

Germinación y micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) tetraploide*

Germination and micropropagation of tetraploid husk tomato (*Physalis ixocarpa*)

Hermila Trinidad García-Osuna¹, Leticia Escobedo Bocardo², Valentín Robledo-Torres¹, Adalberto Benavides Mendoza¹ y Francisca Ramírez Godina^{2§}

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Horticultura. Calzada Antonio Narro 1923, Colonia Buenavista, C. P. 25315 Saltillo, Coahuila, México. Tel: 01 844 4 11 02 03. (abenmen@gmail.com; hgosuna@hotmail.com). ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Fitomejoramiento. Calzada Antonio Narro 1923, C. P. 25315. Saltillo, Coahuila, México. (godramf@gmail.com; bocardo_lety@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: godram@gmail.com.

Resumen

La variedad tetraploide de *Physalis ixocarpa* presenta características adaptativas tanto a nivel morfológico como fisiológico. Una de las limitantes de la semilla es la baja viabilidad, germinación y emergencia de la plántula, así como la poca capacidad de propagación vegetativa, es por ello que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta en la germinación de semillas tetraploides de tomatillo con la aplicación de reguladores y ácidos orgánicos. Se realizó la aplicación de tratamientos de imbibición con reguladores y ácidos orgánicos a las semillas, los cuales fueron: ácido giberélico (AG), los ácidos orgánicos: benzoico (AB), salicílico (AS), sulfosalicílico (ASS), a concentraciones de 10⁻²M, 10⁻⁴M y 10⁻⁶M. La emergencia inició en el cuarto día después de la siembra con un porcentaje de germinación para AG1, AG2 y AG3 de 73.33, 56.66, 63.33% y un IVG de 20.26, 10.44 y 11.59 respectivamente. Para la micropropagación se evaluó la combinación de los reguladores benciladenina (BAP), Kinetina y ácido naftalenético (ANA) a diferentes concentraciones. El mejor tratamiento fue con 3 mg L⁻¹ de BAP con 9.5 brotes por explante.

Palabras clave: ácido benzoico, ácido giberélico, ácido salicílico, ácido sulfosalicílico.

Abstract

The tetraploid variety of tomatillo (*Physalis ixocarpa*) has adaptive characteristics both at morphological and physiological level. One of the limitations of the seed is low viability, germination and seedling emergence, as well as limited vegetative propagation capacity, which is why the objective of this study was to evaluate the response in germination of tetraploid seeds of tomatillo applying regulators and organic acids. Imbibition with regulators and organic acid treatments were applied to seeds, which were: gibberellic acid (AG), organic acids: benzoic acid (AB), salicylic acid (AS), sulfosalicylic (ASS), at concentrations of 10⁻² M, 10⁻⁴ M and 10⁻⁶ M. Emergence began on the fourth day after planting with germination percentage for AG1, AG2 and AG3 of 73.33, 56.66, 63.33% and an IVG of 20.26, 10.44 and 11.59 respectively. For micropropagation the combination of regulators benzyladenine (BAP), kinetin and naphthaleneacetic acid (ANA) were evaluated at different concentrations. The best treatment was 3 mg L⁻¹ BAP with 9.5 buds per explant.

Keywords: benzoic acid, gibberellic acid, salicylic acid, sulfosalicylic acid.

* Recibido: abril de 2015
Aceptado: julio de 2015

Introducción

El fruto de la especie *Physalis ixocarpa* (Brot, ex Hornem.) es conocido como tomatillo, tomate de cáscara, miltomate, tomate de fresadilla, tomate de hoja, tomate milpero, es una solanácea originaria de México. A México se le reconoce como centro de origen, diversidad y domesticación del género *Physalis* ya que está representado por 50 especies (D'Arcy, 1991; Menzel, 1951; Peña y Márquez, 1990; Santiaguillo *et al.*, 1994). La especie *P. ixocarpa* ha sido fuente alimenticia desde épocas prehispánicas, su distribución es desde Estados Unidos hasta Nicaragua (Sánchez *et al.*, 2006). En 2014 la superficie cultivada fue de 46 524 ha y el rendimiento fue de 14.94 t ha⁻¹ (SIAP-SAGARPA, 2014), lo que la ubica dentro de las 10 especies hortícolas más importantes a nivel nacional.

A pesar de la amplia variabilidad genética, tanto en el tomate silvestre como en el domesticado, el rendimiento medio nacional se considera bajo, de acuerdo al rendimiento potencial de la especie 40 t ha⁻¹ esto debido a una actividad agronómica limitada por el uso de variedades nativas de bajo rendimiento y sistemas de producción ineficientes, escasez de agua de insumos agrícolas y de semilla de baja calidad (Peña y Santiaguillo, 1999). Se han realizado numerosos esfuerzos para mejorar el rendimiento y la calidad funcional y nutricional de este fruto como cruza dialélicas, selección masal visual estratificada, cruza planta x planta y más recientemente inducción de poliploidía entre otros (Peña *et al.*, 1998; Peña-Lomelí *et al.*, 2002; Santiaguillo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2012).

El mejoramiento genético por duplicación de cromosomas ha logrado poblaciones tetraploides en las que se observa un incremento en el ciclo de vida, altura de planta, peso de fruto y diámetro ecuatorial de fruto, frutos por planta y sólidos solubles y vitamina C, (Robledo-Torres *et al.*, 2011; Jiménez-Santana *et al.*, 2012). En los poliploides la semilla se observa con mayor tamaño y cantidad de masa, lo que puede afectar el vigor o la capacidad de dispersión, presentan además menor viabilidad, germinación y emergencia de la plántula (Bretagnolle *et al.*, 1995; Al *et al.*, 1998; Beaulieu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010).

Las semillas son el método convencional para su propagación; sin embargo, la gran variabilidad genética no garantiza un rendimiento constante. Por otro lado, la propagación por semilla es limitada por su baja viabilidad (Ramírez *et*

Introduction

The fruit of the species *Physalis ixocarpa* (Brot, former Hornem) is known as tomatillo, husk tomato, mil tomato, fresadilla tomato, leaf tomato, milpero tomato; it is solanum native from Mexico. Mexico is recognized as the center of origin, diversity and domestication of genus *Physalis* as it is represented by 50 species (D'Arcy, 1991; Menzel, 1951; Peña and Márquez, 1990; Santiaguillo *et al.*, 1994). The species *P. ixocarpa* has been a food source since pre-Hispanic times and its distribution is from United States to Nicaragua (Sánchez *et al.*, 2006). In 2014 the cultivated area was 46,524 hectares and yields of 14.94 t ha⁻¹ (SIAP-SAGARPA, 2014), which place it among the 10 most important horticultural species nationwide.

Despite the wide genetic variability, both wild tomato and domesticated, the national average yield is considered low, according to the yield potential of the species 40 t ha⁻¹ this due to limited agricultural activity by the use of native varieties of low yield and inefficient production systems, water shortages of agricultural inputs and poor seed quality (Peña and Santiaguillo, 1999). There have been numerous efforts to improve yield, functional and nutritional quality of this fruit as diallel crosses, stratified visual mass selection, plant x plant crosses and more recently induction of polyploidy among others (Peña *et al.*, 1998; Peña-Lomelí *et al.*, 2002; Santiaguillo *et al.*, 2004; Robledo *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2012).

Genetic improvement by chromosome duplication has achieved tetraploid populations in which is observed an increase in life cycle, plant height, fruit weight and equatorial diameter of fruit, fruits per plant and soluble solids and vitamin C (Robledo-Torres *et al.*, 2011; Jiménez-Santana *et al.*, 2012). In polyploid seed shows greater size and amount of mass, which can affect vigor or dispersibility, it also presents reduced viability, germination and seedling emergence (Bretagnolle *et al.*, 1995; Al *et al.*, 1998; Beaulieu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010).

Seeds are the conventional method for propagation; however, the great genetic variability does not guarantee constant yields. Furthermore, seed propagation is limited for its low viability (Ramírez *et al.*, 2013) and low germination rate. In this regard it is necessary, to increase seed emergence of tetraploids for which there are different techniques that favor and increase emergency synchronization, speed and percentage of seed germination, also generates resistance to biotic and abiotic factors. These techniques include seed imbibition in osmoregulators, saline solutions and growth regulators (Dahal *et al.*, 1990). Arroyo-

al., 2013) y baja tasa de germinación. Al respecto se hace necesario, incrementar la emergencia de las semillas de tetraploides para lo cual existen diferentes técnicas que favorecen e incrementan la sincronización de la emergencia, la velocidad y porcentaje de germinación en las semillas, además generan resistencia a factores bióticos y abióticos. Estas técnicas incluyen la imbibición de la semilla en osmoreguladores, soluciones salinas y reguladores de crecimiento (Dahal *et al.*, 1990). Arroyo-Medina *et al.* (2008) mencionan que la aplicación en ácidos orgánicos en semillas de interés hortícola tuvo efecto positivo en la germinación, peso seco y longitud de tallo y radícula.

Sin embargo, para mantener y multiplicar materiales tetraploides seleccionados, se requieren métodos de reproducción vegetativa, lo cual permite perpetuar el genotipo a través de generaciones (Van y Kroon, 1990), que no es posible a través de semilla, por lo que una buena alternativa alternativa para conserva las cualidades en la mejora de producción de biomasa, propiedades funcionales en tetraploides sería la micropropagación la cual ha sido ampliamente reportada en *Physalis ixocarpa*, el primer fue hecho por Bapat y Schieder (1981) por cultivo de protoplastos, posteriormente otros investigadores han reportado a partir de organogénesis directa, embriogénesis somática y cultivo de anteras (Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1991; Ortuño *et al.*, 1998; Manzo-González *et al.*, 1998; Contreras y Almeida, 2003; Yousry 2013; Yoursdy, 2014) las técnicas de propagaciones utilizadas fue a través de embriogénesis somática, tallos adventicios, sin embargo no existe información sobre la propagación masiva de variedades tetraploides.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta de las semillas tetraploides de tomatillo en el porcentaje de germinación e índice de velocidad de germinación con la aplicación de reguladores y ácidos orgánicos y además micropropagar la variedad tetraploides con la combinación de diferentes reguladores de crecimiento.

Material y métodos

Germinación

El trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento.

Medina *et al.* (2008) mention that the application of organic acids in seeds of horticultural interest had a positive effect on germination, dry weight and stems length and radicle.

However, to maintain and multiply tetraploid selected materials, vegetative reproduction methods are required, allowing to perpetuate the genotype through generations (Van and Kroon, 1990), which is not possible through seed, so a good alternative to keep the qualities in improving biomass production, functional properties in tetraploids would be micropropagation, which has been widely reported in *Physalis ixocarpa*, the primer was made by Bapat and Schieder (1981) by protoplast culture, then other researchers have reported from direct organogenesis, somatic embryogenesis and anther culture (Ramírez-Malagón and Ochoa-Alejo, 1991; Ortuño *et al.*, 1998; Manzo-González *et al.*, 1998; Contreras and Almeida, 2003; Yousry 2013; Yoursdy, 2014) propagation techniques used was somatic embryogenesis, adventitious stems, however there is no information on mass propagation of tetraploid varieties.

The aim of this study was to evaluate the response of tetraploid seeds in germination percentage and germination rate index with the application of regulators and organic acids and also micropropagate the tetraploid variety with the combination of different growth regulators.

Materials and methods

Germination

The work was conducted at the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro in the Laboratory of Plant Tissue Culture from the Plant Breeding Department.

Hydration stage

Hydration was evaluated by weighing the seed every 4 h until seed weight was constant.

Viability

This variable was evaluated determining initial seed viability by the germination capacity test. Where the methodology to assess viability was conducted in accordance with international rules ISTA (2009), determining viable and non-viable seeds, with three replications of 20 seeds, subjected

Etapa de hidratación

Se evaluó el tiempo de hidratación pesando la semilla cada 4 h hasta que el peso de la semilla fue constante.

Viabilidad

Esta variable se evaluó determinando la viabilidad inicial de la semilla en la prueba de capacidad de germinación. Donde la metodología para evaluar la viabilidad se realizó conforme a las reglas internacionales ISTA (2009), determinando las semillas viables y no viables, en tres repeticiones de 20 semillas, sometidas a imbibición en agua corriente durante 24 horas en una tubo de ensaye de vidrio de 15 X100 mm. Las semillas se disectaron a la mitad, se sumergieron en tetrazolio en obscuridad y se incubaron a 30° C por 2 h; posteriormente se observaron en el microscopio estéreo y se evaluó el porcentaje de viabilidad.

Índice de velocidad de emergencia

El IVE se obtuvo contando a diario las semillas emergidas durante 21 días después de la siembra. Considerando la ruptura de la testa como semilla emergida. Para calcular su valor se utilizó la siguiente fórmula de acuerdo con Maguirre (1962).

$$IVE = \sum \text{Núm. P/D} + \dots + \text{Núm. P/D}$$

Donde: IVE= índice de velocidad de emergencia; Núm. P= número de plantas emergidas; D= días después de la siembra.

Pretratamientos

Se conformaron los siguientes pretratamientos: ácido giberélico: G1= a 10⁻² M, G2=10⁻⁴ M, G3=10⁻⁶M; ácido sulfosalicílico: ASS1= 10⁻² M, ASS2= 10⁻⁴ M, ASS3= 10⁻⁶ M ácido salicílico: AS1= 10⁻² M, AS2=10⁻⁴ M, AS3=10⁻⁶ M; ácido benzoico: AB1= 10⁻² M, AB2= 10⁻⁴ M, AB3=10⁻⁶ M y un testigo (T). Cada tratamiento consistió en tres repeticiones con 10 semillas por frasco. Se determinó en un estudio preliminar el tiempo en el cual las semillas llegaban a la máxima absorción de agua que fue de 4 h. Con este dato las semillas se imbibieron en las diferentes soluciones de reguladores y ácidos orgánicos.

Una vez transcurrido el tiempo de saturación hídrica, las semillas pretratadas se desinfectaron en una solución alcohol al 70% por un minuto y se enjuagaron en agua destilada estéril, posteriormente se colocaron en hipoclorito de

to imbibition in water for 24 hours in a culture tube 15 X100 mm. The seeds were dissected in half, immersed in tetrazolium in dark and incubated at 30 °C for 2 h; subsequently were observed in stereo microscope to evaluate percentage viability.

Emergency rate index

IVE (emergency rate index) was obtained by counting the seeds emerged daily for 21 days after planting. Considering testa rupture as seed emerged. To calculate its value the following formula was used Maguire (1962).

$$IVE = \sum \text{Núm. P/D} + \dots + \text{Núm. P/D}$$

Where: IVE= emergency rate index; Núm. P= number of emerged plants; D= days after sowing.

Pretreatment

The following pretreatments were formed: gibberellic acid: G1= 10⁻² M, G2= 10⁻⁴ M, G3= 10⁻⁶ M; sulfosalicylic acid: ASS1= 10⁻² M, ASS2= 10⁻⁴ M, ASS3= 10⁻⁶ M; salicylic acid: AS1= 10⁻² M, AS2= 10⁻⁴ M, AS3= 10⁻⁶ M; benzoic acid: AB1= 10⁻² M, AB2= 10⁻⁴ M, AB3= 10⁻⁶ M and control (T). Each treatment consisted of three replications with 10 seeds per jar. It was determined in a preliminary study the time in which the seeds reached the maximum absorption of water which was 4 h. With this data the seeds were imbibed in solutions with different regulators and organic acids.

Once waterlogging time has passed, the pretreated seeds are disinfected in alcohol solution 70% for one minute and rinsed with sterile distilled water, then placed in sodium hypochlorite 20% and rinsed with sterile distilled water three times under a laminar flow hood, then planted on Murashige and Skoog (MS) to half its concentration supplemented with 100 mg L⁻¹ of myo-inositol (SIGMA®, I-3011), 1 mg L⁻¹ thiamine-HCl (SIGMA®, T-3906), 1 mg L⁻¹ of pyridoxine-HCl (SIGMA®, P-8 666), 1 mg L⁻¹ Kinetin, 30 g L⁻¹ sucrose (SIGMA®, K-0753), 8 g L⁻¹ of agar (SIGMA®, A-1 296) adjusting pH to 5.7 and sterilized at 120 °C for 15 min and transferred to an incubation room at temperature of 25±1 °C, with 16 h light and 8 of darkness at 2500 lux.

Establishment

For this stage germinated seedlings in vitro on MS basal medium at half concentration added with 100 mg L⁻¹ myo-inositol (SIGMA®, I-3011), 1 mg L⁻¹ thiamine-HCl

sodio al 20% y se enjuagaron con agua destilada estéril tres ocasiones bajo la campana de flujo laminar, se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) a mitad de su concentración suplementados con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (SIGMA®, I-3011), 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCL (SIGMA®, T-3 906), 1 mg L⁻¹ de piridoxina-HCL (SIGMA®, P-8 666), 1 mg L⁻¹ Kinetina, 30 g L⁻¹ (SIGMA®, K-0753) de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar (SIGMA®, A-1 296) ajustando a un pH de 5.7 y se esterilizó a 120 °C durante 15 min y se transfirieron al cuarto de incubación a una temperatura de 25±1 °C, con 16 h luz y 8 de oscuridad a 2 500 lux.

Establecimiento

Para esta etapa se utilizó plántulas germinadas *in vitro* en medio basal MS a mitad de la concentración adicionada con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (SIGMA®, I-3011), 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCL (SIGMA®, T-3 906), 1 mg L⁻¹ de piridoxina-HCL (SIGMA®, P-8 666), 80 mg L⁻¹ de adenina, 30 g L⁻¹ (SIGMA®, K-0753) de sacarosa, 4 g L⁻¹ de phytagel (SIGMA®, A-1 296), se ajustó a un pH de 5.7. Las plántulas generadas de 15 d se seccionaron para la obtención de explantes.

Micropropagación

Para la micropropagación se utilizaron medio MS y PCL2 adicionada con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (SIGMA®, I-3011), 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCL (SIGMA®, T-3906), 1 mg L⁻¹ de piridoxina-HCL (SIGMA®, P-8666), 40 mg L⁻¹ de adenina, 30 g L⁻¹ (SIGMA®, K-0753) de sacarosa, 4 g L⁻¹ de phytagel (SIGMA®, A-1296), se ajustó a un pH de 5.7 y se esterilizó a 121 °C durante 15 min. La siembra se transfirió al cuarto de incubación a una temperatura de 25 ± 1 °C, con 16 horas luz y 8 de oscuridad a 2 500 lux. El medio se renovó cada quince días. Se utilizaron la combinación de los fitoreguladores: BAP (bencilaminopurina) y kinetina a 0, 0.5, 1, 2 y 3 mg L⁻¹ con ácido naftalenácético (ANA) a 0 y 0.5 mg L⁻¹.

Se utilizaron como explantes: hipocotilos, cotiledones y segmentos nodales. Las variables a evaluar fueron número de brotes por explante y longitud del explante., número y longitud de raíces.

Etapas de endurecimiento

Para esta etapa se utilizó medio MS a mitad de la concentración sin hormonas y adicionadas con los mismos suplementos de la etapa de establecimiento.

(SIGMA®, T-3906), 1 mg L⁻¹ pyridoxine-HCL (SIGMA®, P-8666), 80 mg L⁻¹ of adenine, 30 g L⁻¹ of sucrose (SIGMA®, K-0753), 4 g L⁻¹ of phytagel (SIGMA®, A-1296), adjusting pH to 5.7, were used. Seedlings generated after 15 d were sectioned to obtain explants.

Micropropagation

For micropropagation MS medium and PCL2 were used, added with 100 mg L⁻¹ of myo-inositol (SIGMA®, I-3011), 1 mg L⁻¹ thiamine-HCL (SIGMA®, T-3906), 1 mg L⁻¹ pyridoxine-HCL (SIGMA®, P-8666), 40 mg L⁻¹ of adenine, 30 g L⁻¹ of sucrose (SIGMA®, K-0753), 4 g L⁻¹ of phytagel (SIGMA®, A-1 296), adjusting pH to 5.7 and sterilized at 121 °C for 15 min. The seed was transferred to the incubation room at a temperature of 25±1 °C with 16 hours light and 8 of darkness at 2 500 lux. The medium was renewed every 15 days. The combination of plant growth regulators used: BAP (benzylaminopurine) and kinetin at 0, 0.5, 1, 2 and 3 mg L⁻¹ with naphthalene acetic acid (ANA) at 0 and 0.5 mg L⁻¹.

As explants the hypocotyls, cotyledons and nodal segments were used. Variables assessed were number of buds per explant and explant length, number of roots and root length.

Hardening stage

For this stage MS medium at half concentration without hormones was used and added with the same supplements from the establishment stage.

Statistical analysis

To the obtained data was performed an analysis of variance under a completely randomized design and a mean comparison test Tukey ($p \leq 0.05$). R® statistical tool version 2.8.1 (2008) was used.

Results and Discussion

Viability

75% of tomato husk seeds were viable and 25% non-viable, indicating that the seed is out of the range of physiological quality for seed marketing or for germination studies, SNICS

Análisis estadístico

Sobre los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza bajo un diseño experimental completamente al azar y una comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Se empleó la herramienta estadística de R[®] versión 2.8.1. (2008).

Resultados y discusión

Viabilidad

Se obtuvo 75% de semillas de tomate de cáscara viables y 25% de no viables, indicando que la semilla está fuera del rango de calidad fisiológica para la comercialización de semillas o en estudios sobre la germinación, según el SNICS lo recomendado debe ser un mínimo de 85%. Estos datos son coincidentes con un estudio previo para determinar la viabilidad de polen en variedades tetraploides de tomatillo donde se observó una disminución de la viabilidad en comparación con polen de planta diploide (Ramírez *et al.*, 2013), con estos datos se confirma lo mencionado por algunos autores sobre la disminución de la viabilidad y fertilidad de las semillas poliploides (Bretagnolle *et al.*, 1995).

La comparación de los diversos tratamientos (Figura 1 y 2) indicó que el testigo presentó los valores más bajos de germinación con 13.33% y IVG de 0.19, iniciando la emergencia en el día 21. El tratamiento con AG observó un incremento significativo en la germinación en todas las concentraciones ($X = 64.44$). La emergencia inició en el cuarto día después de la siembra con un porcentaje de germinación para AG1, AG2 y AG3 de 73.33, 56.66, 63.33% y un IVG de 20.26, 10.44 y 11.59 respectivamente. Se ha reportado que el AG participa en los procesos de regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas.

El tratamiento con ácido giberélico está asociado con la rápida utilización de la síntesis de aminoácidos y amidas, lo cual incrementa la tasa de germinación. (Gupta y Mukherjee 1982). Además está relacionada con el incremento de fenoles al modificar la ruta biosintética de los flavonoides (Gosch *et al.*, 2003; Halbwirth *et al.*, 2003). En la semilla los fenoles son producidos en la testa y están relacionados con los procesos morfogénicos del embrión (Dixon *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010; Dean *et al.*, 2011).

recommends a minimum of 85%. These data are consistent with a previous study to determine the pollen viability on tetraploid varieties of tomatillo where a decrease in viability was observed compared with pollen from diploid plant (Ramírez *et al.*, 2013), this data confirms the aforementioned by some authors on the decrease in viability and fertility of polyploid seed (Bretagnolle *et al.*, 1995).

The comparison of various treatments (Figure 1 and 2) indicated that control had the lowest values for germination with 13.33% and an IVG of 0.19, initiating emergency on day 21. Treatment with AG showed a significant increase in germination at all concentrations ($X = 64.44$). The emergence began on the fourth day after planting with a germination percentage for AG1, AG2 and AG3 of 73.33, 56.66, and 63.33% and an IVG of 20.26, 10.44 and 11.59 respectively. It has been reported that AG participates in regulatory processes of plant growth and development.

Treatment with gibberellic acid is associated with rapid use of amino acids and amides synthesis, which increases the germination rate (Gupta and Mukherjee 1982). It is also related with the increase of phenols by modifying the biosynthetic pathway of flavonoids (Gosch *et al.*, 2003; Halbwirth *et al.*, 2003). In the seed phenols are produced in the testa and are related to the embryo morphogenetic processes (Dixon *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010; Dean *et al.*, 2011).

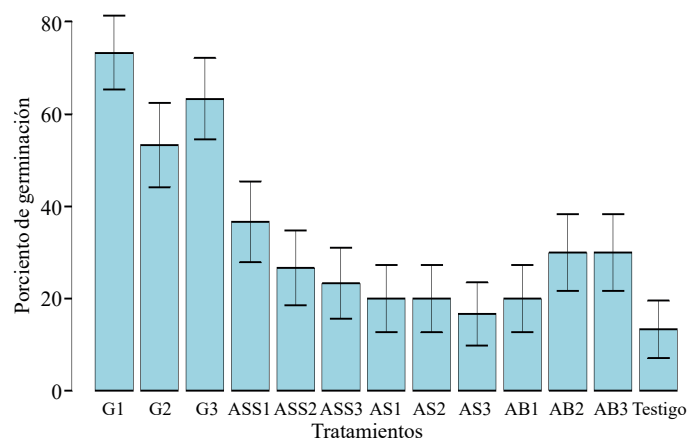


Figura 1. Porcentaje de germinación en la aplicación de soluciones en semillas tetraploides de tomatillo.

Figure 1. Percentage of germination in implementing solutions tetraploid tomatillo seeds.

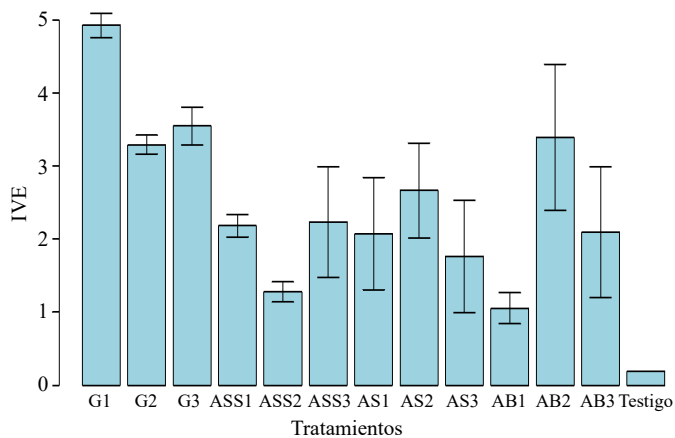


Figura 2. Comportamiento del índice de velocidad de emergencia en semillas tetraploide de tomatillo (*Physalis ixocarpa*), aplicando reguladores y ácidos orgánicos.

Figure 2. Performance index of emergency speed tomatillo seeds in tetraploid (*Physalis ixocarpa*), applying regulators and organic acids.

Con respecto a los ácidos orgánicos el tratamiento con ASS presentó el mayor promedio de germinación ($X=28.88$), seguido por el AB ($X=26.66$), y con el menor promedio el AS ($X=18.88$). Cabe destacar que aunque los IVG (Figura 3) fueron menores, la germinación con los ácidos orgánicos inició el primer día de la siembra. Los ácidos orgánicos derivan de la vía metabólica de los fenilpropanoides, compuestos que participan como fitohormonas en la cascada de señalización intracelular y controlan la producción de compuestos secundarios que funcionan como defensas de las plantas (Álvarez y Espinosa, 2004).

Los pretratamientos de imbibición de la semilla y la siembra el mismo día aumentan la tasa de germinación y emergencia de las semillas.

Los resultados confirman que los pretratamientos germinativos son una herramienta que incrementa la tasa y porcentaje de germinación

Micropropagación

Esta etapa tuvo como objetivo establecer un protocolo para la propagación clonal del cultivar tetraploide de *P. ixocarpa*. Para ello se probó dos medios basales y diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores. Todas los tratamientos resultaron en regeneración de brotes (Cuadro 1 y 2), pero la inducción fue mayor en el tratamiento con 3 mg L^{-1} de BAP con la combinación de ANA con 9.5 brotes por explante, a partir de los segmentos nodales. La mayor longitud de brote (8.93

Regarding organic acids the ASS treatment showed the highest average in germination ($X=28.88$), followed by AB ($X=26.66$), and the lowest average AS ($X=18.88$). Note that although IVG (Figure 3) were lower, germination with organic acids initiated the first day after sowing. Organic acids derived from the metabolic pathway of phenylpropanoid compounds such as plant hormones involved in the intracellular signaling cascade and control the production of secondary compounds that work as plant defenses (Álvarez and Espinosa, 2004).

Seed imbibition pretreatment and planting the same day increase germination rate and seed emergence.

The results confirm that germination pretreatments are a tool that increases germination rate and percentage.

Micropropagation

This stage aimed to establish a protocol for clonal propagation of the tetraploid cultivar *P. ixocarpa*. For this, two basal mediums and different combinations and concentrations of regulators were tested. All treatments resulted in regeneration of shoots (Table 1 and 2), but the induction was greater in the treatment with 3 mg L^{-1} BAP in combination with ANA with 9.5 shoots per explant, from nodal segments. The highest bud length (8.93 cm) was obtained with 0.5 mg L^{-1} BAP with 0.5 ANA (8.02 cm) from PLC2, this medium also showed the highest root number (4.3) and highest length of the same (4.6 mm), was achieved in treatment MS medium with 1 mg L^{-1} BAP. The lowest response (2.7 shoots / explant) was recorded in the BAP treatment (0.5 mg L^{-1}) alone, in the PCL2 medium.

A differential response between the various explants both cotyledons and hypocotyl did not generate a morphogenetic response contrary to that observed by Contreras and Almeida (2003), who mention a greater number of buds (66) with hypocotyl on MS medium with BAP (2 mg L^{-1}), while the cotyledons generated lower response (54) with zeatin. Also Ramírez-Malagón and Ochoa-Alejo (1991) mention a higher proliferation of shoots from hypocotyl with 2.5 mg L^{-1} BAP and with 1.0 mg L^{-1} ANA.

An interesting observation was the ability of flower formation *in vitro* system (Figure 3). Between the two cytokinins, BAP was the most effective in inducing greater number of shoots per explant compared to kinetin. In this

cm) se obtuvo con 0.5 mg l⁻¹ BAP con 0.5 ANA (8.02 cm) del medio PLC2, en este medio también se observó el mayor número de raíces (4.3) y la mayor longitud de las mismas (4.6 mm) se logró en el medio MS en el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de BAP. La menor respuesta (2.7 brotes/explante) se observó en el tratamiento de BAP (0.5 mg L⁻¹) solo, en el medio PCL2.

regard, other researchers agree that BAP was the cytokinin inducing higher formation of buds (29-32) in the genus *Physalis* (Afroz *et al.*, 2009).

There are other works on this genus where BAP and ANA combination (Alejo, 1991; Yousry, 2013) achieved an optimal morphogenetic response.

Cuadro 1. Comparación de medias del efecto de diferentes concentraciones de BAP, kinetina y ANA en el número de brotes, longitud de brotes, número y longitud de raíces en medio basal MS. (H=Hipocotilos; C=Cotiledones).

Table 1. Comparison of means of the effect of different concentrations of BAP, kinetin and NAA in the number of shoots, shoot length, number and length of roots in MS basal medium. (H= hypocotyls, cotyledons = C).

Medio basal MS			H	C	Núm. de brotes/ explante nodal	Longitud de explante (cm)	Núm. de raíces	Longitud de raíces(mm)
BAP	Kinetina	ANA						
0	0	0	-	-	0	0	0	0
0.5	0	0	-	-	5.6±0.57b	6.09±0.29ab	4.3±2.02a	3.3±1.3bc
1	0	0	-	-	7.1±1.5a	8.02±1.49a	4.3±0.3a	4.6±0.3a
2	0	0	-	-	5.4±1.8b	7±0.74ab	2.65±0.3bc	4.3±0.15ab
3	0	0	-	-	5±0.33bc	4.5±0.66d	2.58±1.3bc	2.3±0.85bc
0	0.5	0	-	-	5.5±1c	4.8±0.97cd	3.2±1.3bc	3±1bc
0	1	0	-	-	6.1±0.39ab	4.2±1.1ef	3.6±0.53bc	2.3±01bc
0	2	0	-	-	8.2±1.1a	5.1±0.33bc	2.3±0.33c	3.6±1.53bc
0	3	0	-	-	4.7±±0.5cd	6.1±0.37ab	2.33±0.88c	2.3±0.57bc
0.5	0	0.5	-	-	6.6±1.3ab	8.82±0.14a	2.6±0.3c	4.6±0.05ba
1	1	0.5	-	-	6.4±0.6bc	4.7±0.37cd	3.33±0.88bc	2.3±0.83bc
2	1.5	0.5	-	-	5.7±0.33cd	6.6±0.92ab	2±0.6c	2.3±1.45bc
0	0.5	0.5	-	-	5±1.57cd	6.4±0.06bc	2.1±0.3c	3.56±0.83bc
0	1	0.5	-	-	5±0.24cd	5.8±0.5cd	2.3±0.3c	2.9±0.93bc
0	2	0.5	-	-	5.5±0.26cd	2.8±0.02f	3.5±0.83bc	3±1.3bc

Cuadro 2. Comparación de medias del efecto de diferentes concentraciones de BAP, kinetina y ANA en el número de brotes, longitud de brotes, número y longitud de raíces en medio basal PCL2 (H=Hipocotilo; C= Cotiledones).

Table 2. Comparison of means of the effect of different concentrations of BAP, kinetin and NAA in the number of shoots, shoot length, number and length of roots in PCL2 basal medium (H= hypocotyl C= cotyledons).

Medio basal PCL2			H	C	Núm. de brotes/ Segmento nodal	Longitud de explante (cm)	Núm. de raíces	Longitud de raíces(mm)
BAP	Kinetina	ANA						
0	0	0	-	-	0	0	0	0
0.5	0	0	-	-	2.7±0.8de	8.35±1.76a	2.05±0.57ab	3±1a
1	0	0	-	-	3.65±1.5cd	5.02±1.3bc	2.85.33bc	2.7±0.33ab
2	0	0	-	-	6.05±1.8bc	4.21±0c	2.650.3ab	2.1±0.57ab
3	0	0	-	-	8.25±2.8b	4.1±0.7c	1.58±0.34c	2.3±0.33ab
0	0.5	0	-	-	3.65±1c	6.37±1.95b	2.05±0.57ab	2.98±1a
0	1	0	-	-	4.9±0.9cd	5.45±1.05b	2.3±0.6ab	3±1.66a
0	2	0	-	-	8±1.1b	4.1±1.9c	2.5±0.85ab	2.3±1.45ab

Cuadro 2. Comparación de medias del efecto de diferentes concentraciones de BAP, Kinetina y ANA en el número de brotes, longitud de brotes, número y longitud de raíces en medio basal PCL2 (H=Hipocotilo; C= Cotiledones) (Continuación).

Table 2. Comparison of means of the effect of different concentrations of BAP, Kinetin and NAA in the number of shoots, shoot length, number and length of roots in PCL2 basal medium (H= hypocotyl C= cotyledons) (Continuation).

Medio basal PCL2 Reguladores			H	C	Núm. de brotes/ Segmento nodal	Longitud de explante (cm)	Núm. de raíces	Longitud de raíces(mm)
BAP	Kinetina	ANA						
0	3	0	-	-	3.2±0.85c	4.78±0.06c	4.3±0.3a	3.1±1a
0.5	0	0.5	-	-	3.6±1.3d	8.93±2.6a	2.4±0.3ab	2±1.15ab
1	0	0.5	-	-	4.1±0.56dc	5.8±0.3b	2.6±0.3ab	2.4±0.33ab
2	0	0.5	-	-	6.5±0.43bc	3.9±0.9d	2.3±0.6ab	2.15±1.15ab
3	0	0.5	-	-	9.05±0.57a	3.45±0.3e	3±1a	3.16±1.6a
0	0.5	0.5	-	-	3.9±2.4c	6.02±0.2b	2.3±1ab	2.83±0.66ab
0	1	0.5	-	-	5.35±0.1c	4.56±0.03c	3.6±1.6a	3.56±1.66a
0	2	0.5	-	-	7±0.74ab	3.35±0.04e	2±0.57ab	2.78.33ab
0	3	0.5	-	-	3.1±0.88d	4.01±0.05d	2.31±0.45ab	2.6±033ab

Se observó una respuesta diferencial entre los diversos explantes tanto los cotiledones como el hipocotilo no generaron respuesta morfogénica contrario a lo observado por Contreras y Almeida (2003), quienes mencionan una mayor cantidad de yemas (66) con el hipocotilo en medio MS con BAP (2 mg L⁻¹), mientras los cotiledones generaron una menor respuesta (54) con zeatina. También Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo (1991) mencionan una mayor proliferación de brotes a partir de hipocotilo con 2.5 mg L⁻¹ de BAP con 1 mg L⁻¹ de ANA.

Una observación de interés fue la capacidad de formación de flores en el sistema *in vitro*. (Figura 3). Entre las dos citocininas, BAP fue la más efectiva al inducir mayor número de brotes por explante comparado con la kinetina. Al respecto, otros investigadores coinciden que BAP fue la citocinina que indujo mayor formación de brotes (29-32) en el género *Physalis* (Afroz *et al.*, 2009).

Existen otros trabajos realizados en este mismo género donde la combinación de BAP y ANA (Alejo, 1991; Yousry, 2013) logró una respuesta morfogénica óptima.

Una observación de interés fue la capacidad de formación de flores en el sistema *in vitro*. (Figura 3). Además en este caso, el sistema radicular se desarrolló espontáneamente

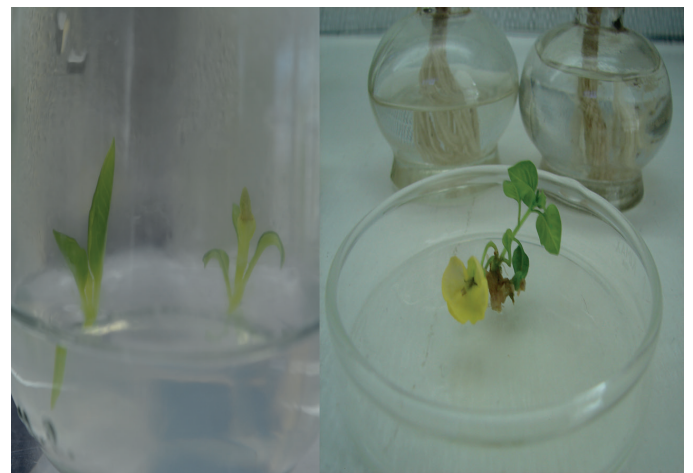


Figura 3. Explantes nodales y floración *in vitro* de tomatillo tetraploide (*Physalis ixocarpa*).

Figure 3. Nodal explants and *in vitro* flowering tetraploid tomatillo (*Physalis ixocarpa*).

An interesting observation was the ability of flower formation *in vitro* system (Figure 3). Also in this case, the root system developed spontaneously eliminating the need of a medium with auxin before acclimatization. According to Zhao *et al.* (2008) a high ratio between cytokinin and auxin promotes root regeneration.

eliminando la necesidad de medio con auxinas antes de la aclimatización. De acuerdo con Zhao *et al.* (2008) una relación alta entre citocinina y auxina promueve la regeneración de raíz.

Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) observaron una amplia variabilidad en la obtención de brotes en diferentes variedades de *Physalis ixocarpa* desde 1.9 en variedades silvestres hasta 21.3 en domesticados. Estos mismos autores mencionan que la capacidad organogénica está dada por el genotipo de la variedad utilizada. La capacidad organogénica de este cultivar se encuentra por debajo de lo reportado para los cultivares domesticados.

La respuesta de la planta depende en gran medida del genotipo y algunas modificaciones y ajustes deben ser realizadas cuando nuevas especies o cultivares son consideradas para esta técnica. El cultivar tetraploide demostró necesitar una alta concentración de citocinina exógena en la etapa de propagación.

Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten establecer un protocolo de germinación y propagación masiva del cultivar tetraploide. El ácido giberélico y los ácidos orgánicos favorecen la emergencia de la plántula con un porcentaje alto de germinación en menor tiempo. El regulador bencilaminopurina solo, es el indicado para la micropropagación.

Literatura citada

- Al, H. A.; Monneveux, P. and Nachit, M. M. 1998. Direct and indirect selection for drought tolerance in alien tetraploid wheat durum wheat crosses. *Euphytica*. 100: 287-294.
- Afroz, F.; Hassan, A. K. M. S.; Bari, L. S.; Sultana, R.; Begum, N.; Jahan, M. A. A. and Khatun, R. 2009. *In vitro* shoot proliferation and plant regeneration of *Physalis minima* L a perennial medicinal Herb. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 44(4):453-456.
- Andrade-Rodríguez, M.; López-Peralta, M. C.; González-Hernández V. A.; García-Velázquez A. y Peña-Lomelí A. 2005. Efecto del genotipo en la micropropagación de tomate de cáscara. *Rev. Chapingo Serie Horticultura*. 11(1):31-37.
- Arroyo-Medina, C.; Benavides-Mendoza, A.; Ramírez, R. H. y Ruiz-Torres, N. A. 2008. Efecto de ácidos orgánicos sobre la germinación de semillas de hortalizas. *Libro Científico Anual de Ganadería y Ciencia Forestal, UAAAN*. 107-115.
- Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) observed a wide variability in obtaining shoots in different varieties of *Physalis ixocarpa* from 1.9 in wild varieties to 21.3 in domesticated. These authors mention that the organogenic capacity is given by the genotype of the variety in use. The organogenic ability of this cultivar is below that reported for domesticated cultivars.
- Plant response depends largely from the genotype and some modifications and adjustments must be made when new species or cultivars are considered for this technique. The tetraploid cultivar showed need for high concentration of exogenous cytokinin in the propagation step.

Conclusions

The result allows establishing a protocol for germination and mass propagation of the tetraploid cultivar. Gibberellic acid and organic acids favor seedling emergence with high germination percentage in less time. The bencilaminopurine regulator by is the indicated for micropropagation.

End of the English version



- Álvarez, T. M. C. y Espinosa, F. B. 2004. Jasmonatos y Salicilatos: Fito hormonas clave en las reacciones de defensa de las plantas y de comunicación en el ecosistema. *In: la ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis*. (Ed.). Reigosa, J. M.; Pedrol, N. y Sánchez, A. Ed. Thomson. Madrid España. 633-723.
- Beaulieu, J. M.; Moles, A. T.; Leitch, I. J.; Bennett, M. D.; Dickie, J. B. and Knight, C. A. 2007. Correlated evolution of genome size and seed mass. *New Phytologist*. 173:422- 437.
- Bretagnolle, F.; Thomson, J. D. and Lumart, R. 1995. The influence of seed size variation on seed germination and seedling vigor in diploid and tetraploid *Dactylis glomerata* L. *Ann. Bot.* 76:607-615.
- Contreras, I. y Almeida, J. 2003. Micropropagación de Tomatillo (*Physalis ixocarpa* L.). *Revista de la Facultad de Farmacia*. 45(1):61-64.
- Dahal, P. and Bradford, K. J. 1990. Effects of priming and endosperm integrity on seed-germination rates of tomato genotypes. 2. Germination at reduced water potential. *J. Exp. Bot.* 41(11):1441-1453.
- D'Arcy, W. G. 1991. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. *In: Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution* (Eds.). Hawkes, J. G.; Lester, R. N.; Nee, M. and Estrada, N. Royal Botanic Gardens, Kew. United Kingdom, 75-138 pp.
- Dean, G.; Cao, Y. G.; Xiang, D.; Provart, N. J.; Ramsay, L. and Ahada, A. 2011. Analysis of gene expression patterns during seed coat development in Arabidopsis. *Mol. Plant*. 4:1074-1091.
- Dixon, R. A.; Xie, D. Y. and Sharma, S. B. 2005. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165:9-28.

- Gosch, C.; Puhl, I.; Halbwirth, H.; Schlangen, K.; Roemmelt, S.; Andreotti, C.; Costa, G.; Fischer, T. C.; Treutter, D.; Stich, K. and Forkmann, G. 2003. Effects of prohexadione-Ca on various fruit crops: Flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. *European J. Hortic. Sci.* 68(3):144-151.
- Gupta P. and Mukherjee, D. 1982. Influence of GA3 pre-soaking of seeds on biochemical changes in seedling parts of *Pennisetum typhoides* Rich. *Proceedings of Indian National Science Academy B.* 48(5):642-648.
- Guzmán, R. E. E.; Godínez, F. H.; De La Vega, O. M. and Alejo, N. O. 2009. *In vitro* embryo formation and plant regeneration from anther culture of different cultivars of Mexican husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.) *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 96:181-189.
- Halbwirth, H.; Fischer, T.; Roemmelt, S.; Spinelli, F.; Schlangen, K.; Peterek, S.; Sabatini, E.; Messina, C.; Speakman, J. B.; Andreotti, C.; Rademacher, W.; Bazzi, C.; Costa, G.; Treutter, D.; Forkmann, G. and Stich, K. 2003. Induction of antimicrobial 3-deoxyflavonoids in pome fruit trees controls fire blight. *Zeitschrift fur Naturforschung.* 58:765-770.
- Hardy, O. J.; Vanderhoeven, S.; De Loose, M.; and Meerts P. 2000. Ecological, morphological, and allozymic differentiation between diploid and tetraploid knapweeds (*Centaurea jacea*) from a contact zone in the Belgian Ardennes. *New Phytol.* 146:281-290.
- Izadpanah, M. and Khui, M. K. 1989. Comparisons of *in vitro* propagation of tomato cultivars. *Iran Agric. Res.* 8(1): 34-47.
- Maguirre, J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2:176-177.
- Mandal, S. M.; Chakraborty, D. and Dey, S. 2010. Phenolics acid act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal Behavior.* 5: 359-368.
- Menzel, Y. M. 1951. The cytotoxicity and genetics of *Physalis*. *Proceedings of the American Philosophical Society.* 95:132-183.
- Nakamura, N.; Masuo, Y. and Ooyabu, E. 2007. Development of tetraploid chinese lantern (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* Makino) and its characteristics. *Hortic. Res.* 6(3):341-345.
- Ortuño, O.; Manzo, G. A. y Peña, A. 1997. Cultivo de anteras en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 4:39-43.
- Peña, L. A. y Márquez, F. S. 1990. Mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo* 71(72):85-88.
- Peña, L. A. y Santiaguillo, H. J. F. 1999. Variabilidad genética de tomate de cáscara en México. *Boletín Técnico #2.* Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo (UACH). Texcoco, Estado de México. 26 p.
- Peña-Lomelí, A.; Molina-Galán, J. D.; Cervantes-Santana, T.; Márquez-Sánchez, F.; Sahagún-Castellanos, J. and Ortiz-Cereceres, J. 1998. Heterosis Intervarial en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). *Revista Chapingo Serie Hortic.* 4 (1): 31-37.
- Peña-Lomelí, A.; Molina-Galán, J. D.; Márquez-Sánchez, F.; Sahagún-Castellanos, J.; Ortiz-Cereceres, J. y Cervantes-Santana, T. 2002. Respuestas estimadas y observadas de tres métodos de selección en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) *Rev. Fitotec. Mex.* 25:171-178.
- Ramírez-Godina, F.; Robledo-Torres, V.; Foroughbakhch-Pournavab, R.; Benavides-Mendoza, A. y Alvarado-Vázquez, M. A. 2013. Viabilidad de polen, densidad estomática y tamaño de estomas en autotetraploides y diploides en *Physalis ixocarpa*. *Bot. Sci.* 91(1):11-18.
- Ramírez, G. F. 2012. Caracterización de tetraploides y formación de híbridos triploides en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. 115 p.
- Ramírez-Malagón, R. and Ochoa-Alejo, N. 1991. Adventitious shoot formation and plant regeneration from tissues of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 25(3):185-188.
- 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. *Breed. Sci.* 61:288-293.
- Sánchez, M. J.; Padilla, G. J. M.; Bojórquez, M. B. A.; Arriaga, R. M. C.; Arellano, R. L. J.; Sandoval, I. E. y Sánchez, M. E. 2006. Tomate de cáscara cultivado y silvestre del occidente de México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Guadalajara, Jalisco, México. 176 p.
- Santiaguillo, H. J. F.; López, R. M. Peña-Cuevas, A. L. y Sahagún, J. C. 1994. Distribución, colecta y conservación de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 2: 125-129.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) - SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). 2015. www.siap.sagarpa.gob.mx.
- Van, G. J. and Kroon, H. 1990. Clonal growth in plants: regulation and function. S. P. B. Academic Publishing. The Hague, The Netherlands. 196 p.
- Yousry, M. M. 2013. *In vitro* propagation and somatic embryogenesis in Egyptian Husk tomato (*Physalis pubescens* L.). *J. Appl. Sci. Res.* 9(3):1415-1425.
- Zhang, X. Y.; Hu, C. G. and Yao, J. L. 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *J. Plant Physiol.* 167:88-94.
- Zhao, J.; Pang, Y. and Dixon, R. A. 2010. The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiol.* 153:437-443.
- Zhang, X. Y.; Hu, C. G. and Yao, J. L. 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *J. Plant Physiol.* 167:88-94.
- Zhao, X. Y.; Su, Y. H.; Cheng, Z. J. and Zhang, X. S. 2008. Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *J. Int. Plant Biol.* 50(7):816-824.