



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® (estreptomocina: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.