

***In vitro* PROPAGATION, ACCLIMATIZATION AND IDENTIFICATION OF A WILD SPECIES OF *Physalis* WITH ALIMENTARY UTILITY IN PUEBLA, MÉXICO**

PROPAGACIÓN *in vitro*, ACLIMATACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UNA ESPECIE SILVESTRE DEL GÉNERO *Physalis* CON UTILIDAD ALIMENTARIA, EN PUEBLA, MÉXICO

Elsa Ventura-Zapata¹, Jeanette Meléndez-Mendoza², Mirna María Sánchez-Rivera¹, Jonathan Sánchez-Muñoz¹,
Nadia Primavera Tapia-Barrera^{1*}, Minerva Méndez-Tinajero¹

¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Colonia San Isidro, Apartado Postal 24. 62731, Yautepec, Morelos, México. (n_primavera@yahoo.com). ²Instituto Tecnológico de Zacatepec. Tecnológico 27, Plan de Ayala. 62780, Zacatepec de Hidalgo, Morelos.

ABSTRACT

Plants of the genus *Physalis* are recognized for their nutritional and medicinal properties in Mexico, but only 24% of the 70 species are used. In Puebla, Mexico, a species of this genus that grows wild, and which is not yet identified, produces fruits that are consumed by the local population. The objective of this research was to identify this new species, and to establish a method of propagation and cultivation, after proving its alimentary utility. A taxonomic study, and *in vitro* culture and hydroponics techniques were applied to identify, propagate and cultivate this species. *In vitro* germination was carried out with seeds of ripe fruits in MS medium at 50%. The germination percentage was 79% at 12 d of cultivation. Nodes from seedlings growing *in vitro* were used to induce multiple sprouting in MS medium supplemented with BAP (6-benzylamine purine) in concentrations of 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹ and a kin factor (Kinetin) with IBA (indole butyric acid) of 0.2-2.0 mg L⁻¹. Hypocotyls and cotyledons were used to induce organogenesis with NAA (naphthalene acetic acid) and BAP (0.5-1.0 mg L⁻¹) added to MS medium. With 1.5 mg L⁻¹ of BAP and 0.5 mg L⁻¹ of IBA 100% multiple sprouting was obtained, and shoots and roots with 1 mg L⁻¹ of BAP and 1 mg L⁻¹ of NAA. Root formation was induced by IAA (indole acetic acid), NAA and IBA of 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹. The best response in rooting was with 0.5 mg L⁻¹ of IBA. The seedlings were acclimatized for 49 d; the percentage of survival was 100%. The taxonomic study identified this plant as *Physalis aff rydbergii* Fernald. Through micropropagation it is possible to propagate species of alimentary and medicinal interest in less time than with conventional methods.

RESUMEN

Las plantas del género *Physalis* son reconocidas en México por sus propiedades nutricionales y medicinales, pero solo se utilizan 24% de las 70 especies existentes. En Puebla, México, una especie de este género que crece de forma silvestre, y la cual no se ha identificado, produce frutos que son consumidos por la población local. El objetivo de la investigación fue identificar a esta nueva especie y establecer un método de propagación y cultivo, después de comprobar su utilidad alimentaria. Un estudio taxonómico y técnicas de cultivo *in vitro* e hidropónicas se aplicaron para identificar, propagar y cultivar esta especie. Una germinación *in vitro* de las semillas de frutos maduros se realizó en MS al 50%. El porcentaje de germinación fue de 79% a 12 d de cultivo. Nódulos de plántulas que se desarrollaron *in vitro* se utilizaron para inducir brotes múltiples en un medio MS suplementado con BAP (6-bencilaminopurina) en concentraciones de 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹ y un factor kin (Kinetina) con IBA (ácido indol butírico) de 0.2-2.0 mg L⁻¹. Hipocótilos y cotiledones se usaron para inducir organogénesis con NAA (ácido naftaleno acético) y BAP (0.5-1.0 mg L⁻¹) agregados al medio MS. Con 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de IBA, se obtuvo una brotación múltiple de 100%, así como tallos y raíces con 1 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de NAA. La formación de las raíces se indujo con IAA (ácido indol acético), NAA y IBA de 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹. La mejor respuesta en enraizamiento fue con 0.5 mg L⁻¹ de IBA. Las plántulas se aclimataron durante 49 d; el porcentaje de sobrevivencia fue de 100%. El estudio taxonómico identificó a esta planta como *Physalis aff rydbergii* Fernald. Por medio de micropropagación es posible propagar especies de interés alimentario y medicinal en menor tiempo que con los métodos convencionales.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: November, 2019. Approved: August, 2020.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 859-872. 2020.

Palabras clave: *Physalis*, cultivo *in vitro*, organogénesis, aclimatación.

Key words: *Physalis*, *in vitro* culture, organogenesis, acclimatization.

INTRODUCTION

Mexican rural communities complement their diet with collected edible plants from the forest, and secondary vegetation that thrives their territory. Ethnobotanical studies carried out in different regions of the country report more than 1500 species of wild edible plants that provide between 8 and 17% of the annual diet of peasant families (Lascurain *et al.*, 2010). All these species are considered genetic resources to face the challenges of national food security; their conservation is important for Mexico (Sarukhán *et al.*, 2017).

Species of the genus *Physalis* are distributed throughout the country (Martínez *et al.*, 2017). These species are edible for humans and animals, but are also medicinal, industrial and ornamental, and even ritual in some communities. This is based on the information of husk tomato samples consulted in 15 Mexican herbaria, including the Universidad Autónoma de México, National Herbarium at Instituto Nacional de Biología (MEXU), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Herbarium (ENCB), Colegio de Posgraduados Herbarium Hortorio (CHAPA), “Luz María Villarreal de Puga” Herbarium (IBUG), “Dr. Jerzy Rzedowski” Herbarium of the City of Querétaro (QMEX) and Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Herbarium (ANSM).

The above mentioned uses are associated with 15 species, which represent 24% of the 70 recognized in the Mexican territory, from which the root, stem, leaves, fruit and receptacle are used (Santiaguillo and Blas, 2009). *Physalis* is an important genus for people since it includes species with edible fruits (López-Sandoval *et al.*, 2018). Fruits from different wild *Physalis* species are harvested for self-consumption or for sale in Mexico (Valdivia-Mares *et al.*, 2016). Maldonado *et al.* (2011) highlighted this genus as a source of witaes-teroides, compounds of terpene origin, with various bioactivities, and preventive properties against cancer. *Physalis peruviana* produces withanolide E and 4 β -hydroxywitanolide E, which are applied as anticancer agents, and also have antioxidant activity (Xia *et al.*, 2016; Barrientos *et al.*, 2019).

INTRODUCCIÓN

Las comunidades rurales mexicanas complementan su dieta con plantas comestibles recolectadas del bosque y vegetación secundaria que crece en su territorio. Estudios etnobotánicos realizados en diferentes regiones del país reportan más de 1500 especies de plantas comestibles silvestres que brindan entre 8 y 17% de la dieta anual de familias campesinas (Lascurain *et al.*, 2010). Todas estas especies se consideran recursos genéticos para enfrentar los retos de la seguridad alimentaria nacional; su conservación es importante para México (Sarukhán *et al.*, 2017).

En todo el país hay una distribución de especies del género *Physalis* (Martínez *et al.*, 2017). Estas especies son comestibles para humanos y animales, pero también son medicinales, industriales y ornamentales, e incluso ceremoniales en algunas comunidades. Esto se basa en la información de muestras de tomate de cáscara consultada en 15 herbarios mexicanos, incluyendo la Universidad Autónoma de México, Herbario Nacional del Instituto Nacional de Biología (MEXU), Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Herbario Hortorio del Colegio de Posgraduados (CHAPA), Herbario “Luz María Villarreal de Puga” (IBUG), Herbario “Dr. Jerzy Rzedowski” de la Ciudad de Querétaro (QMEX) y el Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (ANSM).

Los usos mencionados anteriormente se relacionan con 15 especies, que representan 24% de las 70 reconocidas en territorio mexicano, de las cuales se usan la raíz, el tallo, las hojas, el fruto y el cáliz (Santiaguillo y Blas, 2009). *Physalis* es un género importante para la gente, ya que incluye a especies con frutos comestibles (López-Sandoval *et al.*, 2018). Frutos de especies diferentes de *Physalis* silvestres se cosechan para el consumo o la venta en México (Valdivia-Mares *et al.*, 2016). Maldonado *et al.* (2011) destacaron a este género como una fuente de witaes-teroides, compuestos originados del terpeno, con bioactividades variadas y propiedades preventivas contra el cáncer. *Physalis peruviana* produce witanólido E y 4 β -hidroxiwitanólido E, que se aplican como agentes anticancerígenos y también tienen actividad antioxidante (Xia *et al.*, 2016; Barrientos *et al.*, 2019).

Algunas especies del género *Physalis* son parte de la cultura alimenticia de América Central y del

Species of the genus *Physalis* are part of the food culture in Central and North America, and it is important to identify their state of conservation, and to perform research about genetic diversity and geographical distribution in order to promote their use and conservation (Santiaguillo and Blas, 2009; Sarukhán, *et al.*, 2017). In the Northeast of the state of Puebla, Mexico, a plant of this *Physalis* genus grows wild, its fruits are consumed by local people and it is not identified. Thus, the objective of this research was to identify the species of wild husk tomato from the genus *Physalis*, and to establish a method for propagation and cultivation.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Ripe fruits of *Physalis* were collected during September 2013 at San José Alchichica, a town of Tepeyahualco Municipality, in Puebla.

In vitro germination

The seeds were separated from the fruit, washed with distilled water and dried at room temperature for one week. One hundred seeds were placed into 500 mL beaker with 2% extran solution for 5 min. The seeds were sprayed three times with distilled water, submerged with 7% ethanol for 30 s, and washed with distilled water. Seeds were then placed in *Benomilo* (commercial grade) solution for 20 min, under aseptic conditions using a laminar flow hood (Alder-Mexico) and washed three times with sterile distilled water; then seeds were placed in a 0.6% sodium hypochlorite solution for 10 and 15 min and rinsed three times with sterile distilled water. Seeds were submerged in *Agrimicin* (commercial grade) solution during 5 min, and rinsed three times with distilled water. In glass bottles with 50% Murashige and Skoog (MS) culture medium (Murashige and Skoog, 1962), seeds were placed in sterile conditions and after covering with the lids, they remained 12 d in darkness at 25 ± 1 °C. Afterwards, they were subjected to photoperiod for 8 h in darkness and 16 h in light at 25 ± 1 °C. The total amount of pathogen-free seeds, plus germinated seeds were counted in order to obtain the percentage of both contamination and germination.

Inducing multiple sprouts

Shoot sprouting was induced by placing nodal sections in 36 treatments with plant growth regulators: combination of IBA

Norte, y es importante identificar su estado de conservación, así como investigar su diversidad genética y distribución geográfica para promover su uso y conservación (Santiaguillo y Blas, 2009; Sarukhán, *et al.*, 2017). Al noreste del estado de Puebla, México, una planta del género *Physalis* crece de forma silvestre y, aunque la gente local consume sus frutos, la planta no se ha identificado. Así, el objetivo de esta investigación fue identificar la especie de tomatillo del género *Physalis* y establecer un método para su propagación y cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Frutos maduros de *Physalis* se recolectaron en septiembre de 2013 en San José Alchichica, en el municipio de Tepeyahualco, Puebla.

Germinación *in vitro*

Las semillas se separaron de los frutos, se lavaron con agua destilada y secaron a temperatura ambiente durante una semana. Cien semillas se colocaron en un matraz de 500 mL con Extran al 2% por 5 min. Luego, las semillas se rociaron tres veces con agua destilada, sumergidas en etanol al 7% por 30 s y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se colocaron las semillas en una solución de *Benomilo* (grado comercial) por 20 min bajo condiciones asépticas usando una cabina de flujo laminar (Alder-México) y se lavaron tres veces con agua destilada. Luego se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% por 10 y 15 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se sumergieron en *Agrimicin* (grado comercial) durante 5 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada. En frascos de vidrio con un medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) al 50% (Murashige y Skoog, 1962), se colocaron semillas en condiciones estériles y después de taponarlas, permanecieron por 12 d en la oscuridad a 25 ± 1 °C. Después fueron expuestas a un fotoperiodo de 8 h en la oscuridad y 16 h en la luz a 25 ± 1 °C. La cantidad total de semillas libres de patógenos se contó, más las semillas germinadas, para obtener el porcentaje tanto de contaminación como de germinación.

Inducción de brotación múltiple

El surgimiento de brotes se indujo al colocar secciones nodales en 36 tratamientos con reguladores del crecimiento vegetal: una combinación de IBA con Kin (0.0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg

with Kin (0.0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹), and BAP (0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹). For each treatment 20 explants (nodes) were placed. After 12 and 25 d of cultivation, they were counted for total sprouts in order to calculate the percentage of response and average number of shoots per explant.

Induction by organogenesis

Induction of organogenesis was carried out with a factorial arrangement of ANA (0.5 and 1.0 mg L⁻¹), with BAP (0.5 and 1.0 mg L⁻¹). Six explants from cotyledons and six from hypocotyls were placed in each of the nine treatments. Shoots, calluses and roots generated by hypocotyls and cotyledons as explants, were evaluated as the response in each one of the treatments. The experiment lasted 34 d.

Root induction

To induce root formation ANA, IBA and AIA at 0.2, 0.5, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹ were evaluated. In each of the 12 treatments, 15 shoots between 1.2 and 2.0 cm high, were placed. After 25 d of culture, the percentage of explants that formed root and the average number of roots per explant were evaluated.

Acclimatization of the *in vitro* plants

The method was based on a hydroponic system with gradual decrease in relative humidity, as reported by Ventura *et al.* (2003). On 10 plastics containers (80 mL capacity), 20 mL of nutritive Steiner solution were placed, and in each container an *in vitro*-rooted plant was placed. The containers were covered with an aluminum cap and a transparent polyethylene bag (11 x 21 cm). Each week, the temperature and relative humidity were measured inside the container with a thermo-hygrometer which was introduced through an orifice made at 5 cm from top of the bag. To achieve acclimatization, every 3 d and during seven weeks, an orifice of around 0.8 mm of diameter was drilled in the polyethylene bag (ACME 857-Mexico); thus, the temperature was maintained at 25 ± 2 °C. Stomata conductance as mmol m² s⁻¹ was measurement with a leaf porometer (Decagon Devices Inc., Model SC-1, USA) by placing the underside from upper immature leaves and mature leaves of the plants on the sensor plate.

Taxonomy study

This plant species was identified at the National Herbarium (MEXU), Instituto Nacional de Biología, under the Universidad Autónoma de México. Two specimens, 40 cm long with flowers and fruits, were collected at San José Alchichica. Each specimen

L⁻¹), y BAP (0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹). Por cada tratamiento se colocaron 20 explantes (nódulos). Después de 12 y 25 d de cultivo, se contaron los brotes totales para calcular el porcentaje de respuesta y promedio de brotes por cada explante.

Inducción por organogénesis

La inducción de la organogénesis se llevó a cabo con un arreglo factorial de ANA (0.5 y 1.0 mg L⁻¹), con BAP (0.5 y 1.0 mg L⁻¹). Seis explantes de cotiledones y seis de hipocótilos se colocaron en cada uno de los nueve tratamientos. Tallos, callos y raíces generadas por hipocótilos y cotiledones como explantes, se evaluaron en respuesta a cada uno de los tratamientos. El experimento duró 34 d.

Inducción de raíz

Para inducir la formación de raíces, se evaluaron ANA, IBA y AIA a 0.2, 0.5, 1.0 y 1.5 mg L⁻¹. En cada uno de los 12 tratamientos, se colocaron 15 tallos, de entre 1.2 y 2.0 cm de altura. Después de 25 d de cultivo se evaluaron el porcentaje de explantes que formaron raíces, así como el promedio de raíces por explante.

Aclimatación de las plantas *in vitro*

El método se basó en un sistema hidropónico con una reducción gradual en la humedad relativa, según lo reportado por Ventura *et al.* (2003). En 10 contenedores plásticos (capacidad de 80 mL), se colocaron 20 mL de solución nutritiva Steiner y en cada contenedor se colocó una planta enraizada *in vitro*. Los contenedores se cubrieron con una tapa de aluminio y una bolsa de polietileno transparente (11 x 21 cm). Cada semana se midieron la temperatura y la humedad relativa dentro del contenedor con un termohigrómetro, el cual se introdujo a través de una perforación realizada a 5 cm de la parte superior de la bolsa. Para lograr la aclimatación, cada 3 d durante siete semanas, se le perforaba un orificio con un diámetro de alrededor de 0.8 mm en la bolsa de polietileno (ACME 857-Mexico); de esta forma, la temperatura se mantuvo a 25 ± 2 °C. La conductancia estomática como mmol m² s⁻¹ se midió con un porómetro foliar (Decagon Devices Inc., Model SC-1, EE.UU.); se colocó el lado inferior de las hojas inmaduras superiores y de las hojas maduras de la planta en el sensor.

Estudio taxonómico

Esta especie vegetal se identificó en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto Nacional de Biología, de la Universidad Autónoma de México. Dos especímenes, de 40 cm de largo con

was prepared and placed on a sheet of paper (45 x 30 cm). All the parts of plants were carefully extended and covered with a sheet of paper with equivalent dimensions. The sheets of paper were placed between two pieces of cardboard that were pressed with a wooden grid which had the same dimensions as the cardboard pieces. Then, after the cardboard sheets were tied together with cord, more pressure was applied. The specimens were stored in an herbarium for 48 h in order to identify them via the corresponding protocols.

Statistical analysis

Means in the three replicates, \pm standard deviation, were analyzed using a two-ways ANOVA, and the Mann-Whitney test to compare stomata conductance from upper and lower leaves during acclimatization of the *in vitro* plants.

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro germination

Pathogen-free seeds were obtained in 100% (Figure 1a) and germination ratio was 79% (Figure 1b). Disinfection method allowed 100% of pathogen-free seeds.

Induction of multiple sprouting

All explants treated with 0.5 mg L⁻¹ IBA presented multiple sprouting. In none of the KIN treatments was this percentage obtained, nor in its combination with IBA. And when five concentrations of BAP were used, 1.5 mg L⁻¹ was the only concentration that induced 100% sprouting (Table 1 and Table 2).

flores y frutos, fueron recolectados en San José Alchichica. Cada espécimen se preparó y se colocó sobre una hoja de papel (45 x 30 cm). Todas las partes de las plantas se extendieron con cuidado y se cubrieron con otra hoja de papel de iguales dimensiones. Las hojas de papel se colocaron entre dos piezas de cartón, las cuales se comprimieron con una rejilla de madera con las mismas medidas que los cartones. Después, las láminas de cartón se amarraron entre sí con cuerda y se aplicó más presión sobre ellas. Los especímenes se almacenaron en un herbario por 48 h para identificarlos con los protocolos correspondientes.

Análisis estadístico

Los promedios de las tres réplicas \pm desviación estándar se analizaron por medio de un ANDEVA de doble vía, y se usó la prueba Mann-Whitney para comparar la conductancia estomática de las hojas de las partes superior e inferior de la planta durante la aclimatación de las plantas *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación *in vitro*

Del total de las semillas obtenidas, 100% resultaron libres de patógenos (Figura 1a) y la tasa de germinación fue de 79% (Figura 1b). El método de desinfección permitió obtener el 100% de semillas libres de patógenos.

Inducción de brotación múltiple

Todos los explantes tratados con 0.5 mg L⁻¹ de IBA presentaron brotes múltiples. En ninguno de los tratamientos KIN se obtuvo este porcentaje, ni en

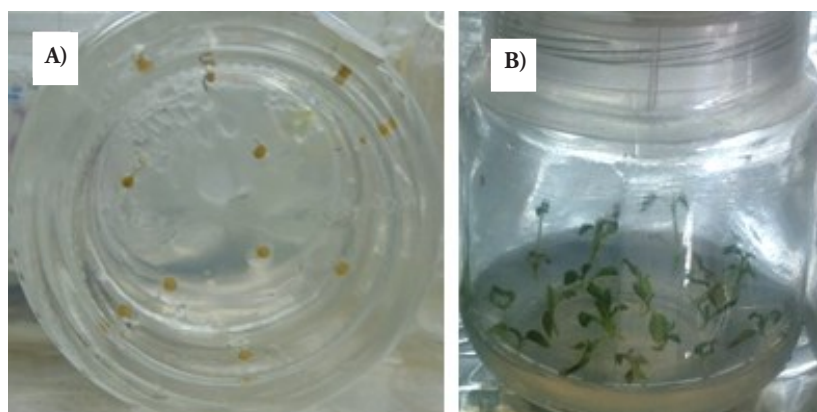


Figure 1. *In vitro* germination of *Physalis aff rydbergii* Fernald. A) seeds sown in culture medium after disinfection, B) seedlings from seed germination.

Figura 1. Germinación *in vitro* de *Physalis aff rydbergii* Fernald. A) semillas sembradas en medio de cultivo después de desinfección, B) plántulas de semillas germinadas.

Table 1. Effect of the combination of concentrations of indolbutyric acid and kinetin in the induction of multiple sprouting.**Cuadro 1. Efecto de la combinación de concentraciones de ácido indol butírico y kinetina en la inducción de brotes múltiples.**

IBA (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)											
	0.0		0.2		0.5		1.0		1.5		2.0	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
0.0 ⁽¹⁾	90	1.0	75	1.06	90	1.00	60	1.00	85	1.20	60	1.08
0.2 ⁽²⁾	90	0.9	60	1.16	70	1.20	85	1.35	85	1.35	85	1.11
0.5 ⁽³⁾	100	1.1	90	1.11	65	1.07	85	1.17	55	1.09	50	1.00
1.0 ⁽⁴⁾	90	1.0	25	1.20	15	1.33	45	1.33	35	1.14	40	1.37
1.5 ⁽⁵⁾	90	1.0	40	1.12	5	1.00	15	1.00	70	1.07	55	1.00
2.0 ⁽⁶⁾	75	1.02	45	1.11	35	1.00	45	1.33	35	1.14	65	1.07

IBA indolbutyric acid, K kinetin, A response rate, B number of buds per explant, Number inside parentheses. ♦ IBA ácido indol butírico, K kinetina, A tasa de respuestas, B número de brotes por explante, Número entre paréntesis.

Table 2. Effect of benzyl amino purine in the induction of multiple sprouting.**Cuadro 2. Efecto de bencilaminopurina en la inducción de brotes múltiples.**

BAP (mg L ⁻¹)	Response (%)	Total buds	Average of buds / explant
0.0	95	27	1.4
0.2	60	14	1.1
0.5	90	24	1.3
1.0	90	28	1.6
1.5	100	26	1.3
2.0	60	12	1.0

BAP= Benzyl amino purine. ♦ BAP= Bencilaminopurina.

The control plants of the IBA and KIN experiment and of the BAP treatment had 90 and 95%, respectively, of multiple sprouting so that the propagation by nodes could be carried out without the addition of growth regulators. Regarding *in vitro* regeneration of the *Solanaceae* family, some of the best efficiency occurs when the medium is supplemented with cytokinins. In our research, the best response to induce shoots was with MS medium supplemented with 1.5 mg L⁻¹ de BAP and 0.5 mg L⁻¹ of IBA, as growth regulators. The average number of shoots per explant in all concentrations for *Physalis aff rydbergii* Fernald were too low.

These results are similar to those obtained by Chaves *et al.* (2005) in *P. peruviana* L, which showed 1.75 shoots by explant using a medium supplemented with 0.3 mg L⁻¹ BAP. Sheeba *et al.* (2015) and Otrshy *et al.* (2013) used nodes culture, and mixing 2.0 mg L⁻¹ BAP and 0.25 mg L⁻¹ IAA, as well as 4 mg L⁻¹ BAP, 1 mg L⁻¹ Kin and 0.5 mg L⁻¹

su combinación con IBA. Y cuando se usaron cinco concentraciones de BAP, solo la concentración de 1.5 mg L⁻¹ indujo una germinación de 100% (Cuadros 1 y 2).

Las plantas testigo del experimento IBA y KIN y del tratamiento BAP tuvieron 90 y 95%, respectivamente, de brotes múltiples, por lo que la propagación por nódulos podría llevarse a cabo sin aplicar reguladores de crecimiento. Respecto a la regeneración *in vitro* de especies de la familia *Solanaceae*, la eficiencia mejor ocurre cuando el medio se suplementa con citoquininas. En nuestra investigación, la respuesta mejor de inducción de brotes fue con el medio MS suplementado con 1.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de IBA como reguladores del crecimiento. El número promedio de brotes por explante en todas las concentraciones para *Physalis aff rydbergii* Fernald fue demasiado bajo.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Chaves *et al.* (2005) en *P. peruviana* L, que pre-

IBA, they obtained a rank of response of multiple sprouting from 80 to 100% for *P. minima* L. and *P. peruviana* L., respectively. However, a high response of sprouting in regulator-free medium was observed; which coincides with Rodríguez (2012) who used *Crasulaceae* plants.

Organogenesis induction

Explants in the control group (treatment A) showed no response due to absence of growth regulators. But explants from hypocotyls and cotyledons expressed organogenic response to NAA/BAP regulators (Table 3). Cotyledon explants showed an organogenesis response to shoots with concentrations of 0.5 and 1.0 mg L⁻¹ of BAP and to roots with concentrations of 0.5 and 1.0 mg L⁻¹ of ANA. In both cases, the highest concentration was which induced the greatest response. Callus formation from cotyledon and hypocotyl occurred mainly in treatments containing BAP, in combination with 0.5 and 1.0 mg L⁻¹ and ANA. The treatment induced shoot formation with 0.5 mg L⁻¹ from both

sentó 1.75 brotes por explante usando un medio suplementado con 0.3 mg L⁻¹ BAP. Sheeba *et al.* (2015) y Otrosby *et al.* (2013) usaron un cultivo de nódulos con una mezcla de 2.0 mg L⁻¹ BAP con 0.25 mg L⁻¹ IAA, así como 4 mg L⁻¹ BAP, 1 mg L⁻¹ Kin y 0.5 mg L⁻¹ IBA, y obtuvieron un rango de respuesta de brotes múltiples de 80 a 100% para *P. minima* L. y *P. peruviana* L., respectivamente. Sin embargo, se observó una tasa alta de respuesta en brotación en un medio libre de reguladores; lo cual coincide con Rodríguez (2012), quien usó plantas de *Crasulaceae*.

Inducción de organogénesis

Los explantes en el grupo testigo (tratamiento A) no presentaron respuesta, debido a la ausencia de reguladores del crecimiento. Pero los explantes de hipocótilos y cotiledones expresaron respuesta organogénica a los reguladores NAA/BAP (Cuadro 3). Los explantes de cotiledones presentaron una respuesta de organogénesis para brotes con concentraciones de 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de BAP y para raíces, con concentraciones de 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de ANA. En ambos

Table 3. Effect of treatments with naphthalene acetic acid and benzyl aminopurine to induce organogenesis from hypocotyl and cotyledon as explant.
Cuadro 3. Efecto de tratamientos con ácido naftalenacético y bencilaminopurina para inducir organogénesis a partir de hipocótilo y cotiledón como explantes.

Explants	Treatments	Buds (%)	Callus (%)	Roots (%)
Hypocotyl	A	0	0	0
"	B	0	33	0
"	C	0	66	0
"	D	0	100	0
"	E	16	100	0
"	F	0	83	0
"	G	0	100	16
"	H	0	100	0
"	I	0	100	0
Cotyledon	A	0	0	0
"	B	33	16	0
"	C	50	33	0
"	D	0	0	33
"	E	0	100	0
"	F	0	100	0
"	G	0	0	100
"	H	0	100	0
"	I	0	100	0

Treatments (NAA/BAP, mg L⁻¹) = A= 0.0/0.0, B = 0.0/0.5, C = 0.0/1.0, D = 0.5/0.0, E = 0.5/0.5, F= 0.5/1.0, G = 1.0/0.0, H = 1.0/0.5, I = 1.0/1.0. ♦ Tratamientos (NAA/BAP, mg L⁻¹) = A= 0.0/0.0, B = 0.0/0.5, C = 0.0/1.0, D = 0.5/0.0, E = 0.5/0.5, F= 0.5/1.0, G = 1.0/0.0, H = 1.0/0.5, I = 1.0/1.0.

growth regulators, but root formation was due only to the treatment with 0.5 mg L⁻¹ of ANA. BAP in the culture medium induced callus formation, but the highest responses occurred in combination with ANA. There was a higher percentage of shoots with C treatment and 1.0 mg L⁻¹ BAP in cotyledon as explant; thus, this treatment was better for *in vitro* propagation of *Physalis* plant for shoot induction using 50% MS medium (Table 3).

The best morphogenetic response to induce shoots was obtained using cotyledons as explant after 34 d of culture, with 50 *vs.* 16% from hypocotyls as explant. This was attributed to the difference in anatomy traits between both explants. Contreras and Almeida (2003) reported morphogenesis induction from hypocotyls and cotyledons of *Physalis ixocarpa* L., using BAP, IAA and Zeatin as growth regulators in the MS medium. However, their results of shoots induction do not agree with our research, since they had a better response by using hypocotyls as explant; 66 shoots using Zeatine, and 44 shoots when mixing BAP and IAA; and a lower response with cotyledons as explant, with 54 shoots in the culture with Zeatine, and 36 shoots using BAP and IAA as regulators. Hence, Zeatine was the better cytoquinine to induce bud formation for both explants (cotyledon and hypocotyls), in contrast to the combination of BAP and IAA.

Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) mixed 1.5 mg L⁻¹ of BAP and IAA, and reported 70% bud formation from hypocotyls of *CHF1-Chapingo* variety, and a yield of 20.8 shoots per explant after 21.1 d of culture. Otroshy *et al.* (2013) reported leaves with nodes from *P. peruviana* L., in medium supplemented with BAP and Kin; callus formation was dependent on the NAA concentration and their combination with BAP.

Root induction

Response in shoot induction and average number of roots per explant existed in 12 treatments with different growth regulators (Table 4). Data was registered after 25 d since the start of each experiment; afterwards, the growth of the roots was stopped. No secondary roots were formed because the roots augmented. A cottony appearance and large size of the roots was gradually observed. Higher percentages of root formation were observed with treatments 0.5 mg L⁻¹ IBA and 0.2 mg L⁻¹ AIA. However, 0.5 mg L⁻¹

casos, la concentración más alta fue la que indujo la respuesta mayor. La formación de callo en hipocótilos y cotiledones ocurrió principalmente en los tratamientos con BAP, en combinación con 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de ANA. El tratamiento indujo la formación de brotes con 0.5 mg L⁻¹ de ambos reguladores del crecimiento, aunque la formación de la raíz solo se debió al tratamiento con 0.5 mg L⁻¹ de ANA. BAP en el medio de cultivo indujo la formación de callo, pero las respuestas mayores ocurrieron en combinación con ANA. Un porcentaje mayor de brotes se generó con el tratamiento C y 1.0 mg L⁻¹ de BAP con el cotiledón como explante. Así, este tratamiento fue el mejor para la propagación *in vitro* de la planta de *Physalis* con inducción de brotes en el medio MS al 50% (Cuadro 3).

La respuesta morfogénica mejor para inducir brotes se obtuvo al usar los cotiledones como explantes después de 34 d de cultivo, con 50 *vs.* 16% a partir de hipocótilos como explante. Esto se atribuyó a la diferencia en los rasgos anatómicos entre ambos explantes. Contreras y Almeida (2003) reportaron inducción morfogénica de hipocótilos y cotiledones en *Physalis ixocarpa* L., con BAP, IAA y Zeatina como reguladores del crecimiento en el medio. Sin embargo, los resultados obtenidos por dichos autores para la inducción de brotes no coinciden con nuestra investigación, ya que ellos obtuvieron una respuesta mejor al usar hipocótilos como explantes; 66 brotes con Zeatina y 44 con la mezcla BAP e IAA; así como una respuesta menor al usar cotiledones como explantes, con 54 brotes en el cultivo con Zeatina y 36 con BAP e IAA como reguladores. Por consiguiente, Zeatina fue la mejor citoquinina para inducir la formación de brotes para ambos explantes (hipocótilos y cotiledones), en contraste con la combinación de BAP e IAA.

Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) mezclaron 1.5 mg L⁻¹ de BAP e IAA y documentaron una formación de brotes de 70% de hipocótilos de la variedad *CHF1-Chapingo*, así como un rendimiento de 20.8 brotes por explante después de 21.1 d de cultivo. Otroshy *et al.* (2013) reportaron hojas con nódulos de *P. peruviana* L. en un medio suplementado con BAP y KIN; la formación de callos dependió de la concentración de NAA y su combinación con BAP.

Inducción de raíces

En los 12 tratamientos con diferentes reguladores del crecimiento existió respuesta en la inducción de

Table 4. Effect of the concentration of auxin types on root formation (%).

Cuadro 4. Efecto de la concentración de tipos de auxinas en la formación de raíz (%).

mg L ⁻¹	NAA (%)	IBA (%)	IAA (%)
0.0	47	-	-
0.2	60	60	73
0.5	67	80	47
1.0	13	47	67
1.5	20	33	27

NAA= Naphthalene acetic acid; IBA= Indol butyric acid; IAA= Indol acetic acid. ♦ NAA= Ácido naftaleno acético; IBA= Ácido indol butírico; IAA= Ácido indol acético.

IBA obtained the higher response to root formation (≈ 80%), and the average counted of roots per explant was four (Figure 1d). This number showed no significant differences among treatments (Figure 2).

Auxins in culture medium can promote the formation of roots. In our research there were three auxins and only 0.5 mg L⁻¹ IBA induced 80% root formation, which is similar to results showed

raíz y en el promedio de raíces por explante (Cuadro 4). Los datos se registraron 25 d después del inicio de cada experimento; después, el crecimiento de las raíces se detuvo. Tampoco se formaron raíces secundarias porque aumentarían las raíces. Una apariencia algodonosa y tamaño grande se observó de manera gradual en las raíces. Porcentajes mayores de formación radical se observaron con los tratamientos 0.5 mg L⁻¹ IBA y 0.2 mg L⁻¹ AIA. Sin embargo, 0.5 mg L⁻¹ de IBA obtuvo la respuesta más alta en la formación de raíces (≈ 80%) y el promedio de raíces contabilizadas por explante fue de cuatro (Figura 1d). Este número no presentó diferencias significativas entre tratamientos (Figura 2).

Las auxinas pueden promover la formación de raíces en un medio de cultivo. En nuestra investigación hubo tres auxinas y solo 0.5 mg L⁻¹ IBA indujo el 80% de formación de raíces, lo cual fue similar a los resultados obtenidos por Otroschy *et al.* (2013), quienes encontraron una formación de raíces de 100% con 0.5 mg L⁻¹ y 1.0 mg L⁻¹ de IBA en *P. peruviana* L. El crecimiento en cultivos libres de reguladores presentó una respuesta de 47% en formación radical, similar a los resultados reportados por Contreras y

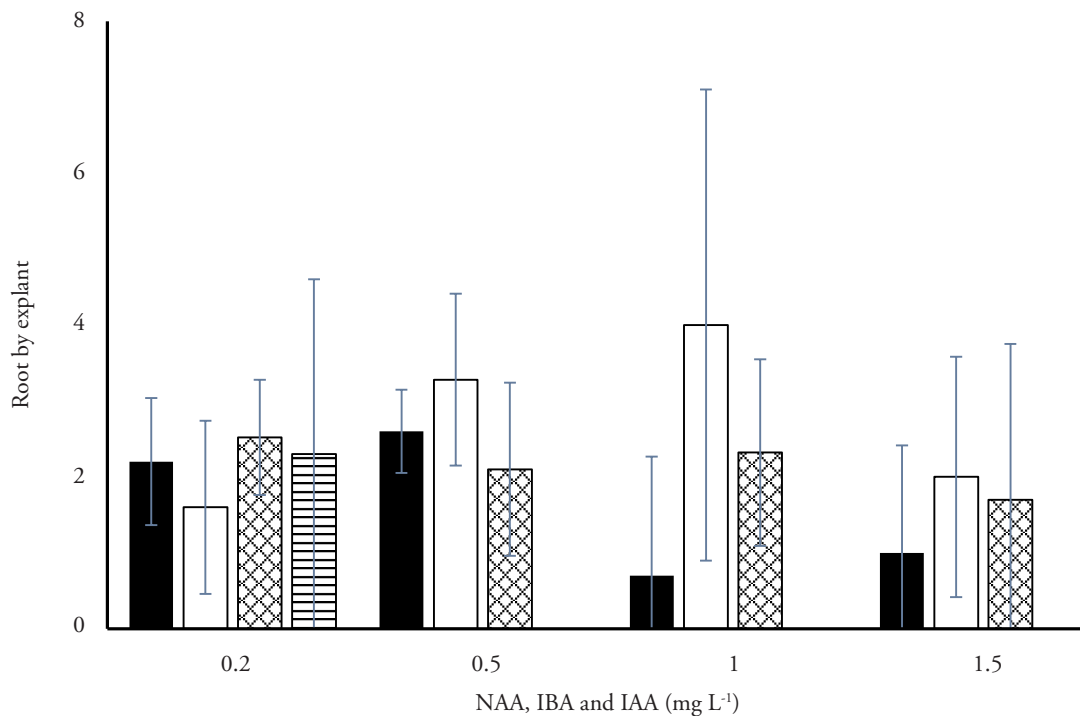


Figure 2. Average of roots per explant, with NAA (■), IBA (□), IAA (⊠) and control (▨). There was no statistical difference (p>0.05).

Figura 2. Promedio de raíces por explante, con NAA (■), IBA (□), IAA (⊠) y testigo (▨). Sin diferencia estadística (p>0.05).

by Otroshy *et al.* (2013) who found 100% root formation with 0.5 mg L⁻¹ and 1.0 mg L⁻¹ of IBA in *P. peruviana* L. Growth in regulators-free cultures showed a response of 47% in root formation, similar to the results reported by Contreras and Almeida (2003) and by Montiel *et al.* (2011), who did not use regulators to induce rooting in *P. ixocarpa* L. and *P. peruviana* L., respectively. This could be related to concentration of salts in the 50% MS medium, because no response was observed using 100% MS medium (Montiel *et al.*, 2011).

Acclimatization

During seven weeks of acclimatization, the temperature and the relative humidity decreased inside the bag used to cover the plants. The difference between the initial data and the final data was 7.0 °C, and a difference of 19% for relative humidity (Figure 3). The stomatal conductance of leaves from the bottom of the plant showed a trend to decrease with values higher than 500 mmol m² s⁻¹ during the first

Almeida (2003) y por Montiel *et al.* (2011), quienes no usaron reguladores para inducir el enraizamiento en *P. ixocarpa* L. y *P. peruviana* L., respectivamente. Esto podría estar relacionado con la concentración de sales en el medio MS al 50%, ya que no se observó respuesta al usar un medio MS al 100% (Montiel *et al.*, 2011).

Acclimatación

Durante siete semanas de aclimatación, la temperatura y la humedad relativa disminuyeron dentro de las bolsas usadas para cubrir las plantas. La diferencia entre el dato inicial y el final fue de 7.0 °C, y para la humedad relativa, una diferencia de 19% (Figura 3). La conductancia estomática de las hojas de la parte inferior de la planta presentó una tendencia a la reducción, con valores mayores a 500 mmol m² s⁻¹ durante las tres primeras semanas de aclimatación y 117.48 mmol m² s⁻¹ al final del proceso, mientras que las hojas de la parte superior de la planta no mostraron ese comportamiento.

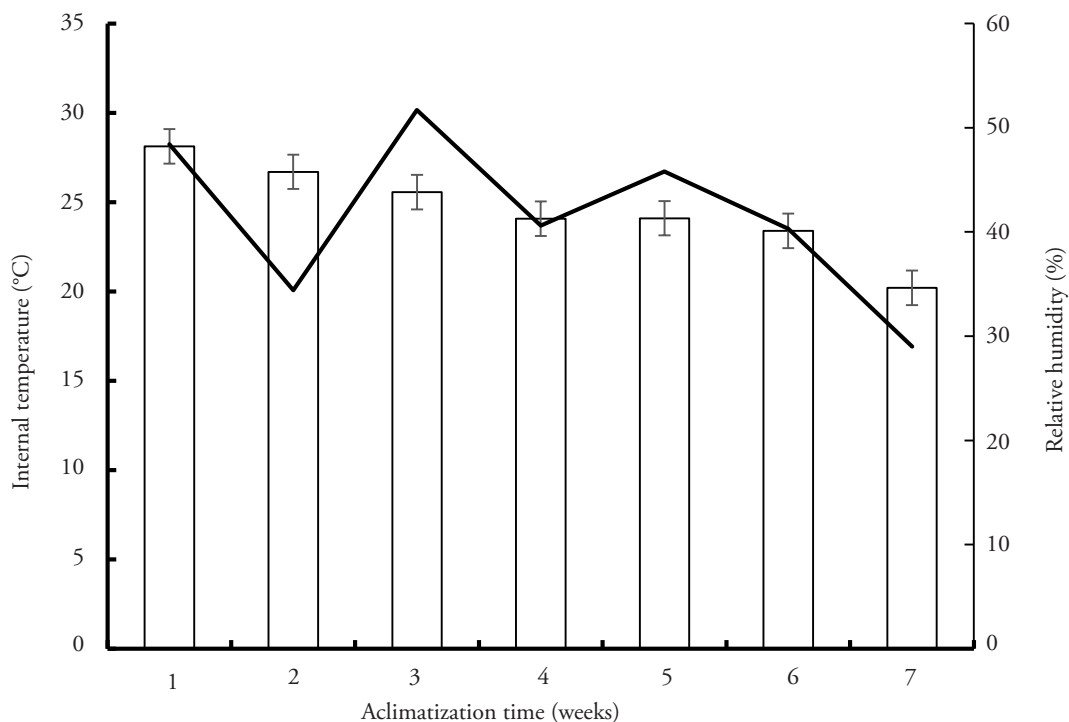


Figure 3. Record of the temperature inside the plastic bag that is covering the plant (□) and the percentage of the temperature and relative humidity of the environment (-).

Figura 3. Registro de la temperatura dentro de la bolsa plástica que cubre la planta (□) y porcentaje de temperatura y humedad relativa del ambiente (-).

three weeks of acclimatization, and $117.48 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$ at the end of the process; while the leaves of the upper part of the plant showed no such behavior.

At the beginning and at the end of the acclimatization stage, conductance recorded was $100 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$, with the highest value ($238.23 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$) in the fourth week (Figure 4). In both types of leaves there was a high interval of standard deviations, with a statistically significant difference in the first two weeks. During acclimatization, seedlings have high transpiration rates due to *in vitro* culture, and their stomata do not regulate opening and closing (Teixeira *et al.*, 2017). In our research, the behavior of the stomatal conductance in lower leaves indicates that there was a gradual regulation in the opening and closing of stomata, in such a way that as air enters with a lower concentration of water vapor, the conductance decreases.

Seon *et al.* (2000) reported a decrease in stomatal conductance during the process of acclimatization of *Rehmannia glutinosa*. The small variation of the stomatal conductivity observed during seven weeks of

Al principio y la final de la etapa de aclimatación, la conductancia registrada fue de $100 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$, con el valor más alto ($238.23 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$) en la cuarta semana (Figura 4). En ambos tipos de hojas hubo un intervalo alto de desviaciones estándar, con una diferencia estadística significativa en las primeras dos semanas. Durante la aclimatación, las plántulas muestran tasas altas de transpiración debido al cultivo *in vitro* y los estomas no regulan su apertura y cierre (Teixeira *et al.*, 2017). En nuestro estudio, el comportamiento de la conductancia estomática en las hojas inferiores indica que hubo una reducción gradual en la apertura y cierre de los estomas; de tal forma que, a medida que entra el aire con una concentración menor de vapor de agua, la conductancia disminuye.

Seon *et al.* (2000) consignaron una reducción en la conductancia estomática durante el proceso de aclimatación de *Rehmannia glutinosa*. La pequeña variación de la conductividad estomática observada durante siete semanas de aclimatación en las hojas superiores puede deberse a la falta de regulación en

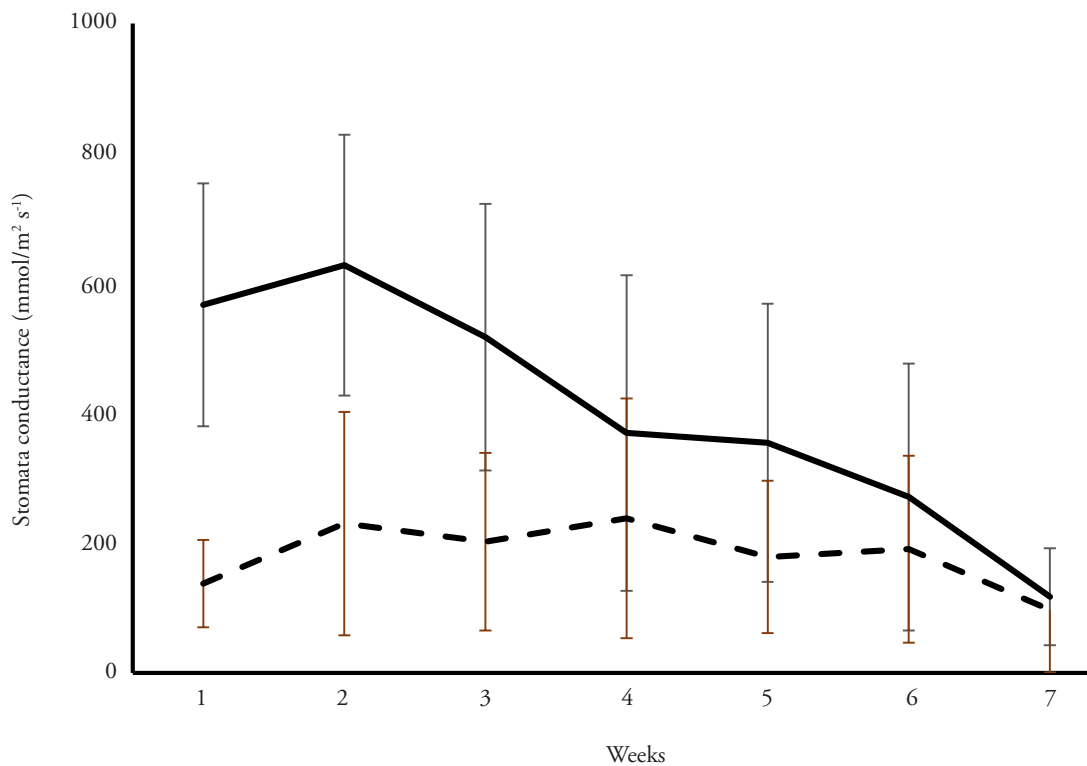


Figure 4. Behavior of the stomata conductance from lower (solid line) and upper leaves (dashed line) when applying Mann-Whitney test ($p=0.017$).

Figura 4. Comportamiento de la conductancia estomática de hojas inferiores (línea continua) y superiores (línea punteada) al aplicar la prueba Mann-Whitney ($p=0.017$).

acclimatization in upper leaves may be due to the lack of regulation in the stomatal opening. The difference in conductance values with those recorded in lower leaves could be due to their lower development, with lower stomatal density or smaller stomatal size, or both. Noé and Bonini (1996) reported the anatomical changes in high bush blueberry leaves (*Vaccinium corymbosum*) cv. 'Bluetta' during the air conditioning process. Therefore, there are changes in the shape of palisade cells from circular to rectangular, double the number of palisade cell layers, and a decrease in the stomatal density.

Identification of *Physalis*

According to the National Herbarium in Mexico (MEXU), *Physalis* was identified as a species that belongs to subgenera *Rydbergis* *Hendrych* from section *Rydbergae* M. Martínez, which has two species: *P. minimaculata* *Waterf* and *P. rydbergii* *Fernald*. Thus, this species was identified as *P. aff rydbergii* *Fernald*, an herbal plant and perennial characterized by its indumentum of simple trichomes that could be glandular or not. Their flowers stand apart from each other, the corolla is yellow and rotated with dark macules (Figure 5A). Receptacle of the fruit is spherical (Figure 5B).

las aperturas estomáticas. La diferencia en valores de conductancia con los registrados en las hojas inferiores puede deberse a su desarrollo menor, con una densidad estomática menor o al tamaño más pequeño de los estomas, o ambos. Noé y Bonini (1996) informaron los cambios anatómicos en hojas de mora azul (*Vaccinium corymbosum*) cv. 'Bluetta' durante el proceso de aclimatación. Por lo tanto, existen cambios en la forma de las células en empalizada de circular a rectangular, se duplica el número de capas de células empalizadas y se reduce la densidad estomática.

Identificación de *Physalis*

De acuerdo con el Herbario Nacional de México (MEXU), *Physalis* se identificó como una especie perteneciente a los subgéneros en *Rydbergis* *Hendrych* de la sección *Rydbergae* M. Martínez, que tiene dos especies: *P. minimaculata* *Waterf* y *P. rydbergii* *Fernald*. Así, esta especie se identificó como *P. aff rydbergii* *Fernald*, una planta herbácea y perenne, caracterizada por su indumento de tricomas simples, que pueden ser glandulares o no. Sus flores sobresalen las unas de las otras, la corola es amarilla y rodeada de máculas oscuras (Figura 5A). El cáliz del fruto es esférico (Figura 5B).



Figura 5. *Physalis aff rydbergii* Fernald A) Flower, B) fruit.
 Figura 5. *Physalis aff rydbergii* Fernald A) Flor, B) Fruto.

CONCLUSIONS

The species of *Physalis* growing in Puebla, Mexico, was identified as *Physalis aff rydbergii* Fernald. *In vitro* propagation was established by the cultivation of nodes and induction of organogenesis in cotyledons. The greatest response in root formation was obtained with indole butyric acid. At the end of acclimatization, the stomatal conductance of lower and upper leaves tended to be the same.

LITERATURE CITED

- Andrade-Rodríguez M., M. C. López-Peralta, V. A. González-Hernández, A. García-Velázquez, and A. Peña-Lomelí. 2005. Effect of genotype on micropropagation of husk tomato. *Rev. Chapingo Ser Hortic.* 11: 31-37.
- Barrientos Ramírez L, M. L. Arvizu, E. Salcedo Pérez, S. Villanueva Rodríguez, J. J. Vargas Radillo, B. Barradas Reyes, y M. Ruiz López. 2019. Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de *Physalis chenopodiifolia* Lam. silvestre y cultivo. *Rev. Mex. Cienc For.* [Internet]. 10: 182-00.
- Chaves, A. D., M. W. Schuchi, and A.C. Erig. 2005. Establecimiento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. *Ciência e Agrotecnol.* 29: 1281-1287.
- Contreras I., y Almeida, P. J. 2003. Micropropagación del tomatillo (*Physalis ixocarpa* L.). *Rev. de Facultad de Farmacia de los Andes* 45: 61-64.
- Lascurain, M., S. Avendaño, S. del Amo, y A. Niembro. 2010. Guía de Frutos Silvestres Comestibles en Veracruz. Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, CONAFOR-CONACYT, México. 144 p.
- López-Sandoval, J. A., E. J. Morales-Rosales, H. Vibrans, E. Uscanga-Mortera, O. Vargas-Ponce, and M. Martínez-Díaz-De-Salas. 2018. Cultivation of wild species of genus *Physalis* and its relationship with synanthropy. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 21: 303-315.
- Maldonado, E., A. L. Pérez-Castorena, C. Garcés, and M. Martínez. 2011. Philadelphicalactones C and D and other cytotoxic compounds from *Physalis philadelphica*. *Steroids.* 76: 724-728.
- Martínez, M., O. Vargas-Ponce, A. Rodríguez, F. Chiang, and S. Ocegueda. 2017. Solanaceae family in Mexico. *Bot Sci.* 95: 131-145.
- Montiel M., O., M.C. Pastelin-Solano, E. Ventura-Zapata, C. Castañeda-Castro, M. T. González-Arno, M. Guevara-Valencia, M. Luna-González, and C. Díaz-Ramos. 2011. Enlargement and rooting of peruvian cherry (*Physalis peruviana* L.) vitroplants. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 13: 537-542.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Noe N., and L. Bonini. 1996. Leaf anatomy of high bush blueberry grow *in vitro* and during acclimatization *ex vitro* conditions. *Biol Plant.* 38: 19-25.

CONCLUSIONES

La especie de *Physalis* que crece en Puebla, México, se identificó como *Physalis aff rydbergii* Fernald. La propagación *in vitro* se estableció con el cultivo de nódulos y la inducción de organogénesis en cotiledones. La mayor respuesta en la formación de raíces se obtuvo con el ácido indol butírico. Al final de la aclimatación, la conductancia estomática de las hojas inferiores y superiores tendió a ser la misma.

—Fin de la versión en Español—

-----*-----

- Otroshy M., A. Mokhtari, S. Mohammad, S. M. M. Khodae, and A. Bazrafshan. 2013. Direct regeneration from leaves and nodes explants of *Physalis peruviana* L. *Intl. J. Farm. All Sci.* 2: 214-218.
- Rodríguez, L., J. 2012. Obtención y propagación *in vitro* de la crasulácea ornamental *Pachyphytum compactum* Rose para su rescate y conservación. Chapingo, México: UACH. 76 p.
- Santiaguillo H., J. F., y S. Blas Y. 2009. Aprovechamiento tradicional de las especies del género *Physalis* en México. *Rev. Geograf. Agríc.* 43: 81-86.
- Sarukhán, J., P. Koleff, J. Carabias, J. Soberón, R. Dirzo, J. Llorente-Bousquets, G. Halffter, R. González, I. March, A. Mohar, S. Anta, J. de la Maza, I. Pisanty, T. Urquiza Hass, S. P. Ruíz G., y G. García M. (comps). 2017. Capital Natural de México. Síntesis: Evaluación del Conocimiento y Tendencias de Cambio, Perspectivas de Sustentabilidad, Capacidades Humanas e Institucionales. CONABIO. Ciudad de México, México. 126 p.
- Seon, J. H., Y. Y. Cui, T. Kozai, and K. Y. Paek. 2000. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival ratio of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 61: 135-142.
- Sheeba, E., S. Palanivel and S. Parvathi. 2015. *In Vitro* flowering and rapid propagation of *Physalis minima* Linn. A medicinal plant. *Int. J. Innov. Res. Sci Eng. Technol.* 4: 18763-18768.
- Teixeira S., J. A., M. M. Hossain, M. Sharma, J. Dobránszki, J. C. Cardoso, and Z. Songiun. 2017. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. *Hortic Plant J.* 3: 110-124.
- Valdivia-Mares, L. E., F. A. Rodríguez-Zaragoza, J. J. Sánchez-González, and O. Vargas-Ponce. 2016. Phenology, agronomic and nutritional potential of three wild husk tomato species (*Physalis*, Solanaceae) from Mexico. *Sci Hortic.* 200: 83-94
- Ventura Z., E., G. Salcedo M., A. N. Hernández L., B. Martínez B., G. Trejo T., A. De Jesús, S., M. Velázquez V., and A. Jiménez A. 2003. *In vitro* regeneration and acclimatization of plants of tumeric (*Curcuma longa* L.) in a hydroponic system. *Biotechnol. Appl.* 20: 25-31.

Xia G., Y. Li, J. Sun, L. Wang, X. Tang, B. Lin, N. Kang, J. Huang, L. Chen, and F. Qiu. 2016. Withanolides from the stems and leaves of *Physalis pubescens* and their cytotoxic activity. *Steroids*. 115: 136-146.