

## Análisis meiótico de cuatro generaciones de polinización cruzada en una población autotetraploide sintética de tomatillo (*Physalis ixocarpa*)

Meiotic analysis of four cross-pollinated generations in a synthetic autotetraploid population of husk tomato (*Physalis ixocarpa*)

Rodríguez de León JI<sup>1</sup>, MH Reyes-Valdés<sup>2</sup>, DV Mendoza-Rodríguez<sup>3</sup>, F Ramírez-Godina<sup>2</sup>, V Robledo-Torres<sup>2</sup>, M Gómez-Martínez<sup>2</sup>, G Hernández-Guzmán<sup>4</sup>

**Resumen.** El tomatillo cultivado (*Physalis ixocarpa*) ( $2n = 2x = 24$ ) es una especie nativa de México y Centroamérica, con una amplia variación genética. Actualmente es la cuarta hortaliza en superficie de producción en México. 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 el comportamiento meiótico de las generaciones subsecuentes (C3, C4, C5, C6) a la original (C2) compuesta solamente por plantas con el genoma duplicado de la variedad Rendidora, y determinar la viabilidad de los granos polen. Como testigo diploide se utilizó la variedad Rendidora de *P. ixocarpa*. La determinación de los niveles de ploidía se llevó al cabo mediante citometría de flujo y análisis meiótico. Para el estudio meiótico, los microsporocitos fueron preparados por el método del aplastamiento, teñidos con colorante carmín y analizados en diacinesis. Se evaluó la viabilidad de los granos de polen por medio del método de tinción con Buffalo Black al 0,01%. La tetraploidía prevaleció a través de las cuatro generaciones estudiadas de apareamiento cruzado, ya que se mantuvo un número cromosómico constante  $2n = 4x = 48$ . En diacinesis los cromosomas del testigo diploide se asociaron en bivalentes, mientras que en los tetraploides se formaron univalentes, bivalentes y trivalentes. Se detectaron diferencias altamente significativas en apareamiento bivalente entre las plantas autotetraploides y entre generaciones. La viabilidad de los granos polen no mostró diferencias significativas entre las generaciones estudiadas y permitió su reproducción. Estos resultados indican que es posible desarrollar una variedad tetraploide 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 podría esperar respuesta a la selección para estabilidad meiótica.

**Palabras clave:** *Physalis ixocarpa*; Autotetraploides; Apareamiento meiótico; Viabilidad del polen.

**Abstract.** The cultivated husk tomato (*Physalis ixocarpa*) ( $2n = 2x = 24$ ) is native from Mexico and Central America and shows a wide genetic variation. Presently, it is the fourth horticultural crop in cultivation surface in Mexico. 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 (C3, C4, C5, C6) from the original (C2) composed only by plants with the duplicated genome from the Rendidora cultivar, and to determine pollen viability. As a diploid control the cultivar Rendidora of *P. ixocarpa* was used. Ploidy level was determined by flow cytometry and meiotic analysis. 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. The tetraploid condition prevailed through four cross-pollinating generations, maintaining a constant chromosome number  $2n = 4x = 48$ . In diakinesis, the chromosomes of the diploid cultivar were associated into bivalents, whereas in tetraploid plants the chromosomes associated into univalents, bivalents and trivalents. Highly significant differences in bivalent pairing were detected between autotetraploid plants and between generations. Pollen viability did not show significant differences between generations and allowed reproduction. 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.

**Keywords:** *Physalis ixocarpa*; Autotetraploids; Meiotic pairing; Pollen viability.

<sup>1</sup> Estudiante de Postgrado. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>2</sup> Profesor e Investigador. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>3</sup> Técnico Académico. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>4</sup> Profesor e Investigador. Universidad de Guanajuato, Departamento de Alimentos, Km 9 Carretera Irapuato-Silao, C.P. 36500 Irapuato, Guanajuato, México.

Address Correspondence to: M. Humberto Reyes-Valdés, e-mail: MathGenome@gmail.com

Recibido / Received 10.I.2014. Aceptado / Accepted 28.III.2014.

## INTRODUCCIÓN

El tomatillo cultivado (*Physalis ixocarpa*) también conocido como tomate 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 48475,17 has (SIAP-SAGARPA, 2011). Su producción se distribuye en 28 estados de la República Mexicana, principalmente en Sinaloa, Jalisco y Puebla. Además es cultivado en Guatemala, Colombia, Nueva Zelanda, Australia, África, Kenia e India (Bukasov, 1963; Fischer et al., 1990). El tomatillo es importante por sus frutos, muy empleados en la cocina mexicana (Santiaguillo-Hernández et al., 1994). Son exportados a Estados Unidos y Canadá por su alto consumo. El rendimiento medio nacional es de 15,58 t/ha (SIAP-SAGARPA, 2011), el cual es considerado bajo, de acuerdo con el rendimiento potencial de 40 t/ha (Peña-Lomelí y Santiaguillo-Hernández, 1999).

Una de las posibles vías para el desarrollo de nuevos cultivos 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 la disminución de la cantidad de ADN 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).

La inducción de poliploidía constituye una vía rápida para la obtención de plantas con mayor variación 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 promisorio su utilización en la agricultura (Cubero, 2003). Una estrategia muy utilizada para la inducción artificial de poliploidía es la aplicación de algunos compuestos químicos, como la colchicina. 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 la variedad Rendidora.

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

Por lo anterior, este trabajo se realizó con los siguientes objetivos: (i) analizar el nivel de ploidía de cuatro generaciones de plantas desarrolladas por polinización cruzada aleatoria, a partir de la población autotetraploide original de *P. ixocarpa*, (ii) estudiar el comportamiento meiótico de las plantas diploides progenitoras y de las autotetraploides, y (iii) determinar la viabilidad de los granos de polen de las plantas a través de cuatro generaciones de apareamiento cruzado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material genético inicial utilizado en este trabajo fueron semillas de la generación C2, procedentes de plantas autotetraploides confirmadas por análisis citogenético y citometría de flujo. Las mismas fueron desarrolladas por Robledo-Torres et al. (2011) por aplicación de colchicina a partir de la variedad diploide Rendidora de *P. ixocarpa*, de la cual se obtuvo la generación C0, y a través de dos ciclos de selección se llegó a la generación C2, la cual contiene únicamente plantas autotetraploides. Estos materiales están depositados en el Laboratorio de Citogenética de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Las cuatro generaciones (C3, C4, C5, C6) descendientes de la población original uniformemente autotetraploide (C2), se obtuvieron a través de polinización cruzada. Para ello, se establecieron las plantas de la generación C3 en condiciones de invernáculo. En la etapa de floración se recolectó polen de todas las plantas y se hicieron polinizaciones sin emascular, mediante cruzamientos aleatorios para obtener la generación C4, y así sucesivamente hasta la generación C7. La emasculación no se efectuó debido a la prevalencia de autoincompatibilidad en *P. ixocarpa*, además de que en nuestra experiencia el proceso de remoción de anteras maltrata los pistilos y disminuye la producción de frutos. En cada generación de cruzamientos, el polen de cada planta se recolectó y se mezcló en cajas de Petri para formar un compuesto. Las polinizaciones se realizaron con brochas hechas de palillos de madera rematados con trozos de franela. Para evitar contaminación por polen no deseado, cada flor involucrada en los cruzamientos se cubrió con bolsas de papel resistentes a la humedad. En promedio se hicieron cruzamientos con 58 plantas de cada generación y todos los botones florales disponibles de cada planta.

Se sembraron 100 semillas por cada generación de C3 a C6 en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato peat moss. Posteriormente las charolas se llevaron al invernáculo para el desarrollo de las plántulas. A los 30 días después de la siembra, cuando las plantas alcanzaron de 10 a 12 cm de altura y dos pares de hojas verdaderas, fueron llevadas al campo para su trasplante en un suelo con acolchado plástico y riego por goteo.

Se establecieron 60 plantas de la variedad Rendidora, utilizada como testigo, y 50 plantas de cada una de las cuatro generaciones obtenidas por polinización cruzada aleatoria a

partir de la generación poliploide confirmadas (C2). La localidad de evaluación fue General Cepeda, Coahuila, México (101° 27' 10" O, 25° 23' 02" N). Se emplearon surcos de 5 m de largo y 1,80 m de ancho y con una separación entre plantas de 60 cm y dos hileras por surco. El riego se hizo por cintilla, y la aplicación de fertilizante fue vía riego por cinco semanas con dos soluciones por separado, la primera compuesta 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/L.

El nivel de ploidía de las tres primeras generaciones se analizó por citometría de flujo, de forma complementaria a la citológica. Para ello se muestrearon 8 plántulas de cada una de las generaciones C3, C4 y C5, y como control la variedad Rendidora, cuya condición diploide ha sido previamente demostrada a través de análisis meiótico y citometría de flujo (Robledo-Torres et al., 2011). Cabe aclarar que la condición poliploide de C2 fue demostrada en el mismo trabajo a través de análisis fenotípico, citológico y con citometría de flujo. 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-diadimino-2-phenylindole), que tiñe el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtró a través de una malla de nylon de 30  $\mu\text{m}$  (Partec 50  $\mu\text{m}$ , 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 citómetro de flujo Partec CyStain® UV precise P-05-5002.

El análisis meiótico se hizo tanto para verificar el mantenimiento de la condición poliploide, como para estudiar los tipos de apareamiento cromosómico. Para ello se muestrearon 10 plantas elegidas aleatoriamente por cada generación (C3, C4, C5 y C6) y se analizaron cinco células por individuo. Asimismo, se analizaron 10 plantas de la variedad Rendidora (C0). Se recolectaron botones florales en frascos de vidrio, con una solución fijadora hecha de 3:1 etanol-ácido acético glacial, en la cual se mantuvieron por 24 h. 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 colorante acetocarmín (carmín al 1% en ácido acético al 45%). Las anteras 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. Las células meióticas se analizaron en diacinesis y todas las observaciones se hicieron con el objetivo 100X en un microscopio compuesto Vistavision con cámara digital Pixera Winder Pro®. Se registraron el número y tipo de configuraciones y los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza con el ambiente y lenguaje de cómputo estadístico R (R Development Core Team, 2012).

Para el estudio de viabilidad de los granos de polen, éste se recolectó de 15 plantas por generación de polinización cruzada, en las cuales se incluyeron aquellas que se usaron para el análisis meiótico, así como de la variedad testigo Rendidora. Se evaluó su desarrollo por un método de tinción con Buffalo Black al 0,01% preparado en ácido acético al 45% (Jackson, 1988). Los granos de polen coloreados se consideran viables, mientras que los que no se tiñen se consideran abortivos. 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 un análisis de varianza con el ambiente y lenguaje de cómputo estadístico R (R Development Core Team, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

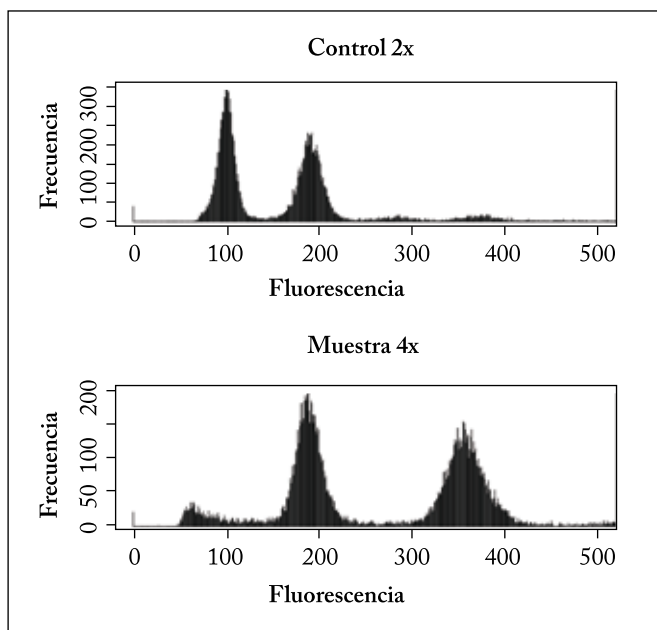
La citometría de flujo practicada en ocho plántulas de cada una de las tres primeras generaciones estudiadas (C3, C4 y C5) indicó sin excepción la presencia de un genoma duplicado con respecto al testigo (Fig. 1). Esto indica que la tetraploidía se mantuvo a través del linaje de la población inicialmente tratada con colchicina. Como se manifestó en el capítulo de Materiales y Métodos, los cruzamientos fueron controlados y realizados únicamente entre plantas de cada generación. No obstante, si se realizan cruzamientos entre plantas tetraploides y diploides se pueden producir plantas triploides, un tópico de estudio en el cual ya se está trabajando (Ramírez et al., 2013).

De acuerdo con el análisis meiótico en diacinesis (Fig. 2) se confirmó la condición tetraploide en las cuatro generaciones, ya que todas las plantas analizadas mostraron un complemento de cromosomas  $2n = 4x = 48$ . La permanencia de la condición tetraploide a lo largo de estas generaciones, sin pérdida notable de la fertilidad, indica que el genoma duplicado se podría mantener indefinidamente, y que sería susceptible de ser utilizado en un programa de mejoramiento genético de tomatillo.

Se observaron configuraciones cromosómicas univalentes, bivalentes y trivalentes, con ausencia de cuadrivalentes. En la Tabla 1 se detallan los números observados para las diferentes configuraciones en 10 plantas de cada generación, representada cada una con 50 células. Por lo que respecta a la variedad Rendidora, solamente se observaron 12 configuraciones bivalentes por célula, consistentes con un número cromosómico  $2n = 2x = 24$ .

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, y la media de trivalentes fue de 0,97 con una desviación estándar 0,85. Esto muestra que en promedio hubieron mayor número de cromosomas involucrados en apareamientos bivalentes (32,48) que en univalentes (12,58) y trivalentes (2,91). Estos números explican en parte el hecho que la fertilidad se mantenga en la población.

Al respecto, en autotetraploides artificiales de *Hyoscyamus niger* también se observó una alta fertilidad con una alta prevalencia de bivalentes (Lavania et al., 1991). Por otro lado, la ausencia de cuadrivalentes en este trabajo se pudo haber debido a una baja incidencia debido al control genético del apareamiento. Una explicación alternativa puede ser la ocurrencia de una falla en el sostenimiento de los quiasmas, que impidió apreciar

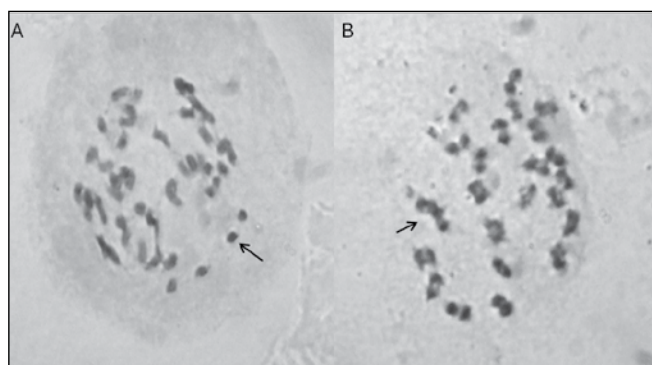


**Fig. 1.** Histograma de citometría de flujo en plantas de *P. ixocarpa* con dos niveles de ploidía. El material diploide (2x) es la variedad Rendidora y el tetraploide (4x) es una planta de la generación C3, descendiente de la población con el genoma duplicado a través de tratamiento con colchicina.

**Fig. 1.** Histogram of flow cytometry in plants of *P. ixocarpa* with two ploidy levels. The diploid material (2x) is the Rendidora cultivar, whereas the tetraploid (4x) is a plant from the generation C3, descendant from the population with duplicated genome through a colchicine treatment.

dichas configuraciones en diacinesis. La condición autotetraploide no previene la formación de bivalentes, con la posibilidad incluso de que todos los apareamientos sean de este tipo, aun cuando estos se compongan de conjuntos diferentes de dos cromosomas y den lugar a segregación del tipo polisómico (Carputo et al., 2006; Sybenga, 1969).

En la Tabla 1 se observa un incremento de bivalentes a lo largo de las cuatro generaciones, lo cual es un indicador de una tendencia hacia la regularidad meiótica. Las diferencias entre generaciones fueron significativas de acuerdo con el análisis de varianza ( $F = 5,062$ ;  $p = 0,0022$ ). Ya que el análisis meiótico se hizo con submuestreo, se pudo probar estadísticamente a través del análisis de varianza, que hubo diferencias altamente significativas ( $F = 2,879$ ;  $p = 3,141 \times 10^{-6}$ ) en el número de bivalentes entre plantas dentro de cada generación. Esto señala la posibilidad de seleccionar individuos para estabilidad meiótica. También en autotetraploides artificiales de *Hyoscyamus niger* se observó un aumento de bivalentes a lo largo de tres generaciones (Lavania et al., 1991).



**Fig. 2.** Células en diacinesis de autotetraploides de *P. ixocarpa* con falta de apareamiento o apareamientos irregulares, señalados con flechas. (A) Célula con presencia de univalentes. (B) Célula con presencia de un trivalente.

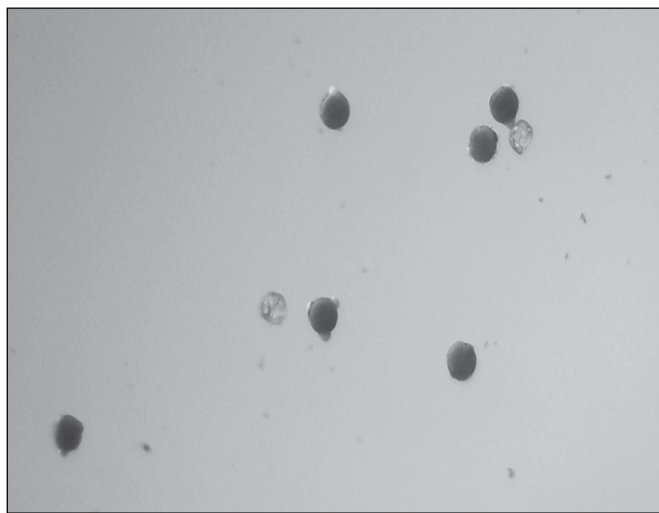
**Fig. 2.** Diakinesis cells of *P. ixocarpa* autotetraploids with pairing failure or irregular pairing, marked by arrows. (A) Cell with presence of univalents. (B) Cell with the presence of a trivalent.

**Tabla 1.** Medias y desviaciones estándar de número de configuraciones meióticas en diacinesis (univalentes, bivalentes y trivalentes) en cuatro generaciones de autotetraploides de *P. ixocarpa*.

**Table 1.** Averages and standard deviations for the number of diakinesis meiotic configurations (univalents, bivalents and trivalents) in four generations of autotetraploids of *P. ixocarpa*.

Generación	Plantas	Células	Univalentes		Bivalentes		Trivalentes	
			Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
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

En la Figura 3 se presentan los granos de polen de una planta autotetraploide, donde el polen teñido se considera viable, mientras que el no teñido se califica como abortivo. En la Tabla 2 se muestran los valores medios del porcentaje de granos de polen viable de un total de 60 plantas de las cuatro generaciones de la población autotetraploide, en las cuales se obtuvo un promedio global de 62,7%, con un mínimo de 60,53% y un máximo de 67,93%. Los granos abortivos representan muy probablemente a gametos desbalanceados. El análisis de varianza no indicó diferencias significativas para viabilidad de polen entre generaciones de apareamiento cruzado ( $F = 0,638$ ;  $p = 0,594$ ). Por otra parte, la variedad Rendidora presentó un valor de 93%. Dicha superioridad ya se esperaba



**Fig. 3.** Granos de polen de un autotetraploide de *P. ixocarpa*. Los granos coloreados se consideran viables, mientras que los no teñidos se consideran abortivos.

**Fig. 3.** Pollen grains of a *P. ixocarpa* autotetraploid. The stained pollen grains are considered viable, whereas those unstained are considered abortive.

**Tabla 2.** Medias y desviaciones estándar para el porcentaje de viabilidad de los granos de polen en cuatro generaciones de autotetraploides de *P. ixocarpa*.

**Table 2.** Averages and standard deviations for the percentage of pollen grain viability in four generations of autotetraploids of *P. ixocarpa*.

Generación	Plantas	Viabilidad de polen (%)	
		Media	Desviación estándar
1	15	62,20	15,26
2	15	67,93	13,65
3	15	60,20	21,29
4	15	60,53	12,64
Total	60	62,72	15,71

dado que Rendidora es una variedad diploide. Stebbins (1947) menciona que los autopoliploides 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 reducida de los granos de polen no originó problemas visibles de infertilidad. El incremento significativo en número de bivalentes por célula no se vio reflejado en una mayor viabilidad de polen. Sin embargo, no se descarta que esto pueda observarse a lo largo de un mayor número de generaciones, especialmente si se establece un esquema de selección hacia regularidad meiótica.

## CONCLUSIONES

La poliploidía se mantuvo a través de las generaciones de reproducción cruzada derivadas de las plantas de *P. ixocarpa* cuyo genoma fue duplicado con colchicina. Hubo una prevalencia de apareamientos bivalentes, con una tendencia hacia su incremento a lo largo de las generaciones de apareamiento. Esto es un indicio de aproximación hacia la regularidad meiótica. Se observaron diferencias entre las frecuencias de bivalentes entre plantas, lo cual ofrece la oportunidad de seleccionar hacia la estabilidad reproductiva. No se mostró variación entre generaciones para la viabilidad de los granos de polen, y aunque fue relativamente baja, no se observó que afectara significativamente la fertilidad de las plantas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación Pública en México, a través del programa de fortalecimiento a Cuerpos Académicos.

## REFERENCIAS

- Bukasov, S.M. (1963). Las plantas cultivadas en México, Guatemala y Colombia. Lima. IICA. Publicación Especial. 20: 2440.
- Carpato, D., E.L. Camadro y S.J. Peloquin (2006). Terminology for polyploids based on cytogenetic behavior: consequences in genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 26: 105.
- Cubero, J.I. (2003). Introducción a la mejora genética vegetal. Segunda Edición. Mundi-Prensa. España. 365 p.
- Doyle, J.J., L.E. Flagel, A.H. Paterson, R.A. Rapp, D.E. Soltis, P.S. Soltis y J.F. Wendel (2008). Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review of Genetics* 42: 443-461.
- Fischer, G., M. Buitrago y P. Lüdders (1990). *Physalis peruviana* L. cultivation and research in Colombia. *Erwerbs-Obstbau* 32: 229-232.
- Imery, J. y H. Cequea (2001). Colchicine-induced autotetraploid in *Aloe vera* L. *Cytologia* 66: 409-413.
- Jackson, R.C. (1988). A quantitative cytogenetic analysis of an inter-sectional hybrid in *Helianthus* (Compositae). *American Journal of Botany* 75: 609-614.

- Lavanaia, U., S. Srivastava y J. Sybenga (1991). Cytogenetics of fertility improvement in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. *Genome* 34:190-194.
- Leitch, A.R. y I.J. Leitch (2008). Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320: 481-483.
- Parisod, C., R. Holderegger y C. Brochmann (2010). Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist* 186: 5-17.
- Peña-Lomelí, A. y J.F. Santiaguillo-Hernández (1999). Variabilidad genética de tomate de cáscara en México. Boletín Técnico #2. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 26 p.
- Poggio, L., G. Gonzáles, M.R. Ferrari, A.M. García, A. Wulff, E. Greizerstein, P. Tomás y G. Schrauf (2004). Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales. En: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds), pp. 379-388. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Editorial INTA, Buenos Aires, Argentina. 647 p.
- 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., V. Robledo-Torres, R. Foroughbakhch-Pournavab, A. Benavides-Mendoza, M.A. Alvarado-Vázquez y D. Quistián-Martínez (2013). Caracterización de tetraploides y formación de híbridos triploides en tomate de cáscara. *Ciencia UANL* 64: 55-66.
- Ramsey, J. y D.W. Schemske (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 589-639.
- 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 Science* 61: 288-293.
- Santiaguillo-Hernández, J.F., R. López-Macías, A. Peña-Lomelí, J.A. Cuevas-Sánchez y J. Sahagún-Castellanos (1994). Distribución, colecta y conservación de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 2: 125-129.
- Sybenga, J. (1969). Allopolyploidization of autopolyploids I. Possibilities and limitations. *Euphytica* 18: 355-371.
- SIAP-SAGARPA (2011). Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. [www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx).
- Stebbins, G.L (1947). Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in Genetics* 1: 403-429.



## Estudio de los cromosomas mitóticos y meióticos del sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.)

### Study of the mitotic and meiotic chromosomes of sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.)

Hernández-Quintero JD<sup>1</sup>, MH Reyes-Valdés<sup>2</sup>, DV Mendoza-Rodríguez<sup>3</sup>, M Gómez-Martínez<sup>2</sup>, R Rodríguez-Herrera<sup>4</sup>

**Resumen.** El género *Dasyilirion* es un grupo de plantas típicas del Desierto Chihuahuense, perennes, de un comportamiento sexual dioico y denominadas comúnmente sotoles. Es un género poco estudiado desde el punto de vista biológico y se desconocen las bases de su dinámica reproductiva. En este trabajo se estudió el número cromosómico y el comportamiento meiótico de *Dasyilirion cedrosanum* en el municipio de Saltillo, Coahuila, una localidad del noreste de México. Para la preparación de cromosomas mitóticos se utilizó una técnica basada en un tratamiento enzimático con pectoliasa y celulasa, así como tinción con acetocarmín. Para el estudio meiótico se recolectaron botones florales masculinos, se fijaron y se tiñeron con el mismo colorante. Como resultado, se reportan por primera vez los números cromosómicos gamético ( $n = x = 19$ ) y somático ( $2n = 2x = 38$ ) de *D. cedrosanum*, y coinciden con observaciones anteriores para otras especies del género *Dasyilirion*, lo cual apunta hacia un nivel de ploidía constante en este grupo. Se observó variación en la morfología y tamaño de los cromosomas somáticos, con tipos de submetacéntrico a subtelocéntrico, y un tamaño que osciló en un rango de 4,43  $\mu\text{m}$ , con una longitud total promedio de 112,38  $\mu\text{m}$  para el complemento cromosómico diploide. Por lo analizado, el complemento cromosómico de *D. cedrosanum* pertenecería a una clasificación 3B de Stebbins, con una variación media entre longitudes cromosómicas y una asimetría intracromosómica baja. Esta variación indica que es factible la construcción de un ideotipo cromosómico para esta especie. El apareamiento cromosómico meiótico mostró características de una herencia disómica propia de una especie diploide, con prevalencia de anillos y cadenas bivalentes, típicamente sin presencia de anomalías en el apareamiento. Las configuraciones

**Abstract.** The genus *Dasyilirion* is a group of plants typically present in the Chihuahuan Desert, perennial, with a dioecious sexual behavior and commonly called sotoles. This genus has been little studied from the biological point of view, and the bases of its reproductive response remain unknown. In this work we studied the chromosome number and meiotic response of *Dasyilirion cedrosanum* in the county of Saltillo, Coahuila, located at the North East of Mexico. For the preparation of mitotic chromosomes, we used a technique based on enzymatic treatment with pectolyase and cellulase, as well as staining with acetocarmine dye. For the study of meiosis, male flower buds were collected, fixed and stained for analysis with the same dye. As a result, the gametic ( $n = x = 19$ ) and somatic chromosome ( $2n = 38$ ) numbers of *D. cedrosanum* are reported for the first time, being consistent with previous findings in other *Dasyilirion* species, which points to a constant ploidy level across the genus. Variation was observed in the morphology and size of the somatic chromosomes, with types ranging from submetacentric to subtelocentric, and sizes oscillating in a range of 4.43  $\mu\text{m}$ , with an average total length of 112.38  $\mu\text{m}$  for the diploid chromosome complement. This shows that the chromosome complement of *D. cedrosanum* would belong to a 3B classification of Stebbins, with a medium variation between chromosome lengths and low chromosome asymmetry. This variation indicates the feasibility of constructing a chromosome ideotype for this species. The meiotic chromosome pairing showed a chromosome behavior consistent with a disomic inheritance characteristic of a diploid species, with prevalence of ring and chain bivalents, typically without pairing abnormalities. Bivalent configurations in all cases were symmetrical.

<sup>1</sup> Estudiante de Postgrado. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>2</sup> Profesor e Investigador. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>3</sup> Técnico Académico. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315 Saltillo, Coahuila, México.

<sup>4</sup> Profesor e Investigador. Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Boulevard Venustiano Carranza s/n, 25000 Saltillo, Coahuila, México.

Address Correspondence to: M. Humberto Reyes-Valdés, e-mail: MathGenome@gmail.com

Recibido / Received 10.XII.2013. Aceptado / Accepted 12.VII.2014.