

REGENERACIÓN *in vitro* DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot.)

A. Manzo-González; A. Ledesma-Hernández; J.C. Villatoro-López; I. Alvarez-Escareño;
J.L. Rodríguez-De la O; A. Peña-Lomelí

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. C.P. 56230, Chapingo, Edo. de México.

RESUMEN

El tomate de cáscara es un cultivo hortícola importante en México. El programa de mejoramiento genético de tomate de cáscara del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo está realizando diversas investigaciones enfocadas a la obtención de híbridos. Sin embargo, esta especie presenta una problemática derivada de sus características de autoincompatibilidad gametofítica lo cual hace que sea una especie alógama obligada. La formación de híbridos involucra la obtención de líneas altamente homocigóticas. Para lograr esto se requiere contar con el método de propagación *in vitro*. Así, la presente investigación planteó como objetivo desarrollar esta metodología para tomate de cáscara de las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula. Se utilizaron como fuente de inóculo o explante segmentos de tallo, hoja, peciolo y yemas axilares. El medio de cultivo básico fue el medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), benziladenina (BA) y ácido indolacético (AIA). Para la formación de callo en tallo y hoja de 'Rendidora' se obtuvo en un medio que contenía BA 10 mg·litro⁻¹ y AIA 3.0 mg·l⁻¹. En la var. Salamanca el mejor tratamiento se obtuvo utilizando 2,4-D 1.0 mg·litro⁻¹. En la var. Tamazula el mejor tratamiento fue con ANA 0.1 mg·litro⁻¹ y 2,4-D 3.0 mg·litro⁻¹. La formación de yemas axilares en la var. Rendidora se obtuvo con BA 3.0 mg·litro⁻¹ y AIA 0.1 mg·litro⁻¹, en la var. Salamanca con BA 3.0 mg·litro⁻¹ y para la var. Tamazula se logró con BA 1.0 mg·litro⁻¹. El enraizamiento para las tres variedades se obtuvo utilizando las sales inorgánicas de MS al 75% y sin reguladores de crecimiento.

PALABRAS CLAVE: Micropropagación, callo, yemas adventicias, enraizamiento, reguladores de crecimiento, cultivo de tejidos.

In vitro REGENERATION OF HUSK TOMATO (*Physalis ixocarpa* Brot.)

SUMMARY

Husk tomato is an important horticultural crop in Mexico. One of the goals of the husk tomato breeding program of the Departamento de Fitotecnia of the Universidad Autonoma Chapingo is to obtain husk tomato hybrids. However, the gametophytic self-incompatibility of husk tomato makes difficult to form hybrids. Anther culture is an option that needs to have the *in vitro* propagation method of husk tomato diploidized haploids. Therefore, the objective of this research was to develop the *in vitro* propagation method for the varieties Rendidora, Salamanca and Tamazula. The explants were sections of stem, leaves, petioles and axilar buds. The media was Murashige and Skoog (1962) (MS) supplemented with 2, 4-diclorophenoxyacetic acid (2,4-D), naphthalenacetic acid (NAA), benziladenine (BA) and indolacetic acid (IAA). 'Rendidora' formed callus in stems and leaves. The best treatment was BA 10 mg·liter⁻¹ and IAA 3.0 mg·liter⁻¹. In 'Salamanca' the best treatment was 2,4-D 1.0 mg·liter⁻¹. In 'Tamazula' the best treatments were NAA 0.1 mg·liter⁻¹ and 2,4-D 3.0 mg·liter⁻¹. In relation with the formation of adventitious shoots the best treatments for 'Rendidora' were BA 3.0 mg·liter⁻¹ and IAA 0.1 mg·liter⁻¹. In 'Salamanca' the best treatment was BA 3.0 mg·liter⁻¹ and for 'Tamazula' BA 1.0 mg·liter⁻¹. The rooting of adventitious shoots in the three varieties was achieved using 75% of the inorganic salts of MS without growth regulators.

KEY WORDS: Micropropagation, callus, adventitious shoots, rooting, growth regulators, tissue culture.

INTRODUCCIÓN

En México el tomate de cáscara, tomate verde o tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) se ha convertido en una especie importante debido a que se ha colocado entre las primeros 10 especies hortícolas. Su cultivo data desde

tiempos prehispánicos y era conocido por los aztecas como miltomatl. Así, desde 1985, el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo inició un proyecto de colecta, conservación y mejoramiento de tomate. A la fecha se tienen más de 200 colectas en el Banco de Germoplasma. La mayor parte de estas colec-

tas se han evaluado por sus características agronómicas como rendimiento, altura, hábitos de crecimiento, resistencia a plagas y enfermedades, homogeneidad en tamaño y peso de fruto. Sin embargo, el avance obtenido en su mejoramiento genético ha sido lento debido a lo limitado de los métodos de mejoramiento factible de utilizar en esta especie como son la selección masal visual estratificada, selección familiar de medios hermanos y selección combinada de medios hermanos (Peña y Márquez, 1990) y esto se debe a la característica de autoincompatibilidad gametofítica que presenta y que hace que la especie se comporte como una especie alógama obligada.

La selección individual es una opción que puede reducir el número de ciclos en el mejoramiento de tomate. Estas plantas, una vez seleccionadas, se pueden clonar *in vitro*, y en un solo ciclo pueden generar líneas con alto grado de homocigosis que posteriormente se pueden cruzar y así poder explotar el vigor híbrido de las poblaciones obtenidas, metodología que fue explorada por Ramírez y Ochoa (1991) utilizando como explante hipocotilo, el medio MS y diferentes reguladores de crecimiento. Otra opción consiste en la utilización de líneas puras obtenidas vía el cultivo de anteras y su clonación (Ortuño, 1995). Con base en lo anterior, se desarrolló el presente trabajo con plantas sobresalientes por su producción de fruto con el objetivo de desarrollar una metodología de propagación clonal *in vitro* de tomate de cáscara de las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, iniciando los trabajos en 1992. En el caso de la variedad Rendidora se utilizaron plantas sembradas en campo provenientes de un cuarto ciclo de selección y en las variedades Salamanca y Tamazula se utilizaron plantas obtenidas de semillas germinadas de frutos colectados en campo.

En las tres variedades se utilizó como fuente de inóculo o explante segmentos de tallos, hojas, peciolo y yemas axilares. Los inóculos se trataron con una solución jabonosa e inmediatamente después se desinfectaron con un producto comercial a base de hipoclorito de sodio al 1.2% durante 10 minutos. A continuación se dieron tres enjuagues con agua destilada esterilizada y los inóculos se establecieron en los tratamientos respectivos.

El medio de cultivo básico utilizado fue el Murashige y Skoog (1996) (MS) suplementado con 3% de sacarosa, 0.4 mg·litro⁻¹ de tiamina, 100 mg·litro⁻¹ de inositol y 0.8% de agar, donde el pH se ajustó a 5.7±0.1.

Las condiciones de incubación fueron: en la etapa I (establecimiento del cultivo aséptico) y II (multiplicación

de propágulos) iluminación a 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 h luz. En la etapa III (enraizamiento de propágulos) se dieron 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y el mismo fotoperiodo.

Los experimentos específicos realizados se plantearon utilizando de base la información bibliográfica existente así como los trabajos desarrollados con tomate durante el desarrollo de la investigación. Así, en la variedad Rendidora para la inducción de callosidades se realizaron diversos experimentos con ácido indolacético (AIA) y benziladenina (BA) en concentraciones de 0.1, 1.0, 3.0 y 10.0 mg·litro⁻¹ y el testigo. El diseño experimental fue un completamente al azar en un arreglo de tratamientos factorial 5², dando un total de 25 tratamientos. En las variedades Salamanca y Tamazula se utilizó un diseño experimental completamente al azar, donde el ácido naltalacético (ANA) 10 mg·litro⁻¹ fue constante y el 2,4-D en concentraciones de 0.1, 1.0, 3.0 y 10.0 mg·litro⁻¹ y el testigo. En la formación de yemas adventicias con la variedad Rendidora, se probó BA y AIA en concentraciones de 0.1, 1.0 y 3.0 mg·litro⁻¹; en la var. Salamanca se probó BA y ácido indolbutírico (AIB) en concentraciones de 0.1, 1.0 y 3.0 mg·litro⁻¹ y el testigo y en la var. Tamazula se probó ANA en concentraciones de 0.0 y 0.1 mg·litro⁻¹ y BA en concentraciones de 0.1, 1.0 y 3.0 mg·litro⁻¹ y el testigo.

En el enraizamiento de yemas se probó el MS a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 % sin reguladores de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de callosidades

En el experimento con la variedad Rendidora, después de 8 semanas de cultivo se observó que todos los inóculos formaron callo organogénico, pero este fue más abundante en los segmentos de tallo y hoja, los cuales se analizaron conjuntamente por su respuesta similar en la organogénesis inducida en ellos. Con respecto a las yemas axilares la formación de callo se dió en forma irregular y el mejor tratamiento fue de 0.1 mg·litro⁻¹ de ANA. El peso fresco promedio de callo de tallos y hojas fue de 0.45-0.7 g en los tratamientos que contenían 10 mg·litro⁻¹ de AIA y 3.0 mg·litro⁻¹ de BA (Cuadro 1).

En las var. Salamanca y Tamazula a diferencia de la var. Rendidora se cuantificó el porcentaje de callosidad formada debido a la cantidad mínima de callo que se tenía. Así, en la var. Salamanca los mejores resultados para la formación de callo fueron obtenidos al utilizar el tallo con un 35.60% seguido por las hojas con un 17.20% y finalmente el peciolo con un 14.15%. Por otra parte, el mejor tratamiento obtenido con reguladores de crecimiento fue con 2,4-D a 1.0 mg·litro⁻¹ seguido por ANA 10 mg·litro⁻¹ (testigo 2; Cuadro 2).

CUADRO 1. Efecto del AIA y BA en la formación de callosidades *in vitro* a partir de explantes de tallo y hoja de *Physalis ixocarpa* Brot. var. Rendidora.

TRATAMIENTO	AIA (mg·litro ⁻¹)	BA (mg·litro ⁻¹)	PESOS DE CALLO (g)
24	10.0	3.0	0.7 a ^z
23	10.0	1.0	0.5 ab
22	10.0	0.1	0.45 ab
18	3.0	1.0	0.42 ab
13	1.0	1.0	0.42 abc
9	0.1	3.0	0.40 abc
14	1.0	3.0	0.40 abc
8	0.1	1.0	0.38 abc
12	1.0	0.1	0.38 abc
17	3.0	0.1	0.37 abc
25	10.0	10.0	0.33 bcd
3	0.0	1.0	0.32 bcd
20	3.0	10.0	0.30 bcd
1	0.0	0.0	0.30 bcd
15	1.0	10.0	0.28 cd
10	0.1	10.0	0.26 cd
7	0.1	0.1	0.25 cd
21	10.1	0.0	0.24 cd
11	1.0	0.0	0.21 cd
5	0.0	10.0	0.20 cd
4	0.0	3.0	0.18 d
2	0.0	0.1	0.16 d
1	0.0	0.0	0.15 d
6	0.1	0.0	0.14 d
16	3.0	0.0	0.08 d

^z Medias con letras iguales no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

CUADRO 2. Formación de callo en diferentes inóculos y efecto de reguladores de crecimiento en *Physalis ixocarpa* Brot. var. Salamanca.

TRATAMIENTO (mg·litro ⁻¹)	TALLO (%)	HOJA (%)	PECIOLO (%)	PROMEDIO (%)
1.0 (2,4-D)	53.0	42.0	24.0	39.6
TESTIGO 2 (ANA)				
10 mg·litro ⁻¹	33.4	47.0	20.4	33.6
0.1 (2,4-D)	57.4	0.4	9.3	22.3
3.0 (2,4-D)	34.0	3.2	21.0	19.4
10.0 (2,4-D)	21.8	10.6	18.6	17.0
TESTIGO 1	14.0	0.0	0.6	4.8
PROMEDIO	35.6	17.2	14.5	

En la var. Tamazula las respuestas de los inóculos para formación de callo arrojaron como mejor tratamiento el peciolo con 54.2% seguido por el tallo con 51.5% y finalmente la hoja con 32% y de los tratamientos con reguladores de crecimiento el mejor fue el testigo 2 (ANA 10 mg·litro⁻¹) seguido por 2,4-D a una concentración de 3 mg·litro⁻¹ (Cuadro 3).

CUADRO 3. Formación de callo en diferentes inóculos y tratamientos con reguladores de crecimiento en *Physalis ixocarpa* Brot. var. Tamazula.

TRATAMIENTO (mg·litro ⁻¹)	PECIOLO (%)	TALLO (%)	HOJA (%)	PROMEDIO (%)
TESTIGO 2 (ANA)				
10 mg·litro ⁻¹	66.0	76.0	85.0	75.0
3.0 (2,4-D)	81.0	70.0	67.5	72.6
10.0 (2,4-D)	51.2	42.0	45.0	46.2
1.0 (2,4-D)	87.0	37.0	0.0	41.3
0.1 (2,4-D)	24.0	51.0	0.0	25.0
TESTIGO 1	16.0	33.0	0.0	16.3
PROMEDIO	54.2	51.5	32.9	

Formación de yemas adventicias

Los resultados obtenidos con la var. Rendidora con respecto a los tipos de inóculo utilizados mostraron que aún cuando los peciolo podrían ser un material vegetal excelente para generar callosidades abundantes (Ledema, 1994), estos no resultaron un buen material organogénico para las vars. Salamanca y Tamazula como se pudo observar en los resultados mostrados en el Cuadro 4 donde el número máximo de yemas adventicias en la var. Rendidora fue de 6.5 (BA 3.0 mg·litro⁻¹ y AIA 0.1 mg·litro⁻¹) contra 10.8 para 'Salamanca' (BA 3.0 mg·litro⁻¹) (Cuadro 5) y 21.5 para 'Tamazula' (BA 1.0 mg·litro⁻¹) (Cuadro 6).

CUADRO 4. Efecto del BA y AIA en la formación de yemas adventicias de *Physalis ixocarpa* Brot. var. Rendidora.

TRATAMIENTO (mg·litro ⁻¹)		NÚMERO DE YEMAS ADVENTICIAS
BA	AIA	
3.0	0.1	6.5 a ^z
3.0	3.0	5.9 a
1.0	0.1	5.8 abc
3.0	1.0	5.1 abc
1.0	1.0	4.5 abcd
0.1	0.3	4.4 abcd
0.1	0.1	4.3 abcd
1.0	3.0	4.2 abcd
3.0	0.0	4.2 abcd
0.3	1.0	4.1 abcd
0.3	0.1	4.0 abcd
1.0	0.0	3.9 abcd
0.1	1.0	3.8 abcd
3.0	0.3	3.6 abcd
0.1	0.0	3.6 bcd
0.3	3.0	3.4 bcd
0.0	3.0	3.4 bcd
0.3	0.0	3.4 bcd
0.0	0.3	3.3 bcd
0.1	3.0	3.3 bcd
0.3	0.3	3.2 bcd
0.0	0.1	2.9 cd
0.0	0.0	2.8 cd
1.0	0.3	2.5 cd

^z Medias con letras iguales no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ($P=0.05$).

Los callos obtenidos en la var. Rendidora y utilizados para la regeneración de yemas adventicias respondieron en forma muy irregular y únicamente destacó el tratamiento de 3.0 mg·litro⁻¹ de BA y 0.1 mg·litro⁻¹ de ANA. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ramírez y Ochoa (1991), al utilizar concentraciones de citocininas superiores a 2.0 mg·litro⁻¹ o mayores para inducir la organogénesis.

En la var. Salamanca después de 10 semanas de observación los callos no mostraron respuestas organogénica en los tratamientos de BA y ANA tornándose posteriormente de un color verde. Las yemas aún presentes respondieron a la organogénesis en los tratamientos de BA y AIB encontrándose que los mejores tratamientos fueron aquellos donde estaba presente el BA 3.0 mg·litro⁻¹ con 10.8 yemas en promedio y el BA (1.0 mg·litro⁻¹) con AIB (0.1 mg·litro⁻¹) con 9.4 brotes en promedio (Cuadro 5).

CUADRO 5. Efecto del BA y AIB en la formación de yemas adventicias de *Physalis ixocarpa* Brot. var. Salamanca.

TRATAMIENTO (mg·litro ⁻¹)		NÚMERO DE YEMAS ADVENTICIAS
BA	AIB	
3.0	0.0	10.8 a ^z
1.0	0.1	9.4 ab
1.0	3.0	9.2 ab
1.0	0.0	8.7 abc
0.0	0.1	6.9 abc
1.0	1.0	6.6 abc
0.1	0.1	6.4 abc
0.1	3.0	5.5 abc
0.0	1.0	5.4 abc
3.0	3.0	5.3 abc
3.0	0.1	5.3 abc
3.0	0.1	4.5 bc
0.1	1.0	4.2 bc
0.0	3.0	4.1 bc
3.0	1.0	3.9 c
0.1	0.0	3.4 c
0.0	0.0	1.7 c

^z Medidas con letras iguales no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P=0.05$).

Con respecto a la var. Tamazula el mejor tratamiento fue con BA 1.0 mg·litro⁻¹ y 3.0 mg·litro⁻¹ con un promedio de 21.5 y 15.6 yemas adventicias, respectivamente (Cuadro 6).

CUADRO 6. Efecto de ANA y BA en el número de yemas adventicias de *Physalis ixocarpa* Brot. var. Tamazula.

TRATAMIENTO (mg·litro ⁻¹)		NÚMERO DE YEMAS ADVENTICIAS
ANA	BA	
0.0	1.0	21.5 a ^z
0.0	3.0	15.6 a
0.0	0.1	11.4 b
0.1	0.0	11.3 bc
0.1	0.1	11.2 bc
0.1	3.0	9.9 bc
0.1	1.0	9.2 bc
0.0	0.0	3.7 c

^z Medidas con letra igual no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P=0.05$).

Enraizamiento de yemas adventicias

Para el enraizamiento de yemas adventicias se encontró que los mejores resultados en las tres variedades se tuvieron cuando se utilizaron las sales inorgánicas del medio MS diluidas al 75% sin reguladores del crecimiento. Así, la var. Rendidora formó un promedio de 2 raíces por propágulo, la var. Salamanca, 10.1 y la var. Tamazula 9.3. Se pudo observar que para la inducción de la rizogénesis en las vars. Salamanca y Tamazula, no fue determinante la utilización de reguladores de crecimiento (Cruz y Alvarez, 1995; Villatoro, 1996). Sin embargo, en el caso de la var. Rendidora, Villatoro (1996) encontró que estas también respondían a la aplicación de kinetina 1.0 mg·litro⁻¹ y AIB 0.3 mg·litro⁻¹, fenómeno que también observaron Ramírez y Ochoa (1991) con la utilización de BA en concentraciones de 2.81-5.62 mg·litro⁻¹ y ANA en concentraciones de 0.19 mg·litro⁻¹.

CUADRO 7. Efecto de la concentración de sales del medio MS en el enraizamiento de brotes de *Physalis ixocarpa* Brot. vars. Rendidora, Salamanca y Tamazula.

TRATAMIENTO (% MS)	NÚMERO DE RAÍCES		
	var. Rendidora	var. Salamanca	var. Tamazula
100	0.6 b ^z	9.2 a	8.6 a
75	2.0 a	10.1 a	9.3 a
50	0.6 b	9.2 a	3.1 b
25	0.0 c	5.0 b	3.8 b

^z Medidas con letras iguales dentro de columnas no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P=0.05$).

De las plantas obtenidas *in vitro* se obtuvo un 50% de sobrevivencia al transplante a suelo, valor que se incrementó arriba del 95% con un segundo lote de plantas propagadas *in vitro*, al tener un sistema de aclimatización en mejores condiciones.

CONCLUSIONES

Mediante la técnica de cultivo de tejidos es posible la regeneración de plantas de *Physalis ixocarpa* Brot.

Las fuentes de inóculo o explante más apropiadas para regenerar plantas en *Physalis ixocarpa* Brot. vía organogénesis son segmentos de tallo y hoja.

El medio de cultivo más adecuado para la inducción y formación de callosidades en *Physalis ixocarpa* Brot. var. Rendidora es el MS suplementado con BA 10 mg·litro⁻¹ y AIA 3.0 mg·litro⁻¹; en la var. Salamanca, el MS suplementado con 2,4-D en una concentración de 1.0 mg·litro⁻¹ y en la var. Tamazula el MS suplementado con ANA 0.1 mg·litro⁻¹ y 2,4-D 3.0 mg·litro⁻¹.

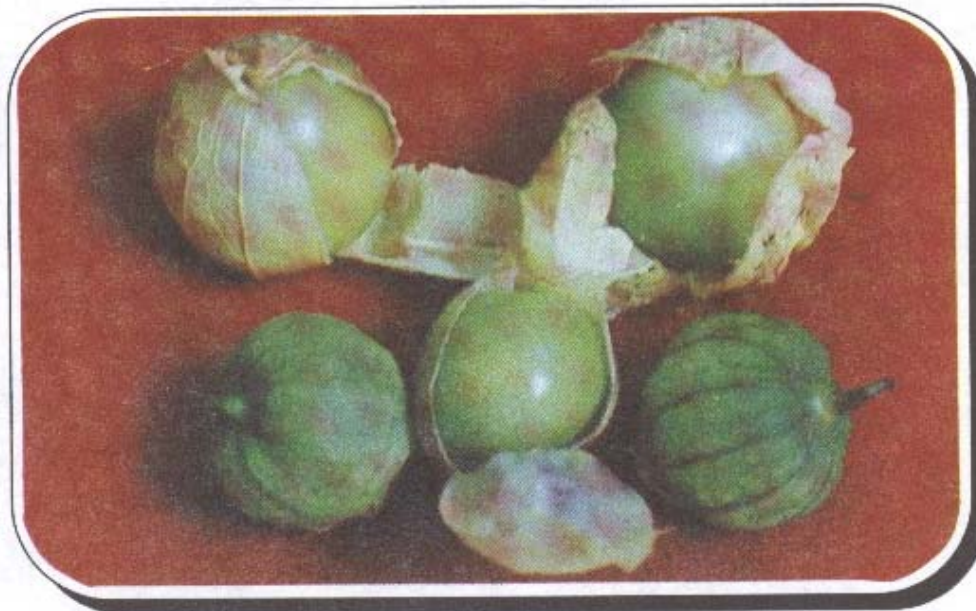
Para inducir la organogénesis en la var. Rendidora el medio de cultivo más indicado es el MS suplementado con BA 3.0 mg·litro⁻¹ más AIA en una concentración de 0.1 mg·litro⁻¹. En la var. Salamanca el medio MS suplementado con BA 3.0 mg·litro⁻¹ y en la var. Tamazula el MS suplementado con BA en una concentración de 1.0 mg·litro⁻¹.

La rizogénesis en las tres variedades se induce y desarrolla en el medio MS al 75% sin reguladores de crecimiento.

La adaptación de las plantas de tomate obtenidas *in vitro* es factible cuando se cuenta con un sistema de aclimatización adecuado.

LITERATURA CITADA

- CRUZ U., A.; ALVAREZ E., I. 1995. Estudio de regeneración *in vitro* de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) variedades Salamanca y Tamazula. Tesis profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México 71 p.
- LEDESMA H., A. 1994. Micropropagación en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) Tesis profesional. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México, México 102 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium growth and bloassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- ORTUÑO O., L. 1995. Cultivo de anteras en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Tesis de Maestría en Horticultura. Universidad Autonoma Chapingo. Chapingo, Méx. 105 p.
- PEÑA L., A.; MÁRQUEZ S., F. 1990. Mejoramiento genético del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo* 71-72:84-88.
- RAMÍREZ, R.; OCHOA, N. 1991. Adventitious shoot formation and plant regeneration from tissues of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25:185-188.
- VILLATORO L., J.C. 1996 Cultivo *in vitro* de yemas axilares para la micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) var. Rendidora. Tesis profesional Departamento de Fitotecnia. Universidad Autonoma Chapingo, Chapingo, Edo. de México, México. 72 p.



Tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.)

(Foto: José Luis Espinoza López)