

EVALUACION DE DIFERENTES MEDIOS PARA LA CONSERVACION DE GERMOPLASMA DE UVILLA (*Physalis peruviana* L.) IN VITRO*

Hernando Criollo Escobar¹
German Chavez Jurado²
Tulio César Lagos Burbano³

RESUMEN

Con el objeto de establecer un medio de cultivo para la producción de plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) *in vitro*, se estudiaron seis tratamientos correspondientes al medio básico de Murashige-Skoog con variaciones en las concentraciones hormonales y utilizando meristemas. Todos los tratamientos indujeron caulogénesis y filogénesis pero solamente el tratamiento correspondiente al medio de papa Murashige 62 con ANA 0,02 ppm y CIN 0,2 ppm (T6) indujo a la formación de plantas completas.

Palabras clave: *Physalis peruviana*, cultivo in vitro.

ABSTRACT

In order to establish a culture medium for the production of gooseberry plants (*Physalis peruviana* L.) *in vitro*, six treatments corresponding to the basic culture medium of Murashige-Skoog with variations in the hormonal concentrations, using meristems were evaluated. All the treatments induced callus and vegetative shoots but only the treatment with Murashige 62 with ANA 0,02 ppm + CIN 0,2 ppm (T₆) induced to formation of complete plants.

Key words: *Physalis peruviana*, culture in vitro.

* Contribución Línea de Investigaciones en Producciones de frutales andinos. Sistema de Investigaciones, Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pasto, Nariño, Colombia.

¹ Profesor Asociado. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pasto, Nariño, Colombia. E-mail: heriollo@hotmail.com

² Ingeniero Agrónomo. Esp. Ecología. Laboratorio de Tejidos vegetales, Universidad de Nariño, Pasto, Nariño, Colombia.

³ Profesor Asistente. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pasto, Nariño, Colombia. E-mail: pasto78@col2.telecom.com.co

INTRODUCCION

La conservación de los recursos genéticos es una tarea que debe preocupar a todos los países ya que de su diversidad dependerá la posibilidad de obtener nuevos, más resistentes y productivos materiales de cualquier especie en particular. Querol (1988) considera que la conservación de recursos puede evitar que la seguridad alimentaria de un país, se vea amenazada por la falta de variabilidad genética.

Recursos no convencionales como la uvilla, dada su alta aceptación como fruta exótica en los países desarrollados, pueden convertirse en un futuro próximo en cultivos comerciales mejorados, con el peligro de reducir su base genética y limitar la capacidad de enfrentarse a situaciones de riesgo por enfermedades y plagas (Ford-Lloyd y Jackson, 1986 y Arias *et al.*, 1987).

En cuanto a las formas de conservación, Querol (1988) considera que la mejor manera de conservación del germoplasma vegetal es conservarlas *in situ*; sin embargo hay otros métodos válidos como los jardines de colecta o en almacenes de semillas, plántulas, polen, células en cultivo o polen.

La conservación de recursos genéticos mediante los cultivos *in vitro* crioconservados es una alternativa de gran importancia en la actualidad, dadas las dificultades económicas que conlleva el mantenimiento de los jardines de colectas y la conservación *in situ* por la acelerada tasa de destrucción de recursos en zonas no protegidas. Según Ford-Lloyd y Jackson (1986) estos métodos consisten en introducir explantes de las plantas a conservar, en medios de cultivo estériles, manteniéndolos libres de patógenos para hacer viable su utilización en el futuro. A estas técnicas se añade el sometimiento de los tejidos producidos *in vitro* a ultra bajas temperaturas, lo cual abre la posibilidad de almacenar el germoplasma indefinidamente en una especie de "animación suspendida" (Sakai, 1965; Sakai and Nishiyama, 1978; Wilkins *et al.*, 1982; Wilkins y Dodds, 1983).

Estas consideraciones hacen de la conservación *in vitro* una de las mejores opciones para el mantenimiento de especies vegetales en peligro de extinción y en zonas con escasos recursos que dificulten su mantenimiento en el campo; por esa razón se planteó el presente trabajo con miras a determinar la mejor posibilidad de producir

plantas completas de uvilla en el Laboratorio, que permita conservar en espacio reducido y a menor precio, la colecta de *Physalis peruviana* que posee la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño.

METODOLOGIA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Nariño adscrito a la Facultad de Ciencias Agrícolas, ubicado en la ciudad universitaria Torobajo, municipio de Pasto, departamento de Nariño a una altura de 2540 msnm, con 20 °C de temperatura y 75% de humedad relativa.

Los esquejes para la extracción de yemas fueron colectados al azar de los cultivares de la colección de uvilla perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño, localizada en el Centro Experimental de Botana de la Universidad de Nariño, ubicada en Pasto (Nariño, Colombia) a 2820 msnm, con una temperatura media de 13 °C y una precipitación media anual de 840 mm.

El material vegetal se llevó al laboratorio donde se realizó una selección, eliminando todo aquel material que por el manipuleo o en el transporte, presentaba daños mecánicos o algún deterioro. Posteriormente, en los esquejes se ubicaron las yemas apicales y axilares de tipo vegetativo para su posterior aislamiento.

Medio de cultivo (primera fase). Se preparó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con las correspondientes sales minerales, vitaminas (Acido nicotínico 1 meq/l, Piridoxina 1 meq/l, Tiamina 10 meq/l, Inositol 100 meq/l), sacarosa al 3% (30 g/l) y agar al 0,6% (6g/l) en los requerimientos establecidos como medio básico y haciendo una adición de hormonas según lo establecido por Santana y Angarita (1999), para esta especie (AG₃ 1,0 ppm, 2,4D 0,5 ppm y BAD 1,0 ppm).

Una vez preparado el medio de cultivo y homogeneizados sus componentes, se procedió a ajustar el pH a 5,7, utilizando NaOH 0,5 y 1 N y HCl 0,5 y 1 N. Luego se adicionó el agar (0,6 %) y dosificando en frascos tipo mayonesa (125 ml), con 10 ml de medio de cultivo en cada uno; los frascos preparados se esterilizaron en autoclave a 121 °C de temperatura, con 15 psi durante 20 minutos.

Preparación del material vegetal. Se realizaron lavados de los esquejes completos con agua y a presión para la eliminación de contaminantes que pudieran estar presentes con la ayuda de un bisturí número 11, se eliminaron las hojas de los esquejes y se segmentaron en explantes, cada uno con una yema (apical o axilar).

Por otro lado, se preparó una solución de jabón (tipo hospitalario) en agua destilada estéril al 9,5 %, al cual se le adicionaron 3 gotas de Tween-80. En esta solución se sumergieron los explantes durante 10 minutos con agitaciones periódicas, al cabo de los cuales se hicieron 5 lavados con agua destilada para eliminar los residuos del jabón.

Seguidamente se preparó una solución de Estreptomicina al 5 % más Benomil 0,5 g/l, más Tween-80 (tres gotas) en agua destilada. Se sumergió el material en esta solución durante diez minutos con agitaciones periódicas. Luego se procedió a realizar cinco lavados con agua destilada.

Posteriormente, y bajo condiciones de cámara de flujo laminar aséptica se colocó el material vegetal en alcohol etílico de 70° blanco durante 20 segundos y en agitación continua haciendo cinco lavados con agua destilada estéril; de la misma forma y bajo las mismas condiciones se preparó una solución de Hipoclorito de sodio (Clorox) al 2,5 % en agua destilada estéril más tres gotas de Tween-80 durante 20 minutos con agitaciones periódicas. Finalmente, al material vegetal se le hicieron cinco lavados con agua destilada estéril, dejándolo con el agua del último lavado.

Preparación del equipo e instrumental. Todo el instrumental (pinzas, bisturíes, gradillas, frascos, etc.), el estereoscopio y la cámara de flujo laminar, se sometieron a una rigurosa esterilización con alcohol de 90°; el cuarto de aislamiento con rayos ultravioleta por 24 horas y aspersiones de hipoclorito de sodio y alcohol de 90°.

Inoculación. La inoculación se realizó aislando las yemas apicales y axilares del segmento del tallo y utilizando una cuchilla de bisturí número 11 y bajo el campo visual del estereoscopio, descartando aquellas yemas deterioradas o aquellas correspondientes a yemas florales. De las yemas vegetativas se obtuvieron los meristemos con dos primordios foliares, los cuales se introdujeron e inocularon en el medio de cultivo. Todas estas labores se realizaron cerca al mechero.

Incubación. Todo el cultivo fue llevado al cuarto de incubación y se colocó en la estantería bajo condiciones de temperatura constante (20 °C), iluminación continua y una humedad relativa del 75%. Con observaciones diarias se evaluó el grado de contaminación, la cual fue negativa para las 20 unidades experimentales, sino que permitieron la formación de callos, presentándose una estructura de constante crecimiento y con pigmentación de color verde.

La formación y crecimiento de los callos se mantuvo durante 14 semanas, tiempo en el cual se pudo observar filogénesis y en algunos casos caulogénesis. Teniendo en cuenta estas observaciones se propuso llevar a cabo una transferencia y replicado de callos a medios de cultivo con cambio y/o adición de hormonas a diferentes concentraciones a las propuestas por Santana y Angarita (1999).

Tratamientos (segunda fase). En esta fase se prepararon los medios de cultivo correspondientes a los tratamientos planteados, los cuales consideraron varios niveles de hormonas, utilizando el mismo medio de M-S (1962), suplementado con vitaminas. Se formularon seis tratamientos con veinte repeticiones por tratamiento, de acuerdo a un diseño irrestrictamente al azar (DIA). Todos los tratamientos se ubicaron bajo las mismas condiciones de fotoperíodo e intensidad lumínica (2000 lux) utilizadas en la primera fase. Cada una de las unidades experimentales correspondió a un frasco de vidrio de 125 ml. A cada frasco se le agregaron 10 ml de medio de cultivo. Los tratamientos fueron los siguientes:

T1 = M-S + vitaminas + AG₃ 1,0 ppm + 2,4-D 0,5 ppm, AIA 0,5 ppm + BAP 1,0 ppm.

T2 = M-S + vitaminas + AG₃ 1,0 ppm + 2,4-D 0,75 ppm, BAP 1,0 ppm.

T3 = M-S + vitaminas + AG₃ 1,0 ppm + 2,4-D 1,0 ppm, BAP 1,0 ppm.

T4 = M-S + vitaminas + AG₃ 1,0 ppm + AIA 0,5 ppm, BAP 1,0 ppm.

T5 = M-S + vitaminas + AG₃ 1,0 ppm + AIA 0,75 ppm, BAP 1,0 ppm.

T6 = Medio básico de papa (Murashige 62) + ANA 0,02 ppm + CIN 0,2 ppm; pH 5,7.

Todos los tratamientos se complementaron con Sacarosa 30 g/l, Agar 6 g/l (1,2 g/ml), Acido nicotínico 1 mg/l, Piridoxina 12 mg/l, Tiamina 10 mg/l, Inositol 100 mg/l.

Repicado de callos. Los callos obtenidos en el ensayo o preliminar se subdividieron teniendo en cuenta que cada fragmento llevase consigo por lo menos una es-

estructura formada, ya sea tallo con hojas u hojas y procurando que fueran del mismo tamaño. En cada unidad experimental debidamente rotulada, se inoculó una de estas estructuras, bajo condiciones asépticas y en la cámara de flujo laminar, cerca del mechero.

Posteriormente las unidades experimentales se llevaron al cuarto de incubación donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (20 °C), iluminación constante a 2000 lux de intensidad lumínica y 75 % de humedad relativa.

Evaluaciones. A partir del quinto día se realizaron observaciones sobre porcentajes de contaminación; a las cuatro semanas se determinó en cada unidad experimental el número de tallos y de hojas formadas, número de plantas con organogénesis completa y el peso final de los tejidos formados; esta última variable con base en cinco unidades experimentales tomadas al azar para poder conservar el material restante.

Análisis estadístico. Las variables fueron sometidas a Análisis de Varianza y en aquellas con diferencias estadísticas se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a la gran variabilidad observada dentro de los datos correspondientes a cada unidad experimental en cuanto al número de tallos y número de hojas (Tabla 1) no fue posible realizar el Análisis de Varianza para estas variables, ya que el modelo siempre mostró baja significancia, por no cumplir los supuestos mínimos para su aplicación. Esta alta variabilidad se puede deber en parte a que los explantes se tomaron indiscriminadamente de la colección y es posible que cada material de la colecta reaccione de manera diferente a las variaciones de concentración hormonal; de la misma manera se puede suponer que esta gran variabilidad en el número de estructuras caulinares y foliares observadas en cada unidad experimental, se debió a que en el proceso inicial de toma de meristemas, estos se tomaron tanto de los ápices como de las axilas, ya que según Navarro (1987) los meristemas apicales son los inóculos más efectivos para la producción de plantas completas.

Tabla 1. Promedios de número de tallos y de hojas obtenidos en los medios de cultivo analizados.

| | T1 | | T2 | | T3 | | T4 | | T5 | | T6 | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | NTall | Hojas | NTall | Hojas | NTall | Hojas | NTall | Hojas | NTall | Hojas | NTall | Hojas |
| Promedio | 3,20 | 9,20 | 5,40 | 17,20 | 6,00 | 16,6 | 9,8 | 19,8 | 4,80 | 12,80 | 4,20 | 12,60 |
| Desv Std. | 2,59 | 9,42 | 4,10 | 10,80 | 2,35 | 8,61 | 2,17 | 3,63 | 4,21 | 7,98 | 1,30 | 2,41 |

Todos los tratamientos permitieron la formación de órganos; sin embargo, el único que favoreció la formación de plantas completas fue el tratamiento 6 que se caracterizó por la presencia de las hormonas ANA y cinetina en el medio de cultivo. Debido a las diferencias entre el contenido hormonal de éste (T6) y los demás tratamientos es necesario explorar otras relaciones hormonales para poder producir plantas completas, ya que la manipulación de auxinas y citocininas en los medios de cultivo permite, según Gerge y Sherrington (1984) y Debergh y Zimmerman, (1991), citados por Segura (1993), controlar la organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales; además se deben tener en cuenta las relaciones auxinas/citocininas, ya que según el modelo Skoog-Miller, la diferencia de yemas vegetativas (caulogénesis) es promovida por balances auxinas/citocininas favorables en éstas últimas, mientras que los balances favorables a las auxinas inducen la formación de raíces (rizogénesis) (Segura, 1993).

La evaluación del peso de los tejidos producidos en cada uno de los tratamientos (Tabla 2) permitió establecer diferencias estadísticas entre los tratamientos, lo cual se traduce en diferencias en cuanto al crecimiento de los tejidos en cada uno de los medios analizados (Tabla 3).

Tabla 2. Peso (mg) de los tejidos de uvilla formados en diferentes medios de cultivo y en cada unidad experimental.

| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 |
|----------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| REP 1 | 31,41 | 1022,25 | 1737,04 | 539,63 | 1953,05 | 974,51 |
| REP 2 | 384,00 | 271,05 | 1362,62 | 4001,40 | 3566,29 | 1752,20 |
| REP 3 | 361,54 | 275,14 | 1646,15 | 2820,54 | 1495,52 | 2756,28 |
| REP 4 | 13,16 | 593,42 | 3685,33 | 3451,00 | 2192,57 | 395,30 |
| REP 5 | 392,09 | 484,00 | 1942,35 | 3021,54 | 3084,52 | 1475,52 |
| PROMED | 236,44 | 529,17 | 2074,70 | 2766,82 | 2458,39 | 1470,76 |
| Tukey (0.05) * | C | BC | BA | A | A | BAC |

* Promedios que contienen la misma letra no difieren estadísticamente

Tabla 3. Análisis de Varianza para el peso de tejido de uvilla alcanzado en diferentes medios de cultivo.

| F V | GL | CM | Fc | Pr>F |
|--------------|----|------------|------|--------|
| Tratamientos | 5 | 5345639,48 | 7,56 | 0,0002 |
| Error | 24 | 707420,90 | | |
| Total | 29 | | | |

La prueba de comparación de promedios de Tukey (Tabla 4) mostró que los inóculos sembrados en los medios correspondientes a los tratamientos 4 (2766,8 mg) y 5 (2458,4 mg) alcanzaron el mayor peso al cabo de cuatro semanas de crecimiento, con diferencias estadísticas significativas cuando se compararon con los inóculos crecidos en el medio básico (T1), los cuales solamente alcanzaron un peso final de 236,4 mg; no se observaron diferencias estadísticas entre los demás tratamientos. Estos resultados conducen a plantear la posibilidad de mejorar las relaciones hormonales correspondientes a los tratamientos 4 y 5, si se desean crecimientos rápidos y plantas completas.

Las diferencias encontradas en el peso de los tejidos formados en cada uno de los medios estudiados las explica Devlin (1980) citado por Barba (1987) cuando afirma que las auxinas actúan de modo diverso en el crecimiento, incrementando el

contenido osmótico de las células y la permeabilidad al agua, reduciendo la presión de la pared o aumentando la síntesis de ARN, proteínas específicas y aún de la misma pared, provocando incrementos en la plasticidad de la pared celular, lo cual repercute en el crecimiento.

CONCLUSIONES

De los medios de cultivo analizados, los correspondientes a los tratamientos T4 y T5 se mostraron como los más promisorios en cuanto a la obtención de mayores velocidades de crecimiento de los tejidos, expresadas en función de peso fresco; el medio básico (T1) presentó los menores pesos promedios.

El tratamiento T6, con ANA y cinetina, fue el único que permitió la formación y desarrollo de plantas completas de uvillas (*Physalis peruviana* L.).

BIBLIOGRAFIA

- ARIAS, D., BELTRAN, J. NARVÁEZ, J. AND ROCA, W. Conservation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasm in vitro; effect of sucrose, mannitol and sorbitol on the growth and viability of shoot cultures. In: International Congress of plant tissue culture tropical species. Bogotá, Colombia, 1987. pp. 20
- BARBA, A. Reguladores del crecimiento vegetal. En: Cultivo de Tejidos vegetales. México, Editorial Trillas, 1987. 233 p.
- QUEROL, D. Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado. Aproximación técnica y económica. Lima, Perú, Industrial Gráfica, 1988. 218 p.
- FORD-LLOYD, B. AND JACKSON M. Plant Genetic Resources. An introduction to their conservation and use. London, Great Britain, Edward Arnold Publishers Ltd. 1986. 146 p.
- NAVARRO, S. Cultivo de meristemos. En: Cultivo de tejidos vegetales. México, Editorial Trillas, 1987. 233p.

SAKAI, A. Survival of plant tissue at super low temperatures. Relations between effective prefreezing temperatures and degree of frost hardiness. *Plant physiology*, 40:882-887. 1965.

SAKAI, A. AND NISHIYAMA, Y. Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *Horticultural Science*. 13:225-227. 1978.

SANTANA, G. Y ANGARITA, A. Regeneración adventicia de somaclones de uchuva. www.usc.unal.edu.co/un/facultades/agronomia/.esp/revista/artic/fuchuu.htm. 1999. 6p.

WILKINS, C. AND DODDS, J. The application of tissue culture technique genetic conservation. *Science progress, Oxford*, 68:259-284. 1983.

WILKINS, C., BENGOCHEA, T. AND DODDS, J. The use of in vitro method plant genetic conservation. *Outlook on Agriculture*, 11:67-72. 1982.