

IBCIENCIAS
IBCIENCIAS
IBCIENCIAS



IBCIENCIAS



www.biociencias.unach.mx/ibciencias



Volumen 2 · Número 2 · Diciembre · 2019

Revista científica electrónica

Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, México



Volumen 2 · Número 2 · Diciembre · 2019

www.biociencias.unach.mx/ibciencias

IBCIENCIAS, volumen 2, número 2, Julio-Diciembre 2019, es una revista científica digital de publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Chiapas, a través del Instituto de Biociencias, Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México. Tel. (962) 64 2 7972, www.biociencias.unach.mx/ibciencias, ibciencias.revista@gmail.com. Editor responsable: Dr. Alfredo Vázquez Ovando. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2019-053014202300-01, ISSN en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número Dr. Alfredo Vázquez Ovando; Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México.

CONTENIDO

Diciembre de 2019 / Vol 2 / Num 2

- 7-11** **Efecto del ácido indol-3-acético y del tipo de explante en la callogénesis de girasol (*Helianthus annuus* L.).** Enrique Pola-Sánchez, Aron O. Cruz-Vázquez, José A. Santiz-Gómez, Susan L. López-López, Roni O. Suchiapa-Díaz, Arturo Gómez-Guirao.
- 12-16** **Cultivo *in vitro* de 22 genotipos silvestres de Chile de la Región Selva de Chiapas, México.** Antonio Magdiel Velázquez-Méndez, Alexander Ramírez-Ocaña, Alma Gabriela Verdugo-Valdez, Carolina Orantes-García.



Volumen 2 · Número 2 · Diciembre · 2019

www.biociencias.unach.mx/ibciencias



Efecto del ácido indol-3-acético y del tipo de explante en la callogénesis de girasol (*Helianthus annus* L.)

Enrique Pola-Sánchez*, Aron O. Cruz-Vázquez, José A. Santiz-Gómez, Susan L. López-López, Roni O. Suchiapa-Díaz, Arturo Gómez-Guirao

Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Resumen

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es el cuarto cultivo oleaginoso más importante del mundo en términos de producción anual total, después de la soya, la colza y el cacahuete. Actualmente, existe creciente interés por implementar técnicas de cultivo de tejidos en esta especie; sin embargo, su cultivo *in vitro* presenta algunos retos. En este sentido, el uso de reguladores de crecimiento vegetal es de gran importancia, ya que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas y participan en procesos de dediferenciación celular. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del ácido indol-3-acético (AIA) en la inducción de callos a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y raíz de *Helianthus annus* L. Los explantes fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (MS) suplementados con 0.1, 0.5 y 1 mg L⁻¹ de AIA. Todas las concentraciones evaluadas de AIA indujeron la formación de callos en los diferentes tipos de explantes utilizados, sin embargo, la concentración de 0.1 mg L⁻¹ tuvo mayor efecto callogénico. El presente trabajo evidencia el efecto del AIA como único regulador de crecimiento para la inducción de callos en explantes de girasol, siendo una alternativa para la aplicación en protocolos para la inducción de callogénesis.

Palabras clave:

Cultivo de tejidos
vegetales
AIA
Callos
Brotos

Keywords:

Plant tissue culture
IAA
Callus
Shoots

Effect of indol-3 acetic acid and explant type on sunflower (*Helianthus annus* L.) callogenesis

Abstract

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is the fourth most important oil crop in the world in terms of total annual production, after soybeans, rapeseed and peanuts. Currently, there is growing interest in implementing tissue culture techniques in this species. However, their *in vitro* culture presents some challenges. In this sense, the use of plant growth regulators is of great importance, since they promote the growth and development of plants and participate in cell dedifferentiation processes. For this reason, the objective of this research was to evaluate the effect of indole-3-acetic acid (IAA) on the induction of callus from explants of cotyledon, hypocotyl and root of *Helianthus annuus* L. The explants were grown in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.1, 0.5 and 1 mg L⁻¹ of IAA. All the evaluated concentrations of IAA induced callus formation in the different types of explants used, however, the concentration of 0.1 mg L⁻¹ had a greater callogenic effect. The present work evidences the effect of the AIA as the only growth regulator for the induction of callus in sunflower explants, being an alternative for the application in protocols for the induction of callogenesis.

* Autor para correspondencia:

Departamento de Ingeniería
Química y Bioquímica,
Instituto Tecnológico de
Tuxtla Gutiérrez.
Km 29020, Carr.
Panamericana 1080,
Boulevares, C.P. 29050.
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas,
México.
Teléfono: +52 961 2961390.
Correo-electrónico:
enrique.pola@ittuxtlagutierrez.edu.mx

1. Introducción

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una de las especies perteneciente al género *Helianthus* de la familia Compositae (Asteraceae). El girasol es el cuarto cultivo de semillas oleaginosas más importante del mundo en términos de la producción anual total después de la soya, la colza y cacahuete, aportando el 12% de aceite comestible producido a nivel mundial (Çakmak et al., 2019; Dagustu, 2018). Así también, es una fuente de vitamina B6, vitamina E, tiamina, magnesio, cobre, fósforo, manganeso y selenio, lo que lo hace un alimento con buen aporte nutrimental (Chantal et al., 2018).

Los estudios de reproducción convencional se han centrado en obtener plantas con características agronómicas mejoradas, tales como alto contenido de aceite, alta resistencia a enfermedades ocasionadas por hongos, entre las que se encuentran: la mancha negra causada por *Alternaria helianthi*, mildiu polvoriento del girasol por *Erysiphe cichoracearum* DC., pudrición sureña por *Sclerotium rolfsii* Sacc., mancha del tallo por *Alternaria solani* y la roya que es provocada por *Puccinia helianthi*, siendo estas enfermedades las de mayor importancia (Martínez-Mejía et al., 2017); además de aumentar, la tolerancia a condiciones de estrés abiótico y los contenidos de aceite y proteína (Faure et al., 2002; Seiler y Gulya, 2004; Vassilevska-Ivanova et al., 2014). Sin embargo, la escasez de recursos genéticos adecuados en las variedades de girasol ha limitado el desarrollo de nuevos híbridos con tales características (Dagustu, 2018), por tal motivo la callogénesis representa una fuente de material celular desdiferenciado para su uso en diferentes aplicaciones, desde el mejoramiento genético para la propagación de híbridos hasta la producción de metabolitos secundarios de interés industrial a nivel *in vitro*. En este sentido, la biotecnología, particularmente el cultivo de tejidos vegetales, es una herramienta que puede ser utilizada para superar los inconvenientes de las técnicas convencionales, permitiendo el mejoramiento de los cultivos (Inoka y Dahanayake, 2015) o incrementando el rendimiento y la producción de metabolitos de interés a nivel *in vitro*. Actualmente, la aplicación de tecnologías de cultivo de tejidos vegetales en girasol ha generado respuestas como la organogénesis, embriogénesis somática, hibridación interespecífica, producción de haploides, cultivo de protoplastos y variación somaclonal específica (Dagustu, 2018).

Durante las últimas décadas, la inducción y el cultivo *in vitro* de callos está siendo ampliamente útil para producir plantas libres de enfermedades y es aceptado como una alternativa capaz para la producción de metabolitos secundarios de interés (Prakasha y Umesha, 2018).

En el cultivo de tejidos vegetales, específicamente en el cultivo de callos, es necesario el uso de reguladores de crecimiento u hormonas vegetales que promueven la desdiferenciación celular dependiendo del tipo de explante y de la concentración utilizada. La composición y concentración de los reguladores del crecimiento en el medio

de cultivo, son factores determinantes para la formación de callos y regeneración de plantas en los sistemas de cultivo de tejidos (Guidolin, 2003). Entre los reguladores de crecimiento más utilizados en la inducción de callogénesis se encuentran las auxinas, como el ácido 3-indol acético (AIA) o el ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D). Estos son empleados para promover el alargamiento y la división celular *in vivo* a concentraciones bajas como 0.01 $\mu\text{mol L}^{-1}$, así como para fomentar la formación *in vitro* de callos en diversas especies vegetales. Por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del ácido 3-indol acético sobre la inducción de callos en explantes de girasol.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Las semillas de girasol gigante marca Víta® producida por Rancho los Molinos, fueron adquiridas en un centro comercial local de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (México). Se utilizó medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas (Phytotechnology Laboratories, KS), sacarosa, phytigel (Phytotechnology Laboratories, KS) y ácido indol-3-acético (AIA) (Sigma Aldrich).

2.2. Desinfección de semillas

Las semillas fueron desinfectadas bajo el protocolo de Elaleem et al. (2015) con algunas modificaciones, en el cual se realizó la inmersión de las semillas en etanol al 70% durante 30 s y lavadas tres veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos de etanol. Posteriormente, las semillas se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial (5% p/v) diluida al 20% durante 2 min y finalmente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Todas las operaciones se realizaron bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar.

2.3. Inducción de callos

Los explantes obtenidos se colocaron en frascos de cultivo de 100 mL que contenían 25 mL de medio MS suplementados con 0.1, 0.5 y 1 mg L^{-1} de AIA como regulador de crecimiento. Los recipientes de los diferentes tratamientos se mantuvieron en una cámara bioclimática a 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 16 h. La formación de callos se observó a partir de los siete días de incubación, sin embargo, los resultados finales registrados fueron después de 4 semanas de incubación. Se evaluó la capacidad de formación de callos de acuerdo al tipo y número de explantes que formaron callos.

2.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA multifactorial con un 95% de confianza mediante el software estadístico STATHGRAPHICS Centurion XVI. II.

3. Resultados y Discusión

3.1. Respuestas fisiológicas

Se obtuvieron callos en todos los explantes después de siete días de la siembra y de la incubación de los mismos; los resultados se registraron después de cuatro semanas. De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible observar que la concentración de AIA que generó callo de forma consistente para todos los explantes fue 0.1 mg L⁻¹. Así mismo, se logró la formación de callos con todos los explantes en las concentraciones evaluadas (0.1, 0.5 y 1 mg L⁻¹) (Figura 1), donde las raíces e hipocótilos adicionados con 0.1 mg L⁻¹ de AIA mostraron ser los mejores explantes con 100% de callogénesis; en explantes de hipocótilo a 0.5 mg L⁻¹ de AIA, no hubo formación de callos. Estas respuestas fisiológicas se presentan en el Cuadro 1.

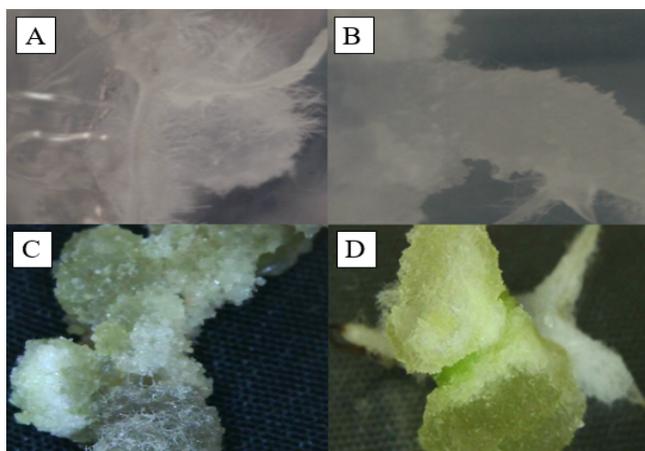


Figura 1. A) callos de explantes de raíz obtenidos a concentración de 0.1 mg L⁻¹ de AIA con formación de raíces adventicias. B) callos de explantes de cotiledón obtenidos a concentración de 0.5 mg L⁻¹ de AIA con formación de raíces. C y D) callos de hipocótilo obtenidos a concentraciones de 1 y 0.1 mg L⁻¹ de AIA, respectivamente.

Actualmente, no se tienen resultados de inducción de callogénesis mediante el uso de AIA como único regulador de crecimiento, pero se han evaluado hormonas sintéticas tales como 6-bencilaminopurina (BAP), ácido α -naftaleno acético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) de forma individual y en combinaciones. Elaleem et al. (2015), reporta la obtención de callos de girasol empleando concentraciones de 1.5 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), así como 2 mg L⁻¹ de ácido α -naftaleno acético (ANA) de manera individual. Inoka y Dahanayake (2015), lograron obtener callos con 0.1 mg L⁻¹ de BAP + 2, 4 D (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg L⁻¹), así como la regeneración de brotes con 0.1 mg L⁻¹ de ácido α -naftaleno acético (NAA) con seis concentraciones diferentes de 6-bencilaminopurina (BAP) (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg L⁻¹).

Cuadro 1. Respuestas fisiológicas inducidas al evaluar diferentes concentraciones de AIA en tres tipos de explantes de girasol a las cuatro semanas de incubación.

Concentración de AIA (mg L ⁻¹)	Variables fisiológicas		
	Callos	Brotes	Raíces
0.1	75.0±6.34 ^b	13.89±6.0 ^a	72.78±7.01 ^a
0.5	58.9±6.34 ^{ab}	2.78±6.0 ^a	52.22±7.01 ^a
1	55.6±6.34 ^a	0±0 ^a	54.44±7.01 ^a
Respuesta por tipo de explante			
Cotiledón	52.80±6.34 ^a	16.67±6.0 ^a	52.78±7.01 ^a
Raíz	92.22±6.34 ^b	0±0 ^a	82.22±7.01 ^b
Hipocótilo	44.40±6.34 ^a	0±0 ^a	44.44±7.01 ^a
DMS ¹	18.8	17.8	20.8
Concentración por explante			
0.1, cotiledón	25.0±10.9 ^a	41.67±10.4 ^b	25.0±12.15 ^a
0.1, raíz	100.0±10.9 ^b	0±0 ^a	93.33±12.15 ^b
0.1, hipocótilo	100.0±10.9 ^b	0±0 ^a	100.0±12.15 ^b
0.5, cotiledón	83.33±10.9 ^b	8.33±10.4 ^b	83.33±12.15 ^b
0.5, raíz	93.33±10.9 ^b	0±0 ^a	73.33±12.15 ^b
0.5, hipocótilo	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
1, cotiledón	50.0±10.9 ^a	0±0 ^a	50.0±12.15 ^b
1, raíz	83.33±10.9 ^b	0±0 ^a	80.0±12.15 ^b
1, hipocótilo	33.33±10.9 ^a	0±0 ^a	33.33±12.15 ^a

¹Diferencia mínima significativa (0.05). ^{a-b}Los valores en las columnas seguidos con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre los tratamientos.

3.2. Formación de raíces

En todos los callos obtenidos hubo formación de raíces primarias y adventicias. La concentración de AIA que indujo una formación constante de raíces fue 0.1 mg L⁻¹ con 72%, mientras que la más baja fue la de 0.5 mg L⁻¹ con 52%. En tejidos de raíces, hubo un 82% de desarrollo de nuevas raíces primarias con numerosas raíces adventicias, mientras que los explantes de hipocótilo presentaron 44%, siendo estas últimas las que menos indujeron raíces. Por otro lado, explantes de raíz e hipocótilo en concentración de 0.1 mg L⁻¹ presentaron 93% y 100% de formación de raíces, respectivamente (Figura 2); sin embargo, en los explantes de hipocótilo con 0.5 mg L⁻¹ de AIA no hubo formación de raíces.

Estudios paralelos realizados por Inoka y Dahanayake (2015) y Ozyigit et al. (2006), lograron la inducción de raíces en girasol a una concentración de 1 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (IBA), a partir de callos formados con ácido α -naftaleno acético (NAA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en explantes de raíz, hoja y tallo; por lo que debido a los resultados obtenidos en esta investigación es posible señalar que el AIA induce la formación de raíces a concentraciones bajas en explantes de hoja, raíz y tallo sin la necesidad de adicionar otros reguladores de crecimiento vegetal. Estos resultados permiten conocer el efecto de reguladores de crecimiento que no han sido utilizados en esta especie debido a que son escasos los reportes del uso unitario de auxinas como lo es el AIA, en la inducción de callogénesis y rizogénesis.

Por otro lado, la formación de raíces adventicias en el cultivo de tejidos es inducida por el uso de auxinas (Nag et al., 2001;

Yan et al., 2014); sin embargo, el tipo de auxina, el tratamiento con auxina, la concentración de auxina y la duración del tratamiento son los factores más importantes para inducir e iniciar el enraizamiento (Naija et al., 2008). La morfología de los callos para cada explante fue variada, para el caso de callos de cotiledón e hipocótilos fueron de coloración verde y estructura compacta, mientras que para raíz se presentó una coloración café oscura (Figura 2A), esta apariencia puede atribuirse a la liberación de exudados complejos de naturaleza fenólica, los cuales son metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos (Azofeifa, 2009). Después de tres semanas, los callos mostraron poco desarrollo y crecimiento y presentaron una apariencia oscura y rígida (Figura 2C), posiblemente se debió a la fenolización. En algunos casos, los exudados liberados en el establecimiento *in vitro* no son tóxicos o inhibitorios, pero en la mayoría de los casos el crecimiento de los explantes es inhibido por estos, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar, cuya situación trae como consecuencia la oxidación y muerte del explante (Ogita, 2005). Aunado al oscurecimiento de explantes, el estrés oxidativo se ha relacionado con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (Cassells y Curry 2001, Van Staden et al., 2006).

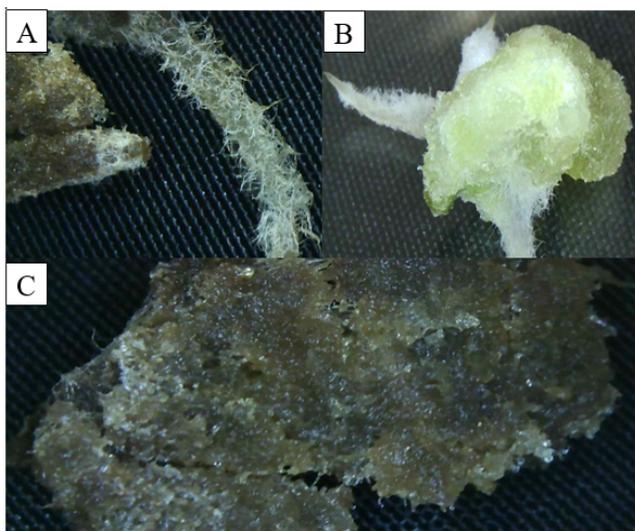


Figura 2. A) Presencia de raíces adventicias en tejidos de raíz primaria formados a partir de callos en concentración 0.1 mg L^{-1} de AIA. B) callos verdes compactos de hipocótilos en concentración de 0.1 mg L^{-1} de AIA con presencia de raíces. C) callos de raíz fenolizados.

3.3. Formación de brotes

Se observaron brotes solo en algunos explantes de cotiledones. La concentración que promovió mayor formación de brotes fue 0.1 mg L^{-1} . Esta característica se consideró como la mejor respuesta de la capacidad de

multiplicación de brotes a partir de cotiledones y como organogénesis directa en el cultivo de girasol.

En la Figura 3, se aprecia un posible brote formado de tejido de cotiledón, así como pequeñas aglomeraciones acompañados de raíces adventicias. Estas aglomeraciones blancas podrían ser embriones en estado globular ya que no mostraban conexión con el tejido vascular. Las células del centro del embrión del callo se dividen rápidamente y se forman embriones globulares que crecen y desarrollan pasando por los estados de corazón, torpedo y cotiledonar, luego maduran y germinan dando lugar a plantas completas (Ammirato, 1989; Winkelmann, 2016). En este sentido, durante el desarrollo de brotes a partir de tejido de cotiledón con 0.1 mg L^{-1} de AIA, se encontró el estado globular, como primera etapa del desarrollo embrionario a las cuatro semanas, mientras que los demás estados de desarrollo no se observaron.



Figura 3. Posibles brotes a partir de cotiledones en concentración 0.1 mg L^{-1} . A) embriones en estado globular.

4. Conclusión

Se logró la obtención de callos en todos los explantes utilizados, siendo los explantes de raíz en los que se obtuvo mayor inducción. La concentración adecuada para inducción de callogénesis en los explantes fue 0.1 mg L^{-1} con 75%, seguido de 0.5 mg L^{-1} con 58.9% y finalmente 55.6% con 1 mg L^{-1} . Se logró obtener 100% de callogénesis en concentraciones de 0.1 mg L^{-1} con explantes de raíz e hipocótilos, mientras que para explantes de hipocótilo en 0.5 mg L^{-1} no se lograron obtener callos. Por otro lado, el AIA indujo organogénesis directa en explantes de cotiledón. El uso del AIA como único regulador de crecimiento demostró ser efectivo para la inducción de callos en explantes de girasol, siendo una alternativa para la aplicación en protocolos para la inducción de callogénesis.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Ammirato PV, 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. International Association for Plant Tissue Culture Newsletter 57: 2–16.

- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Çakmak E, Uncuoğlu AA, Aydın Y. 2019. Evaluation of *in vitro* genotoxic effects induced by *in vitro* anther culture conditions in sunflower. *Plant Signaling & Behavior* 14 (9): 1-10.
- Cassells A, Curry R. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145-157.
- Chantal K, Ongor BT, Bandushubwenge D, Soter N, Félix S. 2018. Effects of different nitrogen fertilizer levels on sunflower growth and yield attributes. *Pakistan Journal of Nutrition* 17(11): 557-562.
- Dagustu N. 2018. *In vitro* tissue culture studies in sunflower (*Helianthus* spp.). *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics* 4(1): 13-21.
- Elaleem KGA, Saeed BEAE, Ahmed MM. 2015. Effect of plant growth regulators on *Helianthus annuus* L. callus induction. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 13: 348-354.
- Faure N, Serieys H, Cazaux E, Kaan F, Bervillé A. 2002. Partial hybridization in wide crosses between cultivated sunflower and the perennial *Helianthus* species *H. mollis* and *H. orgyalis*. *Annals of Botany* 89: 31-39.
- Guidolin AF. 2003. Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium*. Tesis de doctorado Piracicaba, São Paulo, Brazil. pp. 5-61.
- Inoka KPI, Dahanayake N. 2015. Effect of plant growth regulators on micro-propagation of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *International Journal of Scientific and Research Publications* 5(1): 1-5.
- Martínez-Mejía BA, Escamilla-Flores G, Rodríguez-Ortega A, Gomez-Mercado R, Barrón-Yañez R. 2017. 2017. Evaluación de híbridos de girasol (*Helianthus annuus* L.) en régimen de temporal en el Valle del Mezquital. Hidalgo. Ira edición.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Nag S, Saha K, Choudhuri M. 2001. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 182-194.
- Naija S, Elloumi N, Jbir N, Ammar S, Kevers C. 2008. Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple root- stocks MM 106 cultured *in vitro*. *Comptes Rendus Biologies* 331: 518-525.
- Ogita S. 2005. Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology* 22: 119-125.
- Ozyigit I, Gozukirmizi N, Semiz B. 2006. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of sunflower. *Russian Journal of Plant Physiology* 53(4): 556-559.
- Prakasha A, Umesha, S. 2018. Effect of growth hormones in induction of callus, antioxidants, and antibacterial activity in *Nerium odorum*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 6(4): 21-25.
- Seiler GJ, Gulya T. 2004. Exploration for wild *Helianthus* species in North America: Challenges and opportunities in the search for global treasures. *Proc. 16th international Sunflower Conference, Fargo, ND USA*, 43-68.
- Van Staden J, Fennell C, Taylor N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *International Society for Horticultural Science* 725: 55-62.
- Vassilevska-Ivanova R, Shtereva L, Kraptchev B, Karceva T. 2014. Response of sunflower (*Helianthus annuus* L) genotypes to PEG-mediated water stress. *Central European Journal of Biology* 9(12): 1206-1214.
- Winkelmann T. 2016. Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. In *in vitro* embryogenesis in higher plants. In: Germana MA, Lambardi M (eds). *In vitro* embryogenesis in higher plants. Springer, New York, pp 25-46.
- Yan YH, Li JL, Zhang XQ, Yang WY, Wan Y, Ma YM, Zhu YQ, Peng Y, Huang LK. 2014. Effect of naphthalene acetic acid on adventitious root development and associated physiological changes in stem cutting of *Hemarthria compressa*. *PLOS ONE* 9(3): e90700.



ARTÍCULO CORTO

Cultivo *in vitro* de 22 genotipos silvestres de Chile de la Región Selva de Chiapas, México

Antonio Magdiel Velázquez-Méndez¹, Alexander Ramírez-Ocaña¹, Alma Gabriela Verdugo-Valdez², Carolina Orantes-García^{2*}

¹ Universidad Tecnológica de la Selva, Ocosingo, Chiapas, México.

² Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Resumen

Los recursos fitogenéticos son la base de la seguridad alimentaria de la población mundial. México constituye uno de los centros de origen y diversidad de especies fitogenéticas, entre ellas, varios tipos de chile. La mayoría son especies silvestres distribuidas en la mayor parte de México y de amplio interés tanto cultural como económico. El objetivo del presente trabajo fue, determinar la óptima concentración de ácido indol-3-acético (AIA) y cinetina (KIN) para la multiplicación de brotes y raíces de plántulas de 22 genotipos de chile silvestre regeneradas a partir de semillas germinadas *in vitro*. Bajo un diseño completamente al azar, las semillas fueron germinadas en medio de Murashige y Skoog (MS), posteriormente fueron trasplantadas a frascos que contenían 30 cm³ de medio MS suplementados con 0.0/0.0, 1.0/0.3, 0.3/0.5, 0.5/1.0 mg L⁻¹ de KIN/AIA. Se obtuvo un promedio máximo de 9.68 brotes y 10.90 de raíces con el tratamiento 0.5/1.0 mg L⁻¹ de KIN/AIA. La adición de reguladores de crecimiento promovió la inducción de brotes y raíces en los 22 genotipos silvestres de Chile.

Palabras clave:

Capsicum
Solanaceae
Recursos fitogenéticos
Cinetina
Ácido indol-3-acético

Keywords:

Capsicum
Solanaceae
Plant genetic resources
Kinetin
Indole-3-acetic acid

In vitro culture of 22 wild genotypes of chili from the Región Selva de Chiapas, Mexico

Abstract

Plant genetic resources are the basis of the food security for the world population. Mexico is one of the centers of origin and diversity of several phylogenetic species, including various types of chili. The majority are wild species distributed in most of Mexico and of wide cultural and economic interest. The objective of this study was to determine the optimal concentration of indole-3-acetic acid (IAA) and kinetin (KIN) for the multiplication of seedlings shoots and roots of 22 genotypes of wild chili regenerated from seeds germinated *in vitro*. Under a completely randomized design, the seeds were germinated in medium of Murashige and Skoog (MS), later they were transplanted into flasks containing 30 cm³ of MS medium supplemented with 0.0/0.0, 1.0/0.3, 0.3/0.5, 0.5/1.0 mg L⁻¹ of KIN/ IAA. A maximum average of 9.68 shoots and 10.90 of roots were obtained with 0.5 / 1.0 mg L⁻¹ of KIN/ IAA. The addition of growth regulators promoted the induction of shoots and roots in the 22 wild genotypes of chili.

* Autor para correspondencia:

Banco de Germoplasma Vegetal, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente número 1150, Col. Lajas Maciel, CP. 29014, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Teléfono: +52 9611421493. Correo-electrónico: carolina.orantes@unicach.mx

1. Introducción

El cultivo de *Capsicum* es uno de los cultivos más importantes en México, donde aumenta la demanda para los múltiples usos de los frutos en forma natural o procesada. Se usa como condimento o como materia prima para la obtención de colorantes de oleorresinas y con fines industriales, además de ser una fuente dietética de antioxidantes debido al contenido de flavonoides, compuestos fenólicos, carotenoides, ácido ascórbico, vitamina A y capsaicinoides (Daood et al., 2006; Pugliese et al., 2014).

El centro de origen de *Capsicum* es México y América del Sur (Bosland y Votava, 2000). *Capsicum* proviene del griego *Kapsakes* o cápsula y el nombre común proviene del náhuatl chili (CONABIO, 2019; Montes-Hernández, 2010; SIAP, 2019). El número de especies silvestres que comprende el género *Capsicum* es de 26 (CONABIO, 2019; Montes-Hernández, 2010; SIAP, 2012) y de ellas, son solo cinco las especies domesticadas de Chile que se cultivan en el mundo (CONABIO, 2019; Montes-Hernández, 2010; SIAP, 2019). México, como centro de domesticación, cuenta con las cinco especies cultivadas: *C. annuum* var. *annuum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens*, y la silvestre *C. annuum* var. *glabriusculum* (Bosland y Votava, 2000; CONABIO, 2019; Montes-Hernández, 2010; SIAP, 2019). En México, se pueden encontrar poblaciones silvestres de *C. annuum* y *C. frutescens*, que presentan gran variabilidad morfológica y genética (Castañón-Nájera et al., 2008; Votava et al., 2005). *Capsicum ciliatum* se encuentra en todo el país, con excepción del Noroeste, mientras que *C. lanceolatum* ha sido reportada únicamente en los estados de Chiapas y Veracruz (Hernández-Verdugo et al., 2001; Latournerie et al., 2002).

La extensión y la distribución de la variación genética entre las poblaciones son aspectos importantes para comprender el origen y evolución de las poblaciones vegetales en condiciones naturales. Determinar esta variación genética en razas locales, variedades comerciales y sus parientes silvestres, es útil para fitomejoradores y genetistas de poblaciones, y para todos los involucrados en el uso, manejo y conservación de recursos fitogenéticos (Hamrick y Godt, 1999; Votava et al., 2005). Los parientes silvestres de las especies cultivadas constituyen un recurso genético importante que puede contribuir a resolver problemas agrícolas presentes o futuros relacionados con la tolerancia o la resistencia a plagas y enfermedades, y aumentar la calidad y la cantidad de la producción (Hernández-Verdugo et al., 2001).

Protocolos de regeneración *in vitro* de plantas de Chile se han obtenido a partir de brotes adventicios (Pozueta-Romero et al., 2001), de cultivo de protoplastos y de embriogénesis somática (Kintzios et al., 2001). A pesar de que la regeneración *in vitro* de los chiles se ha logrado a través de diferentes protocolos y formas morfogénicas (Joshi y Kothari, 2007; López-Puc et al., 2006; Valera-Montero y Phillips, 2005), ha sido difícil establecer protocolos

eficientes, confiables y de amplio espectro para los miembros de este género, debido a la alta diversidad de los genotipos existentes, lo que resulta en una gran variedad de respuestas al cultivo de tejidos *in vitro*; por lo tanto, es necesario establecer sistemas confiables de regeneración para los chiles, especialmente para los genotipos desarrollados con fines comerciales (Valadez-Bustos, 2009). El uso de reguladores de crecimiento en investigaciones con *C. annuum* confirma el efecto sinérgico de la combinación de citokininas (KIN) con auxinas (AIA) en la regeneración de brotes adventicios (Kumar et al., 2005; Peddaboina et al., 2005).

Por ello, en el presente estudio se determinó la óptima concentración de ácido indol-3-acético (AIA) y cinetina (KIN) para la proliferación de brotes y raíces en plántulas de 22 genotipos de Chile silvestre regeneradas a partir de semillas germinadas *in vitro*.

2. Materiales y métodos

2.1. Área de recolecta del material genético

El área de recolecta fue la región Selva en Chiapas, México, los frutos maduros de 22 genotipos silvestres de Chile se recolectaron de localidades de los municipios de Palenque, Yajalón, Ocosingo y Chilón, Chiapas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Genotipos silvestres de Chile de la región Selva, Chiapas, México

Genotipos	Localidad	Coordenadas	
		Latitud N	Longitud O
Jataté	Chilón	17° 6' 13''	92° 17' 1''
Volte	Chilón	17° 6' 13''	92° 17' 1''
Mira pa' rriba (Lekil lum)	Ocosingo	16° 54' 21''	92° 5' 37''
Moju	Palenque	17° 30' 35''	91° 58' 49''
Ocosingo	Ocosingo	16° 54' 21''	92° 5' 37''
Bolita	Ocosingo	16° 54' 21''	92° 5' 37''
Tonich	Ocosingo	16° 54' 21''	92° 5' 37''
7 caldos San Rafael	Yajalón	17° 10' 15''	92° 19' 51''
Manzana	Yajalón	17° 10' 15''	92° 19' 51''
Habanero Palenque	Palenque	17° 30' 35''	91° 58' 49''
Chilon	Chilón	17° 6' 13''	92° 17' 1''
Güero	Ocosingo	16° 54' 21''	92° 5' 37''
Jalapeño	Palenque	17° 30' 35''	91° 58' 49''
7 caldos	Ocosingo	16° 54' 21''	92° 5' 37''
Relleno	Yajalón	17° 10' 15''	92° 19' 51''
Mira pal' cielo	Ocosingo	16° 54' 21''	92° 5' 37''
Tempenchile	Ocosingo	16° 54' 21''	92° 5' 37''
Habanero pamalá	Palenque	17° 30' 35''	91° 58' 49''
Seco Palenque	Palenque	17° 30' 35''	91° 58' 49''
Simojovel	Ocosingo	16° 54' 21''	92° 5' 37''
Mira pa' rriba (Yajalón)	Yajalón	17° 10' 15''	92° 19' 51''
Volte seco	Chilón	17° 6' 13''	92° 17' 1''

2.2. Desinfección de semillas y germinación *in vitro*

Las semillas fueron extraídas de los frutos maduros, se lavaron con agua destilada esterilizada y jabón comercial, se desinfectaron con una solución 1% (p/v) de agri-micyn500® (estreptomicina:oxitetraciclina:sulfato tribásico de cobre) durante 20 min, se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada, posteriormente con etanol al 70% (v/v) durante 5 min, y por último se sumergieron en hipoclorito de calcio al 10% (p/v) durante 20 min y se lavaron tres veces en agua destilada estéril.

Se prepararon 207 frascos (150 mL) conteniendo cada uno 30 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 30 g de sacarosa, 0.1 g de myo-inositol, 0.05 g de NaHPO₄ y solidificado con 2.5 g de phytigel Sigma®, se esterilizaron a 1.5 kg cm⁻² durante 15 min. Las semillas desinfectadas fueron colocadas tres en cada frasco esterilizados cerrado con tapas de polipropileno sellados con polietileno (kleen pack®) y se incubaron en una cámara bioclimática a 25±1 °C, bajo luz blanca fría fluorescente (50 μmol m⁻² s⁻¹) y fotoperiodo de 16 h luz, 8 h de oscuridad.

2.3. Inducción de brotes y raíces

Las semillas germinadas después de 40 días fueron trasplantadas a frascos que contenían 30 mL de MS suplementados con cinetina (KIN) en concentraciones de 0.0, 0.3, 0.5, 1.0 mg L⁻¹ y ácido indol-3-acético (AIA) en

concentraciones de 0, 0.3, 0.5, 1.0 mg L⁻¹. Cada frasco contenía un brote. Los frascos fueron cerrados con tapas de polipropileno y sellados con polietileno (kleen pack®) y se incubaron en una cámara bioclimática a 25 ± 1 °C, bajo luz blanca fría fluorescente (50 μmol m⁻² s⁻¹) y fotoperiodo de 16 h luz, 8 h de oscuridad.

Para evaluar los efectos de KIN y AIA sobre la formación de brotes y raíces, se utilizó un diseño completamente al azar, con 4 tratamientos (0.0/0.0, 1.0/0.3, 0.3/0.5, 0.5/1.0 mg L⁻¹ de KIN/AIA) y 3 repeticiones cada uno.

2.4. Análisis estadístico

La duración del experimento fue de 60 días. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey (P<0.05) utilizando el software SAS (The SAS System®) versión 9.4.

3. Resultados y Discusión

Las semillas germinaron a los 40 días después de la siembra, los porcentajes máximos de germinación final fueron del 100% en los genotipos Mira pa'rriba (Yajalón), Volte seco, Simojovel y 7 caldos; Tonich fue el genotipo que presentó el porcentaje de germinación final más bajo (85.75%) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Germinación final (%) *in vitro*, sobre la inducción de brotes y raíces de los 22 genotipos de chiles silvestres de la región Selva, Chiapas, México.

Genotipos	Germinación (%)	Brotes	Raíces
Jataté	90.25±0.17 gh	3.25±0.70 e	5.75±0.00 bc
Volte	93.29±0.14 def	6.03±0.33 bcdef	6.46±0.50 abc
Mira pa'rriba (Lekil lum)	91.25±0.35 fgh	4.50±0.00 ef	6.00±0.17 bc
Moju	93.25±0.03 def	5.75±0.00 bcdef	5.50±0.17 bc
Ocosingo	90.75±0.35 gh	4.75±0.17 ef	6.25±0.00 bc
Bolita	90.00±0.17 h	4.50±0.00 ef	6.75±0.00 abc
Tonich	85.75±2.29 i	6.00±0.02 bcdef	5.25±0.17 bc
7 caldos San Rafael	90.00±0.17 h	5.00±0.17 def	7.25±0.00 abc
Manzana	90.50±0.17 gh	5.75±0.17 bcdef	7.00±0.17 abc
Habanero Palenque	98.25±1.23 ab	4.25±0.17 ef	5.75±0.00 bc
Chilon	91.75±0.35 efgh	4.50±0.17 ef	6.75±0.17 abc
Güero	92.25±0.17 defgh	5.75±0.00 bcdef	7.00±0.00 abc
Jalapeño	94.50±1.59 cd	6.00±0.00 bcdef	6.25±0.70 bc
7 caldos	100±0.00 a	9.75±0.00 a	8.25±0.70 ab
Relleno	90.25±0.17 gh	5.25±0.35 cdef	6.75±0.00 abc
Mira pal'cielo	96.75±1.06 bc	6.50±0.17 bcde	5.75±0.17 bc
Tempenchile	93.75±0.53 de	7.75±0.17 abcd	5.25±0.86 bc
Habanero pamalá	92.50±0.53 defg	8.50±0.88 ab	5.75±0.00 bc
Seco Palénque	93.50±0.17 def	8.00±0.35 abc	5.75±0.00 bc
Simojovel	100±0.00 a	6.75±0.70 bcde	7.25±0.35 abc
Mira pa'rriba (Yajalón)	100±0.00 a	9.75±0.00 a	7.75±0.35 abc
Volte seco	100±0.00 a	9.75±0.00 a	9.25±0.00 a
C.V	0.99	18.07	18.07
D.M.S	2.36	2.81	2.81

Media±desviación estándar. ^{a-i} Valores con diferentes letras dentro de las columnas son significativamente diferentes, prueba de Tukey (P<0.05).

Las respuestas de los genotipos a los tratamientos fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.0001$). Los genotipos Mira pa'rriba (Yajalón), Volte seco y 7 caldos presentaron el máximo número de brotes y raíces, la variedad Jataté mostró el número más bajo de brotes (3.25 ± 0.707) (Cuadro 2). El mayor número de brotes y raíces se observó en el tratamiento adicionado con $0.5/1.0 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN/AIA, con un promedio de 9.68 y 10.90, respectivamente (Cuadro 3). Los reguladores de crecimiento (KIN y AIA) promovieron la inducción de brotes y raíces en los 22 genotipos silvestres de Chile. Varios autores (Christopher y Rajam, 1996; Kintzios et al., 2001; Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1996; Valadez-Bustos et al., 2009; Valera-Montero y Ochoa-Alejo, 1992; Valera-Montero y Phillips, 2005) han demostrado, en otros genotipos de Chile, que el uso de KIN y AIA promueven la generación de brotes y raíces; el tipo de respuesta de estos

reguladores del crecimiento, no solo depende de su presencia sino también sus concentraciones determinan el efecto. En este trabajo, todos los medios que contenían KIN y AIA permitieron la morfogénesis, y la magnitud de respuesta estuvo en función de las concentraciones de los reguladores de crecimiento. En la micropropagación de *Capsicum chinense*, en explantes apicales cultivados en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con $23.2 - 93.0 \mu\text{M}$ kinetina (KIN) solo o combinado con $5.7 \mu\text{M}$ ácido 3-indolacético (AIA), el máximo número de brotes se obtuvo en el medio que contenía $4.7 \mu\text{M}$ KIN combinado con AIA (Sanatombi y Sharma, 2008). La no formación de raíces es un obstáculo importante en la micropropagación en condiciones *in vitro*, ya que el enraizamiento podría tener un efecto importante en el establecimiento después de la transferencia *ex vitro* (De Klerk, 2002).

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de cinetina (KIN) y ácido indolacético (AIA) sobre el número de brotes y raíces en plántulas de 22 genotipos de *Capsicum* spp. cultivadas *in vitro*.

Tratamiento	KIN (mg L^{-1})	AIA (mg L^{-1})	Brotes	Raíces
1	0	0	4.03 ± 1.56	4.07 ± 0.89
2	1.0	0.3	6.98 ± 2.26	6.93 ± 1.09
3	0.3	0.5	4.07 ± 1.54	4.10 ± 0.99
4	0.5	1.0	9.68 ± 2.64	10.90 ± 1.72

Media \pm desviación estándar

4. Conclusión

Los genotipos de Chile Mira pa'rriba (Yajalón), Volte seco y 7 caldos presentaron 100 % de germinación y el máximo número de brotes y raíces. El tratamiento suplementado con $0.5/1.0 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN/AIA, obtuvo el promedio máximo de brotes y raíces (9.68 y 10.90, respectivamente), comparado con el testigo que logró 4.03 de brotes y 4.07 de raíces por plántula. La adición de reguladores de crecimiento promovió la inducción de brotes y raíces en los 22 genotipos silvestres de Chile.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Bosland PW, Votava EJ. 2000. Peppers: Vegetable and spice capsicums. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Castañón-Nájera G, Latournerie-Moreno L, Mendoza-Elos M, Vargas-López A, Cárdenas-Morales H. 2008. Colección y caracterización de Chile (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México. International Journal of Experimental Botany 77: 189-202.
- Christopher T, Rajam MV. 1996. Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. Plant Cell Tissue and Organ Culture 46: 245-250.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). <https://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/alimentacion/chile.html>. Fecha de consulta 20 de octubre de 2019.
- Daood HG, Kapitány J, Biacs P, Albrecht K. 2006. Drying temperature, endogenous antioxidants and capsaicinoids affects carotenoid stability in paprika (red pepper spice). Journal of the Science of Food and Agriculture 86(14): 2450-2457.
- De Klerk GJ. 2002. Rooting of microcuttings: Theory and practice. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 38: 415-422.
- Hamrick JT, Godt MJW. 1999. Allozyme diversity in cultivated crops. Crop Science 37: 26-30.
- Hernández-Verdugo S, Oyama K, Vázquez-Yanes C. 2001. Differentiation in seed germination among populations of *Capsicum annuum* along a latitudinal gradient in Mexico. Plant Ecology 155: 245-257.
- Hernández-Verdugo S, Guevara-González RG, Rivera-Bustamante RF, Vázquez-Yanes C, Oyama K. 1998. Los parientes silvestres del Chile (*Capsicum* spp.) como recursos genéticos. Boletín de la Sociedad Botánica de México 62: 171-181.
- Joshi A, Kothari SL. 2007. High copper levels in the medium improves shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. Plant Cell Tissue Organ and Culture 88: 127-133.
- Kintzios S, Drossopoulos JB, Lymperopoulos CH. 2001. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. Plant Cell Tissue Organ and Culture 67: 55-62.
- Kumar V, Gururaj HB, Narasimha BC, Giridhar P, Ravishankar GA. 2005. Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. Scientia Horticulturae 106: 237-246.

- Latournerie ML, Chávez SJL, Pérez PM, Castañón N, Rodríguez HSA, Arias RLM, Ramírez VP. 2002. Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 25-33.
- López-Puc G, Canto-Flick A, Barredo-Pool F, Zapata-Castillo P, Montalvo-Peniche MC, Barahona-Pérez F, Santana-Buzzy N. 2006. Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Scientia Horticulturae* 41: 1645–1650.
- Montes-Hernández S. 2010. Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Capsicum* que crecen y se cultivan en México. Informe Final. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, D.F.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Peddaboina V; Thamidala C; Subhash K. 2005. Selection of atrazine- resistant plants by *in vitro* mutagenesis in pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 83: 75–82.
- Pozueta-Romero J, Houlné G, Cañas L, Schantz R, Chamarro J. 2001. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 67: 173-180.
- Pugliese A, O’Callaghan Y, Tundis R, Galvin K, Menichini F, O’Brien N, Loizzo MR. 2014. *In vitro* investigation of the bioaccessibility of carotenoids from raw, frozen and boiled red chili peppers (*Capsicum annuum*). *European Journal of Nutrition* 53: 501–510.
- Ramírez-Malagón R, Ochoa-Alejo N. 1996. An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Reports* 16: 226-231.
- Sanatombi K, Sharma GJ. 2008. *In vitro* propagation of *Capsicum chinense* Jacq. *Biologia Plantarum* 52(3): 517-520.
- Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera (SIAP). <https://www.gob.mx/siap/es/archivo/documentos>. Fecha de consulta 20 de octubre de 2019.
- Valadez-Bustos MG, Aguado-Santacruz GA, Carrillo-Castañeda G, Aguilar-Rincón VH, Espitia-Rangel E, Montes-Hernández S, Robledo-Paz A. 2009. *In vitro* propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper (*Capsicum* spp.) plants from commercially important genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 45: 650–658.
- Valera-Montero L.; Phillips G.-C. 2005. Long-lasting *Capsicum baccatum* ‘organogenic callus’ formation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41: 470–476.
- Votava EJ, Baral JB, Bosland PW. 2005. Genetic diversity of chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) landraces from northern New Mexico, Colorado, and Mexico. *Economic Botany* 59(1): 8-17.