

Estudio histológico y morfológico de plantas autotetraploides y diploides de tomate de cáscara*

Histological and morphological study of autotetraploid and diploid plants of tomatillo

Francisca Ramírez Godina¹, Valentín Robledo Torres^{2§}, M. Humberto Reyes Valdés¹, Leticia Escobedo Bocardo¹, María Alejandra Torres Tapia¹ y Hermila Trinidad García Osuna¹

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio-Departamento de Fitomejoramiento. (godramf@gmail.com; MathGenome@gmail.com; bocardo_lety@hotmail.com; atorres_tapia@hotmail.com; hgosuna@hotmail.com). ²Departamento de Horticultura. Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315. Saltillo, Coahuila, México. [§]Autor para la correspondencia: varoto@prodigy.net.mx.

Resumen

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) es una especie originaria de México, su importancia radica en su alto consumo en México y exportación a los Estados Unidos de América y Canadá. La formación de autoploidos es una alternativa de introducción de nuevo potencial genético en esta especie; sin embargo, se desconoce el impacto de la poliploidización artificial sobre la histología y morfología de la planta, por lo que se planteó como objetivo; estudiar la histología y morfología de plantas diploides (Rendidora) y autotetraploides. El material vegetal utilizado fueron tres autotetraploides (11,16 y 20) seleccionados en base a rendimiento y calidad de fruto y el diploide rendidora (19). El experimento se estableció a cielo abierto en General Cepeda, Coahuila, en 2011, bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, la parcela útil fueron 10 plantas. Las variables morfológicas fueron: ancho (AH) y largo de hoja (LH), diámetro de tallo (DT), diámetro de flores (DF), altura de planta (AP). Las histológicas fueron: área de vasos de xilema de hoja (AXH), peciolo (AXP), raíz (AXR) y tallo (AXT), parénquima en empalizada (LPEH) y parénquima lagunar en hojas (APLH). Los tetraploides mostraron ancho de hoja y diámetro de florsignificativamente mayor que el diploide ($p \leq 0.05$); sin embargo en altura de planta el diploide fue significativamente mayor que los

Abstract

Husk tomato (*Physalis ixocarpa*) is a species from Mexico, its importance lies in its high consumption in Mexico and export to the United States and Canada. Autopolyploids formation is an alternative to introduce new genetic potential in this species; however, the impact of artificial polyploidization on histology and morphology of plant is unknown, so it was proposed as objective to study histology and morphology of diploid plants (Rendidora) and autotetraploid. The plant material used were three autotetraploid (11, 16 and 20) selected based on yield and quality of fruit and rendidora diploid (19). The experiment was established in the field in General Cepeda, Coahuila in 2011, under a complete randomized block design with four replications, the useful plot were 10 plants. The morphological variables were: widths (AH), leaf length (LH), stem diameter (DT), flower diameter (DF) and plant height (AP). Histological were: leaf xylem vessels area (AXH), petiole (AXP), root (AXR) and stem (AXT), palisade parenchyma (LPEH) and lacunar parenchyma in leaf (APLH). Tetraploid showed leaf width and flower diameter significantly higher than diploid ($p \leq 0.05$); however in plant height diploid was significantly higher than autotetraploid. The area of xylem vessels of stem and root of autotetraploids showed significantly higher

* Recibido: mayo de 2015
Aceptado: agosto de 2015

autotetraploides. El área de vasos de xilema de tallo y raíz de los autotetraploides mostraron valores significativamente ($p < 0.01$) superiores a los diploides de acuerdo a la prueba de Tukey, además las plantas autotetraploides fueron más vigorosas, característica importante en el mejoramiento de esta especie, por lo que este tipo de estudios aportará datos para la comprensión del comportamiento anatómico de los autotetraploides en tomate de cáscara.

Palabras clave: *Physalis ixocarpa* Brot., histología, poliploidia, colchicina, vasos de xilema.

Introducción

Physalis ixocarpa es una especie originaria de México, se conoce como tomatillo, tomate verde, tomate de cáscara, tomate de fresadilla. En 2014 fue la quinta hortaliza en superficie más sembrada, con 46 524.96 ha y un rendimiento promedio nacional de 14.94 t ha⁻¹ (SIAP-SAGARPA, 2014). La importancia de esta hortaliza se debe a su alto consumo en México y a su exportación a los Estados Unidos de América y Canadá. A pesar de existir amplia variabilidad genética tanto en el tomate silvestre como en el domesticado en México (Santiaguillo *et al.*, 2004), el rendimiento medio nacional es considerado bajo.

La autoploidía es un estado biológico inducible caracterizado por la duplicación del número de genomas de un mismo individuo, con lo cual se logra incrementar la variabilidad genética, que puede ser aprovechada por los fitomejoradores. La autoploidía incrementa el tamaño efectivo de la población e incrementa la flexibilidad genómica, facilitando así el manejo de la selección artificial. La redundancia genética puede permitir la divergencia adaptativa de genes duplicados (Parisod *et al.*, 2010). En este sentido Robledo *et al.*, (2011) desarrollaron una población autotetraploide $2n=4x=48$, mediante la utilización de colchicina en la variedad Rendidora.

El material resultante es prometedor para obtener nuevas variedades o híbridos de alto crecimiento y calidad (Robledo *et al.*, 2011) y de acuerdo con lo que mencionan Tang *et al.*, (2010) de que la poliploidización es una tendencia importante en la evolución de las plantas, que tiene muchas ventajas sobre los diploides y debido a que se desconoce el impacto de la autoploidización artificial a nivel histológico y morfológico en tomate de cáscara, se planteó el siguiente objetivo; estudiar la

values ($p < 0.01$) than diploid according to Tukey test, also autotetraploid plants were more vigorous, an important characteristic in the improvement of this species, so this kind of studies provide data to understand the anatomical behavior of autotetraploids in tomatillo.

Keywords: *Physalis ixocarpa* Brot, colchicine, histology, polyploidy, xylem vessels.

Introduction

Physalis ixocarpa is a species from Mexico, known as tomatillo, green tomato, husk tomato, fresadilla tomato. 2014 was the fifth vegetable in acreage, with 46 524.96 ha and a national average yield of 14.94 t ha⁻¹ (SIAP-SAGARPA, 2014). The importance of this vegetable is due to its high consumption in Mexico and export to the United States and Canada. Despite there is a wide genetic variability in both wild and domesticated tomato in Mexico (Santiaguillo *et al.*, 2004), the national average yield is considered low.

Autopolyploidy is an inducible condition characterized by the duplication in the number of genomes from the same individual, which manages to achieve an increase in genetic variability, which can be exploited by plant breeders. Autopolyploidy increases the effective size of the population and increases genomic flexibility, facilitating the management of artificial selection. The genetic redundancy may allow adaptive divergence of duplicated genes (Parisod *et al.*, 2010). In this regard Robledo *et al.* (2011) developed an autotetraploid population $2n=4x=48$, using colchicine in Rendidora variety.

The new material is promising for new varieties or hybrids of high growth and quality (Robledo *et al.*, 2011) and according to that mentioned by Tang *et al.* (2010) polyploidization is a major trend in plant evolution, which has many advantages over diploid and because the impact of artificial self polyploidisation at histological and morphological level in husk tomato is unknown; the following objective was proposed; to study histology and morphology if autotetraploid and diploid plants (Rendidora) of husk tomato previously formed by the action of colchicine, as the anatomical knowledge of artificial autotetraploid of husk tomato will provide data for basic understanding of the induction of autopolyploidy in this species.

histología y morfología de plantas autotetraploides y diploides (Rendidora) de tomate de cáscara previamente formados por la acción de colchicina, ya que el conocimiento anatómico de los autotetraploides artificiales de tomate de cáscara aportará datos para el entendimiento básico de la inducción de autopoliploidía en esta especie.

Materiales y métodos

Establecimiento en campo

El experimento se llevó a cabo en 2011 en General Cepeda Coahuila y Laboratorio de Citogenética de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila. El material vegetal utilizado consistió de tres autotetraploides (11, 16 y 20) seleccionados en base a rendimiento y calidad de fruto y el diploide (19) rendidora. Las poblaciones fueron sembradas depositando de dos a tres semillas por cavidad, en charolas de poliestireno de 200 cavidades, utilizando como sustrato turba y perlita en una proporción de 1:1. Las charolas se llevaron a invernadero donde se desarrollaron las plántulas y cuando alcanzaron de 10 a 12 cm de altura y dos pares de hojas verdaderas, las plántulas fueron trasplantadas a campo abierto a surcos con acolchado plástico de color negro, de 5 m de largo y 1.8 m de ancho y con una separación de 60 cm entre plantas y dos hileras por surco con una separación de 30 cm entre hileras. Diez días después del trasplante se realizó un aclareo dejando solamente una plántula por punto. Los tratamientos se establecieron bajo un diseño experimental de bloques al azar, con cuatro repeticiones, cada tratamiento constituido por 10 plantas. La nutrición se aplicó vía riego, tres veces por semana, los riegos fueron diarios, se aplicaron dos litros por día por planta hasta los 45 días después del trasplante, posteriormente se incrementó a cuatro litros por día por planta.

Caracterización morfológica

A los 60 días después del trasplante, se evaluaron las siguientes variables morfológicas en diploides y tetraploides: ancho (AH) y largo (LH) de hoja, diámetro de tallo en cm (DT), diámetro de flores en cm (DF), altura de planta en cm (AP), estas variables se midieron en tres plantas tomadas al azar de cada tratamiento en cada una de las cuatro repeticiones, dando un total 12 plantas de cada población. Las mediciones fueron con un vernier digital de precisión marca AutoTEC®, la altura de planta fue medida mediante una cinta métrica en cm. Estas variables se evaluaron con la finalidad de caracterizar a las

Materials and methods

Field establishment

The experiment was carried out in 2011 in General Cepeda, Coahuila and in the Cytogenetics Laboratory from the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro in Saltillo Coahuila. The plant materials were three autotetraploid (11, 16 and 20) selected based on yield and quality of fruit and the diploid (19) rendidora. The populations were sown depositing two or three seeds per well in polystyrene trays of 200 cavities, using as substrate peat and perlite at a ratio of 1:1. The trays were carried to a greenhouse where seedlings developed and when these reached a height of 10 to 12 cm and two pairs of true leaves, the seedlings were transplanted in the field on grooves with padded black plastic, 5 m long and 1.8 m wide with a spacing of 60 cm between plants and two rows per groove with spacing of 30 cm between rows. Ten days after transplantation a thinned was performed leaving only one seedling per point. The treatments were established under a randomized block design with four replications, each treatment consisted of 10 plants. Nutrition is applied through irrigation, three times a week; irrigation was daily applying two liters per day per plant until 45 days after transplantation, then increased to four liters per day per plant.

Morphological characterization

At 60 days after transplantation, the following morphological variables were evaluated in diploid and tetraploids: leaf width (AH) and length (LH), stem diameter in cm (DT), flower diameter in cm (DF), plant height in cm (AP), these variables were measured in three plants taken randomly from each treatment in each of the four repetitions, making a total of 12 plants per each population. The measurements were made using a digital precision vernier AutoTEC®, plant height was measured with a tape measure in cm. These variables were evaluated in order to characterize tetraploid populations and to identify morphological changes induced by polyploidization in tomatillo plants.

Histological study

Samples were taken at 60 days after planting three plants per treatment of each replication and taken to the laboratory, cut a piece of tissue (2 cm) from the main root at 3 cm below

poblaciones tetraploides e identificar cambios morfológicos inducidos por la poliploidización en plantas de tomate de cáscara.

Estudio histológico

Se tomaron muestras a los 60 días después de la siembra, tres plantas por tratamiento de cada repetición fueron llevadas al laboratorio, se cortó un fragmento de tejido (2 cm) de la raíz principal a 3 cm bajo la superficie del suelo, fragmento de tejido (2 cm) del tallo a 10 cm sobre la superficie del suelo, además de la base de la primera hoja se obtuvo un fragmento de tejido (aproximadamente 1 cm²) tomando como referencia la nervadura central y un fragmento de pecíolo (2 cm) de la primera rama de cada planta, los tejidos fueron procesadas por la técnica histológica de la parafina como sigue: Para conservar los tejidos con un mínimo de alteraciones fueron colocados en frasco de vidrio de 15 ml con fijador FAA (Formaldehído (36-40%) 5 cc, alcohol etílico al (70%) 90 cc y ácido acético glacial 5 cc). Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en concentraciones de alcohol etílico al 50, 60, 70, 85 y 96%, más eosina, continuando con alcohol etílico absoluto I, alcohol etílico absoluto II, alcohol etílico absoluto más xilol en proporciones volumen de 3:1, alcohol etílico absoluto más xilol en proporciones de 1:1, alcohol etílico absoluto más xilol en proporciones de 1:3 por último los tejidos pasaron a xilol puro y permanecieron en cada solución por espacio de 2 h, y embebidas en parafina con punto de fusión en 58 °C posteriormente se sustituyó el alcohol con xilol (Hernández, 1990; Jáuregui, 2003; Cañizares *et al.*, 2005).

Se realizaron cortes transversales de tejidos a 20 micras con un microtomo rotatorio, los cuales se montaron en porta objetos. Para la tinción se usó la doble coloración de safranina-fast green, donde pasaron por diferentes soluciones de alcohol y xilol, se sacaron las preparaciones del último xilol y se escurrieron. Se sellaron con una gota de bálsamo de Canadá y un cubreobjetos del tamaño del tejido.

Así las preparaciones se pusieron a secar en un horno a 30 °C una semana. Posteriormente los tejidos fueron analizados con la ayuda de un microscopio con cámara digital integrada Pixera Wiender Pro, se seleccionaron las mejores muestras y se fotografiaron con los objetivos 10X y 40X (Wilkinson, 1979). Las mediciones fueron a partir de imágenes digitales, con un software de medición Axion Vision Rel. 4.8. Las variables evaluadas fueron área de vasos de xilema de la nervadura central de la hoja (AXH), vasos de xilema del

soil surface, piece of tissue (2 cm) from stem at 10 cm above soil surface, in addition to the base of the first leaf a piece of tissue (approximately 1 cm²) taking as reference the midrib and petiole fragment (2 cm) from the first branch of each plant; the tissues were processed by the histological paraffin technique as follows: to preserve the tissues with minimal alterations were placed in glass jar 15 ml with fixative FAA (Formaldehyde (36-40%) 5cc, ethyl alcohol (70%) 90 cc and 5 cc glacial acetic acid). Then the samples were dehydrated in ethyl alcohol concentrations 50, 60, 70, 85 and 96%, plus eosin, continuing with absolute ethyl alcohol I, absolute ethyl alcohol II, absolute ethyl alcohol plus xylene in volume ratios of 3:1, absolute ethyl alcohol plus xylene in proportion 1:1, absolute ethyl alcohol plus xylene in proportions of 1:3 and finally the tissues passed to pure xylene and remained in each solution for 2 h and embedded in paraffin with melting point at 58 °C then the alcohol was replaced with xylene (Hernandez, 1990; Jáuregui, 2003; Cañizares *et al.*, 2005).

Transversal cuts of tissue at 20 microns with a rotary microtome were made, which were mounted on a slide. For staining a dual color staining of safranin-fast green were used, passing through different alcohol and xylene solutions, the preparations were pulled out from the last xilol and drained. Sealed with a drop of Canada balsam and a slide of the tissue size.

Thus the preparations were put to dry in an oven at 30 °C for a week. The tissues were analyzed with the aid of a microscope with an integrated camera Pixera Wiender Pro; the best samples were selected and photographed with 10X and 40X objectives (Wilkinson, 1979). The measurements were made from digital images, with measurement software Axion Vision Rel. 4.8. The variables were xylem vessels area from the midrib of the leaf (AXH), petiole xylem vessels (AXP), xylem vessels from the main root (AXR), and stem xylem vessels (AXT) palisade parenchyma (LPEH) and lacunar parenchyma in leaves (APLH).

Statistical analysis

An analysis of variance was performed on a randomized block design with four replications, the significance for morphological variables: leaf width (AH) and length (LH), stem diameter (DT) flowers diameter (DF), plant height (AP), and histologic: xylem vessel area from the midrib of the leaf (AXH) petiole xylem vessels (AXP), xylem vessels from the main root (AXR), and stem xylem vessels (AXT) palisade parenchyma (LPEH) and lacunar parenchyma in

pecíolo (AXP), vasos de xilema de raíz principal (AXR), y vasos de xilema del tallo (AXT), parénquima en empalizada (LPEH) y parénquima lagunar en hojas (APLH).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza en un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, la significancia para variables morfológicas: ancho (AH) y largo (LH) de hoja, diámetro de tallo (DT), diámetro de flores (DF), altura de planta (AP), e histológicas: área de vasos de xilema de la nervadura central de la hoja (AXH), vasos de xilema del pecíolo (AXP), vasos de xilema de raíz principal (AXR), y vasos de xilema del tallo (AXT), parénquima en empalizada (LPEH) y parénquima lagunar en hojas (APLH), fue considerada en función del nivel de plodía, donde el factor de variación fueron tres poblaciones de autotetraploides y una población diploides de tomate de cáscara, para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Se utilizó el programa estadístico de SAS versión 9.0.

Resultados y discusión

Caracterización morfológica

La población diploide tuvo en promedio 6.81 cm de ancho de hoja (AH) mientras que las tres poblaciones autotetraploides presentaron en promedio 8.51 cm, la población autotetraploide 11 presentó el mayor valor con 9.21 cm y fue estadísticamente igual ($p > 0.05$) a las otras dos poblaciones tetraploides, pero diferente ($p < 0.05$) del diploide rendidora (Cuadro 1), se observó que las hojas de las plantas autotetraploides fueron de un color verde más oscuro que las plantas diploides, además el ciclo de vida de las plantas autotetraploides fue más largo (aproximadamente 15 días) que las diploides, estos resultados coinciden con los encontrados por Chen *et al.* (2011) en plantas tetraploides de *Anthurium andraeanum* "Arizona" inducidas con colchicina ya que las plantas tetraploides presentaron pecíolos firmes, hojas gruesas y de un verde más oscuro además vivieron más tiempo en comparación con las plantas diploides. En lo que respecta a la longitud de hoja (LH) en este trabajo no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las poblaciones diploide y las autotetraploides.

leaf (APLH), was considered on the ploidy level, where the variation factor were three autotetraploid populations and one diploid population of tomatillo, for mean comparison Tukey test ($p \leq 0.05$). SAS statistical software version 9.0 was used.

Results and discussion

Morphological characterization

Diploid population had on average a width (AH) of 6.81 cm while the three autotetraploid populations had on average 8.51 cm, autotetraploid population 11 showed the highest value with 9.21 cm and was statistically similar ($p > 0.05$) to the other two tetraploid populations, but different ($p < 0.05$) from rendidora diploid (Table 1) observing that the leaves of autotetraploid plants showed a darker green color than diploid plants, also the life cycle of autotetraploid plants was longer (about 15 days) than diploid, these results agree with those reported by Chen *et al.* (2011) in tetraploid plants of *Anthurium andraeanum* "Arizona" induced with colchicine since tetraploid plants showed firm petioles, thick leaves and a dark green color, also had a longer cycle compared to diploid plants. Regarding to leaf length (LH) in this study, no significant differences ($p > 0.05$) were found between diploid and autotetraploid populations.

In flower diameter (DF) significant differences between autotetraploid and diploid populations were found, the tetraploid populations showed between 2.47 and 2.68 cm, being tetraploid 16 which had the highest value and were statistically similar ($p > 0.05$) between them. The population that showed the smaller flower diameter was diploid 19 (2.07 cm), agreeing with Liu *et al.* (2007) who found morphological differences between diploid and tetraploid on *Platanus acerifolia* developed with the use of colchicine in *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella, the tetraploids showed slow growth, but had greater vigor, broad and thick leaves, larger flowers, longer stems and improved vase life (Gantait *et al.*, 2011).

In stem diameter (DT), there were no significant differences between autotetraploid and diploid population, the tetraploid population 11 (2.53 cm), showed the highest value and was statistically similar ($p > 0.05$) to all others, including diploid population 19.

Cuadro 1. Valores medios de características morfológicas de diploides y autotetraploides de tomate de cáscara.
Table 1. Mean values of morphological characteristics of diploid and autotetraploid tomatillo.

Poblaciones y nivel de ploidía	AH (cm)	LH (cm)	DF (cm)	DT (cm)	AP (cm)
19 Diploide	6.81 ^b	17.96 ^a	2.07 ^b	2.36 ^a	82.19 ^a
11 Tetraploide	9.11 ^a	18.18 ^a	2.51 ^a	2.53 ^a	67.13 ^b
16 Tetraploide	7.86 ^{ab}	17.4 ^a	2.68 ^a	2.28 ^a	58.6 ^b
20 Tetraploide	8.56 ^a	17.35 ^a	2.48 ^a	2.5 ^a	65.78 ^b
DMS	1.41	2.23	0.38	0.74	14.42

AH= ancho de hoja, LH=largo de hoja; DF= diámetro de flor; DT= diámetro de tallo; AP=altura de planta; *Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas a nivel ($P \leq 0.05$); DMS= Diferencia mínima significativa.

En diámetro de flor (DF) se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones autotetraploides y el diploide, las poblaciones tetraploides presentaron entre 2.47 y 2.68 cm, siendo el tetraploide 16 el que presentó el valor más alto y fueron estadísticamente iguales ($p > 0.05$) entre ellas. La población que presentó las flores de menor diámetro fue el diploide 19 (2.07 cm), coincidiendo con Liu *et al.* (2007) quienes encontraron diferencias morfológicas entre diploides y tetraploides de *Platanus acerifolia* desarrolladas con el uso de la colchicina, en *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella los tetraploides mostraron un crecimiento lento, pero tuvieron mayor vigor, hojas anchas y engrosadas, además desarrollaron flores más grandes, tallos más largos, y mejoraron la vida de florero (Gantait *et al.*, 2011).

En diámetro de tallo (DT) no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones autotetraploides y el diploide, la población tetraploide 11 (2.53 cm), presentó el mayor valor y fue estadísticamente igual ($p > 0.05$) a todas las demás, incluyendo a la población diploide 19.

En cuanto a la altura planta (AP) el diploide 19 (82.2 cm) presentó el mayor valor y fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a las poblaciones autotetraploides que presentaron los valores más bajos de (58.6 cm a 67.13cm) y fueron estadísticamente iguales ($p > 0.05$). Los autotetraploides de tomate de cáscara presentaron valores más altos de ancho de hojas y diámetro de flores en comparación con los diploides, coincidiendo con Cequea (2000), quien menciona que los autoploidos tienen una tolerancia ecológica más amplia y tamaños celulares más grandes, por su parte Imery y Cequea (2001) encontraron que los nuevos genotipos tetraploides de *A.*

As for plant height (AP) diploid 19 (82.2 cm) had the highest value and was statistically different ($p < 0.05$) to autotetraploid populations showing the lowest values (58.60 cm to 67.13cm) and were statistically equal ($p > 0.05$). Tomatillo autotetraploids had higher values for leaf width and flower diameter compared to diploid, coinciding with Cequea (2000) who mentions that autoploidoids have a wider ecological tolerance and larger cell sizes, meanwhile Imery and Cequea (2001) found that new tetraploid genotypes of *A. vera* produced greater leaf biomass accumulation, especially due to the increase in width and thickness of the leaves, also, Rego *et al.* (2011) found that with the formation of autotetraploid of *Passiflora edulis* Sims. ($2n = 2x = 18$) using colchicine and oryzalin obtained more vigorous plants ($2n = 2x = 36$).

In this research was noted that tetraploids growth was slower because at 60 days when diploid variables were taken outperformed tetraploids in plant height; however, at the end of the cycle tetraploid exceeded diploid, so it is recommend to take these variables at different stages of development and thus be able to match the observed, Molero and Matos (2008) who found that the gene duplication in *Aloe vera* increased plant height, length, width, thickness and leaf volume regarding to diploid plants, so it is estimated that polyploidization could be an alternative to increase production of cell biomass in this species. Leaf area is an important variable because it is directly related to the photosynthetic activity and this with the accumulation of reserves (Poehlman and Allen, 2005). A variable that normally is related to fruit size is flower size and in this case according to observed values it can be said that an increase was induced in autotetraploids regarding this characteristic.

vera producían mayor acumulación de biomasa foliar, debido especialmente al incremento en el ancho y espesor de sus hojas, además, en este sentido Rêgo *et al.* (2011) encontraron que con la formación de autotetraploides de *Passiflora edulis* Sims. ($2n=2x=18$) mediante el uso de colchicina y oryzalin lograron plantas ($2n=2x=36$) más vigorosas.

En este trabajo se observó que el crecimiento en los tetraploides fue más lento por que a 60 días que se tomaron las variables de las plantas diploides que superaron a las tetraploides en altura de planta; sin embargo, las tetraploides al final del ciclo superaron a las diploides, por lo que se recomienda tomar estas variables a diferentes etapas del desarrollo y así poder coincidir con lo observado por Molero y Matos (2008) quienes encontraron que con la duplicación cromosómica en *Aloe vera* se incrementó la altura de las plantas, la longitud, ancho, espesor y volumen foliar con respecto a las plantas diploides, por lo que se estima que la poliploidización podría constituir una alternativa para aumentar la producción de biomasa celular en esta especie. El área foliar es una variable importante debido a que se relaciona directamente con la actividad fotosintética y ésta con la acumulación de reservas (Poehlman y Allen, 2005). Una variable que normalmente está relacionada con el tamaño de fruto es el tamaño de la flor y en este caso de acuerdo a los valores observados se puede afirmar que se indujo un incremento en los autotetraploides con respecto a ésta característica.

Estudio histológico

Las variables histológicas área de células de parénquima lagunar en hoja (APLH) la poblaciones autotetraploides presentaron en promedio $6\,912.67\ \mu\text{m}^2$ siendo superada por la población diploide que presentó un valor de $7\,398.97\ \mu\text{m}^2$, en área de vasos de xilema de la nervadura central de la hoja (AXH) el diploide presentó $655.08\ \mu\text{m}^2$ mientras que los autotetraploides presentaron en promedio de $602.81\ \mu\text{m}^2$, en longitud de células de parénquima en empalizada (LPEH) los autotetraploides exhibieron $100.61\ \mu\text{m}$ con un valor que superó al diploide, ya que éste presentó $97.361\ \mu\text{m}$ (Figura 1), en área de vasos de xilema en peciolos (AXP) las poblaciones autotetraploides tuvieron en promedio $604.54\ \mu\text{m}^2$ mientras que las plantas diploides presentaron un valor de $714.56\ \mu\text{m}^2$; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre plantas diploides y autotetraploides ya que fueron estadísticamente iguales ($p \geq 0.05$).

El hecho de que en el presente estudio no se presentaran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a estas variables, puede indicar que a pesar de la duplicación de

Histological study

Histological variable cell area of lacunar parenchyma in leaf (APLH) the autotetraploid populations had on average $6\,912.67\ \mu\text{m}^2$ being surpassed by diploid population showing a value of $7\,398.97\ \mu\text{m}^2$, in xylem vessels area from the midrib leaf (AXH) the diploid showed $655.08\ \mu\text{m}^2$ while autotetraploid presented $602.81\ \mu\text{m}^2$, length of palisade parenchyma cells (LPEH) autotetraploids exhibited $100.61\ \mu\text{m}$ with a value that exceeded the diploid, since this had $97.361\ \mu\text{m}$ (Figure 1), xylem vessels area in petioles (AXP) autotetraploid populations showed on average $604.54\ \mu\text{m}^2$ while diploid plants showed a value of $714.56\ \mu\text{m}^2$; however, no significant differences were found between diploid and autotetraploid plants since they were statistically equal ($p \geq 0.05$). The fact that in the present study no significant differences were found in these variables, may indicate that despite chromosomes and genes duplication, leaf and petioles characteristics were little affected by polyploidization in tomatillo, this may also be due to the fact that autotetraploid have a slow growth and the cycle is longer than diploids and for the present study diploid and autotetraploid samples were taken on the same date.

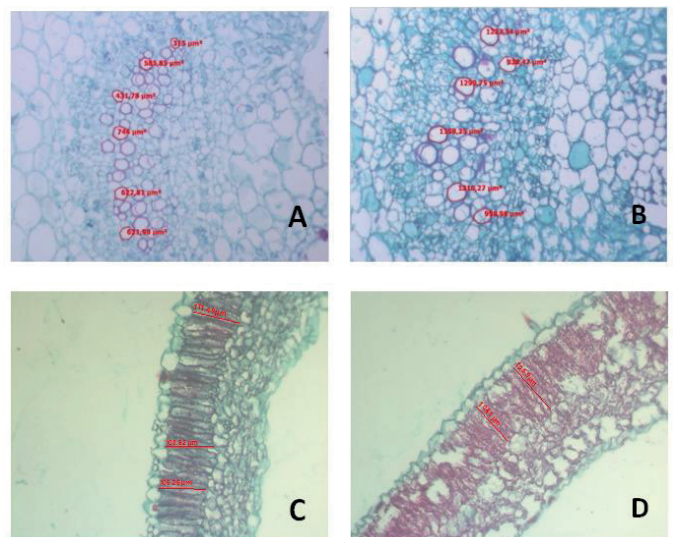


Figura 1. Vasos de xilema de la nervadura central de la hoja; A) Diploide; B) Autotetraploide. Parénquima en empalizada de la hoja; C) Diploide; D) autotetraploide en tomate de cáscara 10X.

Figure 1. Xylem vessels of the midrib of the leaf; A) Diploid; B) autotetraploid. Palisade parenchyma of the leaf; C) Diploide; and D) autotetraploid in tomatillo 10X.

Variance analysis applied to diploid and autotetraploid plants presented significant differences ($p < 0.01$) between diploid and autotetraploid regarding to xylem vessels area from stem

cromosomas y genes, las características de hojas y peciolas resultaron poco afectadas por la poliploidización en tomate de cáscara, esto también quizás se deba a que en los autotetraploides son de crecimiento más lento y el ciclo es más largo que los diploides y para este trabajo las muestras de diploides y autotetraploides fueron tomadas en la misma fecha.

Los análisis de varianza aplicados a plantas diploides y autotetraploides exhibieron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre diploides y autotetraploides en lo que se refiere a área de vasos de xilema del tallo (AXT) donde las tres poblaciones autotetraploides ($1\ 842.66\ \mu\text{m}^2$) superaron al diploide ($748.4\ \mu\text{m}^2$) en 146.17%, para el área de vasos de xilema de raíz (AXR) las plantas autotetraploides presentaron en promedio $1\ 309.68\ \mu\text{m}^2$ mientras que las diploides tuvieron $738.4\ \mu\text{m}^2$ y fueron superados por los tetraploides en un 77.36%, por lo tanto se encontró que al duplicar el genoma de tomate de cáscara, se incrementó el área de los vasos de xilema del tallo y de la raíz (Figura 2 y 3), estos resultados podría ser positivos para esta especie de acuerdo a lo reportado por Zahng y Cao (2009) quienes asumen que se ha probado que la estructura del sistema vascular del tallo en varias especies, tiene una fuerte influencia en la estructura y funcionamiento de las hojas, la asimilación bióxido de carbono, la eficiencia en el uso de nutrientes y la tasa de crecimiento.

(AXT) where the three autotetraploid populations ($1\ 842.66\ \mu\text{m}^2$) exceeded the diploid ($748.4\ \mu\text{m}^2$) in 146.17%, for xylem vessels area in root (AXR) autotetraploid plants showed on average $1\ 309.68\ \mu\text{m}^2$ while diploid had $738.4\ \mu\text{m}^2$ and were excelled by tetraploids in 77.36%, therefore it was found that doubling the genome of tomatillo, increased xylem vessels area in stem and root (Figure 2 and 3), these results could be positive for this species according to Zahng and Cao (2009) who assume that it has been proven that the structure of the vascular system of the stem has a strong influence on leaf structure and functioning, assimilation of carbon dioxide, efficiency in the use of nutrients and growth rate.

Conclusions

In autotetraploid tomatillo morphological variables such as leaf width and flower diameter were modified being higher than in diploid, giving the appearance of greater vigor in autotetraploid plants, also in autotetraploids the xylem vessels area of stem and root was larger than diploid rendidora an important characteristic in water conduction and mineral salts.

End of the English version

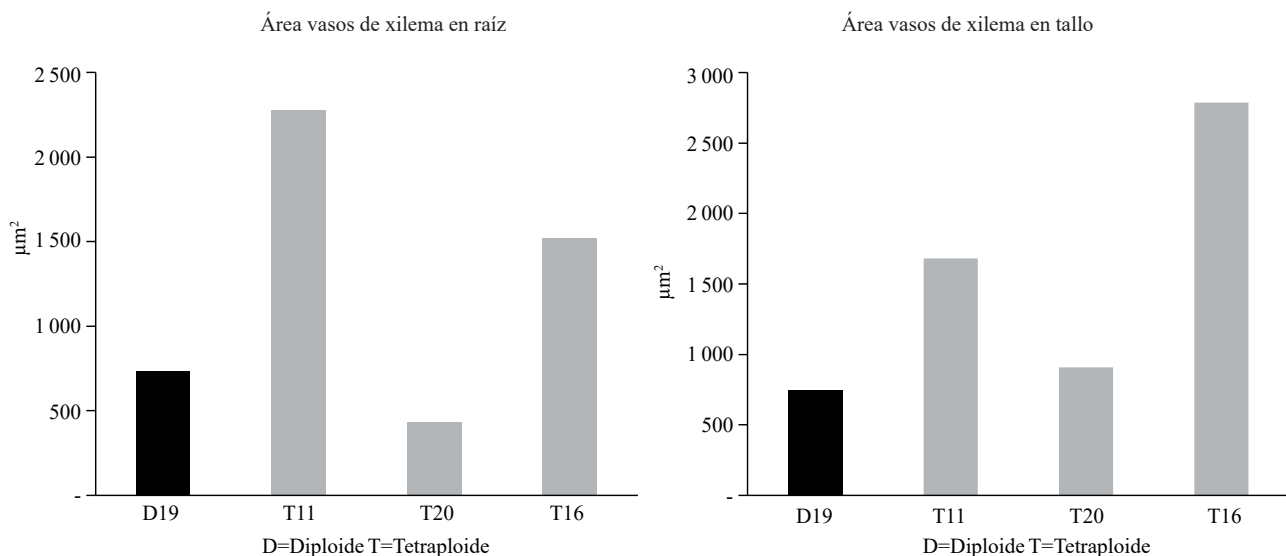


Figura 2. Área vasos de xilema en raíz y tallo de la población diploide y población autotetraploide de tomate de cáscara.
Figure 2. Area of xylem vessels in roots and stems of the diploid population and population autotetraploid tomatillo.

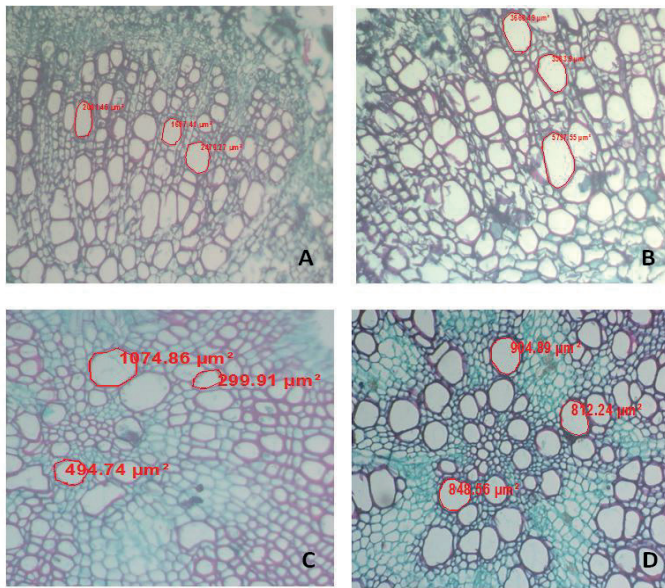


Figura 3. Vasos de xilema de tallo; A) Diploide B) Autotetraploide. Vasos de xilema en raíz; C) Diploide; y D) Autotetraploide en tomate de cáscara 10X.

Figure 3. Stem xylem vessels, A) diploid; B) autotetraploid. Root xylem vessels; C) Diploide; and D) autotetraploid in tomatillo 10 X.

Conclusiones

En los autotetraploides de tomate de cáscara se modificaron variables morfológicas como el ancho de hoja y diámetro de flor siendo mayor que en los diploides, dando apariencia de mayor vigor en las plantas autotetraploides, además en las autotetraploides el área de vasos de xilema de tallo y raíz fue más grande que el diploide rendidora, características importantes en la conducción de agua y sales minerales.

Literatura citada

Cañizares, A.; Sanabria, M. y Rojas, E. 2005. Anatomía de la hoja de Lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka). Revista UDO Agrícola. 5(1):68-73.

Cequea, A. C. 2000. Cytogenetic analysis of the artificial tetraploid *Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme*. Ciencia. 8(2):119-126.

Chen, Ch.; Hou, X.; Zhang, H.; Wang, G. and Tian, L. 2011. Induction of *Anthurium andraeanum* "Arizona" tetraploid by colchicine in vitro. Euphytica. 181(2):137-14.

Gantait, S.; Mandal, N.; Bhattacharyya, S. and Das, P. K. 2011. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 106(3):485-493.

Hernández, S. M. 1990 Manual de laboratorio citología y citogenética. Editorial Trillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 105 p.

Imery, J. and Cequea, H. 2001. Colchicine-induce autotetraploid in *Aloe vera* L. Cytologia. 66:409-413.

Liu, G.; Li, Z. and Bao, M. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. Euphytica. 157(1-2):145-154.

Jáuregui, D. 2003. Manual práctico de microtecnia vegetal. Departamento de Botánica Agrícola. Laboratorio de Botánica. Facultad de Agronomía. Postgrado de Botánica Agrícola. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 71 p.

Molero, P. y Matos, A. 2008. Efectos de la inducción artificial de la poliploidía en plantas de *Aloe vera* (L.). ReviCy HLUZ. Boletín Centro de Investigaciones Biológicas Venezuela. 42(1):111-133.

Parisod, C.; Holderegger, R. and Brochmann, C. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. New Phytologist. 186:5-17.

Poehlman, J. M. y Allen, S. D. 2005. Mejoramiento genético de las cosechas. Segunda edición. Limusa. México. 511 p.

Rêgo, M. M.; Rêgo, E. R.; Bruckner, C. H.; Finger, F. L. and Otoni, W. C. 2011. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 107(3):451-459.

Robledo, T. V.; Ramírez, G. F.; Foroughbakhch, P. R.; Benavides, M. A.; Hernández, G. G. and Reyes, M. H. V. 2011. Development of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) autotetraploids and their chromosome and phenotypic characterization. Breeding Sci. 61:288-293.

Santiagoullo, H. J. F.; Cervantes, S. T. y Peña, L. A. 2004. Selección para rendimiento y calidad de fruto de cruza planta x planta entre variedades de tomate de cáscara. Rev. Fitotec. Mex. 27:85-91.

Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2008. SAS user's guide. Statistics. Version 8. SAS Inst., Cary, NC. USA. Quality, and elemental removal. J. Environ. Qual. 19:749-756.

SIAP-SAGARPA (Sistema de Información Agrícola y Pecuaria). 2014. Resumen nacional de avances agrícolas por estado. Producción anual. Cierre de la producción agrícola por cultivo. www.siap.gob.mx.

Tang, Z. Q.; Chen, D. L.; Song, Z. J.; He, Y. C. and Cai, D. T. 2010. In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 102(2):213-220.

Wilkinson, H. 1979. The plant surface (mally leaf). In: C.R. Metcalfe y Chalk (edo). Anatomy of dicotyledons. Oxford Clarendon Press. 1:97-165.

Zhang, J. L. and Cao, K. F. 2009. Stem hydraulics mediates leaf water status, carbon gain, nutrient use efficiencies and plant growth rates across dipterocarp species. Func. Ecol. 23:658-667.