



## NOTA CORTA [SHORT NOTE]

### ALARGAMIENTO Y ENRAIZAMIENTO DE VITROPLANTAS DE CEREZA DEL PERÚ (*Physalis peruviana* L.)

### [ENLARGEMENT AND ROOTING OF PERUVIAN CHERRY (*Physalis peruviana* L.) VITROPLANTS]

Oscar Montiel Martínez-Montiel<sup>1</sup>, Miriam Cristina Pastelín-Solano<sup>1\*</sup>, Elsa Ventura-Zapata<sup>2</sup>, Odón Castañeda-Castro<sup>1</sup>, María Teresa González-Arno<sup>1</sup>, Marina Guevara-Valencia<sup>1</sup>, Alfonso Luna-González<sup>1</sup> y Carlos Díaz-Ramos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. Prolongación Oriente 6. No. 1009, Orizaba, Veracruz, México.

<sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Departamento de Biotecnología. Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, C.P. 62731, Yautepec, Morelos, México.

\*Autor para correspondencia: mpastelin@uv.mx

#### RESUMEN

La cereza del Perú (*Physalis peruviana* L.) es una planta importante por su alto contenido en minerales, vitaminas A y C, su efecto antidiabético, además contribuye a la disminución de albúmina en riñones. El cultivo de tejidos permitiría su propagación masiva en corto plazo. En el presente trabajo se estudió el efecto de la concentración de las sales Murashige y Skoog (MS), en el alargamiento y enraizamiento *in vitro*; además se comparó el sustrato tradicional de aclimatación de plántulas con un sustrato hidropónico. Para el enraizamiento *in vitro* los mejores resultados se obtuvieron con las sales MS a una concentración del 50 %, lo que produjo mayor altura en brotes (14.4 cm), incremento en tamaño de la raíz (6 cm), en número de hojas (4.3) y en número de yemas (3.3). El enraizamiento ocurrió simultáneamente con el alargamiento *in vitro* y no se encontraron diferencias significativas entre los dos sistemas de aclimatación aplicados. Se logró 100 % de plántulas aclimatadas establecidas en un sistema bajo cubierta, hasta su fructificación en un periodo de 90 días.

**Palabras clave:** *in vitro*; *Physalis peruviana*; alargamiento.

#### INTRODUCCIÓN

La cereza del Perú (*Physalis peruviana*) es una planta originaria de los Andes Peruanos, a la que se le han atribuido diversas propiedades medicinales, entre las que destacan efecto antidiabético, reconstrucción y

#### SUMMARY

The Peruvian cherry (*Physalis peruviana* L.) is an important plant due to its high content of minerals, vitamins A and C, with an antidiabetic effect, also contributing to decrease albumin in the kidneys. Tissue culture techniques could allow its massive propagation in a short time. In this work, the effect of Murashige and Skoog (MS) salts concentrations on *in vitro* enlargement and rooting of this plant was studied; also the traditional acclimation substrate of plantlets was compared with a hydroponic acclimation substrate. The best rooting results were obtained by using a 50 % concentration of MS salts, producing higher shoots (14.4 cm), increase in root size (6 cm), number of leaves (4.3), and number of buds (3.3). Rooting took place simultaneously with *in vitro* shoots enlargement, and no significant differences were observed between acclimation systems. One hundred percent of acclimated plantlets were established in a covered system until fructification, in a period of 90 days.

**Key words:** *in vitro*; *Physalis peruviana*; enlargement.

fortificación del nervio óptico y disminución de albúmina en riñones (Repo-Carrasco, 2003). Ha adquirido gran importancia por su alto contenido de minerales y vitaminas A y C, elementos indispensables para el crecimiento, desarrollo y correcto funcionamiento de los diferentes órganos humanos.

Se conocen pocos estudios de los sistemas de propagación de esta planta. La semilla es la más utilizada para este fin, ya que presenta un porcentaje de germinación de 85 a 90 % aproximadamente. Sin embargo, las semillas originan plantas con frutos que presentan alta variabilidad. Sandhu *et al.* (1989) mencionan que la cereza del Perú propagada por semillas varía en crecimiento, vigor, rendimiento y calidad del fruto. Según Angarita y Santana (1997), por ser una planta alógama y de propagación sexual, la cereza del Perú muestra gran variabilidad fenotípica en la población. Esta característica no es deseada, lo ideal es obtener variedades comerciales de un hábito particular de crecimiento, calidad uniforme y alta productividad. La técnica del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ha sido utilizada para la micropropagación de muchas especies alimenticias (Arribas, 1999). Sin embargo, su aplicación en una nueva especie requiere del establecimiento de una metodología específica para cada etapa de la micropropagación.

El uso potencial de la cereza del Perú en México hace indispensable establecer un sistema eficiente de multiplicación de esta especie, que permita hacer extensivo su cultivo. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* representa una alternativa para la propagación vegetativa, especialmente si se logra desarrollar un sistema con rendimientos aceptables.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología eficiente que permita el enraizamiento *in vitro* de la cereza del Perú y su adaptación bajo cubierta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Docencia, Investigación y Servicio de Biotecnología y Criobiología Vegetal y en la Parcela Experimental Agrícola, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana.

Se utilizaron vitroplantas de cereza del Perú en etapa de multiplicación, proporcionadas por el Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, ubicado en Yauatepec, Morelos. El trabajo de investigación se desarrolló en tres etapas: 1) Evaluación del efecto de la concentración de sales de MS (Murashige y Skoog, 1962) en el medio sobre el alargamiento y enraizamiento *in vitro* de los brotes; 2) Evaluación del sustrato en la aclimatación de plántulas; y 3) Evaluación del traslado de vitroplantas a condiciones de sistema bajo cubierta.

El medio de cultivo utilizado fue el MS adicionado con las vitaminas: tiamina 0.9 mg L<sup>-1</sup>, ácido fólico 0.5 mg L<sup>-1</sup>, biotina 0.05 mg L<sup>-1</sup>, y suplementado con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>. El pH se ajustó a 5.8 ± 0.1 con NaOH ó HCl 0.1 N. Como agente gelificante se utilizó agar-agar en 7 g L<sup>-1</sup>. Finalmente, se esterilizó en autoclave vertical a 120 °C durante 15 min. El banco de germoplasma se mantuvo en un cuarto de incubación de ambiente controlado, con luz blanca fría fluorescente, cuya radiación fotosintéticamente activa fue de 50 µM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, un fotoperiodo de 16:8 h y una temperatura promedio de 26±2 °C.

### Mantenimiento *in vitro* del germoplasma de la cereza del Perú

Durante la multiplicación de la cereza del Perú se seleccionaron plántulas con características vegetativas atractivas (vigor, color, altura); se obtuvieron como explantes partes del tallo con un nudo de aproximadamente 3 cm de longitud, los cuales se colocaron en el medio de cultivo MS adicionado con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, tiamina 0.9 mg L<sup>-1</sup>, ácido fólico 0.5 mg L<sup>-1</sup>, biotina 0.05 mg L<sup>-1</sup>, BAP 1.7 mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1 mg L<sup>-1</sup>, agar-agar 8 g L<sup>-1</sup> y pH 5.8; los sub-cultivos se realizaron a los 30 días. Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones ambientales indicadas anteriormente.

### Concentraciones de sales MS en el medio, en el alargamiento y enraizamiento de los brotes

Se transfirieron, bajo condiciones asépticas, brotes de 1 cm de altura provenientes del medio de multiplicación, y se colocaron en tubos de ensayo con 10 mL de medio de cultivo. Se colocaron dos tratamientos: 1) Sales MS al 100 %, adicionado con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, tiamina 0.9 mg L<sup>-1</sup>, ácido fólico 0.5 mg L<sup>-1</sup>, biotina 0.05 mg L<sup>-1</sup>, BAP 0.2 mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1 mg L<sup>-1</sup>, IBA 0.5 mg L<sup>-1</sup> agar 8 g L<sup>-1</sup> y pH 5.8; y 2) Sales MS al 50 %, adicionado con azúcar 30 g L<sup>-1</sup>, tiamina 0.9 mg L<sup>-1</sup>, ácido fólico 0.5 mg L<sup>-1</sup>, biotina 0.05 mg L<sup>-1</sup>, agar-agar 8 g L<sup>-1</sup> y pH 5.8. En experimentos previos, como consecuencia de la adición de reguladores de crecimiento, se observó la formación excesiva de callos en la base de las plántulas durante esta etapa, por lo que en el tratamiento 2 no se utilizaron reguladores de crecimiento. Las variables a evaluar a los 15 y 25 días después de su cultivo fueron: 1) tamaño del explante, 2) tamaño y número de raíces, 3) número de hojas, 4) número de yemas, y 5) porcentaje de callo.

### Los sustratos en la aclimatación de plántulas de la cereza del Perú

Se trasplantaron en vasos de unicel las plántulas de 8 cm de altura producidas *in vitro* provenientes de la etapa de enraizamiento y alargamiento. Se establecieron dos tratamientos: 1) Hidroponía, y 2) Sustrato orgánico (peat moss) e inorgánico (tezontle con una granulometría de 2.01 a 3.36 mm) en una proporción 1:2. Los vasos fueron cubiertos con una bolsa plástica transparente, con control de la humedad relativa. La bolsa se perforó cada dos días con la intención de que la planta se fuera aclimatando al ambiente externo, hasta transcurrir 30 días. Esta etapa tuvo como propósito evaluar diferentes sustratos para la aclimatación. Si no se lleva a cabo cuidadosamente el proceso durante el cual se transfieren las plántulas de condiciones *in vitro* a *in vivo*, pueden perderse gran cantidad de plantas. Las variables evaluadas fueron: 1) Supervivencia (%), 2) Altura de la planta, y 3) Número de yemas. Las condiciones *ex vitro* no son asépticas, pero se controlaron los factores luz, temperatura y humedad relativa.

### Traslado de plantas aclimatadas a condiciones de sistema bajo cubierta

Después de que las plantas permanecieron 30 días en la etapa de aclimatación, se llevaron al invernadero. Las plantas provenientes del proceso de aclimatación se colocaron en bolsas negras con capacidad para 5 kg. Las bolsas se arreglaron en una cuadrícula a una

distancia de 1 m por cada lado. Se colocó un tutor en forma vertical como apoyo para cada planta. Se aplicaron 800 mL de agua cada dos días y se fertilizó con 20-20-20 N-P-K disuelto en agua al 5 % (80 mL por planta). Para el control de plagas se asperjó cada siete días un extracto de crisantemo en una proporción 1:1 con agua. La primera evaluación se llevó a cabo ocho días después de su establecimiento en el sistema bajo cubierta. Las variables a evaluar fueron: 1) Supervivencia, 2) Altura de la planta, 3) Color de la planta, y 4) Grosor del tallo. Se tomaron 15 plantas en forma aleatoria para realizar las observaciones. Se utilizó un diseño experimental bifactorial con 11 repeticiones. Se realizó un análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ), con posterior comparación de medias mediante la prueba de Gama Múltiple de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se utilizó el paquete estadístico Minitab versión 15.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Concentración de sales de MS en el cultivo, en el alargamiento y enraizamiento de los brotes

El medio con reguladores de crecimiento propició una desorganización celular, que conformó una masa de callo, la cual puede tener un efecto negativo cuando inicia la etapa de aclimatación. La reducción de sales MS al 50 % resultó altamente significativa ( $P \leq 0.001$ ) para las variables: altura del brote (14.4 cm), tamaño de raíz (6 cm), número de hojas (4.3), número de yemas (3.3) y porcentaje de callo (3.5 %) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cuadrados medios y estadísticos descriptivos para el efecto de la concentración de sales Murashige-Skoog en el alargamiento y enraizamiento de brotes de *Physalis peruviana* cultivados *in vitro*.

Fuente	GL	Altura	Raíz	Hojas	Yemas	Callo
Tratamientos	1	513.45**	586.25**	83.769**	83.769**	13025.6**
Tiempo	1	227.64**	8.16*	4.923*	4.923*	20.9
Tratamiento*Tiempo	1	208.80**	8.16*	23.385*	23.385*	54.0
Error	48	125.71	55.65	23.385	23.385	2254.2
Total	51	1075.61	658.23	117.0	117.0	15354.7

GL = Grados de libertad. \* = Significativo ( $P \leq 0.05$ ). \*\* = Altamente significativo ( $P \leq 0.001$ ).

El enraizamiento y alargamiento *in vitro* se dieron a la par, aunque no se adicionaron auxinas para inducir el enraizamiento como en otras especies, tales como *Pyrus pyrifolia* (Lane *et al.*, 1998) y *Amelina arborea* (Ramesh y Padhya, 1990). El enraizamiento de los brotes inició cinco días después de haber sido establecidos en el medio de cultivo con las sales de MS al 50 %. La evaluación se efectuó 15 días después

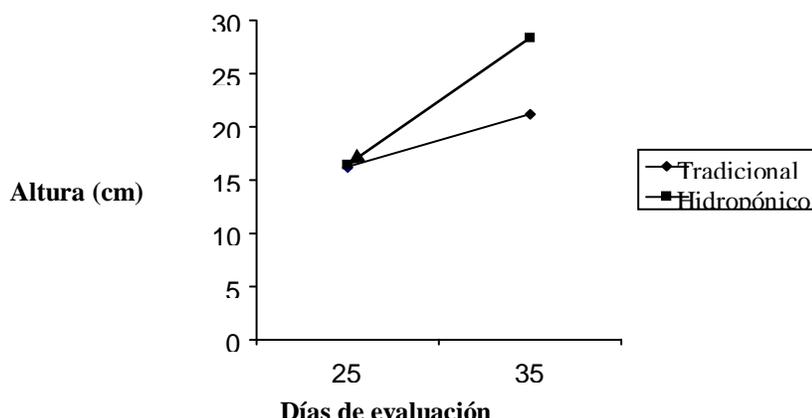
y se encontraron diferencias ( $P \leq 0.001$ ) entre los dos medios probados. En el medio con sales MS al 50 % hubo crecimiento de raíces (6 cm), mientras que en el medio con sales MS al 100 %, no se desarrollaron. Lo anterior coincide con lo indicado por Hyndman *et al.* (1982), quienes señalan que cuando reducen las sales al 50 % de su concentración, obteniendo un mayor tamaño de raíces.

### Métodos hidropónico y tradicional en la aclimatación de plántulas

La transferencia de plántulas que se desarrollaron *in vitro* a un ambiente natural, permite que se vuelven autótrofas, que aumentan su resistencia a la desecación y al ataque de los patógenos (Desjardins, 1995). Por ello, la aclimatación es una de las etapas más críticas en la micropropagación. Los brotes desarrollados *in vitro* se producen en condiciones de alta humedad y baja intensidad de luz, lo que implica un bajo contenido de cera epicuticular, en comparación con plantas producidas en cámaras de crecimiento o en invernadero. Los tejidos de plantas cultivadas *in vitro* pierden agua rápidamente cuando se transfieren a condiciones externas. Además, cuando se hacen crecer

con sacarosa u otra fuente de carbohidratos y se guardan a baja intensidad de luz, las plantas no dependen de su propia fotosíntesis. Por ello se requiere un período de varios días para que las plantas sean capaces de producir su propia fuente de carbono (antes de que sean autótrofas).

Al comparar el efecto de los sistemas de aclimatación sobre el desarrollo de las vitroplantas, los parámetros analizados fueron muy semejantes. La sobrevivencia de las plántulas fue del 100 %. Además, no se mostraron síntomas de deficiencia nutricional y presentaron un desarrollo regular (Fig. 1), 15 días después de haber sometido a las vitroplantas a la etapa de aclimatación (Tabla 2).



**Figura 1.** Sustrato tradicional e hidropónico sobre la altura de plántulas de cereza del Perú producidas *in vitro*.

**Tabla 2.** Dos sistemas de aclimatación en el crecimiento y desarrollo de vitroplantas de *Physalis peruviana*.

	Sobrevivencia (%)	Hojas (Número)	Yemas (Número)	Altura (cm)
Hidropónico	100	8.98	7.95	22.3
Tradicional	100	7.79	6.8	18.59

La sobrevivencia de las vitroplantas regeneradas durante el periodo de adaptación depende fundamentalmente de las peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto del desarrollo *in vitro*. Éste se caracteriza por una elevación de la humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono (generalmente en forma de sacarosa), y mínima variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Xavier y Comério, 1997).

Entre los principales problemas que presentan las plantas *in vitro*, se encuentran la ineficiencia fotosintética debido a los bajos contenidos de pigmentos del aparato fotosintético y al desarrollo de cloroplastos con granas desorganizadas (Preece y Sutter, 1991); una capacidad reducida de formar cutículas cerosas; estomas poco funcionales debido a la alteración en la forma de las células oclusivas (Diez y Gil, 1999), e ineficiencia de los tejidos de sustento debido a la reducida presencia de colénquima y esclerénquima (Preece y Sutter, 1991).

Probablemente no existieron diferencias entre el medio hidropónico y el sistema tradicional debido a que la absorción y transporte de agua fueron ineficientes, como resultado de una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote. Durante las primeras dos semanas después del trasplante es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales. Para evitar el exceso de transpiración de las plantas jóvenes, prácticamente se requiere simular las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones, pues hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de sus estomas y cutícula, es necesario mantener una alta humedad relativa (Ziv, 1991; Haggman *et al.*, 1999; Sánchez, 2000). El control de la intensidad de la luz también es importante, ya que las plantas provienen de un ambiente con intensidad baja y ésta se debe regular para evitar la fotoinhibición del aparato fotosintético.

Treinta días después de establecer la aclimatación de la cereza del Perú se realizó la segunda evaluación. Se encontraron grandes diferencias en el crecimiento de las plantas en los sustratos hidropónico y tradicional, con mejores características vegetativas las plantas sujetas al medio hidropónico. El desarrollo y crecimiento foliar fueron mayores, debido a que después de 30 días se hicieron necesarios los nutrientes proporcionados por el medio hidropónico.

### Traslado de plantas aclimatadas a condiciones de sistema bajo cubierta

Las plantas vigorosas de la cereza del Perú se consideraron aclimatadas al alcanzaron una altura aproximada de 28 a 39 cm, listas para ser llevadas a un sistema bajo cubierta. Lo anterior ocurrió 35 días después de iniciado el proceso de aclimatación. La micropropagación se logró en un periodo de 70 días, con una respuesta que varió del 80 al 100 % (Tabla 3).

**Tabla 3.** Duración de las etapas de micropropagación de la cereza del Perú.

Etapas	Duración (días)	Respuesta (%)
Multiplicación	15	90
Alargamiento y enraizamiento	25	80
Aclimatación	30	100
Transferencia a un sistema bajo cubierta	40	100

## CONCLUSIÓN

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* permite la propagación vegetativa de la cereza del Perú. La mayor altura en brotes se obtuvo en el medio con sales MS al 50 %, adicionado con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, tiamina 0.9 mg L<sup>-1</sup>, ácido fólico 0.5 mg L<sup>-1</sup>, biotina 0.05 mg L<sup>-1</sup>. Todas las plántulas sobrevivieron a la aclimatación tradicional e hidropónica. Plantas regeneradas *in vitro* lograron adaptarse a condiciones ambientales naturales, hasta la etapa de floración y fructificación. La micropropagación de la cereza del Perú permite hacer extensivo su cultivo con rendimientos aceptables.

## REFERENCIAS

- Xavier, A., e Comério, J. 1997. Enraizamiento “ex vitro” de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas “in vitro”. *Scientia Forestalis*. 51: 29-36.
- Angarita, A., Santana, G. 1997. Regeneración adventicia de somaclonales en uchuva (*Physalis peruviana*). *Agronomía Colombiana*. 14(1): 59-65.
- Arribas U., C. 1999. La ingeniería genética aplicada a la alimentación y el caso del Dr. Arpad Pusztai: Información científica y debate público. In: Actes III Jornades de la Curie, AEFIQ-CURIE. pp: 51-57.
- Desjardins, Y. 1995. Factors affecting CO<sub>2</sub> fixation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 1:13-25.
- Diez, G., Gil, L. 1999. Culturing of cell tissues within the Spanish breeding programme against dutchelm disuse. In: Espine S., Ritter E. (eds.). *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp: 307-311.
- Haggman, H., Jokela, A., Krajnakova, K. A., Niemi, K., Aronen, T. 1999. Somatic embryogenesis Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Journal of Experimental Botany*. 50: 1769-1778.
- Hyndman E., S., Hasegawa P., M., Bressan A., R. 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose shorts through the use of

- reduced concentrations of mineral salts. Horticultural Science. 17:82-83.
- Lane, V. D., Iketani, H., Hayashi, T. 1998. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 54: 9-14.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15: 473-497.
- Preece, J. E., Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. In: Debergh, P. C., Zimmerman, R. H. Micropropagation Technology and Application. Editorial Dordrech Kluwer Academic Press. pp: 71-93.
- Ramesh, K., Padhya, M. A. 1990. In vitro propagation of neem *Azadirachta indica* (A. Juss), from leaf discs. Indian Journal of Experimental Biology. 28: 932-935.
- Repo-Carrasco, R. 2003. Caracterización y usos de frutas nativas: Aguaymanto (*Physalis peruviana*), tomate de árbol (*Yphomandra betacea*), papaya arequipeña (*Arica pubescens*) y tuna (*Opuntia ficus indica*). Actas de Evento. I Congreso Internacional de Científicos Peruanos. Lima, Perú.
- Sánchez, O. 2000. Micropropagación de Algunas Leñosas Nativas. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile.
- Sandhu, A. S., Singh, S. N., Minhas, P. P. S., Grewal, G. P. 1989. Rhizogenesis of shoot cuttings of raspberry (*Physalis peruviana* L.). Indian Journal of Horticulture. 46: 376-378.
- Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plant. In: Debergh, P. C., Zimmer, R. H. (eds.). Micropropagation: Technology and Application. Editorial Kluwer Academic. pp. 49-69.

*Submitted February 15, 2011 – Accepted April 11, 2011*  
*Revised received May 13, 2011*