

Micropropagación de chiltepín (*Capsicum annuum* L. cv. 'glabriusculum') mediante el empleo de una oligosacarina de origen péctico

Micropropagation of chiltepín (*Capsicum annuum* L. cv. 'glabriusculum') by applying a pectic oligosaccharide

Humberto Izquierdo Oviedo^{***}; Lilia Alcaraz Meléndez^{**}, Margarito Rodríguez-Álvarez^{**}

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un oligogalacturonido de origen péctico (Pectimorf) en la micropropagación del chiltepín (*Capsicum annuum* L. cv. 'glabriusculum') y la adaptación al trasplante. Se indujeron brotes en cultivo *in vitro* de segmentos nodales de 30 días de edad provenientes de vitropiantas de chiltepín, obtenidas en un medio *Murashige Skoog* (MS) suplementado con 6-BAP 10^{-5} M. El mayor número de brotes, masa fresca y seca por explante fue en medio MS enriquecido con Pectimorf (1 mg.L⁻¹). En el momento de la transferencia de las plántulas obtenidas con Pectimorf (1 mg.L⁻¹ - 10 mg.L⁻¹) de las fases *in vitro* a la *ex vitro*, la supervivencia fue del 100%, lo cual se mantuvo con posterioridad. Asimismo, las plantas que se obtuvieron con esta oligosacarina, generalmente presentaron mayor contenido de clorofilas α , β y feopigmentos. Los mejores resultados fueron en las plántulas tratadas con Pectimorf (10 mg.L⁻¹).

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of a pectic oligogalacturonide (PectiMorf®) in the micropropagation of chiltepín (*Capsicum annuum* L. cv. 'glabriusculum') and its adaptation to transplant. Multiple shoots were obtained by *in vitro* culture of nodal segments of 30-day-old plantlets from chiltepín, using a MS medium supplemented with BAP 10^{-5} M. The highest number of shoots, measuring fresh and dry mass per explant, was obtained in MS medium enriched with Pectimorf (1 mg.L⁻¹). At the time of lifting and resetting plantlets with Pectimorf (1 mg.L⁻¹-10 mg.L⁻¹) *in vitro* to *ex vitro*, the survival rate was of 100%, which was maintained thereafter, obtaining a greater number and length of roots, as well as vigor, than in control plants and those treated with BAP. Also, plants obtained with these oligosaccharides generally showed higher content in chlorophyll α and β , and phaeopigments. The best results were achieved in plantlets treated with Pectimorf (10 mg.L⁻¹).

INTRODUCCIÓN

Los chiles son vegetales de gran importancia económica para México y otras regiones del mundo, pertenecen a la familia Solanaceae y al género *Capsicum*. Dentro de las cinco especies más cultivadas, *Capsicum annuum* L. es la más ampliamente conocida y la de mayor importancia económica ya que presenta una distribución mundial, México es el país que presenta la mayor variabilidad de formas cultivadas y silvestres, la cual se encuentra ampliamente distribuida en el país. Esta diversidad ha sido descrita con base en la clasificación comercial de los frutos, realizada dentro de diversos tipos de chile (Latournerie *et al.*, 2010).

Se desarrolla desde cerca del nivel del mar hasta los 2500 m. s. n. m., abarcando diferentes regiones de México, razón por la cual se encuentra

Recibido: 15 de junio del 2016
 Aceptado: 14 de septiembre del 2017

Palabras clave:

Chiltepín; micropropagación; multiplicación; Pectimorf; trasplante *ex vitro*.

Keywords:

Chiltepín; micropropagation; multiplication; Pectimorf; transplant *ex vitro*.

Cómo citar:

Izquierdo Oviedo, H., Alcaraz Meléndez, L., & Rodríguez-Álvarez, M. (2017). Micropropagación de chiltepín (*Capsicum annuum* L. cv. 'glabriusculum') mediante el empleo de una oligosacarina de origen péctico. *Acta Universitaria*, 27(5), 3-12. doi: 10.15174/au.2017.1452

* Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera a Tapaste Km. 3 ½ San José de las Lajas. Mayabeque. Cuba. C. P. 32700.

** Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Instituto Politécnico Nacional # 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B. C. S., México, C.P. 23096. Correo electrónico: lalcaraz04@cibnor.mx

° Autor de correspondencia.

chile en el mercado todo el año. Por lo que su consumo es muy generalizado en fresco e industrializado en diversas modalidades (Latournerie *et al.*, 2010). El chile “chiltepin” (*Capsicum annuum* cv. ‘*glabriusculum*’) prácticamente se encuentra en todo México, sobre todo en las zonas aledañas a las costas, en donde registra gran variación y usos desde estado inmaduro, maduro, en salsas, deshidratado y en escabeche (Latournerie *et al.*, 2010).

Diferentes tipos de explantes han sido empleados para la regeneración de plantas tales como meristemas apicales (Christopher & Rajam, 1996), hojas, hipocotilos, cotiledones, raíces y embriones (Agrawal, Chandra & Kothari, 1989) para inducir la embriogénesis somática (Kintzios, Drossopoulos & Lymperopoulos, 2000). Sin embargo, dichas investigaciones no informan resultados satisfactorios en cuanto a la regeneración de plantas normales, porque ocurren desórdenes fisiológicos como una baja elongación de las plántulas, formación de rosetas y de brotes anormales (Ochoa-Alejo & Ramírez-Malagón, 2001).

La 6-bencilaminopurina (BAP) es un potente regulador del crecimiento con actividad citoquinina y ha mostrado buenos resultados en diferentes sistemas de cultivo de chile en germinación y organogénesis, entre otras (Ochoa-Alejo & Ramírez-Malagón, 2001; Robles-Paz & Carrillo-Castañeda, 2004).

Los oligogalacturónidos son oligosacáridos que son liberados de los polisacáridos pécticos, que componen la pared celular durante la degradación de estas estructuras por las enzimas pécticas de la propia planta o proveniente de los microorganismos que invaden los tejidos vegetales, posee capacidad para inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento de los callos e incrementar de forma notable el desarrollo y vigor de las vitroplantas de diferentes cultivos (Cid, González-Olmedo, Lezcano & Nieves, 2006); promueven diferentes procesos morfogénicos, fisiológicos y bioquímicos en las plantas y se utilizan en los medios de cultivo en diferentes concentraciones (1 mg.L^{-1} - 15 mg.L^{-1}), rango similar al que se emplea para los reguladores tradicionales al expresarlas en unidades de concentraciones molares (10^{-7} M - 10^{-6} M) (Simpson, Ashford, Harvey & Bowles, 2007). Regular, entre otros procesos, la interacción entre las auxinas, citoquininas, giberelinas y el etileno (Souter, Pullen, Topping, Zhang & Lindsey, 2004), por lo que su introducción a mayor escala en los procesos biotecnológicos pudiera hacerlos más eficientes. Los oligogalacturónidos se han empleado en micropropagación por organogénesis o embriogénesis somática en diferentes

cultivos como plátanos (*Musa paradisiaca*, L.) (Díaz *et al.*, 2004; Izquierdo, 2014), caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Nieves *et al.*, 2006), mandarina (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) (Hernández *et al.*, 2007) y *Spathiphyllum* sp. (Hernández, Suárez & Valcárcel, 2009), entre otros. Sin embargo, nunca se ha empleado en la micropropagación del chiltepin, como sustituto de las hormonas tradicionales, que permita incrementar el número de brotes por explante y la calidad de las vitroplantas que se obtengan.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un oligogalacturónido de origen péctico (Pectimorf) en la micropropagación del chiltepin (*Capsicum annuum* L. cv. ‘*glabriusculum*’) estimulando meristemas preexistentes y la sobrevivencia al transplantarlos a macetas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (Cibnor), que está ubicado en La Paz, Baja California Sur, México.

Material vegetal

Se emplearon explantes (segmentos nodales de 1 cm - 1.5 cm de longitud), sembrados en posición vertical, provenientes de vitroplantas de chiltepin (*Capsicum annuum* L.) cv. ‘*glabriusculum*’ (Dunal) Heiser and Pickergill, (accesión CIB #2 Mayo 2014), de 30 días de edad, obtenidos *in vitro* en medio Murashigue y Skoog (1962) (MS) adicionado con 10^{-5} M de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) a partir de plántulas *in vitro*, obtenidas de semillas y transferidas cada 30 días.

Medio de Cultivo

Se empleó como medio basal el MS con vitaminas, suplementado con 6.5 g.L^{-1} de agar y 3% sacarosa. El pH se ajustó a 5.8 antes de realizar la esterilización del mismo en autoclave a 1.5 atm de presión y $121 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura durante 20 min.

Los tratamientos que se emplearon se muestran en la tabla 1. En todos los casos se emplearon 20 mL de medio de cultivo por frasco y se trasplantó un explante. Todos los frascos se sellaron con plástico adhesivo. Se llevaron a cabo 10 repeticiones por tratamiento y tres experimentos independientes, sumando un total de 30 repeticiones por tratamiento.

Tabla 1.

Promedio del número de brotes por explante durante el cultivo *in vitro* de plántulas de chiltepin (*Capsicum annuum* L.) cv. 'glabriusculum', a los 30, 60 y 90 días. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tukey, $p \leq 0.05$). Número de muestras ($n = 15$).

Número	Tratamientos	Días		
		30	60	90
1	MS	0.4d	0.5d	0.6d
2	BAP 10 ⁻⁵ M	0.4d	0.4d	0.5d
3	Pectimorf 1mg.L ⁻¹	2.6a	2.9a	3.3a
4	Pectimorf 5 mg.L ⁻¹	1.3c	1.5c	1.8c
5	Pectimorf 10 mg.L ⁻¹	1.5b	1.8b	2b

Fuente: Elaboración propia.

Condiciones de cultivo

Todos los frascos con los explantes se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 28 °C ± 2 °C, a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos entre 220 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ - 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y subcultivados los explantes cada 30 días al mismo medio de cultivo.

A partir de los siete días, se evaluó:

1. El total de explantes vivos para determinar posteriormente el porcentaje de supervivencia de las plántulas que se obtuvieron.
2. Formación de nuevos brotes.
3. Tiempo en que se formaron los brotes (días).
4. Vigor: 1.- Poco vigoroso, 2.- Vigoroso; 3.- Muy vigoroso. Esta evaluación se realizó por apreciación visual.
5. Altura de las vitroplantas (cm).
6. Total de explantes enraizados para determinar con posterioridad el porcentaje de enraizamiento de las plántulas que se obtuvieron.
7. Número de raíces por plántulas.
8. Longitud de las raíces (cm).
9. Cuantificación de clorofila α , β y feopigmentos.

En el momento de la transferencia de las plántulas a la fase de aclimatización se evaluó:

1. Masa fresca de las plántulas (g).
2. Masa seca de las plántulas (g).

Se transfirieron a un invernadero con paredes de policarbonato y climatizado con aire acondicionado con

temperatura de 26 °C ± 2 °C y 70% ± 5% de humedad relativa. Después de 50 días de transferencia a las macetas se evaluó la tasa de crecimiento en porcentaje.

Se determinó contenido de clorofila α (mg.g MS⁻¹), contenido de clorofila β (mg.g MS⁻¹), contenido de feopigmentos (mg.g MS⁻¹). Por medio de la metodología de Parsons, Maita & Lalli (1984) en un espectrofotómetro (Beckman modelo DU 640)

Diseño experimental y análisis de los datos

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con 10 frascos por tratamiento y el mismo se repitió tres veces. Los datos se procesaron mediante Análisis de Varianza de Clasificación Simple (ANOVA) con el programa SPSS 11.5 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL) y la comparación entre las medias se realizó de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) y Holm-Sidak ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de supervivencia

Los resultados relacionados con el porcentaje de supervivencia de los explantes *in vitro* de chiltepin se reflejan en la figura 1. Como se puede observar en general, hubo diferencias significativas entre los tratamientos a los 30, 60 y 90 días. De forma general, se observó que la supervivencia de los explantes se incrementó desde los 30 hasta los 90 días. En sentido general, la supervivencia de los explantes fue alta en esta fase en los tratamientos 1 (MS), 3 (MS + Pectimorf 1 mg/L) y 4 (MS + Pectimorf 5 mg/L a los 90 días fue de 100%, para el tratamientos 2 fue de 80% en el mismo período de tiempo (tabla 1), al parecer el efecto acumulativo del 6-BAP afectó este parámetro, así como las altas concentraciones de Pectimorf (10 mg.L⁻¹) y en el tratamiento 5 (MS + Pectimorf 10 mg/L) fue de 80% en el mismo período de tiempo. La alta supervivencia *in vitro* de las plántulas pudiera deberse a la activación de la biosíntesis de las oligosacarinas (Côté & Hahn, 1994) y por consiguiente influir en el posterior crecimiento y desarrollo de las mismas.

Formación de nuevos brotes

Con respecto al número de brotes por explante hubo diferencias significativas entre los tratamientos que se evaluaron a los 30, 60 y 90 días (tabla 1). Los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó el Pectimorf en las diferentes concentraciones, el tratamiento 3 (MS + Pectimorf 1 mg.L⁻¹), fue el mejor con 2.60 brotes (30 días), 2.85 brotes (60 días) y 3.00 brotes

(90 días) y los resultados más bajos fueron los del tratamiento 2 (MS + 6-BAP 10^{-5} M).

La morfogénesis ocurrió en todos los explantes con independencia del tratamiento, pero fue superior en las plántulas que se obtuvieron con Pectimorf (1 mg.L^{-1} , 5 mg.L^{-1} y 10 mg.L^{-1}). Sin embargo, este proceso fue muy bajo en los tratamientos 2 (6-BAP 10^{-5} M) y 1 (MS), por lo que estos resultados pudieran deberse a la concentración de fitohormonas de los segmentos nodales de chiltepin. Sin embargo, Ahmad, Siddique & Anis (2006) informó que no ocurrió formación de brotes en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.

Valadez-Bustos *et al.* (2009), evaluaron el efecto de diferentes medios de cultivo y fitohormonas inducción de brotes y regeneración de plantas provenientes de *Capsicum annuum* var. *annuum* (Jalapeño y Serrano), *C. annuum* var. *glabriusculum/aviculare* (Piquín), and *C. chinense* (Habanero), empleando explantes de cotiledones. Obtuvieron un alto porcentaje de formación de brotes de Habanero en el medio de cultivo MS adicionado con las fitohormonas ácido indol 3 acético y 6-BAP. Posteriormente Li, Zhao & Xie (2003) obtuvieron alto porcentaje de regeneración de brotes, a partir de explantes de cotiledones de pimiento en un medio MS suplementado con 0.5 mg.dm^{-3} de thidiazuron (TDZ).

Sanatombi & Sharma (2007) concluyeron que el cultivar 'Morok Amuba' genera el mayor número de brotes por explante (4.7), obtuvieron en un medio de cultivo con alta concentración de zeatina (10 mg.L^{-1}), pero sin diferencias estadísticamente significativas de los tratamientos que estaban suplementados con 6-BAP (5 mg.L^{-1}) y AIA (1 mg.L^{-1}) y 6-BAP (10 mg.L^{-1}) y AIA (1 mg.L^{-1}), con 4.4 y 3.8 brotes por explante, respectivamente.

Esta respuesta diferencial puede deberse a la especie, tipo de explante, reguladores del crecimiento y concentraciones de los mismos.

En el cultivar 'California Wonder', algunos explantes no completaron su ciclo de crecimiento cuando los mismos fueron transferidos de un medio de inducción de brotes a otro de elongación (Elwan, 2009). Sin embargo, esto no se observó en este trabajo, ya que no hubo que transferir los explantes de un tipo de medio de cultivo a otro; la inducción de brotes y la elongación de los mismos se produjeron en el mismo medio de cultivo.

Evaluación de variables morfológicas

Los resultados relacionados con la evaluación de diferentes variables morfológicas *in vitro* se muestran en la tabla 2. En todos los casos hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Tanto en el número de raíces como en su longitud del tallo, los mejores resultados se alcanzaron con el tratamiento 5 (MS + Pectimorf 10 mg.L^{-1}), incrementándose los valores de las mismas en el transcurso del tiempo (30, 60 y 90 días). Sin embargo, las plántulas más vigorosas fueron las del tratamiento 3 (MS + Pectimorf [1 mg.L^{-1}]), sin diferenciarse estadísticamente de las plántulas del tratamiento 4 (MS + Pectimorf [5 mg.L^{-1}]) a los 90 días, pero sí del resto de los tratamientos (figura 1).

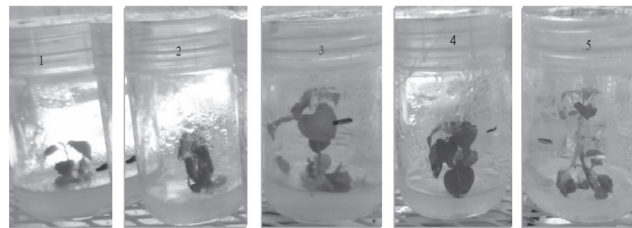


Figura 1. Vigor de las plántulas de chiltepin (*Capsicum annuum* L.) cv. 'glabriusculum', en el momento de la transferencia a la fase de aclimatización (120 días). 1.- MS [vigorosas]; 2.- MS + 6-BAP (10^{-5} mM) [poco vigorosas]; 3.- MS + Pectimorf (1 mg.L^{-1}) [muy vigorosas]; 4.- MS + Pectimorf (5 mg.L^{-1}) [muy vigorosas] y 5.- MS + Pectimorf (10 mg.L^{-1}) [muy vigorosas].
Fuente: Elaboración propia

Tabla 2.

Variables morfológicas que se evaluaron durante el cultivo *in vitro* de plántulas de chiltepin (*Capsicum annuum* L.) cv. 'glabriusculum', a los 30, 60 y 90 días. 1. Plántulas poco vigorosas 2. Plántulas vigorosas 3. Plántulas muy vigorosas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tukey, $p \leq 0.05$). Número de muestras ($n = 15$).

Tratamientos	Número de raíces por plántulas (promedio)			Longitud de las raíces de las plántulas (cm)			Vigor de las plántulas		
	días			días			días		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90
1. MS	0.45d	0.45d	0.50d	2.74d	2.86d	3.00d	1b	2b	2b
2. MS + 6-BAP (10^{-5} M)	0.15e	0.15e	0.15e	1.12e	1.16e	1.20e	1b	1c	1c
3. MS + Pectimorf (1 mg.L^{-1})	2.70c	2.80c	2.85c	3.01c	3.18c	3.26c	2a	3a	3a
4. MS + Pectimorf (5 mg.L^{-1})	3.40b	3.65b	3.70b	3.33b	3.42b	3.50b	2a	2b	3a
5. MS + Pectimorf (10 mg.L^{-1})	4.15a	4.60a	4.90a	3.45a	3.54a	3.62a	1b	2b	3a

Fuente: Elaboración propia.

El 100% de los explantes en los tratamientos con Pectimorf enraizaron, mientras que solo entre el 45% - 50% y el 15% de los explantes en el medio de cultivo MS (control) y MS + 6-BAP 10^{-5} M, emitieron raíces. Como se puede observar al aplicar los tratamientos probados, se estimuló la producción de brotes y enraizamiento con los tratamientos probados. Ahmad *et al.* (2006) en plantas de chile obtuvieron entre 56.6% - 90% de enraizamiento en medios de cultivo suplementados con ácido indol acético (AIA), ácido naftalen acético (ANA) y ácido indol butírico (AIB), a concentraciones entre $0.5 \mu\text{M}$ - $1.5 \mu\text{M}$. También informaron que las plántulas solo obtuvieron el mayor número de raíces en un medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de AIB.

La literatura relacionada con el efecto de los oligogalacturónidos en el enraizamiento de las plantas es diversa, por ejemplo, en papaya la acción sinérgica del AIB con 9 mg L^{-1} de Pectimorf permitió obtener plantas *in vitro* con mayor número de raíces, un alto porcentaje de enraizamiento y un menor porcentaje de estomas abiertos permitiendo alcanzar un 76.2% de supervivencia en condiciones *ex vitro* (Posada-Pérez *et al.*, 2016), sin embargo, no existen referencias hasta el presente del empleo de oligosacarinas en procesos de micropropagación de *Capsicum* spp.

Navazio *et al.* (2002) informaron que en miniexplantes de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), la adición al medio de cultivo de concentraciones micromolares de un oligogalacturónido inhibió la formación de las raíces y este efecto se revirtió cuando se incrementó en el medio de cultivo la concentración de una auxina. Posteriormente, Suárez & Hernández (2008) informaron que el empleo de Pectimorf (10 mg.L^{-1} o 15 mg.L^{-1}) como sustituto del ANA incrementó el número de hojas y raíces por vitroplanta en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar 'CMC-40'.

Otros autores plantearon que la violeta africana (*Saintpaulia ionantha* L.), la caña de azúcar (*Saccharum* spp.), así como los plátanos y bananos (*Musa* spp.) incrementaron el número de hojas y raíces, área foliar, masa fresca y seca, así como en la longitud de las raíces (Falcón & Cabrera, 2007; Izquierdo, 2014; Nieves *et al.*, 2006). Estos resultados, pudieran estar dados porque las dosis que se emplearon de Pectimorf fueron capaces de propiciar el balance de fitohormonas adecuado, para estimular el proceso de división y alargamiento celular.

Lo expuesto anteriormente es similar a los resultados que se obtuvieron en este trabajo, por lo que sería

interesante continuar profundizando en los efectos fisiológicos de los oligogalacturónidos en los diferentes procesos morfogénicos en el chiltepín, cultivar 'glabriusculum' accesión CIB #2 Mayo 2014, así como realizar estudios en los que se combine una auxina con el Pectimorf, lo cual pudiera aumentar la eficiencia del proceso de micropropagación en este genotipo de gran importancia para el consumo y la venta en frontera de la región de Baja California Sur, México.

Transferencia de las plántulas a la fase de aclimatización

A los 120 días, que fue el momento en que las plántulas se transfirieron a la fase de aclimatización, período en el que se logró un mayor desarrollo de brotes y raíces, las provenientes de los tratamientos 1 (MS), 3 (MS + Pectimorf [1 mg.L^{-1}]) y 4 (MS + Pectimorf [5 mg.L^{-1}]), alcanzaron el 100% de supervivencia, y se diferenciaron estadísticamente de las plántulas de los tratamientos 2 [MS + 6-BAP (10^{-5} M)] y 5 [MS + Pectimorf (10 mg.L^{-1})] con 80% de supervivencia.

La supervivencia de las vitroplantas fue eficiente, ya que osciló entre 80% - 100%. Orlińska & Nowaczyk (2015) informaron una supervivencia similar entre 85% - 95%, en cuatro genotipos de *Capsicum* spp. Resultados similares a los anteriores fueron expuestos por otros autores (Kumar *et al.*, 2007; Kumar, Rupavathi & Subba, 2012; Sanatombi & Sharma, 2007). Sin embargo, los resultados expuestos por Grozeva, Rodeva & Todorova (2012) en dos cultivares de pimiento dulce, la aclimatización fue buena en la variedad 'stryama' (83.3%) y regular en la variedad 'maritsa' (68.7%).

El empleo del Pectimorf a la concentración de 10 mg.L^{-1} en *Anthurium cubense* L. en la fase de aclimatización fue del 90% y las características morfológicas de las vitroplantas fueron superiores a las de las plantas donantes (Montes, Aldaz, Cevallos, Cabrera & López, 2000) y en esquejes de *Psidium guajava* L. cv. 'enana roja', a la concentración de 20 ppm (20 mg.L^{-1}), la supervivencia fue del 80% (Ramírez, Cruz & Franchialfaro, 2003).

Si bien la supervivencia es el principal indicador que se evalúa en la aclimatización de las plantas, es preciso realizar una caracterización más profunda de las mismas que permita explicar el mejor porcentaje de supervivencia que se obtuvo cuando se empleó el Pectimorf en la micropropagación de chiltepín cv. 'glabriusculum'.

Como se aprecia en la tabla 3, hubo diferencias significativas entre las plántulas que se evaluaron en el momento de la transferencia a la fase de aclimatación (120 días). Las plántulas de los tratamientos 1 (MS) y 2 (MS + 6-BAP [10^{-5} M]) fueron las que presentaron mayor altura, pero un menor número de brotes por explante (figura 2), sin diferencias estadísticas entre ellas, pero si se diferenciaron de las de los otros tratamientos. El mayor número y longitud de las raíces se obtuvo con el tratamiento 5 (MS + Pectimorf [10 mg.L $^{-1}$]) (tabla 3), que se diferenció estadísticamente de las del resto de los tratamientos. Sin embargo, el mayor el mayor número de brotes por explante, masa fresca y seca se obtuvo con las plántulas del tratamiento 3 (MS + Pectimorf [1 mg.L $^{-1}$]).

Las plantas que se obtuvieron con los tratamientos en que se aplicó el Pectimorf (1 mg.L $^{-1}$ - 10 mg.L $^{-1}$) presentaron un 100% de enraizamiento, mientras que las del tratamiento 1 (MS solo) y 2 (6-BAP [10^{-5} M]) alcanzaron un 60% y 25%, respectivamente (datos no mostrados).

Según Swamy, Krupakar, Surendra & Koshy (2014), los explantes a las cuatro semanas de encontrarse en un medio de cultivo suplementado con 6-BAP (0.5 mg.L $^{-1}$ - 3 mg.L $^{-1}$) presentaron diferencias entre los cultivares: 'Red capsicum' (0.6 - 1.3 brotes por explante), 'Yellow capsicum' (0.3 - 1.3 brotes por explante), 'Purple capsicum' y 'White capsicum' (0.3 - 1 brotes por explante) y, 'Green capsicum' (0.3 - 1.6 brotes por explante). Sin embargo, los mejores resultados lo alcanzaron, en el caso de los cuatro primeros genotipos, cuando el medio se suplementó con 6-BAP (2 mg.L $^{-1}$) y AIA (0.5 mg.L $^{-1}$) (3 - 6.3 brotes por explante) y en el quinto ('Green capsicum') en un medio con la misma concentración de AIA pero con 6-BAP (3 mg.L $^{-1}$) (6.6 brotes por explante).

Kumar *et al.* (2012) en *Capsicum annum* L. cv. 'X-235' en un medio MS solo no obtuvieron brotes, sin embargo en un medio suplementado con 6-BAP (2 mg.L $^{-1}$) lograron 3.1 brotes por explante con 70.4% de enraizamiento; las altas concentraciones de esta citoquinina (9 mg.L $^{-1}$) redujeron estos parámetros a 2.2 brotes por explante y 63% de enraizamiento, respectivamente. Estos autores alcanzaron los mejores resultados con un medio MS que contenía 6-BAP (9 mg.L $^{-1}$) y AIA (1 mg.L $^{-1}$) con 19.2 brotes y 95% de enraizamiento de los mismos, pero la elongación de los brotes la lograron en otro medio de cultivo que contenía GA $_3$ (0.50 mg.L $^{-1}$) con 6.6 cm.

Ahmad *et al.* (2006) en pimiento rojo (*Capsicum annum* L.) cv. 'pusa jwala' en un medio de cultivo enriquecido con AIB (0.5 - 1.5 μ M), obtuvieron entre 60% - 90% de enraizamiento, entre 11 - 11.20 raíces por brotes, con una longitud entre 3.40 cm- 3.74 cm.

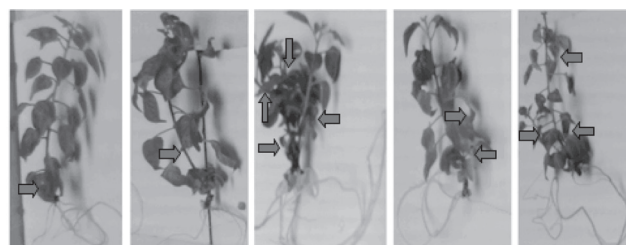


Figura 2. Número de brotes (flechas) y raíces por explante en las plántulas de chiltepin (*Capsicum annum* L.) cv. 'glabriusculum', en el momento de su transferencia a la fase de aclimatación (120 días) 1. MS; 2. MS + 6-BAP (10^{-5} M); 3. MS + Pectimorf (1 mg.L $^{-1}$); 4. MS + Pectimorf (5 mg.L $^{-1}$) y 5. MS + Pectimorf (10 mg.L $^{-1}$). Se separaron los brotes al momento de sembrarlos en macetas.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.

Variables morfológicas y fisiológicas que se evaluaron en las plántulas de chiltepin (*Capsicum annum* L.) cv. 'glabriusculum', en el momento de la transferencia a la fase de aclimatación (120 días). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tukey, $p \leq 0.05$). Número de muestras ($n = 15$).

Tratamientos	Altura de las plántulas (cm)	Número de brotes por plántula	Número de raíces	Longitud de las raíces (cm)	Masa fresca de las plántulas (g)	Masa seca de las plántulas (g)
1. MS	7.66a	0.80d	0.60d	3.15d	0.4300b	0.0560c
2. MS + 6-BAP (10^{-5} M)	7.85a	0.50d	0.20e	1.25e	0.3325c	0.0350e
3. MS + Pectimorf (1 mg.L $^{-1}$)	6.35d	3.30a	3.00c	5.38c	0.4900a	0.1009a
4. MS + Pectimorf (5 mg.L $^{-1}$)	6.80c	2.40b	3.80b	5.55b	0.2350d	0.0700b
5. MS + Pectimorf (10 mg.L $^{-1}$)	7.05b	2.25c	5.00a	5.68a	0.3675c	0.0400d

Fuente: Elaboración propia.

Los efectos de diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento en la micropropagación de *Capsicum annuum* L. fue expuesto por Otroshy, Moradi & Khayam (2011). Ellos emplearon segmentos nodales que cultivaron *in vitro* en un medio MS suplementado con AIA (0.5 mg.L⁻¹) y ANA (0.1 mg.L⁻¹) solo con 6-BAP (2 mg.L⁻¹) indujeron un mayor número de brotes por explante comparado con la citoquinina sola que contenían los medios de cultivo. La adición de auxinas o citoquininas solas promovieron la inducción de raíces después de tres semanas de inoculados los explantes.

En el presente estudio, la formación de nuevos brotes, su elongación y enraizamiento se lograron en el mismo medio de cultivo, lo cual reduce la manipulación de las plántulas y los costos durante el período de cultivo *in vitro* de los explantes.

Cuantificación de clorofila en vitroplantas

Las plántulas que se obtuvieron *in vitro* con las diferentes concentraciones de Pectimorf 1, 5 y 10 mg.L⁻¹ (tratamientos 3, 4 y 5, respectivamente) generalmente presentaron mayor contenido de clorofila a, b y feopigmentos. En tal sentido las plántulas del tratamiento 4 (MS + Pectimorf [5 mg.L⁻¹]), fueron la que alcanzaron los mejores resultados en las variables que se evaluaron, diferenciándose de las del resto de los tratamientos (tabla 4).

Siddique & Anis (2006), en *Capsicum annuum* L cv. 'Pusa Jwala' propagado *in vitro* en un medio MS suplementado con TDZ (1.5 µM) y AIA (0.5 µM), obtuvieron un alto porcentaje de regeneración de plantas y mayor número de brotes por explante; para el enraizamiento de las mismas emplearon el mismo medio basal, pero enriquecido con ANA (1 µM) y para el enraizamiento *ex vitro* (fase de aclimatización) se le aplicó en la parte basal de los explantes (previamente se le realizó un corte a los mismos) AIB (200 µM) durante 30 min y obtuvieron un 95% de supervivencia. Asimismo, el contenido de carotenoides fue significativamente superior en las plantas obtenidas *in vitro* comparadas con las plantas provenientes de semillas.

En el trabajo que se presenta, cuando se empleó el Pectimorf (1 mg.L⁻¹ - 10 mg.L⁻¹), el contenido de clorofilas a y b, así como el de feopigmentos y la supervivencia de las plantas fueron superiores a los informados por los autores anteriores. Estos resultados son inéditos en *Capsicum* spp., pero en otras especies no, tal es el caso de las hojas de banano (*Musa* spp.) cuando fueron tratadas con esta oligosacarina (1 mg.L⁻¹) presentaron un mayor contenido de clorofilas (Izquierdo,

2014). Por otra parte, el aumento del contenido de clorofilas foliares totales, pudiera contribuir a incrementar la fotosíntesis, ya que las oligosacarinas como el Pectimorf, intervienen en el incremento en masa seca de las plantas.

El 100% de las plántulas tratadas *in vitro* con Pectimorf, cinco días después de su transferencia a la fase de aclimatización sobrevivieron; sin embargo murió una planta del tratamiento control (90%) y dos del tratamiento de BAP (80%) (figura 3).

Se determinó la tasa de crecimiento después de 50 días, en donde se observó que al aplicar Pectimorf en concentración de 10 mg/L el incremento de crecimiento fue mayor que en los otros tratamientos probados y al aplicar BAP fue el menor crecimiento, aún menor que el control y la desviación estándar muy alta, por lo que se observa que hubo alta variabilidad en el crecimiento (tabla 5)

Tabla 4. Contenido de clorofila α, clorofila β y feopigmentos en las plántulas de chiltepin (*Capsicum annuum* L.) cv. 'glabriusculum', en el momento de su transferencia a la fase de aclimatización (120 días). Peso seco (PS)

Tratamientos	Clorofila α (mg/ g PS)	Clorofila β (mg/ g PS)	Feopigmentos (mg/ g PS)
MS	1.883	0.307	0.429
6-BAP (10 ⁻⁵ M).	1.998	0.318	0.478
Pectimorf (1 mg.L ⁻¹)	1.080	0.182	0.238
Pectimorf (5 mg.L ⁻¹)	4.211	0.548	1.040
Pectimorf (10 mg.L ⁻¹)	2.142	0.297	0.512

Fuente: Elaboración propia.

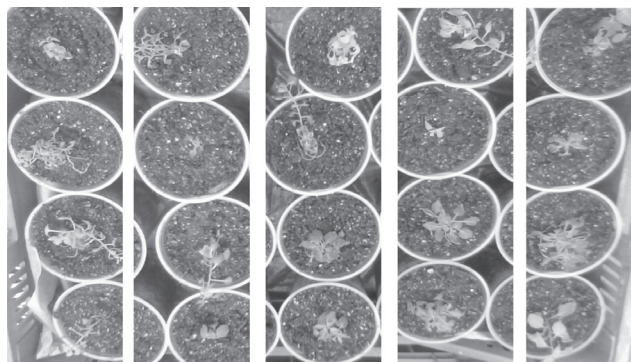


Figura 3. Plántulas de chiltepin (*Capsicum annuum* L.) cv. 'glabriusculum', cinco días después de su transferencia a la fase de aclimatización. 1. MS; 2. MS + 6-BAP (10⁻⁵ M); 3. MS + Pectimorf (1 mg.L⁻¹); 4. MS + Pectimorf (5 mg.L⁻¹) y 5. MS + Pectimorf (10 mg.L⁻¹).

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5. Tasa de crecimiento (%) de las plantas transplantadas a macetas después de 50 días de siembra. La letra muestra la diferencia significativa entre cada tratamiento de acuerdo al análisis estadístico Holm-Sidak, $p \leq 0.05$). Número de muestras ($n = 15$).

Tratamientos	Tasa de crecimiento (%)
MS	106.9b
6-BAP (10^{-5} M).	52.2c
Pectimorf (1 mg.L^{-1})	168.2ab
Pectimorf (5 mg.L^{-1})	144.6ab
Pectimorf (10 mg.L^{-1})	189.8a

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados confirman el efecto antiestrés que provoca el Pectimorf en la transferencia de las plántulas de la fase *in vitro* a la *ex vitro* y el mayor vigor de las plantas, lo cual es muy beneficioso para puedan aclimatizarse exitosamente a las condiciones ambientales. Resultados similares se han informado en otros cultivos por diferentes autores en otros cultivos (Izquierdo *et al.*, 2009; Izquierdo, 2014; Suárez & Hernández, 2008).

Capsicum spp. es uno de los géneros de la familia Solanaceae más recalcitrante para su manipulación *in vitro*. Las mayores dificultades en la regeneración de plantas son la inducción de nuevos brotes y la elongación de los mismos, así como la formación de rosetas a partir de hojas distorsionadas, lo cual afecta el desarrollo normal de los brotes (Ochoa-Alejo & Ramírez-Malagón, 2001). Sin embargo, en este estudio, no se observaron estas anomalías en las vitroplantas que se obtuvieron con Pectimorf.

El efecto positivo en la regeneración *in vitro* de plántulas de pimiento cuando utilizaron bajas concentraciones de AgNO_3 fue expuesto por Grozeva *et al.* (2012), sin embargo, las altas concentraciones de esta sustancia (0.2 mg.L^{-1}) inhibieron la regeneración del proceso.

Aunque en este trabajo no se desarrolló el protocolo para organogénesis, es importante mencionar trabajos con pimiento donde la correlación positiva en la organogénesis entre la expresión del gen que activa las proteínas quinasas dependiente de ciclinas tipo A (CDKA) y la etapa de proliferación a partir del cultivo *in vitro* de cotiledones (Mezghani *et al.*, 2014). Los autores concluyeron que la expresión de las CDKA puede emplearse como un marcador molecular en la fase de desdiferenciación celular. Resultados similares, pero en banano (*Musa* spp.) clon 'FHIA-18', expuso

Izquierdo (2014), quien plantea que las citoquininas (CK) se incorporan mediante los transportadores de esta fitohormona, que se encuentran en la membrana, y se unen en el núcleo a los oligogalacturonidos (OGs) como el Pectimorf y a las auxinas como el AIA; y el complejo formado AIA/OGs/CK, pudiera activar las CDKA (presente durante todo el ciclo celular) e inclusive las de tipo B (CDKB) [se expresan preferentemente durante la transición de la fase G_2 (post-síntesis)/M (mitosis) del ciclo celular] y estimular la formación de brotes (división celular), lo cual permite que se complete el ciclo celular.

Es importante mencionar que, si se lograran identificar los genes que regulan los procesos de desarrollo en cultivo de tejidos morfogénesis (organogénesis y embriogénesis somática) en *Capsicum* spp. y otras especies de plantas de importancia económica, sería de gran ayuda para mejorar los tratamientos y obtener mejores resultados.

CONCLUSIONES

En el presente estudio, de acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró un nuevo y eficiente método para la regeneración de plantas *in vitro* mediante el empleo de una oligosacarina de origen péptico (Pectimorf), donde se observó que este compuesto incrementa la producción de brotes y raíces simultáneamente. En cultivos *in vitro* la mayor producción de brotes, raíces, longitud de raíces, mayor vigor en las plantas se observó al aplicar Pectimorf 10 mg.L^{-1} a los 90 días. En la transferencia hacia la fase de aclimatación, aumentó el contenido de clorofilas y feopigmentos al aplicar Pectimorf 5 mg.L^{-1} y en segundo lugar Pectimorf 10 mg.L^{-1} , asegurando la adaptación *ex vitro*. Así mismo la mayor tasa de crecimiento en la fase de aclimatación fue en las plantas tratadas con Pectimorf 10 mg.L^{-1} a los 50 días de siembra. Por lo tanto, en general, se puede recomendar el uso de Pectimorf en concentración de 10 mg.L^{-1} .

Este protocolo de regeneración puede ser aplicado a la producción masiva de plantas de chiltepín (*Capsicum annum* L.) cv. 'glabriusculum' y así conservar el germoplasma, incrementar la producción y reducir el precio del fruto.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Relaciones Exteriores de México (SRE) que otorgó la Beca Postdoctoral de Excelencia para Extranjeros 2015. Al grupo de investigación del

Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Cibnor, Sergio Real-Cosío, Elvia Perez, Federico Soto, Lluvia de Abril Soriano y Edgar Esquivel por el apoyo brindado durante el desarrollo de las investigaciones. A Diana Dorantes por la edición en inglés del resumen.

REFERENCIAS

- Agrawal, S., Chandra N., & Kothari, S.L. (1989). Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annum* L. cv. *mathania*). *Plant, Tissue and Organ Culture*, 16, 47-55.
- Ahmad, N., Siddique, I., & Anis, M. (2006). Improved plant regeneration in *Capsicum annum* L. from nodal segments. *Biología Plantarum*, 50(4), 701-704.
- Cid, M., González-Olmedo, J. L., Lezcano, Y., & Nieves, N. (2006). Influencia del Pectimorf sobre la calidad de la semilla artificial de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). *Cultivos Tropicales*, 27, 31-34.
- Côté, F., & Hahn, M. G. (1994). Oligosaccharins: structures and signal transductin. *Plant Molecular Biology*, 26(5), 1379-1411.
- Christopher, T., & Rajam, M. V. (1996). Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. *Plant, Cell Tissue and Organ Culture*, 46, 245-250.
- Díaz, B., Héctor, E., Torres, A., Cabañas, M., Garcés, N., Izquierdo, H., Núñez, M., & Iglesias, R. (2004). Empleo de productos bioactivos cubanos como sustitutos de los reguladores del crecimiento en la propagación del plátano macho (AAB). Fase de establecimiento *in vitro*. *Alimentaria*, 51(359), 103-107.
- Elwan, M. W. M. (noviembre, 2009). *In vitro* shoot regeneration, elongation and rooting of pepper (*Capsicum annum* L.) II: Improving of *in vitro* shoot elongation and subsequent rooting of sweet pepper cv. 'California wonder' using GA₃ and TDZ. 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture, Cairo, Giza, Egypt.
- Falcón, A. B., & Cabrera, J. C. (2007). Actividad enraizadora de una mezcla de oligogalacturonidos en peciolas de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* L.). *Cultivos Tropicales*, 28(2), 87-90.
- Grozeva, S., Rodeva, V., & Todorova, V. (2012). *In vitro* shoot organogenesis in Bulgarian Sweet Pepper (*Capsicum annum* L.) varieties. *Electronic Journal of Biology*, 8(3), 39-44.
- Hernández, M. M., Suárez, L., & Valcárcel, M. (2009). Empleo del Pectimorf en la micropropagación de *Spathiphyllum* sp. *Cultivos Tropicales*, 30(3), 56-58.
- Hernández, R. M., Lara, R. M., Diosdado, E., Cabrera, J. C., González, C., Valdés, M., & Xiqués, X. (2007). Evaluación de la actividad del Pectimorf en la embriogénesis somática de la mandarina 'Cleopatra' (*Citrus reshni* Hort. et Tan.) mediante marcadores isoenzimáticos. *Cultivos Tropicales*, 28(4), 25-31.
- Izquierdo, H. (2014). Empleo de nuevas sustancias como reguladores del crecimiento en la micropropagación del banano (*Musa* spp.) clon 'FHIA-18' (AAAB). (Tesis de doctorado). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Universidad Agraria de La Habana.
- Izquierdo, H., González, M. C., Núñez, M. de la C., Proenza, R., Cabrera, J. C., & Álvarez, I. (2009). Influencia de un oligogalacturónido de origen péctico sobre la aclimatización de vitroplantas de banano del clon 'FHIA-18' (*Musa* spp. AAAB). *Cultivos Tropicales*, 30(1), 37-42.
- Kintziros, S., Drossopoulos, J. B., & Lympopoulos, C. (2000). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of rose. *Journal of Plant Nutrition*, 23(10), 1407-1420.
- Kumar, V., Sharma, A., Prasad, B. C. N., Gururaj, H. B., Giridhar, P., & Bavis-hankar, G. A. (2007). Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. *Acta Physiologia Plantarum*, 29(1), 11-18.
- Kumar, A., Rupavathi, T., & Subba, S. (2012). Adventitious shoot bud induction in chili pepper (*Capsicum annum* L. cv. 'X-235'). *International Journal of Science and Nature*, 3(1), 192-196.
- Latournerie, M. L., Aguilar, R. V. H., López, L. P., Ramírez, M. S., Corona, T. T., López, S. T., & Villalón, M. H. (2010). Los recursos genéticos del chile (*Capsicum* spp. en México: estudio, conservación y utilización. *Resúmenes Ejecutivos Ejercicio 2010*, SNICS. 157-159. Recuperado el 18 de octubre del 2017 de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/232379/Resúmenes_ejecutivos_ejercicio_fiscal_2010.pdf
- Li, D., Zhao, K., & Xie, B. (2003). Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Reports*, 21(8), 785-790.
- Mezghani, N., Zauuali, I., Bel Amri, W., Rouz, S., Simon, P. W., Hannachi, Ch., Ghrabi, Z., Neffati, M., Bouzbida, B., & Spooner, D. M. (2014). Fruit morphological descriptors as a tool for discrimination of *Daucus* L. germplasm. *Genetic Resource Crop Evolution*, 61(2), 499-510.
- Montes, S., Aldaz, J. P., Cevallos, M., Cabrera, J. C., & López, M. (2000). Uso del biorregulador Pectimorf en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales*, 21(3), 29-31.
- Navazio, L., Moscattello, R., Baldan, B., Meggio, F., Brini, M., Bowler, C., & Mariani, P. (2002). The role of calcium in oligogalacturonide-activated signaling in soybean cells. *Planta*, 215(4), 596-605.
- Nieves, N., Poblete, A., Cid, M., Lezcano, Y., González-Olmedo, J. L., & Cabrera, J. C. (2006). Evaluación del Pectimorf como complemento del 2,4-D en el proceso de embriogénesis somática de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Cultivos Tropicales*, 27(1), 25-30.
- Ochoa-Alejo, N., & Ramírez-Malagón, R. (2001). *In vitro* chilli pepper Biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 37(6), 701-729.
- Orliška, M., & Nowaczyk, P. (2015). *In vitro* plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 60-68.
- Otroshy, M., Moradi, K., & Khayam, M. (2011). The effect of different cytokenins in propagation of *Capsicum annum* L. by *in vitro* nodal cutting. *Trakia Journal of Sciences*, 9(3), 21-30.
- Parsons, T. R., Maita, Y., & Lalli, C. M. (1984). *A Manual of Chemical and Biological methods for seawater analysis*. Oxford, Pergamon Press.
- Posada-Pérez, L., Padrón-Montesinos, Y., González-Olmedo, J., Rodríguez-Sánchez, R., Barbón-Rodríguez, R., Norman-Montenegro, O., Rodríguez-Escriba, R., & Gómez-Kosky, R. (2016). Efecto del Pectimorf® en el enraizamiento y la aclimatización *in vitro* de brotes de papaya (*Carica papaya* L.) cultivar Maradol Roja. *Cultivos Tropicales*, 37(3), 50-59.

- Ramírez, A., Cruz, N., & Franchialfaro, O. (2003). Uso de bioestimuladores en la reproducción de guayaba (*Psidium guajava* L.) mediante el enraizamiento de esquejes. *Cultivos Tropicales*, 24(1), 59-63.
- Robles-Paz, A., & Carrillo-Castañeda, G. (2004). Regeneración *in vitro* de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocotilos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27(2), 121-126.
- Sanatombi, K., & Sharma, G. J. (2007). Micropropagation of *Capsicum annuum* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 35(1), 57-64.
- Siddique, I., & Anis, M. (2006). Thidiazuron induce high frequency shoot bud formation and plant regeneration from cotyledonary node explants of *Capsicum annuum* L. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 303-308.
- Simpson, S. D., Ashford, D. A., Harvey, D. J., & Bowles, D. J. (2007). Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*, 8(6), 579-583.
- Souter, M. A., Pullen, M. L., Topping, J. F., Zhang, X., & Lindsey, K. (2004). Rescue of defective auxin-mediated gene expression and root meristem function by inhibition of ethylene signaling in steroid biosynthesis mutants of *Arabidopsis*. *Planta*, 219(5), 773-783.
- Suárez, L., & Hernández, M. M. (2008). Efecto de una mezcla de oligogalacturónidos en la propagación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), var. 'CMC-40'. *Cultivos Tropicales*, 29(3), 47-52.
- Swamy, S., Krupakar, A., Surendra, D., & Koshy, P. (2014). Direct regeneration protocols of five *Capsicum annuum* L. varieties. *African Journal of Biotechnology*, 13(2), 307-312.
- Valadez-Bustos, M. G., Aguado-Santacruz, G. A., Carrillo-Castañeda, G., Aguilar-Rincón, V. H., 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 & Developmental Biology Plant*, 45(6), 650-658.