

REGENERACION ADVENTICIA DE SOMACLONES DE UCHUVA (*Physalis peruviana*)*

Adventitious shoot formation in somaclons of Cape gooseberry or uchuva (*Physalis peruviana*)

Gloria E. Santana ¹ y Antonio Angarita ²

RESUMEN

Hipocótilos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) fueron utilizados en la inducción de callos y regeneración de plántulas. El medio basal de Murashige y Skoog (MS) fue suplementado con bencil amino purina (BAP) de 0 a 5,0 ppm, ácido giberélico (GA₃ 0 y 1,0 ppm) en combinación con ácido naftalenoacético (ANA de 0 a 1,0 ppm) o con ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D de 0 a 1,0 ppm). La inducción de callos dependió de las interacciones hormonales y condiciones de luz. La regeneración de plántulas en medios que contenían ANA o cuando el medio no fue suplementado con 2,4-D fue nula o muy poca. El mayor número de plántulas regeneradas fue observado en medios complementados con 1,0 ppm de BAP, 1,0 ppm de GA₃ y 0,5 ppm de 2,4-D en condiciones de luz. Las plántulas regeneradas fueron micropropagadas en el medio basal de MS sin ningún suplemento hormonal. Finalmente, las plantas se evaluaron *in vitro* bajo condiciones de heladas simuladas.

Palabras claves: Variación somaclonal, inducción de callos, ~~modogénesis indirecta~~, cultivo *in vitro*.

* Recibido: Enero de 1997

1. Bióloga. Universidad Nacional de Colombia.
2. Profesor. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 14490, Santafé de Bogotá.

SUMMARY

Hypocotyl explants of uchuva (*Physalis peruviana* L.), were used in calli induction and plant regeneration. Murashige & Skoog (MS) basal medium was supplemented with benzyladenine (BA) from 0 to 5,0 ppm, gibberellic acid (GA₃) 0 and 1,0 ppm, with either naphthalene acetic acid (ANA) from 0 to 1,0 ppm, or 2,4-D dichloro-phenoxyacetic acid (2,4-D from 0 to 1,0 ppm). Calli induction depended on hormonal interactions and light conditions. Plant regeneration failed on media containing ANA or when the media was not supplemented with 2,4-D. The highest plant number regenerated was observed on media supplemented with 1,0 ppm BA, 1,0 ppm GA₃ and 0,5 ppm 2,4-D under light. The plants regenerated were micropropagated on MS basal medium without hormonal supplement. Finally, the plants were evaluated *in vitro* under freezing stresses.

Key words: Semiclonal variation, calli induction, indirect morphogenesis, culture *in vitro*.

INTRODUCCION

El género *Physalis* incluye, aproximadamente, 100 especies entre hierbas perennes y anuales. En Colombia, la especie comestible es *Physalis peruviana* L., conocida con el nombre común de uchuva. Es una planta herbácea que pertenece a la familia *Solanaceae*.

Su cultivo, en 1991, ocupó un área de siembra de 60 hectáreas, aproximadamente, en la Sabana de Bogotá, con una producción estimada de 569.520 toneladas/año, de las cuales 273.065 toneladas fueron exportadas por un valor de U.S.\$1.573.828.

Physalis peruviana, por ser una planta alógama y de propagación, principalmente, por semilla sexual, presenta una gran variabilidad fenotípica en la población. Esta característica no es deseada cuando lo ideal es obtener variedades comerciales de calidad uniforme, alta productividad y con un hábito particular de crecimiento. Una forma de obtener características estables en los cultivares es a través de la micropropagación clonal de individuos seleccionados, mediante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Bernal, 1986).

Las investigaciones concernientes a la regeneración *in vitro* de plantas en el género *Physalis* son limitadas. Además de la utilización de hipocótilos como explante en *Physalis ixocarpa* Brot, para obtener regeneración de plántulas *in vitro* (Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1991), otros autores utilizaron yemas laterales y apicales, fragmentos de hoja, peciolo y tallos (Torres *et al.*, 1991).

La investigación se realizó con el fin de establecer una metodología para la inducción de callos y regeneración adventicia de plántulas a partir del cultivo *in vitro* de hipocótilos de uchuva (*Physalis peruviana* L.), con el objeto de inducir la variación somaclonal y, posteriormente, seleccionar somaclones resistentes al estrés de heladas simuladas. Los somaclones seleccionados fueron micropropagados para su evaluación (Santana, y Angarita, en vía de publicación).

Cuadro 1: Evaluación de la interacción entre BAP, ANA y GA₃ en la inducción de callos y la regeneración adventicia en condiciones de luz y oscuridad.

TRATAMIENTOS	REGULADORES DE CRECIMIENTO (ppm)		
	BAP	ANA	GA ₃
1	0,0	0,0	0,0
2	2,5	0,0	0,0
3	5,0	0,0	0,0
4	0,0	0,5	0,0
5	2,5	0,5	0,0
6	5,0	0,5	0,0
7	0,0	1,0	0,0
8	2,5	1,0	0,0
9	5,0	1,0	0,0
10	0,0	0,0	1,0
11	2,5	0,0	1,0
12	5,0	0,0	1,0
13	0,0	0,5	1,0
14	2,5	0,5	1,0
15	5,0	0,5	1,0
16	0,0	1,0	1,0
17	2,5	1,0	1,0
18	5,0	1,0	1,0

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL VEGETAL

Las semillas, provenientes de un kilo de frutos maduros tipo exportación, fueron desinfectadas superficialmente en una solución de etanol al 70% con 0,1% de Tween 20, por 30 segundos; luego fueron colocadas en una solución comercial de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% (v/v) (1% ingrediente activo) por 10 minutos y se lavaron con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas en agua destilada estéril, en agitación horizontal a 110 r.p.m. y en condiciones de luz continua (lámparas fluorescentes; 18 a 24 mmol m⁻² s⁻¹) a 24 ± 2° C.

MEDIOS DE CULTIVO

Como medio basal se utilizó MS (Murashige y Skoog, 1962), con las interacciones hormonales descritas en el cuadro 1 (condiciones de luz y oscuridad) y en el cuadro 2 (condiciones de luz).

El pH de los medios fue ajustado a 5,7 después de adicionar los reguladores de crecimiento y antes de agregar el agar (6 gL⁻¹).

Se dispensaron 25 ml. del medio en frascos de vidrio de 125 c.c. de capacidad.

Como explantes se utilizaron fragmentos de 0,5 cm de longitud, provenientes de plántulas germinadas de 15 días de edad.

Para el ensayo preliminar (cuadro 1), se tuvieron 20 repeticiones por cada tratamiento (en cada frasco 3 explantes de hipocótilo). Diez de las repeticiones permanecieron en condiciones de oscuridad desde el momento de la siembra hasta la cuarta semana de cultivo; luego, fueron expuestas a luz continua junto con las otras 10 repeticiones que permanecieron siempre en condiciones de luz continua.

El ensayo, que tuvo la interacción con 2,4-D (cuadro 2), se realizó después de obtener los primeros resultados del ensayo preliminar y, para este nuevo ensayo, se tuvieron 10 repeticiones por tratamiento y se mantuvieron en condiciones de luz continua (lámparas fluorescentes: 18-24 mmol m⁻² s⁻¹). Todos los tratamientos de los dos ensayos estuvieron a 23 ± 2°C.

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial de los tratamientos. En los tratamientos, fueron evaluados el número total de callos formados por tratamiento y el número total de plantas regeneradas por tratamiento. La evaluación se realizó durante ocho semanas.

Cuadro 2: Evaluación de la interacción entre 2,4-D, BAP en condiciones de GA₃ y luz constante para la inducción de callos y regeneración adventicia.

TRATAMIENTOS	REGULADORES DE CRECIMIENTO (ppm)		
	GA ₃	BAP	2,4-D
1	1,0	0,0	0,0
2	1,0	0,0	0,5
3	1,0	0,0	1,0
4	1,0	1,0	0,0
5	1,0	1,0	0,5
6	1,0	1,0	1,0
7	1,0	2,0	0,0
8	1,0	2,0	0,5
9	1,0	2,0	1,0

RESULTADOS

INDUCCION DE CALLOS

La inducción de callos, en medios suplementados con BAP, GA₃ en combinación con ANA o 2,4-D, se observó a partir de la

segunda semana de siembra. Después de la cuarta semana de siembra, no hubo diferencias en el número de callos formados entre los tratamientos que permanecieron las cuatro semanas en oscuridad y aquellos que permanecieron siempre en condiciones de luz

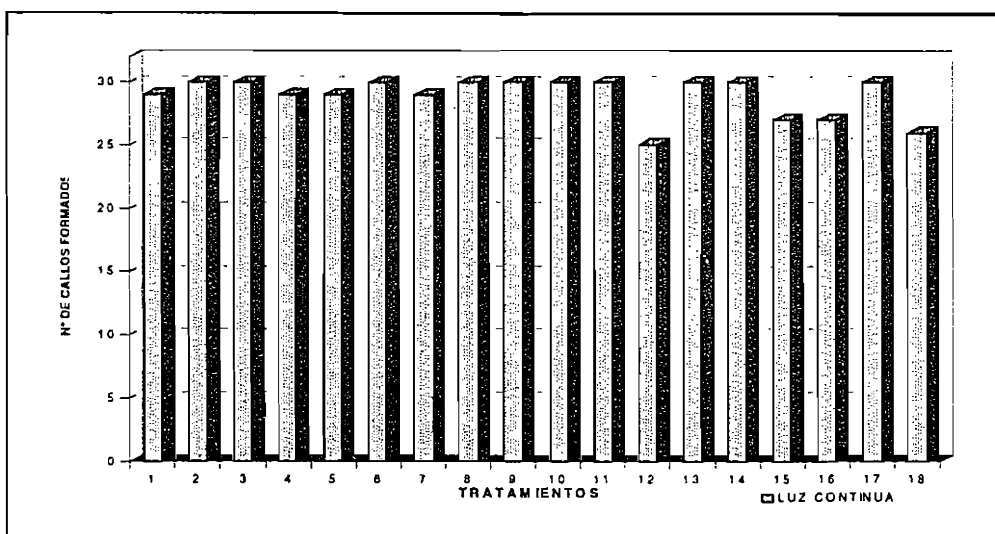


Figura 1. Efecto de las interacciones hormonales (BAP, ANA y GA3 en la inducción de callos. Evaluación 4 semanas después de la siembra.

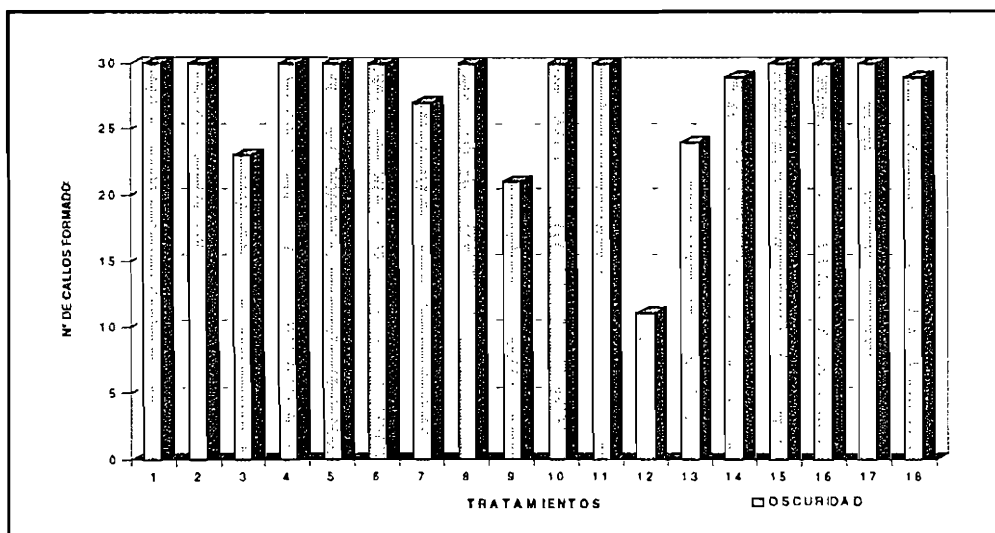


Figura 2. Efecto de las interacciones hormonales (BAP, ANA y GA3 en la inducción de callos. Evaluación 4 semanas después de la siembra.

continúa en el ensayo preliminar (Fig. 1 y 2). También, se observó la inducción de callos en todos los tratamientos suplementados con,

por lo menos, uno de los reguladores de crecimiento utilizados: ANA; GA₃, 2,4-D o BAP en concentraciones menores a 2,5 ppm. Así

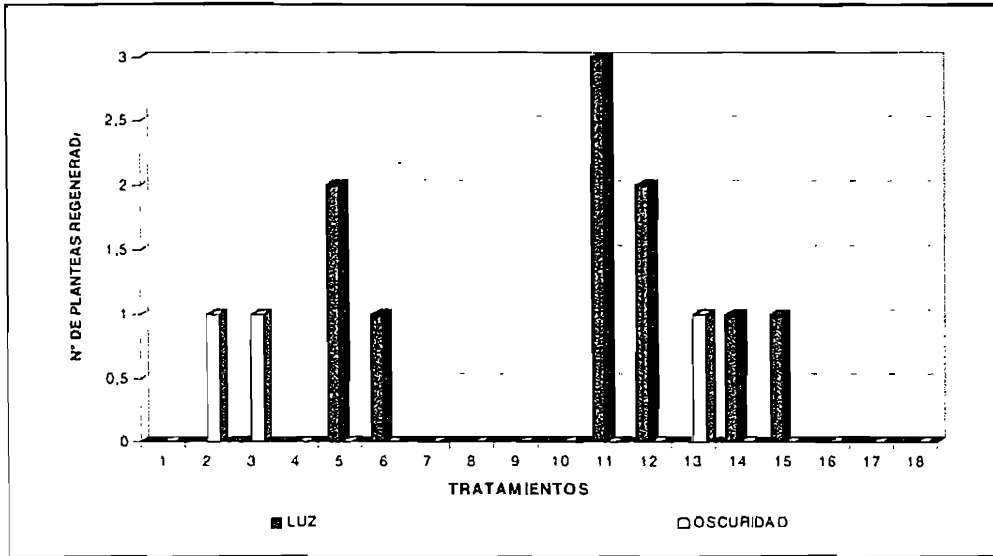


Figura 3. Efecto de las interacciones hormonales (BAP, ANA y GA₃) y condiciones de luz** en la regeneración de plántulas. Evaluación 4 semanas después de la siembra.

**Tratamientos en oscuridad sólo durante las 4 semanas iniciales del cultivo.

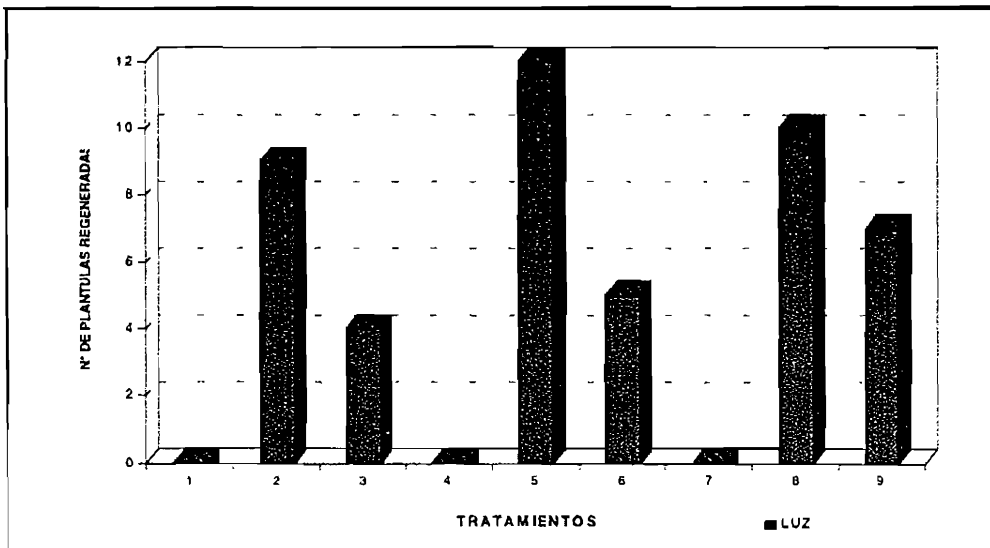


Figura 4. Efecto de las interacciones hormonales (BAP, ANA y GA₃) y condiciones de luz** en la regeneración de plántulas. Evaluación 4 semanas después de la siembra.

mismo, en los tratamientos sin algún suplemento hormonal, se observó la inducción de callos (Fig. 1 y 2).

REGENERACIÓN DE PLANTAS

En medios suplementados con ANA, BAP y GA₃, la regeneración de plantas se observó desde la segunda semana después de siembra, a partir de pequeños brotes verdes que aparecieron en la superficie de los callos. Al terminar la octava semana de cultivo, el número nuevas de plantas regeneradas fue nulo o muy bajo tanto en condiciones de luz como en oscuridad. El tratamiento suplementado con 2,5 ppm de BAP y 1,0 ppm de GA₃ mostró un total de tres plantas regeneradas (Fig. 3). De otra parte, el medio suplementado con GA₃ (1,0 ppm), 2,4-D (0,5 ppm) y BAP (1,0 ppm) indujo el mayor número de plantas regeneradas, mientras que los tratamientos (1;4 y 7) carentes de 2,4-D no indujeron caulogénesis (Fig. 4).

Dentro de las plantas regeneradas y micropropagadas, se observaron somaclones con variaciones en las características morfológicas de tallo y hojas en condiciones *in vitro*. Algunos somaclones fueron acaules, con brotación basal múltiple de hojas suculentas, nervaduras poco notorias y limbo entorchado. También se observaron somaclones albinos de porte bajo, acaules con brotación basal, hojas translúcidas y sistema radical no desarrollado.

DISCUSION

La inducción de callos ha sido reportada en forma reciente en *Physalis ixocarpa* Brot. (Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1991) a partir de hipocótilos y en *Physalis peruviana* L. a partir de yemas laterales y apicales (Torres *et al.*, 1991).

Aunque la inducción de callos en uchuva no dependió de manera marcada de las condiciones de luz, en presencia de ésta los callos presentaron brotes verdes, debido a que la luz estimula la producción de clorofila (Lal & Lal, 1990). De otra parte, la proliferación de la masa callosa puede ser atribuida al efecto de las auxinas (ANA ó 2,4-D) en la estimulación de la división celular, que, en

forma combinada con las citoquininas (BAP), promueve la disociación de tejidos en grupos celulares. (Skoog y Miller, 1957). Este hecho podría deberse a una acción sinérgica entre los reguladores de crecimiento (Setterfield, 1963) junto con la acción de auxinas y citoquininas endógenas (Skoog y Miller, 1957). También, por la interacción con compuestos orgánicos como las vitaminas (inisol y tiamina) presentes en el medio de MS (Linsmaier y Skoog, 1965). De otra parte, la inducción de callos en ausencia de auxinas (ANA o 2,4-D) o de citoquininas (BAP) puede deberse a una habituación doble a citoquininas y auxinas (Meins *et al.*, 1980).

La regeneración adventicia de plantas no fue observada en medios suplementados con ANA. Pero fue estimulada en los tratamientos suplementados con, sólo, BAP en combinación con GA₃ y en presencia de luz. De otra parte, la acción combinada entre 2,4-D (0,5 p.p.m.), BAP (1,0 p.p.m.) y GA₃ (1,0 ppm. indujeron caulogénesis, mientras que tratamientos sin 2,4-D no indujeron el proceso. Es posible que el suplemento de ANA en el medio inhiba la caulogénesis aún en bajas concentraciones o que las concentraciones de auxinas endógenas sean lo suficientemente altas para producir el mismo efecto (Torres *et al.*, 1991). Además, los resultados sugieren que, en el proceso de caulogénesis, es indispensable el complemento hormonal de 2,4-D. Es posible, también, que haya un efecto sinérgico entre GA₃, 2,4-D y BAP (Margara, 1969) que favorecen el proceso de caulogénesis (Al-Khayri *et al.*, 1992). De otra parte, la luz fue un factor determinante para estimular la caulogénesis (Fig. 3 y 4). La variación morfológica encontrada en algunos somaclones pudo ser debida a los cambios ocurridos durante la fase callosa en las células o los grupos celulares que regeneraron plantas. Además, algunos reguladores de crecimiento, como el 2,4-D, pueden inducir cambios morfológicos (Ramírez-Malagón, y Ochoa-Alejo, 1991). Asimismo, el 2,4-D puede alterar la función y estructura de los cloroplastos (Nadakavukaren & McCracken, 1977), de tal forma que es posible la regeneración de plantas albinas o variantes en la pigmentación de tallos y hojas (Bingham & McCoy, 1986).

BIBLIOGRAFIA

AL-KHAYRI, J., HUANG, F., MORELOCK, T. Y BASHARAR, T. 1992. Stimulation of shoot regeneration in spinach callus by gibberellic acid. *HortScience* 27(9):1046.

BERNAL, J. 1986. La uchuva (*Physalis peruviana* L.), historia, taxonomía y biología. Memorias primer curso nacional de uchuva. Tunja.

BINGHAM, E. Y MCCOY, T. 1986. Somaclonal variation in alfalfa, *Plant Breed. Rev.* 4: 123.

LAL, R. Y LAL, S. 1990. Crop Improvement utilizing biotechnology. CRC Press, Florida.

LINSMAIER, E. Y SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 18:100-127.

MARGARA, L. 1969. Etude des facteurs de la neoformation *in vitro* de bourgeons inflorescentiels chez *Cichorium intybus* L. Etude méthodologique. *Colloq. CNRS* 1967:71-82.

MEINS, F., LUTZ, J. R. Y FOSTER, R. 1980. Factors influencing the incidence of habituation for cytokinin in tobacco pith tissue in culture. *Planta* 150:264-68.

MURASHIGE, T. Y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physio.* 15:473-97.

NADAKAVUKAREN, M. Y MCCRACKEN, D. 1977. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on the Structure and function of developing chloroplasts. *Planta* 137:65-69.

RAMÍREZ-MALAGÓN, R. Y OCHOA-ALEJO, N. 1991. Adventitious shoot formation and plant regeneration from tissues of tomatillo *Physalis ixocarpa* Brot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25:185-88.

SETTERFIELD, G. 1963. Growth regulation in excised slice of Jerusalem artichoke tuber tissue. *In* : cell differentiation. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 17:98-126.

SKOOG, F. Y MILLER, C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro* . *In* :The Biological Action of Growth Substances, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, Ed. Porter, HB., 11: 118-131.

TORRES, O., PEREA, M., LÓPEZ, A., SALAMANCA, A. Y MIKAN, J. 1991. The use of *Physalis peruviana* L., tissue culture for breeding and selection. *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*, ed. Hawkes, Lester Nee & N. Estrada, Londres, 429-32.