente controlado con temperatura promedio de 27 ± 2 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz proporcionado por lámparas fluorescentes "Luz de día" de 75 W (30 mmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>).

Cuando las plantas tenían dos hojas verdaderas (14 días después de la siembra), se tomaron segmentos de hipocótilo de 1 cm (próximo a las hojas cotiledonares) que fueron sembrados en frascos de 125 ml con 20 ml del medio MS adicionado con 30 g·litro<sup>-1</sup> de azúcar comercial, 0.65 % (p:v) de agar (Merck) y con 1.5 mg·litro<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BA) y ácido 3-indolacético (AIA), tomando como base los resultados obtenidos por Andrade

(1998). Se sembraron 15 frascos por variedad, cinco de ellos para continuar con la fase de alargamiento.

El diseño experimental fue un completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento (variedad); cada repetición consistió de un frasco de cultivo con cuatro explantes. Las variables cuantificadas fueron: inicio de brotación (días), explantes con brotes (%), número de brotes por explante, y altura del brote (mm). La primera se determinó mediante evaluaciones cada dos días a partir de los siete días después de la siembra; las otras tres variables se evaluaron a las seis semanas.

### Fase de alargamiento de brotes

De los brotes producidos por las razas cultivadas en la fase anterior (y destinados para este experimento), los que tenían 5 mm de altura fueron colocados en frascos de 125 ml con 20 ml del medio MS, sin reguladores del crecimiento, con 10 g·litro<sup>-1</sup> de azúcar comercial, 0.65 % (p:v) de agar (Merck), para su alargamiento. Por variedad se sembraron 15 frascos con cuatro brotes cada uno y así tener disponibilidad de brotes en la fase siguiente. Las razas silvestres no se incluyeron porque en la fase de inducción no produjeron brotes suficientes.

Se usó un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones para cada una de las ocho variedades (tratamientos); cada repetición estuvo constituida por cuatro brotes. A las dos semanas se cuantificó: altura (cm), número de hojas, peso fresco (mg), y contenido de agua de cada brote (se determinó el porcentaje de agua de cada brote mediante el peso de la materia fresca y peso de la materia seca y se usó la fórmula:

$$\text{Aguadel brote (\%)} = \left[ \frac{\text{Peso de materia fresca} - \text{peso de materia seca}}{\text{Peso de materia fresca}} \right] \cdot 100$$

El peso fresco y contenido de agua en los brotes fueron evaluados como indicadores de calidad, dado que son más convenientes aquellos brotes con mayor peso de materia fresca pero con menor contenido de agua.

### Fase de enraizamiento

En resultados previos, se observó que el tomate de cáscara puede enraizar *in vivo* (Andrade, 1998). Por ello se tomaron brotes de 2 cm de altura, provenientes de la fase de alargamiento de brotes, cuyas bases fueron sumergidas en polvo de Radix® (0.25 %, p:p) y luego transplantados a charolas de plástico que contenían una mezcla estéril de los sustratos, tierra negra y tierra de hoja, en proporción 1:1, regada a saturación con agua destilada estéril. Terminado el transplante, la charola fue cubierta con plástico transparente para evitar la deshidratación de los brotes y luego colocada en el cuarto de incubación con

temperatura promedio de 27 ± 2 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz proporcionado por lámparas fluorescentes "Luz de día" de 75 W (30 mmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con diez repeticiones; cada repetición estuvo representada por un brote. A los diez días se midió: número de raíces, longitud de raíz (cm), peso fresco de raíz (mg), peso seco de raíz (mg) y altura de plántula (cm).

### Fase de aclimatación de plántulas

A los brotes producidos *in vitro* por las ocho variedades cultivadas, de 2 cm de altura con dos hojas expandidas, se les aplicó polvo de Radix® (0.25 %, p:p) en la base del tallo, y cada brote se transplantó a un sustrato estéril (tierra negra y tierra de hoja en proporción 1:3) contenido en macetas de 17 cm de diámetro y 15 cm de altura (2 kg), y las macetas se colocaron en el invernadero. Los brotes plantados fueron cubiertos por dos semanas con vasos de plástico transparente de 1 litro, con la finalidad de mantener una alta humedad relativa y evitar la deshidratación. En 30 brotes establecidos por variedad, se hicieron seis evaluaciones semanales, a partir de los diez días, en las que se midió la altura de planta (cm), y el porcentaje de sobrevivencia. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento (variedades); cada repetición estuvo constituida por un brote.

### Análisis cromosómico

Se observaron los cromosomas en dos ápices radicales de 20 plántulas obtenidas a partir de semilla y de otras 20 plántulas regeneradas y multiplicadas *in vitro*, para un total de 80 ápices de raíz. Para tener un mayor número de células en metafase, las raíces de ambos tipos de plantas fueron pretratadas con una solución de 8-hidroquinoleína (2 mM), a 4 °C durante 8 horas; este pretratamiento no fue de utilidad para los ápices de plantas producidas *in vitro* ya que no se pudieron obtener células en metafase en las cuales se pudiera hacer el recuento de cromosomas. Por ello, las raíces de estas plantas fueron pretratadas con una solución de colchicina (0.05 %, p:v) durante 2.5 o 5 horas. La fijación, hidrólisis, coloreado, y maceración de los ápices radicales se hizo con la técnica recomendada por García (1990). El recuento de cromosomas se hizo utilizando preparaciones temporales, y un microscopio Carl Zeiss.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS (SAS, 1987), mediante análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ) y pruebas de comparación de medias, de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fase de inducción de brotes

La producción de brotes requirió menos tiempo (21 d) en los explantes de la variedad CHF1-Chapingo que en la Silvestre autocompatible la cual no produjo brotes en 40 días. La brotación se inició más pronto (21.1 d) en explantes de variedades cultivadas, que en los de la Silvestre autoincompatible y 'Milpero' (33.1 y 31.1 d) (Cuadro 1). La proporción de explantes con brotes varió de 0 a 70 %, con los valores mayores en las variedades Tamazula, Rendidora y CHF1-Chapingo, y los menores en Silvestre autoincompatible y 'Milpero'.

Las variedades que produjeron de 20.4 a 21.3 brotes por explante fueron 'Tamazula', 'CHF1-Chapingo' y 'Salamanca', y las que menos produjeron fueron Silvestre autoincompatible y 'Milpero', con apenas 1.9 y 4.0 brotes por explante, respectivamente (Cuadro 1, Figura 1). En la variedad Silvestre autocompatible no hubo formación de brotes. Estos resultados superaron los obtenidos por Manzo *et al.* (1997) quienes reportaron 6.5 y 10.8 brotes para 'Rendidora' y 'Salamanca'; sin embargo, en 'Tamazula' obtuvieron 21.5 brotes por explante, similar al máximo obtenido en esta investigación. En cuanto a la altura del brote, las variedades Rendidora original, Milpero, Tamazula y CHF1-Chapingo fueron las que produjeron brotes de mayor tamaño (de 5.3 a 5.7 mm), mientras que la Silvestre autoincompatible presentó los más pequeños (1.0 mm).

La regeneración de brotes (organogénesis) fue mayor en las variedades cultivadas que en las silvestres, debido posiblemente a que tales variedades han pasado por el proceso de domesticación mediante la selección de los mejores individuos; tal proceso de domesticación pudo contribuir también a la selección de genes que favorecen la regeneración *in vitro*. En el caso de *Physalis* esto no ha sido estudiado aún en detalle; sin embargo, en *Medicago*

*sativa* encontraron que los genes responsables de la regeneración de plantas se acumularon por efecto de la selección cíclica efectuada en los genotipos estudiados (Bingham *et al.*, 1975). De igual forma, en *Helianthus* se ha estudiado el efecto del genotipo en la regeneración de brotes y señalan que este proceso morfogénico estuvo bajo un control genético aditivo y la variación genética en la organogénesis fue debida a efectos de dominancia (Weber *et al.*, 2000).

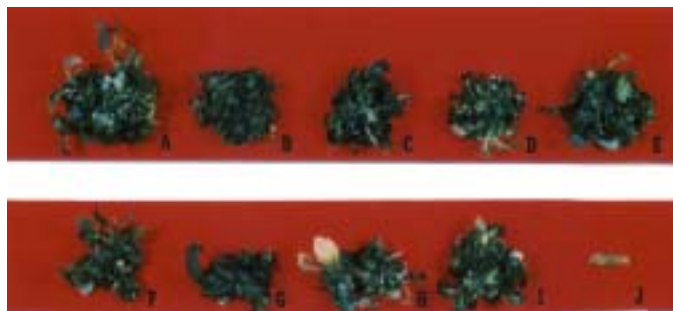


FIGURA 1. Producción de brotes *in vitro* en diez variedades de tomate de cáscara. A: 'Tamazula', B: 'CHF1-Chapingo', C: 'Salamanca', D: 'Rendidora' original, E: 'Arandas', F: 'Milpero', G: Silvestre autoincompatible, H: 'Puebla', I: 'Manzano', J: Silvestre autocompatible.

Las diferencias entre variedades en la capacidad de inducción de brotes fue variable, y evidenciaron que en *Physalis ixocarpa* existe diversidad genética en totipotencialidad de las células para formar brotes. Este tipo de diversidad también se ha reportado en *Cucumis melo* L., en donde la variedad Reticulatus presentó más diferencias en el número de brotes por explante (6.0 a 17.3) que la variedad Inodorus (12.2 a 14.2) (Ficcadenti y Rotino, 1995); también en *C. melo* cv. Cantaloupe Charentain se observó que la frecuencia de regeneración de brotes varió entre semillas individuales (Molina y Nuez, 1995); en 14 cultivares de *Capsicum annuum* L. hubo oscilación en el

CUADRO 1. Formación de brotes *in vitro* en diez variedades de tomate de cáscara.

Variedad	Inicio de brotación (días)	Explantes con brotes (%)	Brotos por explante	Altura del brote (mm)
Silvestre autocompatible	—	0.0 c	0.0 c	0.0 d
Silvestre autoincompatible	33.1 a <sup>z</sup>	40.0 b	1.9 c	1.0 d
'Milpero'	31.1 ab	40.0 b	4.0 c	5.6 a
'Arandas'	25.1 c	60.0 a	18.8 a	2.8 c
'Tamazula'	24.8 c	70.0 a	21.3 a	5.4 ab
'Manzano'	25.1 c	60.0 a	13.1 b	4.6 ab
'Rendidora' original	23.0 c	70.0 a	18.0 a	5.7 a
'CHF1-Chapingo'	21.1 c	70.0 a	20.8 a	5.3 ab
'Salamanca'	23.8 c	60.0 a	20.4 a	4.3 ab
'Puebla'	26.9 bc	50.0 ab	10.6 b	3.8 bc
DMSH	5.9	25.0	4.7	1.7

<sup>z</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales, según prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ . DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

porcentaje de explantes con brotes, de 9 a 87 %; en el número de brotes por explante de 1.1 a 3.9 (Ezura *et al.*, 1993). También Deglene *et al.* (1997) observaron alta variabilidad genética en variables organogénicas de trece genotipos de *Helianthus annuus* al cultivar cotiledones en medio MS con 4.4 mM de BA y 5.4 mM de ANA.

Los resultados obtenidos en este estudio conducen a la necesidad de probar otras combinaciones y concentraciones de reguladores del crecimiento y posiblemente también otros medios de cultivo, para poder obtener formación de brotes en las variedades silvestres.

### Alargamiento de brotes

Los brotes obtenidos en la fase de inducción eran pequeños e incapaces de crecer en suelo o de ser usados para micropropagación, por lo que fue necesario inducir su alargamiento *in vitro* durante dos semanas. Al final de las dos semanas, los brotes de mayor altura fueron los de las variedades Rendidora original, CHF1-Chapingo y Milpero (3.5 a 3.7 cm), y los de tamaño menor (2.5 cm) correspondieron a la variedad Tamazula (Cuadro 2, Figura 2).

**CUADRO 2. Características de brotes de ocho variedades de tomate de cáscara alargados *in vitro*.**

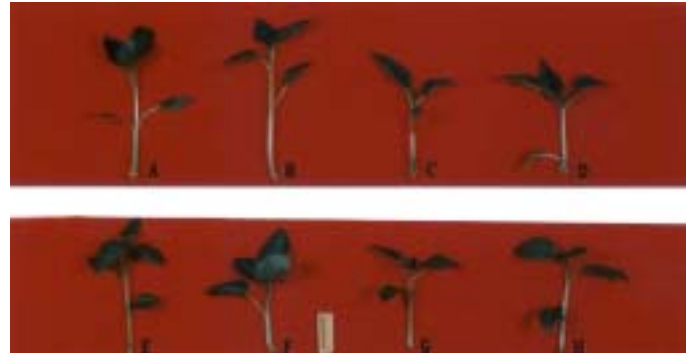
Variedad	Altura (cm)	Hojas	Peso fresco por brote (mg)	Contenido de agua (%)
'Milpero'	3.5 ab <sup>2</sup>	4.6 ab	146 ab	96.1 a
'Arandas'	3.2 bc	4.5 ab	113 bc	94.8 ab
'Tamazula'	2.5 d	4.0 b	114 bc	94.5 b
'Manzano'	2.7 cd	4.0 b	119 bc	94.7 ab
'Rendidora' original	3.7 a	5.0 a	108 c	94.7 ab
'CHF1-Chapingo'	3.5 ab	4.3 ab	160 a	95.5 ab
'Salamanca'	2.7 cd	4.3 ab	104 c	94.7 ab
'Puebla'	3.1 bc	4.0 b	121 bc	95.3 ab
DMSH	0.53	0.79	34.8	1.49

<sup>2</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales, según prueba de Tukey a una P≤0.05.

DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

Para que los brotes sean de calidad, se requiere además del tamaño que los brotes tengan un número de hojas proporcional a su altura. En esta variable, se encontró poca variación (4 y 5 hojas por brote), en donde la variedad Rendidora original presentó brotes con más hojas, el menor número fue producido por las variedades Tamazula, Manzano y Puebla (Cuadro 2). En el peso fresco de los brotes, el mayor valor correspondió a la variedad 'CHF1-Chapingo' y los menores a 'Salamanca' y 'Rendidora' original, con 104 y 108 mg (Cuadro 2). El contenido de agua en los brotes varió poco (94.5 a 96.1 %) entre variedades, pero la variabilidad genotípica fue significativa en el

alargamiento de brotes. Ezura *et al.* (1993) también reportaron que el porcentaje de explantes con alargamiento de brotes varió de 0 a 68 % en 14 cultivares de *Capsicum annuum* L. En tomate de cáscara, Grimaldo (1997) señaló que la variedad Milpero está menos domesticada que las otras siete cultivadas; sin embargo, los brotes de 'Milpero' aquí presentaron crecimiento similar al de las variedades presumiblemente más domesticadas.



**FIGURA 2. Altura de brotes de ocho variedades de tomate de cáscara. A: 'Milpero', B: 'Rendidora' original, C: 'Puebla', D: 'Salamanca', E: 'CHF1-Chapingo', F: 'Tamazula', G: 'Manzano', H: 'Arandas'. Escala: 1 cm.**

### Enraizamiento de brotes *in vivo*

La aparición de raíces inició a los siete días y dio lugar a una buena producción de raíces en las ocho variedades cultivadas, lo que indica que esta especie tiene alta capacidad de enraizamiento. El mayor valor promedio fue producido por la variedad Milpero (65.6 raíces por brote), y los menores por las variedades Puebla y Salamanca, con 26 y 29 (Cuadro 3). Las raíces fueron vigorosas y su longitud varió de 0.7 a 1.5 cm entre variedades, con el valor mayor en los brotes de 'Manzano' y 'Puebla' (Cuadro 3). El peso fresco y seco de las raíces no mostraron diferencias estadísticas entre variedades. La altura de las plántulas varió de 3.5 a 4.6 cm, donde el valor mayor correspondió a la variedad Milpero. El efecto del genotipo se manifestó en el número y longitud de raíces, lo que coincide con Kallar *et al.* (1997) quienes señalaron que la regeneración de tallo y raíz dependió del genotipo en *Dianthus caryophyllus*.

En esta fase no se evaluó el peso de materia fresca y seca de los brotes, pero su vigor y crecimiento fue similar al obtenido en la fase de alargamiento de brotes.

### Aclimatación de plántulas en invernadero

Hasta después de una semana en invernadero fue que los brotes reanudaron el crecimiento en altura. Este crecimiento, aunado a que la supervivencia fue de 100 %, permite afirmar que la metodología usada para aclimatar las plántulas de tomate de cáscara fue adecuada. Cruz y Alvarez (1995) registraron porcentajes de supervivencia en las variedades Salamanca y Tamazula de apenas 68 % en

**CUADRO 3. Características de brotes de ocho variedades de tomate de cáscara enraizados *in vivo*.**

Variedad	Número de raíces	Longitud de raíz (cm)	Peso fresco de raíz (mg)	Peso seco de raíz (mg)	Altura del brote (cm)
'Milpero'	65.6 a <sup>2</sup>	0.7 d	21.8 a	1.4 a	4.6 a
'Arandas'	48.2 ab	1.2 abc	21.8 a	1.6 a	3.5 b
'Tamazula'	41.4 ab	1.1 abcd	18.4 a	1.0 a	3.5 b
'Manzano'	46.8 ab	1.5 a	23.8 a	3.0 a	3.7 b
'Rendidora' original	37.2 ab	1.2 abc	26.2 a	1.2 a	3.5 b
'CHF1-Chapingo'	45.0 ab	0.7 cd	17.0 a	0.8 a	3.9 ab
'Salamanca'	29.4 b	1.0 bcd	11.0 a	1.0 a	3.8 ab
'Puebla'	26.6 b	1.4 ab	23.0 a	2.0 a	3.5 b
DMSH	30.36	0.49	18.02	2.34	0.85

<sup>2</sup>Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales, según prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ . DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

una primera fecha y de 41 % en una segunda fecha de trasplante. La mejor respuesta observada en este trabajo se atribuye al mejor manejo de las plantas durante la aclimatación, que permitió compensar los problemas de funcionalidad estomática y cutícula escasamente desarrollada; es decir, estos problemas señalados por Granada (1985) y Pierik (1990) pueden ser superados completamente con el manejo adecuado de las plántulas durante la aclimatación.

Las variedades de tomate de cáscara estudiadas mostraron diferencias genotípicas en la inducción, alargamiento y enraizamiento de brotes, pero no en la aclimatación en invernadero.

### Análisis cromosómico

El recuento de cromosomas en ápices radicales de plántulas obtenidas a partir de semilla de las diez variedades, invariablemente indicó un número diploide  $2n=2x=24$  (Figura 3). Este mismo número fue observado en las plántulas regeneradas *in vitro*, en concordancia con lo reportado por García (1976) y Grimaldo (1997). Esto indica que las plántulas regeneradas *in vitro* mantuvieron constante el número de cromosomas, debido a que la vía de regeneración seguida fue organogénesis directa. De manera similar, Ezura *et al.* (1993) observaron que en *Cap-sicum annuum* L. el número cromosómico en plantas regeneradas *in vitro* fue estable. Sin embargo, en esta misma especie las plantas regeneradas usando TIBA en combinación con BA y cinetina, no presentaron aberraciones cromosómicas, mientras que las regeneradas únicamente con BA (66.6 y 88.8 mM) o cinetina (92.9 y 116.2 mM) mostraron cromosomas agrupados, anafases con puentes y disminución del índice mitótico; las altas concentraciones de citocininas pudieron ser las responsables de la inestabilidad citogenética ocurrida (Christopher y Rajam, 1994).

Cambios en número cromosómico en brotes regenerados *in vitro* han sido reportados también en



**FIGURA 3. Número cromosómico diploide ( $2n=24=2x$ ) en plantas regeneradas *in vitro*.**

*Cucumis melo* (Yadav *et al.*, 1996), en donde hubo cambios de diploide a tetraploide en 11 de 23 plantas regeneradas *in vitro*. En tomate de cáscara, Ortuño *et al.* (1997) reportaron que en cultivo de anteras obtuvieron plantas con número cromosómico diferente al diploide ( $n=12$ ,  $3n=36$  y  $4n=48$ ). Esto sugiere que el tipo de explante usado en el cultivo *in vitro* es factor importante a considerar cuando se desea mantener el número diploide de la especie ( $2n=24$ ).

### CONCLUSIONES

La capacidad de propagación *in vitro* del tomate de cáscara varió en función del genotipo de la variedad utilizada. En inducción de brotes las mejores variedades fueron 'Tamazula', 'CHF1-Chapingo' y 'Rendidora' original; en alargamiento de brotes, 'CHF1-Chapingo', 'Milpero' y 'Arandas' fueron las mejores; y en el enraizamiento, 'Manzano' y 'Puebla' tuvieron mejor comportamiento. Las variedades silvestres presentaron baja capacidad de regeneración *in vitro*.

Todas las plántulas regeneradas *in vitro* de las

variedades cultivadas pudieron aclimatarse a las condiciones de invernadero, debido a la cubierta que mantuvo alta humedad relativa.

El periodo crítico de aclimatación de las plántulas al invernadero fue la primera semana después del trasplante.

El número cromosómico de las plántulas de tomate de cáscara propagadas *in vitro* fue igual al de las producidas a partir de semilla.

### LITERATURA CITADA

- ANDRADE R., M. 1998. Cultivo *in vitro* de tomate de cáscara. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México. 163 p.
- BHAU, B. S.; WAKHLU, A. K. 2001. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 66: 25-29.
- BINGHAM, E. T.; HURLEY, L. V.; KAATZ, O. M.; SAUNDERS, J. W. 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. Crop Science 15: 719-721.
- CHU, C. C. 1981. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. Proceedings of the Symposium of Plant Tissue Culture. Pitman Pub. Ltd. and The Science Press. Peking, China. pp. 35-42.
- CRUZ U., A.; ALVAREZ E., I. 1995. Estudio de regeneración *in vitro* de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.) variedades Salamanca y Tamazula. Tesis de Licenciatura. Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. México. 69 p.
- CHRISTOPHER, T.; RAJAM, M. V. 1994. *In vitro* clonal propagation of *Capsicum* spp. Plant Cell Tissue and Organ Culture 38: 25-29.
- DEGLENE, L.; LESIGNES, P.; ALIBERT, G.; SARRAFI, A. 1997. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 48: 127-130.
- EZURA, H.; NISHIMIYA, S.; KASUMI, M. 1993. Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 12: 676-680.
- FICCADENTI, N.; ROTINO, G. L. 1995. Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. Plant Cell Tissue and Organ Culture 40: 293-295.
- FEI, S. Z.; ZHOU, W. Y. 1994. Studies on morphological and cytological variation on chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). Acta Horticulturae Sinica 21: 193-198.
- GARCÍA V., A. 1976. Citotaxonomía del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.), Avances en la investigación 1975-76. C.P., p. 43, E.N.A. Chapingo, México.
- GARCÍA V., A. 1990. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. 3ª ed. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 144 p.
- GRANADA C., I. 1985. Manejo de plantas en invernadero, pp. 161-168. In: Fundamentos Teórico Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales. V. M. VILLALOBOS A. (ed.) CP-FAO. Chapingo, México.
- GRIMALDO J., O. 1997. Relación entre el grado de domesticación y las características citológicas y morfológicas del fruto en tomate de cáscara (*Physalis* spp.). Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 76 p.
- KALLAR, H.; REIDLA, M.; HILLPUS, I.; VIRUMÄE, K. 1997. Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture 51: 127-135.
- KAMO, K. K.; GRIESBACH, R. J. 1993. Ploidy changes in 'Mitchell' Petunia. Acta Horticulturae 336: 307-314.
- MANZO G., A.; LEDESMA H., A.; VILLATORO L, J. C.; ALVAREZ-ESCAREÑO, I.; RODRÍGUEZ DE LA O., J. L.; PEÑA L., A. 1997. Regeneración *in vitro* de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Chapingo Serie Horticultura 4: 45-49.
- MOLINA, R. V.; NUEZ, F. 1995. Characterization and classification of different genotypes in a population of *Cucumis melo* based on their ability to regenerate shoots from leaf explants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 43: 249-257.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- ORTUÑO O., L.; MANZO G., A.; PEÑA L., A. 1997. Cultivo de anteras en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Chapingo Serie Horticultura 4: 39-43.
- PANDEY, K. K. 1957. Genetics of self-incompatibility in *Physalis ixocarpa* Brot. A new system. American Journal of Botany 44: 879-887.
- PIERIK R., L. M. 1990. Propagación *in vitro* de las Plantas Superiores. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. 326 p.
- RAMIREZ-MALAGÓN, R.; OCHOA A., N. 1991. Adventitious shoot formation and plant regeneration from tissues of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 25: 185-188.
- SAS. 1987. SAS User's Guide. Statistics. SAS Institute Inc. Cary, N. C. USA. 956 p.
- WEBER, S.; HORN, R.; FRIEDT, W. 2000. High regeneration potential *in vitro* of sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines derived from interspecific hybridization. Euphytica 116: 271-280.
- YADAV, R. C.; SALEH, M. T.; GRUMET, R. 1996. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. Plant Cell Tissue and Organ Culture 45: 207-214.