

# *In vitro* propagation of select tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) plant families

## Propagación *in vitro* de familias de plantas selectas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.)

Héctor Luna-Vicente; Aureliano Peña-Lomelí\*; Natanael Magaña-Lira; José Luís Rodríguez-de la O; Juan Martínez-Solís

Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

\*Corresponding author: penalomeli@gmail.com

### Abstract

The objective was to propagate select *Physalis ixocarpa* plants *in vitro*, acclimatize them and describe their phenological cycle. The *in vitro* response of stem apices was evaluated in families from the Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa and Morado San Miguel varieties. The apices were cultured in a medium containing Murashige and Skoog inorganic salts (100 %), supplemented with 0.4 mg·L<sup>-1</sup> thiamine, 60 mg·L<sup>-1</sup> L-cysteine, 100 mg·L<sup>-1</sup> myo-inositol, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> nicotinic acid, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> pantothenic acid, 3 % sucrose and 7 g·L<sup>-1</sup> agar, without growth regulators and the pH adjusted to 5.7 ± 0.1. *In vitro* rooting was done for 30 days, with 16 h of light at 3,000 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. The variables evaluated *in vitro* were seedling height, vigor, callus presence, root length, and number of leaves, roots, stems and buds. Plants produced *in vitro* were acclimatized and transplanted in greenhouses to follow their phenological cycle. The variables evaluated in acclimatization and phenological cycle were plant height and number of leaves, buds, flowers and set fruits. A completely randomized design was used for the *in vitro* evaluation, and randomized complete blocks for the greenhouse. The families with the best morphogenic responses *in vitro* were Tecozautla 04 and Manzano, and in phenological development they presented greater plant height. In acclimatization, survival was 100 % in all clones. *In vitro* responses, acclimatization and phenology depended on the variety and families.

**Keywords:** acclimatization, *in vitro* culture, phenology.

### Resumen

El objetivo fue propagar de manera *in vitro* plantas selectas de *Physalis ixocarpa*, aclimatizarlas y describir su ciclo fenológico. Se evaluó la respuesta *in vitro* de ápices de tallo en familias de las variedades Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa y Morado San Miguel. Los ápices se cultivaron en un medio con las sales inorgánicas Murashige y Skoog (100 %), suplementado con 0.4 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 60 mg·L<sup>-1</sup> de L-cisteína, 100 mg·L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de ácido pantoténico, 3 % de sacarosa y 7 g·L<sup>-1</sup> de agar, sin reguladores del crecimiento y el pH ajustado a 5.7 ± 0.1. El enraizamiento *in vitro* se hizo durante 30 días, con 16 h de luz a 3,000 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. Las variables evaluadas *in vitro* fueron altura de plántula, vigor, callo, longitud de raíz, número de hojas, raíces, tallos y botones. Las plantas producidas *in vitro* se aclimatizaron y trasplantaron en invernadero para dar seguimiento a su ciclo fenológico. Las variables evaluadas en aclimatación y ciclo fenológico fueron altura de planta, número de hojas, botones, flores y bolsas. Se usó un diseño completamente al azar para la evaluación *in vitro*, y bloques completos al azar para invernadero. Las familias con mejores respuestas morfogénicas *in vitro* fueron Tecozautla 04 y Manzano, y en el desarrollo fenológico presentaron mayor altura de planta. En la aclimatación, la sobrevivencia fue de 100 % en todos los clones. Las respuestas *in vitro*, la aclimatación y la fenología dependieron de la variedad y de las familias.

**Palabras clave:** aclimatización, cultivo *in vitro*, fenología.



## Introduction

Tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) is the seventh most cultivated vegetable in Mexico, accounting for 4.8 % of national vegetable production. The main producing states, in order of importance, are Sinaloa, Zacatecas, Jalisco, Puebla and Michoacán, with a share of 55 % (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2021). According to the National Seed Inspection and Certification Service (SNICS, 2021), there are 16 registered and improved by selection varieties. However, given the drastic environmental conditions and the demand in the national and international market for this vegetable, varieties with better agronomic characteristics and resistance to phytopathogens are required.

The most suitable genotypic methods for the generation of improved varieties are stratified visual mass selection (SVMS), half-sib family selection (HSFS) and combined half-sib selection (CHSS) (Peña-Lomelí & Márquez, 1990). This is due to the fact that plants show gametophytic self-incompatibility (Kant-Pandey, 1957), which prevents the formation of inbred lines for hybrid formation.

One strategy to generate hybrids in tomatillo is to cross populations with a certain degree of inbreeding, generated through fraternal or plant-to-plant crosses in high-yielding elite families, until a hybrid combination between superior-yielding parents is found. However, commercial production of hybrid seed requires propagation and maintenance of the genotype of the parents throughout generations (Santiaguillo-Hernández, Cervantes-Santana, & Peña-Lomelí, 2004). This may be possible through vegetative propagation by *in vitro* culture (van Groenendael & de Kroon, 1990; Manzo-González et al., 1998).

One of the purposes of *in vitro* culture in breeding programs is the clonal propagation of parental lines for hybrid seed production (Dore, 1987). One method of propagation in *in vitro* culture is through enhanced axillary branching, using stem tips and side shoots as explants. The advantage of this type of micropropagation is that very little callus is formed, and the degree of abnormality and genetic variability is reduced, which guarantees the genetic stability of propagated plants (George & Debergh, 2008).

Regarding *in vitro* culture of *Physalis ixocarpa*, different sources have been used as explants. Ramírez-Malagón and Ochoa-Alejo (1991) evaluated the morphogenic response of hypocotyl explants grown in Murashige and Skoog (1962) medium (MS), in combination with benzyladenine (BA), naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Shoot and root induction was performed with a combination of

## Introducción

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) es la séptima hortaliza que más se cultiva en México, y ocupa el 4.8 % respecto de la producción nacional de hortalizas. Los principales estados productores, en orden de importancia, son Sinaloa, Zacatecas, Jalisco, Puebla y Michoacán, con una participación del 55 % (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2021). De acuerdo con el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS, 2021), se dispone de 16 variedades registradas y mejoradas por selección. No obstante, dadas las condiciones ambientales drásticas y la demanda en el mercado nacional e internacional de dicha hortaliza, se requieren variedades con mejores características agronómicas y resistentes a fitopatógenos.

Los métodos genotécnicos más adecuados para la generación de variedades mejoradas son la selección masal visual estratificada (SMVE), la selección familiar de medios hermanos (SFMH) y la selección combinada de medios hermanos (SCMH) (Peña-Lomelí & Márquez, 1990). Lo anterior debido a que las plantas presentan autoincompatibilidad de tipo gametofítica (Kant-Pandey, 1957), la cual impide la generación de líneas endogámicas para la formación de híbridos.

Una estrategia para generar híbridos en tomate de cáscara es cruzar poblaciones con cierto grado de endogamia, generada mediante cruces fraternales o planta a planta en familias elite de alto rendimiento, hasta encontrar una combinación híbrida entre progenitores de rendimiento superior. Sin embargo, la producción comercial de semilla híbrida requiere la propagación y mantenimiento del genotipo de los progenitores a lo largo de las generaciones (Santiaguillo-Hernández, Cervantes-Santana, & Peña-Lomelí, 2004). Esto puede ser posible a través de la reproducción vegetativa por cultivo *in vitro* (van Groenendael & de Kroon, 1990; Manzo-González et al., 1998).

Uno de los propósitos del cultivo *in vitro* en los programas de mejoramiento genético es la propagación clonal de las líneas parentales para la producción de semilla híbrida (Dore, 1987). Un método de propagación en cultivo *in vitro* es a través de ramificación axilar mejorada, usando puntas de tallos y brotes laterales como explantes. La ventaja de este tipo de micropropagación es que se forma muy poco callo, y el grado de anormalidad y variabilidad genética se reduce, lo cual garantiza la estabilidad genética de las plantas propagadas (George & Debergh, 2008).

Respecto al cultivo *in vitro* de *Physalis ixocarpa*, se han empleado diferentes fuentes como explantes. Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo (1991) evaluaron la respuesta morfogénica de explantes de hipocótilos

cytokinins and auxins. Manzo-González et al. (1998) used as explants stem, leaf, petiole and axillary bud segments of the Rendidora, Salamanca and Tamazula varieties, and used MS culture medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), naphthaleneacetic acid (NAA), benzyladenine (BA) and indolacetic acid (IAA).

Andrade-Rodríguez, López-Peralta, González-Hernández, García-Velázquez, and Peña-Lomelí (2005) studied the *in vitro* induction and elongation capacity, *in vivo* rooting, acclimatization and chromosomal stability of plants from 10 *Physalis ixocarpa* Brot. varieties, including two wild ones. In addition, *in vitro* regenerated plants were brought to the acclimatization stage in a greenhouse using sterile substrate composed of black soil and leaves (1:3 ratio) in pots covered with 1 L transparent plastic cups.

It is essential to evaluate the different tomatillo varieties to know their regeneration response in *in vitro* culture, as well as to adapt the culture medium to the genotypes of agronomic interest for a breeding program; this is because *in vitro* regeneration is mainly determined by the genotype of the plants. This influence has been observed in the response to organogenesis of four cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. (Kallak, Reidla, Hilpus, & Virumäe, 1997) and in embryogenesis induction in microspore culture of 50 different genotypes of *Capsicum annuum* L., using growth regulators and activated charcoal (Cheng, Ma, Jiao, Quiao, & Li, 2013).

The acclimation stage is the most critical for plants obtained *in vitro*, as it determines the success of total plant survival to transplanting under greenhouse or field conditions. The stomata of *in vitro*-grown plants are unable to close when first removed from *in vitro* culture, resulting in excessive evapotranspiration after transplantation under *ex vitro* conditions (Drew, Kavanagh, & Maynard, 1992). This causes plants in *ex vitro* conditions to wilt and possibly even die from water loss. To avoid this, a suitable transitional environment applied to acclimatization is provided over a period of one to several weeks (Grout & Millam, 1985). In this transitional environment, the relative humidity should be maintained in a range of 70 to 100 % by means of a misting system (Teixeira-da Silva et al., 2017).

Based on the above, the present work was carried out with the objective of evaluating the response of select families from three tomatillo varieties to *in vitro* culture, as well as establishing and evaluating the protocol for acclimatization of plants from *in vitro* culture, and studying the phenology of the plants obtained by this means.

cultivados en el medio Murashige y Skoog (1962) (MS), en combinación con benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). La inducción de brotes y raíces se realizó con una combinación de citoquininas y auxinas. Manzo-González et al. (1998) utilizaron como explantes segmentos de tallo, hoja, peciolo y yemas axilares de las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula, y emplearon el medio de cultivo MS suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), benziladenina (BA) y ácido indolacético (AIA).

Andrade-Rodríguez, López-Peralta, González-Hernández, García-Velázquez, y Peña-Lomelí (2005) estudiaron la capacidad de inducción y alargamiento *in vitro*, enraizamiento *in vivo*, aclimatación y estabilidad cromosómica de plantas de 10 variedades de *Physalis ixocarpa* Brot., entre ellas dos variedades silvestres. Además, las plantas regeneradas *in vitro* se llevaron a la fase de aclimatación en un invernadero mediante el uso de sustrato estéril compuesto por tierra negra y hojas (proporción 1:3) en macetas cubiertas con vasos de plástico transparentes de 1 L.

Es fundamental evaluar las diferentes variedades de tomate de cáscara para conocer su respuesta de regeneración en cultivo *in vitro*, así como adecuar el medio de cultivo a los genotipos de interés agronómico para un programa de mejoramiento genético; esto debido a que la regeneración *in vitro* está determinada, principalmente, por el genotipo de las plantas. Dicha influencia se ha observado en la respuesta a la organogénesis de cuatro cultivares de *Dianthus caryophyllus* L. (Kallak, Reidla, Hilpus, & Virumäe, 1997) y en la inducción de embriogénesis en el cultivo de microsporas de 50 genotipos diferentes de *Capsicum annuum* L., usando reguladores del crecimiento y carbón activado (Cheng, Ma, Jiao, Quiao, & Li, 2013).

La etapa de aclimatación es la más crítica para las plantas obtenidas *in vitro*, ya que determina el éxito de la sobrevivencia total de las plantas al trasplante bajo condiciones de invernadero o campo. Los estomas de las plantas cultivadas *in vitro* son incapaces de cerrar cuando se han retirado por primera vez del cultivo *in vitro*, lo cual provoca una excesiva evapotranspiración después del trasplante en condiciones *ex vitro* (Drew, Kavanagh, & Maynard, 1992). Esto produce que las plantas en condiciones *ex vitro* se marchiten y puedan llegar a morir por pérdida de agua. Para evitar esto, se provee un ambiente de transición adecuado aplicado a la aclimatación en un tiempo de una a varias semanas (Grout & Millam, 1985). En este ambiente de transición, la humedad relativa se debe mantener en un rango de 70 a 100 % mediante un sistema de nebulización (Teixeira-da Silva et al., 2017).

## Materials and methods

The work consisted of two stages, and was carried out in the Tissue Culture Laboratory of the Plant Science Department and in the greenhouses of the Experimental Agricultural Field of the *Universidad Autónoma Chapingo*. In the first stage, axillary buds and apices were obtained from select plants cloned in advance and acclimatized in a greenhouse, which were established under aseptic conditions for micropropagation and evaluation in the Tissue Culture Laboratory. In the second stage, the clones obtained were transferred to a greenhouse for acclimatization in a plastic tunnel with constant relative humidity, after which they were transplanted in the greenhouse into pots with tezontle irrigated with Steiner's (1984) nutrient solution at 100 %.

Botanical seeds were established from 12 maternal half-sib families (MHFS) derived from three generations of fraternal crosses of the Diamante, Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa and Morado San Miguel varieties, three families for each variety. The families were provided by the Tomatillo Breeding Program of the *Universidad Autónoma Chapingo*. The 12 original families were obtained through a mass selection cycle and a family selection one (Peña-Lomelí & Márquez, 1990). The 12 select families were sown in spring 2017 in 200-cavity polystyrene trays with peat moss as substrate. After five weeks, they were transplanted into 54 pots per family with two plants per pot, which were kept in a greenhouse. Twenty days after transplanting, a selection was made based on the best individual per pot. Data on number of flowers, number of fruits, vigor and health were collected from all plants, which were only used as criteria to select the 10 best individuals per family.

From the best individuals of each of the 12 MHFS established by seed, axillary buds and stem apices were taken for disinfection, micropropagation in the Tissue Culture Laboratory, and subsequent acclimatization and transplanting in the greenhouse. From these cloned plants, axillary buds and apices of healthy plants of the Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa and Morado San Miguel varieties were collected in December 2017. Of the original clones, due to unfavorable responses in *in vitro* culture, only clones of the varieties Tecozautla (one from family 2 and one from family 3), Morado San Miguel (two different clones from family 2, two different clones from family 3 and one clone from family 1) and Manzano Tepetlixpa (one clone from family 2) were obtained. That is, eight clonal families were studied, which was due to the fact that not all of the original families had a favorable response to *in vitro* culture.

Con base en lo antes expuesto, el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta de familias selectas de tres variedades de tomate de cáscara al cultivo *in vitro*, así como establecer y evaluar el protocolo para aclimatación de plantas provenientes del cultivo *in vitro*, y estudiar la fenología de las plantas obtenidas por dicho medio.

## Materiales y métodos

El trabajo consistió de dos etapas, y se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia y en los invernaderos del Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo. En la primera se llevó a cabo la obtención de yemas axilares y ápices de plantas selectas clonadas con antelación y aclimatadas en el invernadero, las cuales se establecieron bajo condiciones asépticas para su micropropagación y evaluación en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos. En la segunda etapa, los clones obtenidos se trasladaron a un invernadero para su aclimatación en un túnel de plástico con humedad relativa constante, después de lo cual se trasplantaron en el invernadero a macetas con tezontle regadas con la solución nutritiva de Steiner (1984) al 100 %.

Se establecieron semillas botánicas de 12 familias de medios hermanos maternos (FMHM) derivadas de tres generaciones de cruces fraternales de las variedades Diamante, Tecozautla 04, Manzano Tepetlixpa y Morado San Miguel, tres familias por cada variedad. Las familias fueron proporcionadas por el Programa de Mejoramiento Genético de Tomate de Cáscara de la Universidad Autónoma Chapingo. Las 12 familias originales se obtuvieron mediante un ciclo de selección masal y uno de selección familiar (Peña-Lomelí & Márquez, 1990). Las 12 familias selectas se sembraron en primavera de 2017 en charolas de poliestireno de 200 cavidades con turba como sustrato. Después de cinco semanas, se trasplantaron a 54 macetas por familia con dos plantas por maceta, las cuales se mantuvieron en un invernadero. Veinte días después del trasplante, se llevó a cabo una selección con base en el mejor individuo por maceta. Se tomaron datos de número de flores, número de frutos, vigor y sanidad de todas las plantas, los cuales únicamente se usaron como criterio para seleccionar los 10 mejores individuos por familia.

De los mejores individuos de cada una de las 12 FMHM establecidas por semilla, se tomaron yemas axilares y ápices de los tallos para su desinfección, su micropropagación en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, y posterior aclimatación y trasplante en el invernadero. De estas plantas clonadas, en diciembre de 2017 se colectaron yemas axilares y ápices de plantas sanas de las variedades Tecozautla



The bud disinfection treatment consisted of washing vigorously with detergent and Tween 20, carefully separating apices and buds. The explants were then immersed in a solution of alcohol diluted in 70 % water for 3 min, then transferred to a solution of sodium hypochlorite (Cloralex®) diluted in 7 % water for 15 min, then rinsed three times in sterile water and, finally, *in vitro* seeding was performed.

For multiplication of apices and buds, culture medium with 100 % Murashige and Skoog (1962) inorganic salts was used, supplemented with 0.4 mg·L<sup>-1</sup> thiamine, 60 mg·L<sup>-1</sup> L-cysteine, 100 mg·L<sup>-1</sup> myo-inositol, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> nicotinic acid, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> pantothenic acid, 3 % sucrose and 7 g·L<sup>-1</sup> agar. The culture medium was adjusted to a pH of 5.7 ± 0.1 and poured into clear glass canning jars with a 460 mL volume (78.3 mm in diameter and 134.95 mm in height) and a twist-off screw cap. Fifty mL of culture medium were added to each jar. The jars, scalpels, scissors, crystals and water were sterilized in an autoclave for 20 min at 121 °C and 1.5 kg·cm<sup>-2</sup> pressure. Subsequently, with the explants disinfected and the materials sterilized, the explants were seeded in a laminar flow hood. Once the buds and apices were seeded in the jars, they were transferred to the laboratory culture area for 30 days, with 16 h of light and 3,000 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> illumination.

For acclimatization, peat moss was used as substrate, which was sterilized and deposited in 240 mL Styrofoam cups. At this stage, the seedlings were removed from the *in vitro* culture vessels and rinsed with water; data were then collected and the seedlings were transplanted into the cups. Afterwards, the cups were placed in a mini-greenhouse with a misting system comprising eight irrigations per day, with a 1 h interval between irrigations of 5 min. With this misting system, a relative humidity of 60 to 100 % and an average temperature of 25 °C were maintained. The entire acclimatization system remained active for 15 days.

Once the seedlings were acclimatized, they were transplanted in the greenhouse in 18 L black polyethylene pots, with tezontle as substrate. The pots were drip irrigated with 100 % Steiner solution (Steiner, 1984). Data were collected every two weeks.

To assess the response to micropropagation through rooting in the laboratory, a completely randomized experimental design was used. The experimental unit consisted of three plants per vessel, with four replications per family. Data were recorded for *in vitro* plant height (cm), stem vigor (ordinal scale 1, 2, 3), callus presence (binomial proportion), health (binomial proportion), root length (cm), and number of leaves, roots, stems and buds.

04, Manzano Tepetlixpa y Morado San Miguel. De los clones originales, debido a respuestas desfavorables en el cultivo *in vitro*, sólo se obtuvieron clones de las variedades Tecozautla (uno de la familia 2 y otro de la familia 3), Morado San Miguel (dos clones diferentes de la familia 2, dos clones diferentes de la familia 3 y un clon de la familia 1) y Manzano Tepetlixpa (un clon de la familia 2). Es decir, se estudiaron ocho familias clonales, lo cual se debió a que no todas las familias originales tuvieron una respuesta favorable al cultivo *in vitro*.

El tratamiento de desinfección de yemas consistió en lavar vigorosamente con detergente y Tween 20, separando cuidadosamente ápices y yemas. En seguida, los explantes se sumergieron en una solución de alcohol diluido en agua al 70 % durante 3 min, luego se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) diluido en agua al 7 % durante 15 min, después se enjuagaron tres veces en agua estéril y, finalmente, se realizó la siembra *in vitro*.

Para la multiplicación de los ápices y las yemas, se utilizó el medio de cultivo con las sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962) al 100 %, suplementado con 0.4 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 60 mg·L<sup>-1</sup> L-cisteína, 100 mg·L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de ácido pantoténico, 3 % de sacarosa y 7 g·L<sup>-1</sup> de agar. El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 y se vertió en tarros de conserva de vidrio claro con volumen de 460 mL (78.3 mm de diámetro y 134.95 mm altura) y tapa con rosca *twist-off*. A cada tarro se le agregaron 50 mL de medio de cultivo. Los tarros, bisturís, tijeras, cristales y el agua se esterilizaron en una autoclave durante 20 min a 121 °C y presión de 1.5 kg·cm<sup>-2</sup>. Posteriormente, con los explantes desinfectados y los materiales esterilizados, se sembraron los explantes en una campana de flujo laminar. Una vez sembrados las yemas y los ápices en los tarros, se trasladaron al área de cultivo del laboratorio durante 30 días, con 16 h de luz e iluminación de 3,000 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

Para la aclimatación, se utilizó como sustrato turba, la cual se esterilizó y se depositó en vasos de unicel de 240 mL. En esta etapa, se extrajeron las plántulas de los frascos de cultivo *in vitro*, se enjuagaron con agua, se tomaron datos y se trasplantaron a los vasos. Después, los vasos se colocaron en un mini invernadero con un sistema de nebulización de ocho riegos por día, con 1 h de intervalo entre los riegos de 5 min. Con este sistema de nebulización se mantuvo una humedad relativa de 60 a 100 %, y temperatura media de 25 °C. Todo el sistema de aclimatación se mantuvo activo durante 15 días.

Una vez que las plántulas estaban aclimatadas, se trasplantaron al invernadero en macetas de polietileno negro de 18 L, con tezontle como sustrato. Las macetas

To evaluate acclimatization, a randomized complete block design with four replications was established, where the experimental unit consisted of seven plants. Data on plant height (cm) and number of leaves, buds and flowers were recorded, and the percentage of acclimatization was determined. To study the phenology of the clones transplanted in the greenhouse, a randomized complete block design with four replications was used. The experimental unit was seven plants, and the data recorded were plant height and number of leaves, flowers and set fruits.

With the data obtained, analysis of variance and Tukey's mean comparison tests ( $P \leq 0.05$ ) were performed for the variables in the three stages, except for seedling vigor (where the Kruskal-Wallis test was used), and for callus presence and health (where the comparison of binomial proportions was made;  $P \leq 0.05$ ).

## Results and discussion

The *in vitro* plant height of the eight clonal families showed a slight difference among them, with the greatest heights in families 2 from Tecozautla 04 and Manzano Tepetlixpa, and family 3a from Morado San Miguel. The lowest values were from family 1 of Morado San Miguel and family 3 of Tecozautla 04 (Table 1). Plants from family 2b of the Morado San Miguel variety presented greater height, as did plants from clonal family 2 of the Tecozautla 04 variety (Figures 1a and 1b).

For number of leaves, family 2 from the Tecozautla 04 variety had the greatest quantity in relation to the other families, among which there were no significant differences in this variable (Table 1). On the other hand, the longest root length was obtained by family 2a from Morado San Miguel, and the lowest value was obtained by family 1 from the same variety (Table 1). Family 3a, of the same variety, presented the greatest root development, and in the other families, the number of roots was not significantly different (Table 1). The root system of the plants developed to a greater or lesser extent depending on the family and variety. Plants from clonal family 3 of the Tecozautla 04 variety showed vigorous root development (Figure 1c).

The highest number of stems developed per explant corresponded to family 1 from Morado San Miguel; however, there was no significant difference in relation to families 2a and 3b of the same variety, and to both families from Tecozautla 04. Families 3a and 2b from Morado San Miguel, and family 2 from Manzano Tepetlixpa, presented the lowest number of stems (Table 1).

se regaron por goteo con solución Steiner al 100 % (Steiner, 1984). Los datos se tomaron cada dos semanas.

Para evaluar la respuesta a la micropropagación a través del enraizamiento en el laboratorio, se usó un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental se conformó de tres plantas por frasco, con cuatro repeticiones por familia. Se registraron datos de altura de planta *in vitro* (cm), vigor de tallo (escala ordinal 1, 2, 3), presencia de callo (proporción binomial), sanidad (proporción binomial), longitud de raíz (cm), número de hojas, raíces, tallos y botones.

Para evaluar la aclimatación, se estableció un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, donde la unidad experimental consistió de siete plantas. Se registraron los datos de altura de planta (cm), número de hojas, botones y flores, y se determinó el porcentaje de aclimatización. Para estudiar la fenología de los clones trasplantados en el invernadero, se empleó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental fueron siete plantas, y los datos registrados fueron altura de planta, número hojas, flores y bolsas.

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para las variables en las tres etapas, excepto para vigor de plántula (donde utilizó la prueba de Kruskal-Wallis), y para la presencia de callo y sanidad (donde se realizó la comparación de proporciones binomiales;  $P \leq 0.05$ ).

## Resultados y discusión

La altura de planta *in vitro* de las ocho familias clonales mostró una ligera diferencia entre sí, con las mayores alturas en las familias 2 de Tecozautla 04 y Manzano Tepetlixpa, y la familia 3a de Morado San Miguel. Los valores menores fueron de la familia 1 de Morado San Miguel y la familia 3 de Tecozautla 04 (Cuadro 1). Las plantas de la familia 2b de la variedad Morado San Miguel presentaron mayor altura, al igual que las plantas de la familia clonal 2 de la variedad Tecozautla 04 (Figuras 1a y 1b).

Para el número de hojas, la familia 2 de la variedad Tecozautla 04 presentó la mayor cantidad en relación con las demás familias, entre las cuales no hubo diferencias significativas en dicha variable (Cuadro 1). Por otro lado, la mayor longitud de raíz la obtuvo la familia 2a de Morado San Miguel, y el menor valor fue de la familia 1 de la misma variedad (Cuadro 1). La familia 3a, de la misma variedad, presentó el mayor desarrollo radical, y en las demás familias, el número de raíces no fue significativamente diferente (Cuadro 1). El sistema radicular de las plantas se desarrolló en mayor o menor medida dependiendo de la familia y la variedad. Las

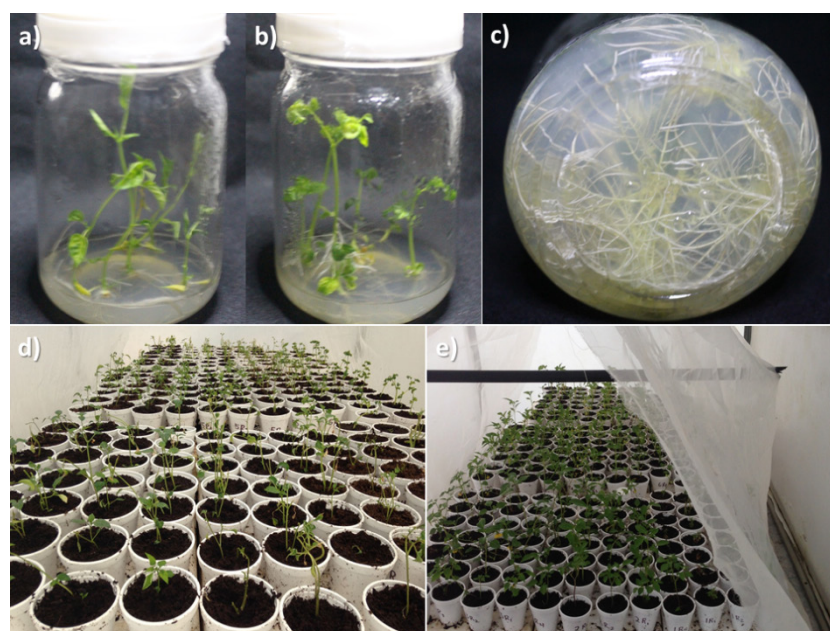
**Table 1. Comparison of means of plant height, root length and number of leaves, roots, stems, and buds of plants of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) plants *in vitro*.**

**Cuadro 1. Comparación de medias de altura de planta, longitud de raíz, número de hojas, raíces, tallos y botones de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) *in vitro*.**

Variety/ Variedad	Family/ Familia	PH/ALT	NL/NH	RL/LR	NR	NS/NT	NB
Morado San Miguel	1	4.16 b <sup>z</sup>	7.3 b	1.86 c	9.6 b	1.6 a	1.4 ab
Morado San Miguel	2 a	8.26 ab	5.5 b	15.76 a	29.9 b	1.1 ab	0.4 c
Morado San Miguel	2 b	8.26 ab	7.3 b	7.27 bc	26.0 b	1.0 b	0.3 c
Morado San Miguel	3a	9.04 a	5.4 b	11.66 ab	65.5 a	0.9 b	0.9 bc
Morado San Miguel	3 b	6.53 ab	8.8 b	5.51 bc	34.7 b	1.4 ab	0.4 c
Manzano Tepetlixpa	2	9.79 a	8.3 b	6.58 bc	14.5 b	1.0 b	0.0 c
Tecozautla 04	2	10.5 a	14.7 a	10.63 ab	22.1 b	1.1 ab	0.0 c
Tecozautla 04	3	4.45 b	5.3 b	8.53 bc	20.5 b	1.2 ab	2.1 a
LSD/DMSH		4.38	4.9	6.88	27.6	0.6	1.0

PH = plant height (cm); NH = number of leaves; RL = root length (cm); NR = number of roots; NT = number of stems; NB = number of buds. LSD = least significant difference. <sup>z</sup>Means with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

ALT = altura de planta (cm); NH = número de hojas; LR = longitud de raíz (cm); NR = número de raíces; NT = número de tallos; NB = número de botones. DMSH = diferencia mínima significativa honesta. <sup>z</sup>Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).



**Figure 1. Plants of the clonal families grown *in vitro*. a) Plant from family 2b of Morado San Miguel, b) plant from family 3 of Tecozautla 04, c) root system of family 3 of Tecozautla 04, d) plants grown *in vitro* at the beginning of acclimatization and e) plants grown *in vitro* after 15 days of acclimatization.**

**Figura 1. Plantas de las familias clonales cultivadas *in vitro*. a) Planta de la familia 2b de Morado San Miguel, b) planta de la familia 3 de Tecozautla 04, c) sistema radicular de la familia 3 de Tecozautla 04, d) plantas de cultivo *in vitro* al inicio de la aclimatación y e) plantas de cultivo *in vitro* después de 15 días de aclimatización.**

Family 3 from the Tecozautla 04 variety had the highest number of buds, but without significant difference in relation to family 1 from Morado San Miguel. The other families presented a lower number of buds, with no significant differences among them (Table 1).

The plants that developed the greatest stem vigor corresponded to family 2 from Tecozautla, with no significant difference with family 2 from Manzano Tepetlixpa. Families 1 from the Morado San Miguel variety and 3 from Tecozautla 04 developed the least stem vigor (Table 2).

Explants from families 3a and 3b of Morado San Miguel variety, and 2 of Manzano Tepetlixpa, developed more callus, while families 2 of Tecozautla 04 and 2a of Morado San Miguel showed less callus. Regarding health, plants from families 1, 2a and 2b of Morado San Miguel presented more disease problems. Families 2 of Manzano Tepetlixpa, 2 of Tecozautla 04, and 3b and 3a of Morado San Miguel had no health problems (Table 2).

The response to the number of roots increased successfully *in vitro* with the 100 % MS medium without the addition of growth regulators, and varied depending on the genotype. This coincides with what was reported by Manzo-González et al. (1998), who were able to induce root formation with 100 % MS medium and without growth regulators in

plantas de la familia clonal 3 de la variedad Tecozautla 04 presentaron un desarrollo vigoroso de raíces (Figura 1c).

El mayor número de tallos desarrollados por explante correspondió a la familia 1 de Morado San Miguel; sin embargo, no hubo diferencia significativa en relación con las familias 2a y 3b de la misma variedad, y con ambas familias de Tecozautla 04. Las familias 3a y 2b de Morado San Miguel, y la familia 2 de Manzano Tepetlixpa, presentaron el menor número de tallos (Cuadro 1).

La familia 3 de la variedad Tecozautla 04 presentó el mayor número de botones, pero sin diferencia significativa en relación con la familia 1 de Morado San Miguel. Las demás familias presentaron menor número de botones, sin mostrar diferencias significativas entre sí (Cuadro 1).

Las plantas que desarrollaron el mayor vigor del tallo correspondieron a la familia 2 de Tecozautla, sin mostrar diferencia significativa con la familia 2 de Manzano Tepetlixpa. Las familias 1 de la variedad Morado San Miguel y 3 de Tecozautla 04 desarrollaron el menor vigor en sus tallos (Cuadro 2).

Los explantes de las familias 3a y 3b de la variedad Morado San Miguel, y la 2 de Manzano Tepetlixpa, desarrollaron más callos, mientras que las familias 2 de Tecozautla 04 y la 2a de Morado San Miguel presentaron menor

**Table 2. Kruskal-Wallis test for stem vigor and comparison of binomial proportions for callus presence and health in tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) plants regenerated *in vitro*.**

**Cuadro 2. Prueba de Kruskal-Wallis para vigor de tallo y comparación de proporciones binomiales para presencia de callo y sanidad en plantas de tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) regeneradas *in vitro*.**

Variety/Variiedad	Family/Familia	R(x)	Callus/Callo	Health/Sanidad
Morado San Miguel	1	23.08 e <sup>y</sup>	0.667 ab <sup>z</sup>	0.417 ab
Morado San Miguel	2 a	49.21 c	0.167 cd	0.583 a
Morado San Miguel	2b	47.00 cd	0.333 bc	0.250 abc
Morado San Miguel	3 a	53.23 bc	0.909 a	0.182 bcd
Morado San Miguel	3 b	41.67 cd	0.833 a	0.083 cd
Manzano Tepetlixpa	2	66.96 ab	0.750 a	0.000 d
Tecozautla 04	2	71.83 a	0.000 d	0.000 d
Tecozautla 04	3	31.46 de	0.333 bc	0.167 bcd
Tc		34.43 **		

Tc = Kruskal-Wallis test statistic; R(x) = average rank for stem vigor; Callus = binomial proportion of callus presence; Health = binomial proportion of healthy plants. <sup>y</sup>Ranks with the same letter are not different (Kruskal-Wallis,  $P \leq 0.05$ ). <sup>z</sup>Proportions with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). \*\*Significant with  $P \leq 0.01$ .

Tc = estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis; R(x) = rango promedio para vigor de tallo; Callo = proporción binomial de la presencia de callo; Sanidad = proporción binomial de plantas sanas. <sup>y</sup>Rangos con la misma letra no son diferentes (Kruskal-Wallis,  $P \leq 0.05$ ). <sup>z</sup>Proporciones con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). \*\*Significativo con  $P \leq 0.01$ .



the Rendidora, Salamanca and Tamazula varieties of tomatillo, where they obtained different numbers of roots among varieties. Andrade-Rodríguez et al. (2005), when rooting *in vivo* 10 varieties of tomatillo from *in vitro* culture in 100 % MS without the addition of growth regulators, obtained different numbers and lengths of roots according to the genotype used.

The differentiated responses to *in vitro* culture obtained among the clonal families of the three varieties were a function of the particular genotype of each one. This was demonstrated by Andrade-Rodríguez et al. (2005), who observed that the *in vitro* propagation capacity of tomatillo varied according to the genotype of the variety used. Muktadir, Habib, Mian, and Akhond (2016) also found different responses in *in vitro* culture of five varieties of *Solanum melongena* L. with respect to the number of shoots regenerated per explant and their rooting.

At the beginning of acclimatization, family 1 from Morado San Miguel presented the lowest height compared to the other families, among which there were no significant differences (Table 3). After two weeks under acclimatization, families 1 and 3b from the Morado San Miguel variety and 2 from Tecozautla 04 showed the lowest height (Figure 2a). In general, the clonal families with the greatest height at the beginning of acclimatization maintained it during the entire period evaluated.

cantidad de callos. En cuanto a la sanidad, las plantas de las familias 1, 2a y 2b de Morado San Miguel presentaron más problemas de enfermedad. Las familias 2 de Manzano Tepetlixpa, la 2 de Tecozautla 04, y la 3b y 3a de Morado San Miguel no presentaron problemas de sanidad (Cuadro 2).

La respuesta al número de raíces incrementó de manera exitosa *in vitro* con el medio MS al 100 % sin adición de reguladores del crecimiento, y varió en función del genotipo. Esto coincide con lo reportado por Manzo-González et al. (1998), quienes lograron inducir la formación de raíces con el medio MS al 100 % y sin reguladores del crecimiento en las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula de tomate de cáscara, donde obtuvieron diferente número de raíces entre las variedades. Andrade-Rodríguez et al. (2005), al enraizar *in vivo* 10 variedades de tomate de cáscara provenientes de cultivo *in vitro* en MS al 100 % sin adición de reguladores del crecimiento, obtuvieron número y longitud de raíces diferentes de acuerdo con el genotipo empleado.

Las respuestas diferenciadas al cultivo *in vitro* obtenidas entre las familias clonales de las tres variedades estuvo en función del genotipo particular de cada una. Esto fue demostrado por Andrade-Rodríguez et al. (2005), quienes observaron que la capacidad de propagación *in vitro* del tomate de cáscara varió en función del genotipo de la variedad utilizada. Muktadir, Habib, Mian, y

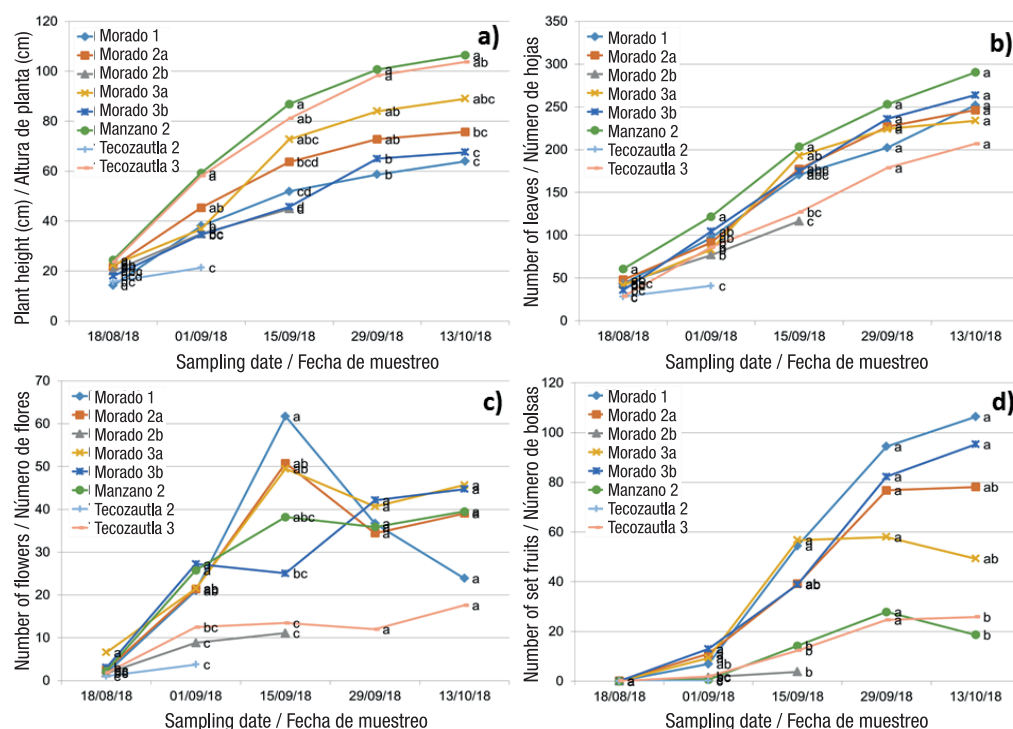
**Table 3. Comparison of means of plant height and number of leaves, flowers, buds and stems taken from tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) plants regenerated *in vitro* for acclimatization.**

**Cuadro 3. Comparación de medias de la altura de planta, número de hojas, flores, botones y tallos tomados de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) regeneradas *in vitro* para aclimatación.**

Variety/ Variedad	Family/ Familia	PH/ALT	NL/NH	NF	NB	NS/NT
Morado San Miguel	1	4.42 b <sup>z</sup>	11.6 de	0.0 b	1.3 cd	1.6 a
Morado San Miguel	2 a	12.95 a	13.6 cde	0.3 a	2.3 bc	1.2 ab
Morado San Miguel	2 b	13.66 a	16.7 abcd	0.1 ab	3.0 ab	1.3 ab
Morado San Miguel	3 a	12.92 a	18.6 abc	0.2 ab	4.0 a	1.5 ab
Morado San Miguel	3 b	12.38 a	21.3 a	0.0 b	0.8 d	1.4 ab
Manzano Tepetlixpa	2	10.87 a	14.2 bcde	0.0 b	1.5 cd	1.3 ab
Tecozautla 04	2	10.88 a	19.8 ab	0.1 ab	1.8 bcd	1.3 ab
Tecozautla 04	3	11.28 a	10.1 e	0.1 ab	2.2 bcd	1.1 b
LSD/DMSH		2.96	5.8	0.3	1.4	0.5

PH = plant height (cm); NL = number of leaves; NF = number of flowers; NB = number of buds; NS = number of stems. LSD = least significant difference. <sup>z</sup>Means with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

ALT = altura de planta (cm); NH = número de hojas; NF = número de flores; NB = número de botones; NT = número de tallos. DMSH = diferencia mínima significativa honesta. <sup>z</sup>Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).



**Figure 2. Comparison of means between clonal families of three varieties of tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) under a greenhouse for 75 days after acclimatization. a) Plant height, b) number of leaves, c) number of flowers and d) number of set fruits. Means with the same letter, for each date and variable, do not differ statistically (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).**

**Figura 2. Comparación de medias entre familias de clones de tres variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) bajo invernadero durante 75 días a partir de la aclimatización. a) Altura de planta, b) número de hojas, c) número de flores y d) número de bolsas. Medias con la misma letra, para cada fecha y variable, no difieren estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).**

Regarding the number of leaves, at the beginning of acclimatization, family 3b from Morado San Miguel had the most leaves, and family 3 from Tecozautla had the lowest number of leaves (Table 3). After acclimatization, the highest number of leaves corresponded to family 1 from Morado San Miguel, and the lowest number of leaves was for family 2 from the Tecozautla 04 variety (Figure 2b).

The highest number of buds was presented by families 3a and 2b of the Morado San Miguel variety, and the fewest buds were from families 1 and 3b of Morado San Miguel, 2 and 3 of Tecozautla 04, and 2 of Manzano Tepetlixpa (Table 3). After acclimatization, all families presented a number of buds that were not significantly different from each other (Figure 2c).

Regarding the number of flowers before acclimatization, family 2a from Morado San Miguel had the most flowers, and the only families that did not present flowers were 1 and 3b of the same variety (Table 3). After acclimatization, the family that developed the most flowers was family 3a from

Akhond (2016) también encontraron respuestas diferentes en el cultivo *in vitro* de cinco variedades de *Solanum melongena* L. respecto al número de brotes regenerados por explante y su enraizamiento.

Al inicio de la aclimatación, la familia 1 de Morado San Miguel presentó la menor altura respecto de las otras familias, entre las que no hubo diferencias significativas (Cuadro 3). Después de dos semanas bajo aclimatación, las familias 1 y 3b de la variedad Morado San Miguel, y la 2 de Tecozautla 04, presentaron la menor altura (Figura 2a). En general, las familias clonales de mayor altura al inicio de la aclimatación la conservaron durante todo el periodo evaluado.

En cuanto al número de hojas, al comenzar la aclimatación, la familia 3b de Morado San Miguel fue la que presentó más hojas, y la familia 3 de Tecozautla tuvo el menor número de hojas (Cuadro 3). Después de la aclimatación, el mayor número de hojas correspondió a la familia 1 de Morado San Miguel, y la menor cantidad de hojas fue para la familia 2 de la variedad Tecozautla 04 (Figura 2b).

Morado San Miguel, and family 2 from Tecozautla 04 had the lowest number of flowers (Figure 2d). The family with the highest number of stems was family 1 from Morado San Miguel, although it only significantly surpassed family 3 from Tecozautla, which had the lowest value (Table 3).

At the beginning of the acclimatization stage, the plants showed excessive transpiration (Figure 1d) due to the anatomical conditions of the leaves from the *in vitro* culture. However, for all clonal families of the three varieties, 100 % survival was obtained, with excellent response to the established protocol and to the control of relative humidity by misting (Figure 1e). This coincides with the results of Andrade-Rodríguez et al. (2005), who obtained an equal survival percentage when acclimatizing eight improved and two wild varieties of *Physalis ixocarpa* Brot. Manzo-González et al. (1998) also achieved 100 % survival in the acclimatization of tomatillo plants of the Rendidora, Salamanca, and Tamazula varieties obtained *in vitro*.

The success achieved in acclimatization was due, firstly, to the induction of an acceptable functional root system *in vitro* in all clonal families (Table 1). A good root system is essential for guaranteeing a high percentage of survival in *ex vitro* conditions after transplanting (Teixeira-da Silva et al., 2017). This is because roots generated *in vitro* continue their growth during the *ex vitro* acclimatization process (Clapa, Fira, & Joshee, 2013; George & Debergh, 2008). Secondly, the maintenance of high relative humidity and its gradual decrease enhance the adaptation process of morphology and physiology, mainly of the leaves. This was demonstrated by Shekhawat, Kannan, Manokari, and Ravindran (2015), who by acclimatizing *Passiflora foetida* L. plants from *in vitro* culture, maintaining relative humidity at 100 % for the first two weeks and decreasing it for the subsequent two weeks achieved 100 % survival after acclimatization.

The phenological development of the cloned plants of the evaluated varieties showed a differentiated behavior. The Morado San Miguel variety had a prostrate or creeping growth, while Tecozautla 04 and Manzano Tepetlixpa had an erect growth. At the beginning of the transplant to the greenhouse, the plants from acclimatization showed good height (Figures 3a and 3b).

For the plant height variable, family 2 from Manzano Tepetlixpa had the highest height, and families 1 and 3b from Morado San Miguel the lowest value during the evaluation (Figure 2a). In addition, it was observed that the increase in plant height in all families did not decrease during the evaluated phenological cycle. It should be noted that at the end of the cycle, families 2 from Tecozautla 04 and 2b from Morado

El mayor número de botones lo presentaron las familias 3a y 2b de la variedad Morado San Miguel, y la menor cantidad de botones fueron de las familias 1 y 3b de Morado San Miguel, 2 y 3 de Tecozautla 04, y 2 de Manzano Tepetlixpa (Cuadro 3). Después de la aclimatación, todas las familias presentaron una cantidad de botones que no eran significativamente diferentes entre sí (Figura 2c).

Respecto a la cantidad de flores previo a la aclimatación, la familia 2a de Morado San Miguel fue la que presentó más flores, y las únicas familias que no presentaron flores fueron la 1 y 3b de la misma variedad (Cuadro 3). Posterior a la aclimatación, la familia que desarrolló más flores fue la 3a de Morado San Miguel, y la familia 2 de Tecozautla 04 resultó con menor número de flores (Figura 2d). La familia con mayor número de tallos fue la 1 de Morado San Miguel, aunque solo superó significativamente a la familia 3 de Tecozautla, que fue la de menor valor (Cuadro 3).

Al inicio de la etapa de aclimatación, las plantas presentaron una transpiración excesiva (Figura 1d), debido a las condiciones anatómicas de las hojas provenientes del cultivo *in vitro*. No obstante, para todas las familias clonales de las tres variedades se obtuvo el 100 % de sobrevivencia, con excelente respuesta al protocolo establecido y al control de la humedad relativa mediante nebulización (Figura 1e). Esto coincide con los resultados de Andrade-Rodríguez et al. (2005), quienes obtuvieron un porcentaje igual de sobrevivencia al aclimatar ocho variedades mejoradas y dos silvestres de *Physalis ixocarpa* Brot. Manzo-González et al. (1998) también lograron 100 % de sobrevivencia en la aclimatación de plantas de tomate de cáscara de las variedades Rendidora, Salamanca y Tamazula obtenidas *in vitro*.

El éxito logrado en la aclimatación se debió, en primer lugar, a la inducción de un sistema de raíces funcional *in vitro* aceptable en todas las familias clonales (Cuadro 1). Un buen sistema radicular es indispensable para garantizar un alto porcentaje de sobrevivencia en las condiciones *ex vitro* después del trasplante (Teixeira-da Silva et al., 2017). Esto debido a que las raíces generadas *in vitro* continúan su crecimiento durante el proceso de aclimatación *ex vitro* (Clapa, Fira, & Joshee, 2013; George & Debergh, 2008). En segundo lugar, el mantenimiento de la humedad relativa alta y su disminución gradual mejoran el proceso de adaptación de la morfología y fisiología, principalmente de las hojas. Lo anterior fue demostrado por Shekhawat, Kannan, Manokari, y Ravindran (2015), quienes al aclimatar plantas de *Passiflora foetida* L. provenientes de cultivo *in vitro*, manteniendo la humedad relativa al 100 % las primeras dos semanas y disminuyéndola las dos semanas posteriores, lograron una supervivencia del 100 % después de la aclimatización.

San Miguel were eliminated due to the presence of phytopathogens.

Regarding the number of leaves, at the beginning of the evaluation, family 1 from the Morado San Miguel variety presented more leaves, and family 2 from Tecozautla 04 had the lowest number of leaves. However, at the end of the evaluation, the number of leaves among the families of the three varieties was not significantly different (Figure 2b). The increase in the number of leaves continued until the last weeks of the evaluation, a phenomenon that does not occur in plants from seed; this is in accordance with the four phenological phases of the tomatillo described by Cartujano, Fernández, and Jankiewics (1987). The increase was probably due to a greater juvenility of the plants obtained *in vitro*. It would be advisable to jointly study the phenology of plants from seed and cloned *in vitro*.

For the number of flowers, at the beginning of the evaluation, family 3a from Morado San Miguel presented the highest value, and family 2 from Tecozautla 04 the lowest. At the end of the evaluation, families 3 from Tecozautla 04 and 1 from Morado San Miguel had the lowest number of flowers in relation to the other families (Figures 2c and 3c). At the beginning of the cycle, the number of flowers increased until week 10, but from then on there was a decrease in the formation of buds and flowers, which is due to the continuous growth of generative organs that cause competition among them (Cartujano et al., 1987).

In relation to the variable number of set fruits, families 1 and 3b from the Morado San Miguel variety presented the highest values, while families from Tecozautla 04 and Manzano Tepetlixpa developed fewer set fruits (Figures 2d and 3d). This is mainly due to the growth habit, since creeping-type varieties have a greater number of set fruits than those with erect growth, so they are slightly more productive (Cartujano et al., 1987; Peña-Lomelí, Ponce-Valerio, Sánchez-del Castillo, & Magaña-Lira, 2014).

From the above, it can be affirmed that the evaluated variables and their expression are mainly due to the growth habit of each variety. Regarding the number of set fruits and flowers, the Morado San Miguel families expressed the highest value, this as a result of a higher level of branching present due to their creeping habit, which means that they produce more fruits, but of smaller size (Cartujano et al., 1987; Peña-Lomelí et al., 2014). Regarding height and the number of leaves and flowers, it can be confirmed that plants from *in vitro* culture have a lower value compared to plants from seed. Nevertheless, the life cycle of the plants obtained by *in vitro* propagation lasted about 98 days,

El desarrollo fenológico de las plantas clonadas de las variedades evaluadas muestra un comportamiento diferenciado. La variedad Morado San Miguel tuvo un crecimiento de tipo postrado o rastro, mientras que Tecozautla 04 y Manzano Tepetlixpa presentaron un crecimiento erecto. Al inicio del trasplante al invernadero, las plantas provenientes de la aclimatación presentaron una buena altura (Figuras 3a y 3b).

Para la variable altura de planta, la familia 2 de Manzano Tepetlixpa presentó la mayor altura, y las familias 1 y 3b de Morado San Miguel, el menor valor durante la evaluación (Figura 2a). Además, se pudo observar que el incremento de altura de las plantas en todas las familias no decrece durante el ciclo fenológico evaluado. Cabe señalar que al final del ciclo, las familias 2 de Tecozautla 04 y 2b de Morado San Miguel se eliminaron debido a la presencia de fitopatógenos.

Respecto al número de hojas, al inicio de la evaluación, la familia 1 de la variedad Morado San Miguel presentó más hojas, y la familia 2 de Tecozautla 04 tuvo el menor número de hojas. No obstante, al final de la evaluación, la cantidad de hojas entre las familias de las tres variedades no fue significativamente diferente (Figura 2b). El incremento en el número de hojas continúa hasta las últimas semanas de evaluación, fenómeno que no ocurre en plantas provenientes de semilla; esto de acuerdo con las cuatro fases fenológicas del tomate de cáscara descritas por Cartujano, Fernández, y Jankiewics (1987). El incremento se debió, probablemente, a una mayor juvenilidad de las plantas obtenida *in vitro*. Sería recomendable estudiar de manera conjunta la fenología de plantas provenientes de semilla y clonadas *in vitro*.

Para el número de flores, al inicio de la evaluación, la familia 3a de Morado San Miguel presentó el mayor valor, y la familia 2 de Tecozautla 04, el menor. Al final de la evaluación, las familias 3 de Tecozautla 04 y 1 de Morado San Miguel tuvieron la menor cantidad de flores en relación con las demás familias (Figuras 2c y 3c). Al inicio del ciclo, el número de flores sufre un incremento hasta la semana 10, pero a partir de ahí se presenta un decremento en la formación de botones y flores, lo cual se debe al continuo crecimiento de órganos generativos que provocan competencia entre ellos (Cartujano et al., 1987).

En relación con la variable número de bolsas, las familias 1 y 3b de la variedad Morado San Miguel presentaron los valores más altos, mientras que las familias de Tecozautla 04 y Manzano Tepetlixpa desarrollaron menos bolsas (Figuras 2d y 3d). Esto debido, principalmente, al hábito de crecimiento, ya que las variedades de tipo rastro presentan mayor



from the *in vitro* culture in the laboratory to the development of the first fruits.

The propagation process included the stages of regeneration, rooting, acclimatization and development under greenhouse conditions, which, in a certain way, coincides with the life cycle of plants from seed (Mulato, Fernández, & Jankiewics, 1987). The first two stages took place in the laboratory. Regeneration lasted two weeks (Figures 1a and 1b), and rooting took two weeks (Figure 1c). Subsequently, the clones were taken to the greenhouse, where acclimatization lasted another two weeks (Figures 1d and 1e); at this stage, the first buds and flowers appeared. After transplanting under greenhouse conditions (Figure 3a), vegetative (Figure 3b) and reproductive (Figure 3c) development occurred during eight weeks, where pollination and fruit development comprised the last six weeks (Figure 3d).

The vigor expressed by the plants obtained *in vitro*, compared to those from seed, may be due to the

número de bolsas que las de crecimiento erecto, por lo que son un poco más productivas (Cartujano et al., 1987; Peña-Lomelí, Ponce-Valerio, Sánchez-del Castillo, & Magaña-Lira, 2014).

De lo anterior, se puede afirmar que las variables evaluadas y su expresión obedecen, principalmente, al hábito de crecimiento de cada variedad. Respecto al número de bolsas y flores, las familias de Morado San Miguel expresaron el mayor valor, esto como resultado de un mayor nivel de ramificación presente por su hábito rastrero, lo cual significa que producen más frutos, pero de menor tamaño (Cartujano et al., 1987; Peña-Lomelí et al., 2014). En cuanto a la altura, y al número de hojas y de flores, se puede confirmar que las plantas provenientes de cultivo *in vitro* presentan un menor valor en comparación con las plantas provenientes de semilla. No obstante, el ciclo de vida de las plantas obtenidas por propagación *in vitro* comprendió alrededor de 98 días, contados a partir del cultivo *in vitro* en el laboratorio hasta el desarrollo de los primeros frutos.



**Figure 3.** Acclimatized plants grown under greenhouse conditions. a) Plant from family 2b of Morado San Miguel, b) plant from family 2 of Manzano Tepetlixpa, c) flowers from family 1 of Morado San Miguel at 75 days after acclimatization, d) fruits from family 2b of Morado San Miguel, e) fruit from the Tecozautla 3 x Manzano Tepetlixpa 2 interclonal cross and f) fruit from the Morado San Miguel 1 x Morado San Miguel 2a interclonal cross.

**Figura 3.** Plantas aclimatadas cultivadas bajo invernadero. a) Planta de la familia 2b de Morado San Miguel, b) planta de la familia 2 de Manzano Tepetlixpa, c) flores de la familia 1 de Morado San Miguel a los 75 días después de la aclimatación, d) frutos de la familia 2b de Morado San Miguel, e) fruto de la cruce interclonal Tecozautla 3 x Manzano Tepetlixpa 2 y f) fruto de la cruce interclonal Morado San Miguel 1 x Morado San Miguel 2a.

anatomical and physiological changes they underwent, mainly in the leaves, in the transition stage from *in vitro* to *ex vitro* conditions, which causes slow development (Driver & Suttle, 1986). However, manually controlled pollination was performed (Peña-Lomelí, Magaña-Lira, Gámez-Torres, Mendoza-Celino, & Pérez-Grajales, 2018) for the cross between five clonal families, resulting in normal fruit set and interclonal hybrid seed production (Figure 3e and 3f).

## Conclusions

The *in vitro* culture and acclimatization protocol was successfully established, in which a survival rate of 100 % was obtained in all the clonal families of the three varieties.

The response to *in vitro* culture of the clonal families depended on the genotype, with the Tecozautla 04 and Manzano Tepetlixpa varieties standing out, and the Morado San Miguel variety having a lower response.

The phenology of the clonal families showed normal development, similar to the phenology of seed plants, where the complete cycle from *in vitro* culture to seed production lasted 14 weeks.

## End of English version

## References / Referencias

- Andrade-Rodríguez, M., López-Peralta, M. C., González-Hernández, V. A., García-Velázquez, A., & Peña-Lomelí, A. (2005). Efecto del genotipo en la micropropagación de tomate de cáscara. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(1), 31-37. doi: 10.5154/r.rchsh.2003.06.040
- Cartujano, E. F., Fernández, O., V. M., & Jankiewicz, L. S. (1987). Tomate de cáscara variedad rendidora: desarrollo y fenología. *Revista Chapingo*, 56-57, 48-50.
- Cheng, Y., Ma, R., Jiao, Y., Qiao, N., & Li, T. (2013). Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *South African Journal of Botany*, 88, 306-309. doi: 10.1016/j.sajb.2013.08.012
- Clapa, D., Fira, A., & Joshee, N. (2013). An efficient *ex vitro* rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture. *HortScience*, 48(9), 1159-1167. doi: 10.21273/HORTSCI.48.9.1159
- Dore, C. (1987). Application of tissue culture to vegetable crop improvement. In: Green, C. E., Somers, D. A., Hackett, W. P., & Biesboer, D. D. (Eds.), *Plant tissue and cell culture* (pp 419-32). New York: Alan R. Liss.
- Drew, A. P., Kavanagh, K. L., & Maynard, C. A. (1992). Acclimatizing micropropagated black cherry by

El proceso de propagación tuvo las etapas de regeneración, enraizamiento, aclimatación y desarrollo bajo invernadero, lo cual, de cierta manera, coincide con el ciclo de vida de las plantas provenientes de semilla (Mulato, Fernández, & Jankiewicz, 1987). Las primeras dos etapas tuvieron lugar en el laboratorio. La regeneración duró dos semanas (Figuras 1a y 1b), y el enraizamiento se dio en dos semanas (Figura 1c). Posteriormente, los clones se llevaron al invernadero, donde la aclimatación duró otras dos semanas (Figuras 1d y 1e); en esta etapa aparecieron los primeros botones y flores. Después del trasplante bajo invernadero (Figura 3a), el desarrollo vegetativo (Figura 3b) y reproductivo (Figura 3c) ocurrió durante ocho semanas, donde la polinización y el desarrollo de frutos comprendió las últimas seis semanas (Figura 3d).

El vigor expresado por las plantas obtenidas *in vitro*, en comparación con las de semilla, se puede deber a los cambios anatómicos y fisiológicos que experimentaron, principalmente en las hojas, en la etapa de transición de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, lo cual provoca un desarrollo lento (Driver & Suttle, 1986). No obstante, se realizó polinización controlada manualmente (Peña-Lomelí, Magaña-Lira, Gámez-Torres, Mendoza-Celino, & Pérez-Grajales, 2018) para la cruce entre cinco familias clonales, con lo que se obtuvo amarre normal de frutos y producción de semilla híbrida interclonal (Figura 3e y 3f).

## Conclusiones

Se estableció con éxito el protocolo de cultivo *in vitro* y aclimatación, en el cual se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de 100 % en todas las familias clonales de las tres variedades.

La respuesta al cultivo *in vitro* de las familias clonales dependió del genotipo, sobresaliendo las variedades Tecozautla 04 y Manzano Tepetlixpa, y con menor respuesta la variedad Morado San Miguel.

La fenología de las familias clonales presentó un desarrollo normal, similar a la fenología de plantas de semilla, donde el ciclo completo desde el cultivo *in vitro* hasta la producción de semilla duró 14 semanas.

## Fin de la versión en español

- comparison with half-sib seedlings. *Physiologia Plantarum*, 86(3), 459-464. doi: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb01344.x
- Driver, J. A., & Suttle, G. R. L. (1986). Nursery handling of propagules. In: Bonga, J. M., & Durzan, D. J. (Eds.), *Cell and tissue culture in forestry* (pp. 320-31), Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. doi: 10.1007/978-94-009-4484-8\_17
- George, E. F., & Debergh, P. C. (2008). Micropropagation: uses and methods. In: George, E. F., Michael, A. H., & DeKlerk, G. J. (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (pp. 29-64). Netherlands: Springer.
- Grout, B. W., & Millam, S. (1985). Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Annals of Botany*, 55(1), 129-131. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a086872
- Kallak, H., Reidla, M., Hilpus, I., & Virumäe, K. (1997). Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 127-135. doi: 10.1023/A:1005932229770
- Kant-Pandey, K. (1957). Genetics of self-incompatibility in *Physalis ixocarpa* Brot. A new system. *American Journal of Botany*, 44(10), 879-887. doi: 10.1002/j.1537-2197.1957.tb08275.x
- Manzo-González, A., Ledesma-Hernández, A., Villatoro-López, J. C., Álvarez-Escareño, I., Rodríguez-de la O, J. L., & Peña-Lomelí, A. (1998). Regeneración *in vitro* de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 4(1), 45-49. doi: 10.5154/r.rchsh.1997.06.044
- Muktadir, M. A., Habib, M. A., Mian, M. A. K., & Akhond, M. A. Y. (2016). Regeneration efficiency based on genotype, culture condition and growth regulators of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Agriculture and Natural Resources*, 50(1), 38-42. doi: 10.1016/j.anres.2014.10.001
- Mulato, J., Fernández, V. M., & Jankiewicz, S. (1987). Tomate de cáscara: desarrollo y fenología. *Revista Chapingo*, 56-57, 44-47.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Peña-Lomelí, A., & Márquez, F. (1990). Mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). *Revista Chapingo*, 71-72, 84-88.
- Peña-Lomelí, A., Ponce-Valerio, J. J., Sánchez-del Castillo, F., & Magaña-Lira, N. (2014). Desempeño agronómico de variedades de tomate de cáscara en invernadero y campo abierto. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(4), 381-391. doi: 10.35196/rfm.2014.4.381
- Peña-Lomelí, A., Magaña-Lira, N., Gámez-Torres, A., Mendoza-Celino, F. A., & Pérez-Grajales, M. (2018). Manual pollination in two tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) varieties under greenhouse conditions. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(1), 5-12. doi: 10.5154/r.rchsh.2017.02.011
- Ramírez-Malagón, R., & Ochoa-Alejo, N. (1991). Adventitious shoot formation and plant regeneration from tissues of tomatillo (*Physalis ixocarpa*, Brot.). *Plant Cell and Organ Culture*, 25, 185-188. doi: 10.1007/BF00036209
- Santiaguillo-Hernández, J. F., Cervantes-Santana, T., & Peña-Lomelí, A. (2004). Selección para rendimiento y calidad de fruto de cruza planta x planta entre dos variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27(1), 85-91. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/27-1/11a.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2021). *Avance de siembras y cosechas: Resumen nacional por cultivo*. Retrieved on February 22, 2021 from [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do)
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). (2021). *Catálogo nacional de variedades vegetales*. Retrieved on February 22, 2021 from <https://www.gob.mx/snics/articulos/el-catalogo-nacional-de-variedades-vegetales-cnvv?idiom=es>
- Shekhawat, M., Kannan, N., Manokari, M., & Ravindran, C. P. (2015). *In vitro* regeneration of shoots and *ex vitro* rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13, 209-214. doi: 10.1016/j.jgeb.2015.08.002
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. In: *Proceedings 6<sup>th</sup> International Congress on Soilless Culture* (pp. 633-650). Nueva York, USA: International Society for Soilless Culture
- Teixeira-daSilva, J. A., Hossain, M. M., Sharma, M., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Zeng, S. (2017). Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 110-124. doi: 10.1016/j.hpj.2017.07.009
- van Groenendael, J., & de Kroon, H. (1990). *Clonal growth in plants: regulation and function*. The Hague, The Netherlands: S.P.B. Academic Publishing.