

**ESTUDIO DE LA DINÁMICA GENÓMICA Y SELECCIÓN PARA
LA ESTABILIDAD MEIÓTICA EN UNA POBLACIÓN
AUTOTETRAPLOIDE DE TOMATILLO (*Physalis ixocarpa*
Brot.)**

JUANA INÉS RODRÍGUEZ DE LEÓN

TESIS

Presenta como Requisito Parcial para

Obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN FITOMEJORAMIENTO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

PROGRAMA DE GRADUADOS

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

ESTUDIO DE LA DINÁMICA GENÓMICA Y SELECCIÓN PARA LA
ESTABILIDAD MEIÓTICA EN UNA POBLACIÓN AUTOTETRAPLOIDE DE
TOMATILLO (*Physalis ixocarpa* Brot.)

TESIS

PRESENTADA POR:


JUANA INÉS RODRÍGUEZ DE LEÓN

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada como
requisito parcial para optar el grado de:


MAESTRO EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO

COMITÉ PARTICULAR

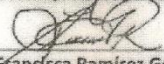
Asesor Principal:


Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés


Asesor:


Dr. Valentín Robledo Torres


Asesor:

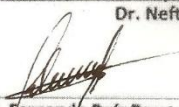

Dra. Francisca Ramírez Godina

Asesor:


M.C. Leticia Escobedo Bocado

Asesor Externo:


Dr. Neftalí Ochoa Alejo


Dr. Fernando Ruíz Zarate
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2012.

AGRADECIMIENTOS

Quiero presentarle mis agradecimientos a mi asesor principal al Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés, por mi formación profesional en el transcurso del período de la maestría, y por haberme dado la oportunidad de participar en uno sus proyectos de investigación.

Al Dr. Valentín Robledo Torres, por sus comentarios en el proceso de elaboración de la Tesis y sus correcciones.

A la Dra. Francisca Ramírez Godina, por sus correcciones y críticas que me fueron de gran ayuda, en la realización de la tesis.

A la M.C. Leticia Escobedo Bocardo, por ser parte de mi formación académica así como por sus asesorías y observaciones en el trabajo de tesis.

Al Dr. Neftalí Ochoa Alejo, por la colaboración en la realización de tesis.

Al Dr. José Espinoza Velázquez, por ser parte de mi formación académica y por sus valiosos consejos.

A la L.C.Q. Dulce Victoria Mendoza Rodríguez, por haberme auxiliado y apoyado en el trabajo de laboratorio de Genomas y campo para la realización de la tesis. Y sobre todo, gracias por tu compañía, consejos, convivencia y más importante tú amistad, así mismo por permitir entrar a tu hogar.

M.C. Martha Gómez Martínez, agradezco por los consejos, el apoyo en el laboratorio de Genomas y el ánimo que me brindó.

T.A. Norma Leticia Portos Gaona, por brindarme su apoyo en el laboratorio de Citogenética para la realización de la tesis.

Al trabajador de campo el Sr. Miguel Ángel Rodríguez Armendáriz, por haberme apoyado en el trabajo de campo para la realización de la tesis.

Biol. Ana María Ochoa, por haberme auxiliado y apoyado en el trabajo de laboratorio para la realización de la tesis.

A Juan de Dios Hernández Quintero, por apoyarme en el trabajo de campo. Gracias por brindarme tu amistad incondicional y apoyo moral. Nunca cambies tu forma de ser Juanito, eres una linda persona.

A Eva Arenas Hernández, por brindarme su amistad y siempre regalarme una sonrisa, cuando estuvimos juntas.

A Yadhira del Carmen Ortiz Covarrubias y Rosendo Hernández Martínez, por permitirme convivir estos dos años dentro y fuera de las horas de clases.

A Agustín Domínguez Tamayo, gracias por la compañía, las convivencias y por tu amistad.

Al CONACYT, por el apoyo financiero otorgado al proyecto de investigación del cual derivo esta tesis.

A todos los maestros que me impartieron su interesante clase, muchas gracias.

A Livier Guizar Guzmán, agradezco por apoyarme y motivarme en el estudio de ingles y por brindarme su amistad.

A Violeta Aspeitia Echegaray, agradezco el apoyo que me brindo y su amistad.

Gracias también a mis queridos compañeros de postgrado, que me permitieron convivir con cada uno de ellos. Violeta, Mayra, Alondra, Diana, Gaby, Pilar, José Antonio Negrete, José Luis, Antonio, Abel, Paquito y Huberto.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor.

A ti Dios y a la Santísima Virgen de Guadalupe, que me dieron la oportunidad de vivir esta experiencia y de regalarme una familia maravillosa.

Con mucho amor principalmente a mi padre José Luis Rodríguez Ibarias, a mis abuelitas Juana Ibarias Vidal y Esther de León que en ausencia han estado conmigo en todo momento.

A mi mamá Herminia de León Hermitaño, por darme un futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre has estado apoyándome y brindándome todo tu amor, por todo esto te agradezco de todo corazón.

A mi hijo Caleb Josué Rodríguez de León, a ti mi pequeño, esperando que en el futuro leas esta tesis y puedas entenderme el por qué de mi ausencia. TE AMO y TE EXTRAÑE, en estos dos años de mi formación profesional.

A mis hermanos Emmanuel y José Daniel Rodríguez de León gracias por apoyarme siempre, los quiero mucho. Recuerden la familia siempre unida.

A mi Tía Graciela de León Hermitaño, muchas gracias por su apoyo incondicional, ha sido de gran ayuda para mí, que Dios me la bendiga siempre.

A mis tíos, que de una u otra manera estuvieron pendientes a lo largo de este proceso, brindado su apoyo incondicional.

A mis amigas Laura, Daicy, Adriana, Betzayda, Esmeralda, Mary Ángel, Yessi, Tere y Lidia, gracias por seguir brindándome sus amistad. Las quiero nenas y Gary Zamudio Rodríguez, un amigo incondicional que siempre he contado con su amistad a pesar de las distancias. Te quiero.

COMPENDIO

ESTUDIO DE LA DINÁMICA GENÓMICA Y SELECCIÓN PARA LA ESTABILIDAD MEIÓTICA EN UNA POBLACIÓN AUTOTETRAPLOIDE DE TOMATILLO (*Physalis ixocarpa* Brot)

POR

JUANA INÉS RODRÍGUEZ DE LEÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. 2012

Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés

-Asesor-

Palabra clave: *Physalis ixocarpa*, autotetraploides, apareamiento meiótico, polen, micropropagación.

El tomatillo cultivado (*Physalis ixocarpa*) es una especie nativa de México y Centroamérica y posee una amplia variación genética. Actualmente es la cuarta hortaliza en superficie de producción en nuestro país. El equipo

de trabajo de esta investigación desarrolló previamente una población autotetraploide con el uso de colchicina. Los objetivos del presente trabajo fueron analizar el nivel de ploidía y comportamiento meiótico de las generaciones subsecuentes a la original y determinar la viabilidad de polen. Como testigo diploide se utilizó la variedad Rendidora de *P. ixocarpa*. La determinación de niveles de ploidía se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Para el estudio meiótico se utilizó el método de aplastado en microsporocitos en diacinesis, teñidos con colorante carmín al 1%. Se evaluó la viabilidad de polen por medio de el método de tinción con Buffalo Black al 0.01%. Para la propagación *in vitro* se utilizaron semillas autotetraploides, las cuales fueron desinfectadas con una solución jabonosa e hipoclorito de sodio al 20%, después se colocaron en medio MS. A las cuatro semanas se escindieron los ápices meristemáticos y se colocaron individualmente en medio MS con Paclobutrazol. La autotetraploidía prevaleció a través de las tres generaciones estudiadas de apareamiento cruzado. En el testigo diploide, los cromosomas en diacinesis se asociaron en bivalentes, mientras que en los autotetraploides se forman univalentes, bivalentes y trivalentes. Se detectaron diferencias altamente significativas en apareamiento bivalente entre las plantas autotetraploides y entre generaciones. La viabilidad de polen no mostró diferencias significativas entre generaciones. Estos resultados indican que es posible desarrollar una variedad autotetraploide ya que se mantiene la poliploidía y las plantas son fértiles. Además, dadas las diferencias significativas en formación de bivalentes entre plantas y

generaciones, se espera respuesta a la selección para estabilidad meiótica. Las semillas establecidas para propagación *in vitro* ayudarán a continuar con el mejoramiento genético de esta población.

ABSTRACT

**STUDY OF GENOME DYNAMICS AND SELECTION FOR MEIOTIC
STABILITY IN AN AUTOTETRAPLOID HUSK TOMATO POPULATION
(*Physalis ixocarpa* Brot)**

BY

JUANA INÉS RODRÍGUEZ DE LÉON

MASTER OF SCIENCES

PLANT BREEDING

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SALTILLO, COAHUILA. DICIEMBRE 2012.

Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés Valdés-Major Advisor-

Key words: *Physalis ixocarpa*, autotetraploids, meiotic pairing, pollen, micropropagation.

The cultivated husk tomato (*Physalis ixocarpa*) is native from Mexico and Central America and shows a wide genetic variation. Presently, it is the fourth horticultural crop in cultivation surface in our Country. The working team of this research previously developed an autotetraploid population by using colchicine. The objectives of the present work were to analyze the ploidy level and meiotic behavior of the subsequent generations from the original, and to determine pollen viability. As a diploid control the cultivar Rendidora of *P. ixocarpa* was used. Ploidy level was determined by flow cytometry. For the meiotic study, the microsporocytes were prepared by the squash method, stained with carmin and analyzed in diakinesis. Pollen viability was evaluated through 0.01% Buffalo Black staining. Seeds from selected autotetraploid plants were used for *in vitro* propagation, and were disinfected with a soapy solution and sodium hypochlorite 20%, then placed in MS culture medium.. After four weeks, meristematic apices were excised, which were then placed individually in MS medium with Paclobutrazol. The autotetraploid condition prevailed through three cross-pollinating generations. In diakinesis, the chromosomes of the diploid cultivar associated into bivalents, whereas in autotetraploid plants the chromosomes associated into univalents, bivalents and trivalents. Highly significant differences in bivalent pairing were detected between autotetraploid plants and generations. Pollen viability did not show significant differences between generations. These results indicate that it is possible to develop an autotetraploid cultivar, because the polyploid state is naturally maintained and the plants are fertile.

Furthermore, given the differences in bivalent pairing between plants and generations, a response to selection toward meiotic stability is expected. The seeds established for in vitro propagation, will help to continue the genetic improvement of this population

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Origen del tomatillo	3
Descripción taxonómica	3
Importancia económica.....	4
Poliploidía	6
Autopoliploidía	7
Análisis meiótico	7
Micropropagación.....	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
Obtención de generaciones de autotetraploides.....	10
Establecimiento del cultivo en campo.....	11
Análisis de citometría de flujo	12
Análisis meiótico	13
Viabilidad de Polen.....	13
Micropropagación.....	14
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
Citometría de flujo	17
Análisis meiótico	18
Viabilidad de Polen.....	20
Micropropagación.....	22

V. CONCLUSIONES.....	23
VI. LITERATURA CITADA	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3. 1 Fertilizantes y cantidades en gramos utilizadas en el cultivo de tomatillo establecido en General Cepeda, Coah. 2012.....	11
Cuadro 3. 2 Composición basal del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).	15
Cuadro 3. 3 Composición de medio nutritivo para la propagación <i>in vitro</i> de hojas y tallos de plantas autotetraploides de <i>P. ixocarpa</i>.	16
Cuadro 4.1 Medias y desviaciones estándar de número de configuraciones bivalentes en cuatro generaciones de autotetraploides de <i>P. ixocarpa</i>.	19
Cuadro 4. 2 Medias y desviaciones estándar del porcentaje de viabilidad de polen en la variedad rendidora y cuatro generaciones de autotetraploides de <i>P. ixocarpa</i>.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 4.1** Histograma de citometría de flujo en plantas de *Physalis ixocarpa* con dos niveles de ploidía. El material diploide (2x) es la variedad Rendidora y el tetraploide (4x) son plantas descendientes de la población con el genoma duplicado a través de tratamiento con colchicina.....18
- Figura 4.2** Células en diacinesis de autotetraploides de *P. ixocarpa* con faltas de apareamiento o apareamientos irregulares, señalados con flechas. A. célula con presencia de univalentes; B. célula con presencia de un trivalente.....18
- Figura 4.3** Cambio del promedio de bivalentes a través de cuatro generaciones consecutivas de autotetraploides de *P. ixocarpa*.....20
- Figura 4.4** Granos de polen de un autotetraploide de *P. ixocarpa*. El polen teñido se considera desarrollado, mientras que el no teñido se considera abortivo.21
- Figura 4.5** Propagación *in vitro* a 4 semanas germinación de plantas autotetraploides de *P. ixocarpa*.....22

I.INTRODUCCIÓN

El tomatillo cultivado (*Physalis ixocarpa*) también conocido como tomate de verde, es una especie con un número cromosómico diploide $2n = 2x = 24$, nativa de México y América Central, y actualmente uno de los cultivos más importantes en México, donde ocupa el cuarto lugar como hortaliza, con una superficie sembrada de 48,475.17 ha (SIAP-SAGARPA, 2011); así mismo es exportada a Estados Unidos y Canadá. El rendimiento medio nacional es de 15.58 t ha⁻¹ (SIAP-SAGARPA, 2011), el cual es considerado bajo, de acuerdo al rendimiento potencial de 40 t ha⁻¹ (Peña-Lomelí y Santiaguillo-Hernández, 1999).

Una de las posibles vías para el desarrollo de nuevos cultivares de *P. ixocarpa* es la poliploidía. En particular la autoploidía es un estado biológico inducible que puede incrementar la variación genética, materia prima para el fitomejoramiento (Parisod et al., 2010). Se ha demostrado que los autoploidos son capaces de experimentar cambios genómicos como la diploidización y disminución de la cantidad de DNA por célula, y que poseen alta plasticidad genómica (Doyle et al., 2008; Leitch y Leitch, 2008). Una desventaja de esta manipulación genómica es la pérdida de fertilidad; sin embargo, se sabe que los nuevos autoploidos son altamente variables para esta característica (Ramsey y Schemske, 2002).

Una estrategia para la inducción artificial de poliploidía es la utilización de algunos compuestos químicos, como la colchicina, lo cual constituye una vía rápida para la obtención de plantas con mayor variabilidad genética, la cual es útil para iniciar programas de selección (Imery y Cequea, 2001). Además, los poliploides suelen presentar gigantismo y las células suelen ser mayores o de

diferente forma, por lo que es promisoro su utilización en la agricultura (Cubero, 2003). Para el caso del tomatillo, Robledo-Torres et al. (2011) desarrollaron una población autotetraploide $2n = 4x = 48$ de *P. ixocarpa*, mediante la utilización de colchicina en plántulas de la variedad Rendidora. El material resultante es prometedor para obtener nuevas variedades o híbridos de alto crecimiento y calidad (Robledo-Torres et al., 2011).

Uno de los problemas asociados a la generación de autotetraploides, es el desbalance en la segregación meiótica, debido a apareamientos irregulares. De aquí que resulta necesaria la evaluación y selección para estabilidad meiótica en las plantas cultivadas cuyo genoma ha sido duplicado. En particular, surge la necesidad de buscar formación de bivalentes en meiosis (Profase I y Metafase I), ya que ello determina que exista buenas segregación y formación de gametos balanceados y viables (Poggio et al., 2009).

Una forma de propagar plantas autotetraploides con regularidad meiotica y fertilidad en mayor cantidad y menor tiempo, es por medio del cultivo *in vitro*, el cual permite promover plantas nuevas de calidad uniforme de un genotipo selecto y una tasa de multiplicación ilimitada (Olmos et al., 2004).

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Analizar el nivel de ploidía de las generaciones desarrolladas por apareamiento cruzado, a partir de la población autotetraploide original desarrollada por colchicina.
- Estudiar el comportamiento meiótico y seleccionar plantas con apareamiento regular.
- Determinar la viabilidad de polen de los autotetraploides.
- Iniciar la propagación *in vitro* de la descendencia de plantas con una meiosis de regularidad sobresaliente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Origen del tomatillo

Dentro del género *Physalis* existen entre 90 y 100 especies, donde el 70% son endémicas en México, entre las cuales se encuentra *Physalis ixocarpa* Brot. (D´Arey, 1973; Martínez-Díaz, 1998).

Physalis ixocarpa Brot. es conocido como tomatillo en Aguascalientes, Sinaloa y Zacatecas, también como tomate verde en el centro del país y tomate de fresadilla en el norte (Saray, 1977). La palabra tomate es de origen azteca proveniente del vocablo náhuatl “*Ayacach tomatl*” cuya etimología “*ayacach* (tly) significa sonaja y “*tomatl*” a tomate (Sánchez-Martínez et al., 2005). Los aztecas llamaban al tomate de cáscara “*miltomatl*” que significa tomate cultivado que sirve para elaborar salsas o guisos (Lambert-Ortiz, 1998).

La especie *P. ixocarpa* crece en forma silvestre en 26 estados de la República Mexicana, incluyendo las fronteras de Estados Unidos de América y Centroamérica, y están confinados a los climas tropicales y templados (Peña-Lomelí y Santiaguillo-Hernández, 1999).

Descripción taxonómica

Actualmente ha existido discusión al respecto del status taxonómico de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem. Sin embargo se encuentran sinónimos

como *P. aequata* Jacq. F. ex Nees., *P. philadelphica* var. *inmaculata*, *Physalis philadelphica* var. *parviflora*, y *P. philadelphica* var. *Lam.* (Sobrino-Vesperina y Sanz-Elorza, 2007). Martínez (2008) determina la clasificación taxonómica del tomatillo de la siguiente forma:

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Physalis*

Epíteto específico: *ixocarpa*

Especie: *Physalis ixocarpa* Brot ex Hornem.

Importancia económica

En México se cultiva en los estados de Sonora, Baja California, Morelos y San Luis Potosí, con un rendimiento promedio nacional de 12.4 ton ha⁻¹ (Soto et al., 1998). A nivel nacional es importante debido al aumento en el consumo de 4.5 kg (Peña-Lomelí et al., 2002), y ocupa el cuarto lugar en superficie sembrada de 48 475.17 ha (SIAP-SAGARPA, 2011).

El tomatillo es una de las especies vegetales mexicanas más utilizadas en el aspecto alimenticio. Este constituye un recurso de recolección en diversas zonas del territorio mexicano y de importancia económica. El cultivo comercial se realiza para el mercado nacional y exportación. En México se ha consolidado

como una de las principales hortalizas y como un cultivo potencial en América y Europa (Santiaguillo-Hernández y Peña-Lomelí, 1997).

En la actualidad el tomatillo es un componente constante de la dieta mexicana, principalmente en forma de salsas, las cuales mejoran el sabor de las comidas y estimulan el apetito. Del fruto cocinado o crudo, se elaboran purés o picadillos, que se utilizan como base para salsas agregadas a los guisados. Las salsas y el tomate entero son exportados a los Estado Unidos de América. (Montes y Aguirre, 1994).

Mejoramiento genético

El mejoramiento genético es un conjunto de principios científicos, métodos, técnicas y estrategias aplicadas al descubrimiento o la creación de una variación genética en una especie vegetal y la selección, dentro de esa variación, de plantas con características deseables que pueden heredarse de manera estable (Sala et al 2004).

Se pueden encontrar tomatillos silvestres y de la forma cultivada, que presentan una amplia diversidad genética y pueden ser aprovechadas en los programas de mejoramiento genético (Peña-Lomelí y Márquez-Sánchez, 1990). Actualmente se distribuye prácticamente en todo el país (Peña-Lomelí y Santiaguillo-Hernández, 1999) y se reconocen ocho variedades criollas, donde las más importantes de uso comercial son: Rendidora, Salamanca, Arandas y Tamazula (Peña-Lomelí y Márquez-Sánchez, 1990; Peña-Lomelí, 1994).

Los avances del mejoramiento genético en el cultivo de tomatillo han sido escasos y limitados por los métodos de mejoramiento, debido a su autoincompatibilidad gametofítica y que la hace una especie alógama obligada (Manzo-González et al., 1998). Por lo anterior los fitomejoradores deben

mantener y aumentar la variabilidad de dicha especie para alcanzar objetivos de mejoramiento vegetal (Krarup, 1984).

Una alternativa para el mejoramiento genético de diversas especies, es la inducción de la poliploidía, con el propósito de aumentar los niveles de producción de los cultivos (Sartor et al., 2004). Hagiwara (2002) menciona que los autotetraploides previamente caracterizados y seleccionados, podrían ser un camino promisorio para obtener nuevas variedades.

Poliploidía

La poliploidía es un estado biológico en el que se presentan más juegos de cromosomas de los que corresponden al número diploide básico (Leitch y Bennet, 1997), con un potencial evolutivo y práctico en la generación de nuevos cultivos (Thompson y Lumaret, 1992).

La poliploidización ha jugado un papel muy importante en la evolución de las plantas con el aumento en el tamaño del genoma causada por el incremento en los conjuntos de cromosomas (Gar et al., 2011). La duplicación de cromosomas pueden proceder de la misma especie o un individuo estrechamente relacionados (autopoliploides) o de la hibridación de dos especies diferentes (alopoliploides) (Otto, 2007).

En el mejoramiento genético en la especie de tomatillo al seleccionar tetraploides puede ser un camino prometedor para obtener nuevas variedades o híbridos de alto rendimiento (Jiménez-Santana, 2012). Los poliploides suelen presentar gigantismo y las células suelen ser mayores o de diferente forma, también generan una adaptabilidad y mayor tolerancia a diferentes condiciones ambientales, por lo que es promisoria su utilización en la agricultura (Cubero, 2003).

Autopoliploidía

La autopoliploidía consiste en la duplicación de un mismo genoma (García-Alonso, 2008). Por lo tanto los poliploides más frecuentes son 4x (Cubero, 2003). En la naturaleza existen autopoliploides derivados de un diploide, que se ha considerado como un fenómeno raro (Stebbins, 1971). La autopoliploidía es un estado biológico inducible caracterizado por la duplicación del número de genomas de un individuo, lo cual incrementa el tamaño efectivo de la población y mejora la flexibilidad genómica, facilitando así el manejo de la selección (Parisod et al., 2010).

Los individuos autopoliploides muestran una alta frecuencia de configuraciones cromosómicas multivalentes durante la meiosis y la fertilidad en general puede estar reducida debido a una segregación irregular de los cromosomas (Stebbins, 1971; Grant, 1989). Por otro lado, los poliploides a través de sucesivas generaciones tienden a comportarse como diploides (Grant, 1989); este proceso se denomina diploidización, y puede analizarse citológicamente estudiando la proporción de bivalentes durante la meiosis en individuos autopoliploides (Reynoso et al., 2005).

Análisis meiótico

El número de cromosomas y el nivel de ploidía son datos útiles en el estudio de una especie y en la caracterización de germoplasma, ya que nos pueden mostrar relaciones existentes entre especies dentro de un género o familia y clarificar el origen de híbridos naturales y variedades cultivadas. Además, gran parte de las características reproductivas y evolutivas de las

especies se explican por el conocimiento de sus rasgos citológicos (Valladolid et al., 2004).

Una especie diploide presenta un apareamiento normal entre cromosomas homólogos, lo cual origina configuraciones bivalentes. Las especies autopoliploides presentan en meiosis frecuencias relativamente altas de configuraciones cromosómicas multivalentes de acuerdo a estudios citológicos. Sin embargo se ha logrado demostrar que las frecuencias de multivalentes observadas en algunas plantas poliploides puede ser mucho más baja que la esperada, debido a la influencia de genes que ejercen un control del apareamiento cromosómico (Sañudo y Ruíz-Rejon, 1975).

Micropropagación

La micropropagación es una técnica que ha sido utilizada para la multiplicación de muchas especies vegetales (Arribas-Ugarte, 1999). La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente, donde se puedan controlar las condiciones del ambiente y la nutrición (Hartmann y Kester, 1995).

En la actualidad la micropropagación se practica con especies hortícolas, ornamentales y leñosas con las siguientes ventajas: incremento del número de plantas, corto tiempo en la multiplicación, posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas con superficie reducida o una variedad de la cual existan pocos individuos y a bajo costo, control de sanidad del material que se propaga y facilidad de transportar el material *in vitro* de un lugar a otro (Villalobos y Thorpe, 1991).

Thomas y Schiefelbein (2001) destacan la posibilidad de guardar stocks durante años, sin la pérdida de potencial de multiplicación con una serie de subcultivos y el retorno de plantas normales al campo con características de adulto. Esta técnica se compone de cuatro etapas secuenciales: 1) establecimiento; 2) proliferación o multiplicación; 3) enraizamiento y 4) aclimatación (Boutherin y Bron, 1994).

La propagación en el tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) se ha realizado por inducción de brotes, para lo cual se emplean varios tipos de explantes como hipocotilos (Ramírez-Malangon y Ochoa-Alejo, 1991), segmentos de tallo, hoja, peciolo y yemas axilares (Manzo-González et al., 1997), y anteras (Ortuño-Olea et al., 1997). La inducción de raíces en los brotes obtenidos *in vitro* se ha logrado con: enraizamiento *in vivo* (Andrade, 1998) e *in vitro*, al utilizar 1 mM de BA en combinación con 1 mM ANA en el medio MS (Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1991). 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 (Andrade-Rodríguez et al., 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de generaciones de autotetraploides

Las semillas previamente extraídas de frutos maduros de cada generación derivada de la población original autotetraploides fueron sembradas en charolas de 200 cavidades en sustrato peat-moss, las cuales se colocaron en una cámara germinadora a 28°C por un lapso de 12 días. Las generaciones de autotetraploides se desarrollaron en el invernadero del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Saltillo, Coahuila. El terreno fue barbechado manualmente y se formaron cuatro camas de siembra, con instalación de riego por goteo y acolchado plástico. Las plantas se espaciaron a 50 cm y la fertilización se aplicó vía riego por cinco semanas con dos soluciones por separado, compuesta la primera de: N (12), P (0) y K (45) y la segunda de: N (20), P (30) y K (10). Ambas soluciones, se aplicaron a una concentración de 5.4 g por litro.

En la etapa de floración, se recolectó polen de flores abiertas de todas las plantas de cada generación de autotetraploides y fueron colocadas en cajas petrí. Los botones florales se abrieron con una pinza sin emascular, para exponer el estigma y posteriormente se hicieron las polinizaciones de 8 a 10 a.m., mediante cruzamientos aleatorios para generar descendientes de la siguiente generación. Para evitar contaminación por polen no deseado, cada flor involucrada en cruzamientos se cubrió con bolsas resistentes a la humedad. El polen sobrante fue puesto en refrigeración a 4°C para su conservación. El periodo de cruzamientos duró hasta el término de la floración. En promedio se

hicieron cruzamientos con 58 plantas de cada generación. Se originaron cuatro generaciones autotetraploides.

Establecimiento del cultivo en campo

En el mes de abril del 2012, se inició a la siembra de cuatro generaciones de autotetraploides en el Invernadero del departamento de Horticultura de la UAAAN. Se utilizaron seis charolas de plástico con sustrato peat-moss y se colocaron sobre un polietileno por 15 días. Después de la germinación se aplicó el riego con solución nutritiva de Ferti-Drip (20-20-20) en una dosis de 1 gL⁻¹ de agua. Para su evaluación, la variedad Rendidora y las cuatro generaciones derivadas de la población autotetraploide original, se sembraron en campo bajo el diseño de bloques al azar con tres repeticiones en tres bloques en suelo con acolchado plástico y riego por goteo. Así se lograron establecer 60 plantas testigo y 200 derivadas de la población autotetraploide. La localidad de evaluación fue General Cepeda, Coahuila, situada en las coordenadas 101° 27' 10'' de longitud oeste y 25° 23' 02'' de latitud norte. Se emplearon surcos de 5 m de largo y 1.80 de ancho y con una separación de 60 cm entre planta y dos hileras por surco. El riego se hizo por cintilla, y se aplicó fertilizantes en las siguientes fechas: 01 de mayo de 2012; 11, 16 y 22 de junio de 2012, utilizando las cantidades que se indican en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3. 1 Fertilizantes y cantidades en gramos utilizadas en el cultivo de tomatillo establecido en General Cepeda, Coah. 2012.

Fecha de aplicación	Fertilizantes	Gramos
01/06/2012	Multi Ks	75
	Urea	195
	FMP	192
11/06/2012 y 16/06/2012	Multi Ca	500
	Multi Ks	500
	Ferti-Drip	400

22/06/2012	Sulfato de potasio (K ₂ SO ₄)*	100
	Nitrato de Calcio (Ca(NO ₃) ₂)*	500
	Sulfato de Magnesio (2MgSO)*	350

FMP= Fosfato de Magnesio fusionados; *Fórmula.

Análisis de citometría de flujo

Previo al proceso de citometría de flujo se realizó la germinación de semillas autotetraploides y diploides. Se tomaron un total de 90 semillas de tres generaciones consecutivas de autotetraploides y 30 semillas de la variedad Rendidora, fueron puestas a germinar entre dos capas de papel germinación (Anchor), humedecido con agua destilada. Posteriormente fueron enrollados y colocados en bolsas de plásticos. Después fueron trasladadas a una cámara de crecimiento a una temperatura de 28°C durante 15 días, colocándolas en posición vertical.

La citometría de flujo se realizó, en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en el CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato.

Para el análisis del nivel de ploidía por citometría de flujo, se muestrearon 8 plántulas de cada una de tres generaciones derivadas de la población autotetraploide original y la variedad Rendidora testigo como control. Al tejido de las plántulas se le adicionaron 0.5 ml de una solución buffer de extracción (CyStain UV Ploidy) y se seccionó finamente con una navaja de afeitar en una caja de Petri. Una vez disgregado el tejido, se le añadieron 1.5 ml de buffer de extracción en el que se dejó incubar el tejido por 1 minuto a temperatura ambiente. Este buffer de extracción de núcleos contiene el fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole), que tiñe el DNA. Tras resuspender la mezcla, se filtró a través de una malla de nylon de 30 µm (Partec 50 µm, Cell Trics™), lo cual permite separar los núcleos, que caen a un tubo receptor. La suspensión de núcleos se hizo circular por el circuito de microtubos de un clitómetro de flujo Partec CyStain® UV precise P-05-5002.

Análisis meiótico

Para el análisis meiótico, se muestrearon 10 plantas por generación de autotetraploides y el diploide testigo variedad Rendidora. Se recolectaron botones florales de 8 a 9 a.m., los cuales se fijaron en una solución 3:1 etanol-ácido acético glacial por 24 hrs, y fueron trasladados al Laboratorio de Análisis de Genomas del Departamento de Fitomejoramiento de la UAAAN. Se colocaron los botones fijados en cajas de Petri con agua destilada para extraer las anteras, las cuales se depositaron en portaobjetos con una gota de acetocarmín al 1%. Después se cortaron en mitades para liberar los microsporocitos y se eliminaron los restos de tejido. Se colocó un cubreobjetos y la preparación se calentó en una plancha citológica a 65°C e inmediatamente se procedió al aplastamiento manual. Se analizaron cinco células por planta en diacinesis de meiosis I, en un microscopio marca Vistavisión con el objetivo 100x, equipado con cámara digital Pixera Winder Pro y sistema de cómputo con el software AxionVisión Rel. 4.8 del Laboratorio de Citogenética. Se registraron el número y tipo de configuraciones por célula y los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y comparaciones múltiples con el ambiente y lenguaje de cómputo estadístico R (R Development Core Team, 2012).

Viabilidad de Polen

Para el estudio de viabilidad de polen, este se recolectó en horario de 8 a 10 a.m., de dos a cuatro flores de 15 plantas por generación de autotetraploides, así como de la variedad Rendidora. El polen de cada flor, se sacudió sobre un portaobjetos procurando que la distribución fuera uniforme, se depositó una gota de colorante con Buffalo Black al 0.01% preparado en ácido acético al 45% (Jackson, 1988), encima se colocó un cubreobjetos y después de 5 a 10 segundos se procedió a la observación al microscopio. Los granos de polen redondeados y coloreados se consideraron desarrollados y los

constreñidos y sin teñir, no viables. Los conteos de granos de polen se efectuaron en el microscopio, en un número de 100 granos por planta. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y comparaciones múltiples con el ambiente y lenguaje de cómputo estadístico R (R Development Core Team, 2012).

Micropropagación

Con el objetivo de multiplicar plantas en estado adulto de autotetraploides de *P. ixocarpa* seleccionadas en campo con base en el estudio meiótico, se tomó tejido de plantas que presentaron una mayor regularidad de apareamiento cromosómico. Las muestras se trasladaron del campo al Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Las hojas y tallos se sometieron a una desinfección rigurosa ya que presentaban cenicilla (*Sphaerotheca pannosa*). Los fragmentos de hoja y tallo fueron colocadas en medio MS con reguladores de crecimiento Benzil-Adenine (BA), Ácido Naftalenacético (ANA) e hidrolizado de caseína. Después de dos semanas de establecimiento el material se contaminó. Se decidió entonces propagarlas mediante semillas de las plantas autotetraploides seleccionadas.

El establecimiento de propagación por semillas de 15 plantas autotetraploides seleccionadas con tendencia a regularidad meiótica se hizo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos de la UAAAN.

Las semillas fueron tratadas con una solución jabonosa e inmediatamente después se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 20% durante 15 minutos. Se enjuagaron con agua destilada esterilizada. Se prepararon soluciones madres, para la elaboración de medio nutritivo MS (Murashige y Skoog) (Cuadro 3.2) y se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos. Fueron colocadas cuatro semillas en cada frasco de vidrio conteniendo medio MS sólido (Murashige y Skoog, 1962) y agregando 30 gL⁻¹ de sacarosa.

Cuadro 3. 2 Composición basal del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

Compuestos	Por litro	Gramos	10 litros
Macronutrientes			
NH ₄ NO ₃	1650.00 mg	1.650	16.50
KNO ₃	1900.00 mg	1.900	19.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00 mg	0.440	3.322
KH ₂ PO ₄	170.00 mg	0.170	1.70
MgSo ₄ .7H ₂ O	370.00 mg	0.370	3.70
Micronutrientes			
KI	830.00 µg	0.00083	0.0083
H ₃ BO ₃	6.20 mg	0.00620	0.0620
MnSo ₄ .4H ₂ O	17.00 mg	0.01700	0.1288
ZnSo ₄ .4H ₂ O	8.60 mg	0.00860	0.0860
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	250.00 µg	0.00025	0.0025
CuSO ₄ .5H ₂ O	25.00 µg	0.000025	0.00025
CoCl ₂ .6H ₂ O	25.00 µg	0.000025	0.00025
Solución de hierro			
Na ₂ EDTA	37.30 mg	0.0373 x 10	0.373
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80 mg	0.0278 x 10	0.278
Vitaminas			
Inositol	100.00 mg	0.10000	1.000
Ácido nicotínico	0.50 mg		0.005
Pirodoxina HCl	0.50 mg		0.005
Tiamina HCl	0.10 mg		0.001
Glicina	2.00 mg		0.020

A las cuatro semanas de la germinación de las plántulas en crecimiento , se tomaron hojas y fragmentos de tallos, que fueron puestos individualmente en

el medio MS con 1mg/l de paclobutrazol como regulador de crecimiento (Cuadro 3.3) y fueron trasladados a la cámara de incubación con temperatura de 24°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

Cuadro 3. 3 Composición de medio nutritivo para la propagación *in vitro* de hojas y tallos de plantas autotetraploides de *P. ixocarpa*.

Compuestos	Concentraciones
Macronutrientes	30 ml
Micronutrientes	10 ml
Solución Fierro	10 ml
Vitaminas	10 ml
Regulador de crecimiento	
Paclobutrazol	1 mg/l
pH	5.7

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Citometría de flujo

De acuerdo con la citometría de flujo, en las ocho plántulas de cada una de las tres generaciones probadas se observó que las muestras experimentales presentaron un genoma duplicado 4x con respecto al testigo 2x (Figura 4.1), lo cual indica que el estado tetraploide se mantiene a través del linaje de la población inicialmente tratada con colchicina. Como se manifestó en el capítulo de Materiales y Métodos, los cruzamientos fueron controlados y realizados únicamente entre plantas de este linaje. No obstante, el realizar cruzamientos entre las plantas tetraploides y diploides, puede conducir a la producción de plantas triploides.

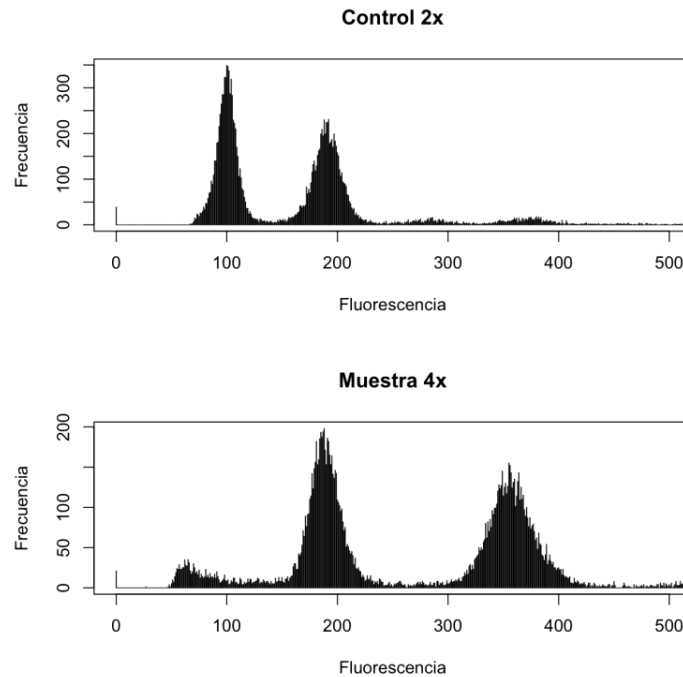


Figura 4. 1 Histograma de citometría de flujo en plantas de *Physalis ixocarpa* con dos niveles de ploidía. El material diploide (2x) es la variedad Rendidora y el tetraploide (4x) son plantas descendientes de la población con el genoma duplicado a través de tratamiento con colchicina.

Análisis meiótico

De acuerdo al análisis meiótico en diacinesis (Figura 4.2) se confirmó la condición tetraploide en las cuatro generaciones, ya que mostraron un complemento de cromosomas de $2n = 4x = 48$. Estos resultados coinciden con lo reportados por Ramírez et al (2011) y Robledo-Torres et al (2011). En el Cuadro 4.1 se anotan los números observados para las diferentes configuraciones en 10 plantas de cada generación, representada cada una con 50 células.

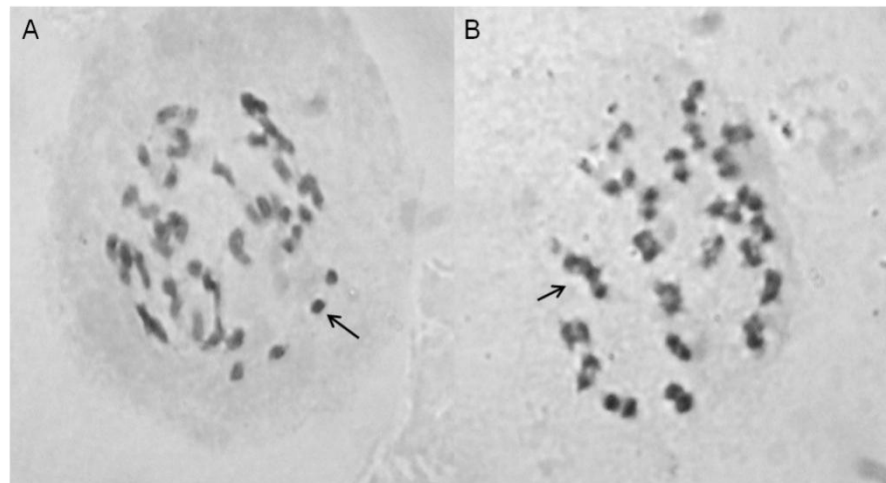


Figura 4. 2 Células en diacinesis de autotetraploides de *P. ixocarpa* con faltas de apareamiento o apareamientos irregulares,

señalados con flechas. A. célula con presencia de univalentes; B. célula con presencia de un trivalente.

Cuadro 4. 1 Medias y desviaciones estándar de número de configuraciones bivalentes en cuatro generaciones de autotetraploides de *P. ixocarpa*.

Generaciones	Plantas	Células	Univalentes		Bivalentes		Trivalentes	
			Media	DS	Media	DS	Media	DS
1	10	50	16.34	5.80	15.22	2.92	0.42	0.70
2	10	50	15.26	4.68	16.04	2.49	0.24	0.55
3	10	50	14.26	7.82	16.42	3.94	0.30	0.61
4	10	50	4.48	2.96	17.28	2.92	2.94	1.55
Total	40	200	12.58	5.31	16.24	3.06	0.97	0.85

DS=Desviación estándar.

Para el total de 200 células por las cuatro generaciones, se obtuvo un promedio general de univalentes de 12.58 con una desviación estándar de 5.31 mientras que en bivalentes fue de 16.24 con una desviación estándar 3.06, en tanto la media de trivalentes fue de 0.97 con una desviación estándar 0.85. En la Figura 3 se observa un incremento de bivalentes a lo largo de las cuatro generaciones, lo cual es indicador de una tendencia hacia la regularidad meiótica. Molero y Matos (2008) mencionan que la inducción de poliploidía puede ser poco estable, ocurriendo el restablecimiento del número diploide de cromosomas. Las diferencias entre generaciones fueron significativas de acuerdo con el análisis de varianza, con un valor de $p = 0.0022$. Ya que el análisis meiótico se hizo con submuestreo, se pudo probar estadísticamente a través del análisis de varianza, que hubo diferencias altamente significativas ($p = 3.141 \times 10^{-6}$) de número de bivalentes entre plantas, lo cual señala la posibilidad de seleccionar individuos para estabilidad meiótica.

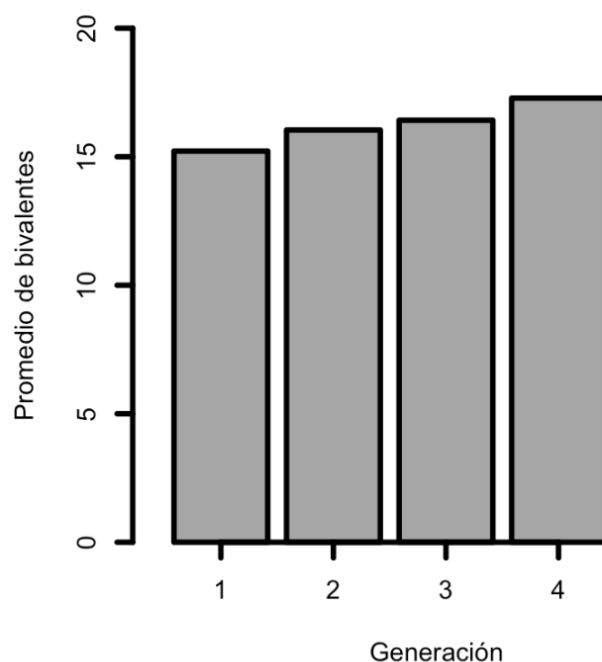


Figura 4. 3 Cambio del promedio de bivalentes a través de cuatro generaciones consecutivas de autotetraploides de *P. ixocarpa*.

Viabilidad de Polen

En la Figura 4.4 se presenta granos de polen de una planta autotetraploide, donde el polen teñido se considera desarrollado, mientras el no teñido se califica como abortivo. En el Cuadro 4.2 se muestran los valores medios del porcentaje de polen desarrollado de un total de 60 plantas de cuatro generaciones de autotetraploides, en las cuales se obtuvo un promedio global de 62.7%. Por otra parte, la variedad Rendidora presentó un valor de 93%. Dicha superioridad se esperaba ya que es una variedad diploide. Stebbins (1947) menciona que los autoploiploides presentan multivalentes en meiosis, lo cual provoca una baja viabilidad de polen y por lo tanto fertilidad reducida. En el caso de la población autotetraploide de tomatillo, la viabilidad de polen reducida

no originó problemas de infertilidad. El análisis de varianza no indicó diferencias significativas para viabilidad de polen entre generaciones de apareamiento cruzado ($p = 0.5286$).

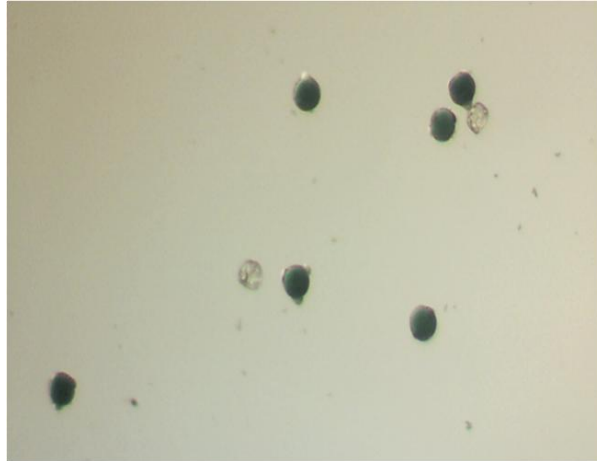


Figura 4. 4 Granos de polen de un autotetraploide de *P. ixocarpa*. El polen teñido se considera desarrollado, mientras que el no teñido se considera abortivo.

Cuadro 4. 2 Medias y desviaciones estándar del porcentaje de viabilidad de polen en la variedad Rendidora y cuatro generaciones de autotetraploides de *P. ixocarpa*.

Generaciones	Plantas	Viabilidad de polen	
		Media	Desviación estándar
variedad Rendidora	15	93	6.92
1	15	62.2	15.26
2	15	67.9	13.65
3	15	60.2	21.29
4	15	60.5	12.64
Total	60	62.7	15.71

Micropropagación

En la Figura 4.5 se observan plantas de cuatro semanas de germinación de autotetraploides seleccionadas con posible regularidad meiotica con un tamaño alcanzado de 5 cm aproximadamente de altura. Las plantas se fraccionaron y fueron transvasadas a medio MS con 1mg/l de paclobutrazol. Después se trasladaron a la cámara de incubación con luz y temperatura controladas.

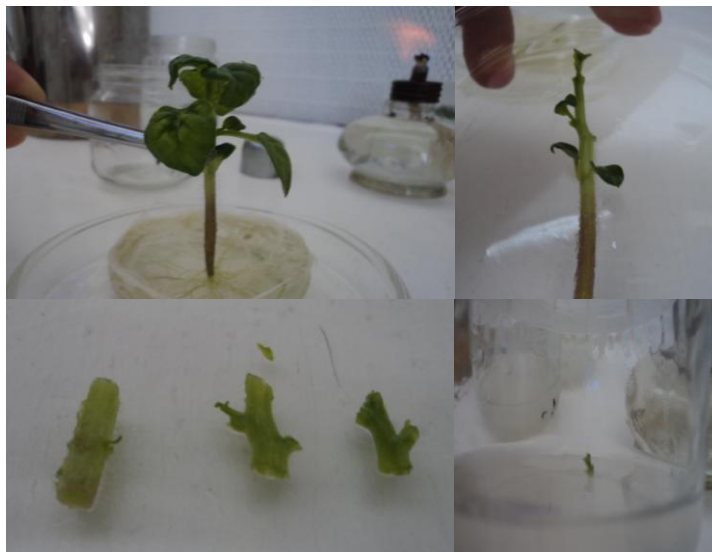


Figura 4. 5. Propagación *in vitro* a 4 semanas germinación de plantas autotetraploides de *P. ixocarpa*.

Después de dos semanas de la propagación e incubación de los segmentos de ápices meristemáticos de tallo de autotetraploides de *P. ixocarpa*, que llevaran a generar nuevos explantes.

La propagación *in vitro*, nos permitirá obtener mayor número de plantas autotetraploides, esperando formar poblaciones autotetraploides de *P. ixocarpa*, que presente un apareamiento meiótico regular y alta fertilidad.

V. CONCLUSIONES

La autoploidía se mantiene a través de las generaciones de reproducción cruzada derivadas de plantas de *P. ixocarpa* cuyo genoma fue duplicado con colchicina. Se observa una tendencia al incremento de apareamientos meióticos bivalentes, indicio de aproximación hacia la regularidad meiótica. Hay diferencias entre frecuencias de bivalentes entre plantas, lo cual ofrece oportunidad de seleccionar hacia estabilidad reproductiva. No se muestra variación entre generaciones para viabilidad de polen, y aunque es relativamente baja, no se observó afectación de la fertilidad. Se logró la propagación *in vitro* a partir de semillas autotetraploides, lo que permitirá la formación de nuevas poblaciones de plantas que presente un comportamiento meiótico con mayor regularidad.

VI. LITERATURA CITADA

- Andrade, R. M. 1998. Cultivo *in vitro* de tomate de cáscara. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México. 163 pp.
- Andrade-Rodríguez, M., M. C. López-Peralta, V. A. González-Hernández, A. García-Velázquez, A. Peña-Lomelí. 2005. Efecto del genotipo en la micropropagación de tomate de cáscara. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 11:31-37.
- Arribas-Ugarte, 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.
- Boutherin, D. y G. Bron. 1994. Multiplicación de plantas hortícolas. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 225 pp.
- Cubero, J. I. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. Segunda Edición. Mundi-Prensa. España. 365 pp.
- D'Arcy, W. G. 1973. Solanaceae. In: Woodson, R. y R. W. Schery. Flora of Panama. Ann. Mo. Bot. Gard. 60:573-780.
- Doyle, J. J., L. E. Flagel, A. H. Paterson, R. A. Rapp, D. E. Soltis, P. S. Solti y J. F. Wendel. 2008. Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. Annu. Rev. Genet. 42:443-461.
- Gar O., D. J. Sargent, T. Ching-Jung, T. Pleban, G. Shalev, H. D. Byrne y D. Zamir. 2011. An autotetraploid Linkage Map of Rose (*Rosa hybrida*)

- García-Alonso, R. 2008. La huella de la evolución (Una historia en límite del caos). ISBN: 978-1-4092-0288-2. London. 637 pp.
- Grant, V. 1989. Especiación vegetal. Ed. Limusa. México. 587 pp.
- Hagiwara, J. C., C. A. Kato, M. Mori y I. Miyajima. 2002. Obtención de poliploides en *Calibracoa pygmaea* mediante el uso de colchicina *in vitro*. In: 1er. Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales IV. Jornadas Nacionales de Floricultura. Buenos Aires, Argentina. 90 pp.
- Hartmann, H. y D. Kester. 1999. Propagación de plantas: Principios y prácticas. 7ª edición. Compañía Editorial Continental S.A. D.F., México. 760 pp.
- Imery, J. y H. Cequea. 2001. Colchicine-induce autotetraploid in *Aloe vera* L. *Cytologia* 66:409-413.
- Jackson, R. C. 1988. A quantitative cytogenetic analysis of an intersectional hybrid in *Helianthus* (Compositae). *Amer. J. Bot.* 75:609-614.
- Jiménez-Santana, E., V. Robledo-Torres, A. Benavidez-Mendoza, F. Ramírez-Gódina, H. Ramírez-Rodríguez y E. de la Cruz-Lázaro. 2012. Calidad de fruto de genotipos tetraploides de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo.* 28:153-161.
- Krарup, H. A. 1984. Organización de la variabilidad genética en poblaciones de plantas. In: Contreras, A. y A. J. Esquinas. Anales Simposio Recursos Fitogenéticos. Contreras. Universidad Autónoma Chapingo e International Board for Plant Genetic Resources.
- Lambert-Ortiz, E. 1998. Cocina latinoamericana. Editorial EADAF, S.A. Madrid, España. 414 pp.
- Leitch, A. R. y I. J. Leitch. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plant. *Sci.* 320:481-483.

- Leitch, I. J. y M. D. Bennet. 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends plant Sci.* 2:470-476.
- Manzo-González, A., A. Ledesma-Hernández, J. C. Villatoro-López, I. Álvarez-Escareño, J. L. Rodríguez de la O, A. Peña-Lomelí. 1997. Regeneración *in vitro* de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 4:45-49.
- Manzo-González, A., A. Ledesma-Hernández, J. C. Villatoro-López, I. Álvarez-Escareño, J. L. Rodríguez de la O, A. Peña-Lomelí. 1997. Regeneración *in vitro* de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 4:45-49.
- Martínez, M. 2008. Instituto de Biología. "*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem. - IBUNAM: MEXU: PV577606". UNIBIO: Colecciones Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV577606>.
- Martínez-Díaz, M. L. 1998. Revisión de *Physalis* Sección *Epeteiorhiza* (Solanaceae). *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ser. Bot.* 69: 71-117.
- Molero, T. y A. Matos. 2008. Efectos de la inducción artificial de la poliploidía en plantas de *Aloe vera* L. *Bol. Centro Invest. Biol.* 42:111-133.
- Montes, H. S. y R. J. R. Aguirre. 1994. Etnobotánica del tomate mexicano (*Physalis philadelphica* Lam.). *Revista de Geografía Agrícola.* 20:163-172.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

- Olmos, S., G. Luciani y E. Galdeano. 2004. Micropropagación. In: Levitus, G., V. Echenique, E. Hopp y L. Mroginski. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Editorial INTA. Buenos Aires. 163 pp.
- Ortuño-Olea, L., G. A. Manzo-González y A. Peña-Lomelí. 1997. Cultivo de anteras en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Rev. Chapingo Ser. Hortic. 4: 39-43.
- Otto, S. P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. Cell. 131:452–462.
- Parisod, C., R. Holderegger y C. Brochmann. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. New. Phytol. 186:5–17.
- Peña-Lomelí, A. 1994. Hibridación en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) In: Programa y memoria de la XL reunión anual de la Interamerican Society for Tropical Horticulture. Campeche, México. 67 pp.
- Peña-Lomelí, A. y F. Márquez-Sánchez. 1990. Mejoramiento genético del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). Rev. Chapingo. 71-72:84-88.
- Peña-Lomelí, A. y J. F. Santiaguillo-Hernández. 1999. Variabilidad genética de tomate de cáscara en México. Boletín técnico No. 2. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 26 pp.
- Peña-Lomelí, A, J. D. Molina-Galán, F. Márquez-Sánchez, J. Sahagún-Castellanos, J. Ortiz-Cervantes, T. Cervantes-Santana. 2002. Respuestas estimadas y observadas de tres métodos de selección en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Rev. Fitotec. Mex. 25:171-178.
- Poggio, L., G. González, M. R. Ferrari, A. M. García, A. Wulff, E. Greizerstein, P. Tomás y G. Schrauf. 2009. Citogenética. In: Levitus, G., V. Echenique,

- E. Hopp y L. Mroginski. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Editorial INTA. Buenos Aires. pp. 379-388.
- R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-Project.org/>.
- Ramírez-Godina, F., P. Rahim-Foroughbakhch, V. Robledo-Torres, A. Benavides-Mendoza y M. A. Alvarado-Vázquez. 2011. Caracterización de autotetraploides en tomate de cáscara. Planta Año 6 No. 12. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León. 28 pp.
- Ramírez-Malagón, R. y N. Ochoa-Alejo. 1991. Adventitious shoot formation and plant regeneration from tissues of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.). Plant. Cell. Tiss Org. 25:185-188.
- Ramsey, J. y D. W. Schemske. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. Annu. Rev. Ecol. Syst. 33:589-639.
- Reynoso, W. L., A. Fernández y V. G. Solís-Neffa. 2005. Análisis preliminar del grado de diploidización de *Turnera krapovickasii* Arbo autotetraploide (Turneraceae). Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. 3 pp.
- Robledo-Torres, V., F. Ramírez-Godina, R. Foroughbakhch-Pournavab, A. Benavides-Mendoza, G. Hernández-Guzmán y M. H. Reyes-Valdés. 2011. Development of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) autotetraploids and their chromosome and phenotypic characterization. Breeding Sci. 61:288-293.
- Robles, S. R. 1990. Terminología Genética y Fitogenética. Ed. Trillas. D. F., México. 163 pp.
- Sala, C., M. Bulos, A. Fresco y E. Altieri. 2004. Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos. In: Levitus, G., V. Echenique, E. Hopp y L. Mroginski. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Editorial INTA. Buenos Aires, Argentina. pp. 327-337.

- Sánchez-Martínez, J., J. M. Padilla-García, O. Vargas-Ponce, B. Bojórquez-Martínez., G. Romero-Verdín, M. Aguilar-Govea y S. Padilla-Orozco. 2005. Colecta, caracterización, conservación y aprovechamiento del Tomate de Cáscara (*Physalis spp.*) y sus parientes cercanos en el occidente de México. Avances en la investigación Científica en el CUCBA. ISBN: 970-27-0770-6. pp. 163-168.
- Santiaguillo-Hernández, J. F., F. Márquez-Sánchez., A. Peña-Lomelí y J. A. Cuevas-Sánchez. 1997. Importancia de los recursos fitogenéticos en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica. Serie Recursos Vegetales Mesoamericanos, núm. 2. Universidad Autónoma Chapingo. México. 11 pp.
- Sañudo, A. y M. Ruíz-Rejon. 1975. Sobre la naturaleza autoploide de algunas plantas silvestres. Anal. Inst. Bot. Canavilles. 32:633-648.
- Saray, M. C. R. 1977. Tomate de Cáscara, Algunos Aspectos sobre su Fisiología e Investigación. Campo Agrícola Experimental Zacatepec, Morelos, México.
- Sartor, M., F. Espinoza y C. Quarín. 2004. Inducción de autoploidía en *Paspalum plicatulum*. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET). Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Argentina. pp. 1-5.
- SIAP-SAGARPA. 2011. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. www.siap.sagarpa.gob.mx.
- Sobrino-Visperinas, E. y M. Sanz-Elorza. 2007. Sobre el status de *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hormen. Acta Bot. Malacitana. 32: 232-233.
- Soto, G., A., Peña, J. F. Santiaguillo, J. E. Rodríguez y A. Palacios. 1998. Resistencia a *Fusarium sp.* de 95 colectas de tomate de cáscara (*Physalis spp.*). Rev. Chapingo Ser. Hortic. 4:51-55.

- Stebbins, G. L. 1947. Types of polyploids: Their classification and significance. *Adv. Genet.* 1:403–429.
- Stebbins, G. L. 1971. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Edward Arnold, London. 216 pp.
- Thomas, P. y J. W. Schiefelbein. 2001. Combined *in vitro* and *in vivo* propagation for rapid multiplication of grapevine cv. Arka Neelamani. *Hortscience*. 36:1107-1110.
- Thompson J. D. y R. Lumaret. 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecol. Evol.* 7:302-306.
- Validated Using the Strawberry (*Fragaria vesca*) Genome Sequence. *PLoS One*. 6:e20463.
- Valladolid, A., R. Blas y R. González. 2004. Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. In: Seminario J. Raíces andinas contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Lima, Perú. pp. 95- 99.
- Villalobos, V. M. y T. A. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, métodos y resultados. In: Roca, W. y L. Mroginski. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT. Bogotá, Colombia. pp. 127-141.