



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

**MORFOGÉNESIS *in vitro* DE
CHILE CHILTEPÍN
(*Capsicum annuum* var.
glabriusculum)**

JOSÉ NICOLÁS BELTRÁN BURBOA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2018

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe JOSÉ NICOLÁS BELTRÁN BURROA, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DRA. MARÍA CRISTINA ESCOBARDE LÓPEZ PERALTA, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

MORFOGÉNERIS IN VITRO DE CHILE CHILTEPÍN (Capsicum annuum var. glabriusculum)

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 17 de SEPTIEMBRE de 2018

Firma del
Alumno (a)

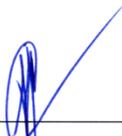
DRA. MARÍA CRISTINA ESCOBARDE LÓPEZ PERALTA
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada "**Morfogénesis in vitro de Chile Chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*)**", realizada por el alumno: **José Nicolás Beltrán Burboa**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA _____


DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA

ASESOR _____


DR. ELEODORO HERNÁNDEZ MÉNDEZ

ASESOR _____


DR. NICACIO CRUZ HUERTA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre 2018

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE CHILE CHILTEPÍN (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*).

JOSÉ NICOLÁS BELTRÁN BURBOA, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018.

RESUMEN

El chile chiltepín es una especia que se colecta de plantas silvestres y enfrenta fuerte presión antropogénica por su extracción irracional. Asociado con problemas de baja germinación, demanda creciente y nulas prácticas de manejo agronómico la especie podría verse amenazada en el corto plazo. El presente estudio tuvo como objetivos establecer las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de chile chiltepín y desarrollar un método eficiente para la morfogénesis *in vitro* de plantas por organogénesis. Las semillas se desinfectaron con 20 % (v/v) de NaOCl por 15 min. Para promover la germinación se evaluaron tratamientos de acondicionamiento por tiempos de inmersión en H₂O₂ 3 % y en AG₃ a 2.89 y 5.78 µM, también éstas concentraciones fueron adicionadas al medio de cultivo. Para la organogénesis se evaluaron tipos de explantes y concentraciones de BAP así como combinaciones de BAP y AIA para la inducción y multiplicación de brotes. En el alargamiento de brotes se evaluaron concentraciones de AG₃ y en el enraizamiento el AIB. La mejor respuesta de germinación *in vitro* (90 %) se obtuvo al sumergir las semillas por 30 min en 5.7 µM de AG₃ y adicionándolo al medio MS con 50 % de concentración de sales. La organogénesis se indujo a partir de segmentos nodales con yemas axilares donde se obtuvieron 6.6 brotes por explante con 11.1 µM de BAP y 2.8 µM de AIA. La multiplicación de brotes se obtuvo en estas mismas combinaciones de reguladores de crecimiento. El alargamiento de los brotes se favoreció en medio MS con 11.5 µM de AG₃ y el enraizamiento se indujo con 10.0 y 12.5 µM de AIB.

Palabras clave: ácido giberélico, germinación, micropropagación, morfogénesis, silvestre.

***In vitro* MORPHOGENESIS OF CHILTEPIN PEPPER (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*).**

JOSÉ NICOLÁS BELTRÁN BURBOA, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Chiltepin pepper is a spice that is collected from wild plants and faces strong anthropogenic pressure due to its irrational extraction. Associated with problems of low germination, growing demand and null management practices the species could be threatened in the short term. The present study had as objectives to establish the optimal conditions for the *in vitro* germination of chiltepin pepper and to develop an efficient method for the *in vitro* morphogenesis of plants by organogenesis. The seeds were disinfected with 20% (v/v) of NaOCl for 15 min. To promote germination conditioning treatments were evaluated for immersion times in H₂O₂ 3% and in GA₃ at 2.89 and 5.78 μM, also these concentrations were added to the culture medium. For organogenesis explants and BAP concentrations were evaluated as well as combinations of BAP and IAA for the shoots induction and multiplication. In the elongation of shoots GA₃ concentrations were evaluated and in the rooting the IBA. The best *in vitro* germination response (90%) was obtained by immersing the seeds for 30 min in 5.7 μM of GA₃ and adding it to the MS medium with 50% concentration of salts. Organogenesis was induced from nodal segments with axillary buds where 6.6 shoots were obtained per explant with 11.1 μM of BAP and 2.8 μM of IAA. The shoots multiplication was achieved in these same combinations of growth regulators. The elongation of the shoots was obtained in MS medium with 11.5 μM of GA₃ and the rooting was induced with 10.0 and 12.5 μM of IBA.

Key words: giberelic acid, germination, micropropagation, morphogenesis, wild.

DEDICATORIA

A mis padres

Humberto Beltrán Ramírez y Manuela Burboa Reynaga, por ser mis guías y benefactores, brindando su apoyo incondicional, sustento económico, su confianza y sobre todo su amor y cariño, quienes me alentaron a seguir adelante como una persona recta, responsable y honesta para lograr la culminación de este trabajo.

A mi familia, amigos y profesores

Por su apoyo incondicional, el cariño y la sincera amistad que me brindaron durante este trayecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, por siempre brindarme su cariño y apoyo en todo momento y ante cualquier situación sin importar cual difícil fuera.

Al Colegio de Postgraduados, por haberme brindado la oportunidad de llevar una formación académica a nivel postgrado.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme el apoyo económico a través de una beca y así poder solventar los gastos durante mis estudios.

A la Dra. María Cristina Gpe. López Peralta, por su paciencia y su tolerancia hacia mi persona y, sobre todo, por su gran apoyo durante mi estancia como su aconsejado.

Al Dr. Eleodoro Hernández Meneses, por sus consejos y su apoyo, así como sus enseñanzas y tolerancia en diferentes situaciones.

A mi compañero Carlos, quien sufrió el agobio de la misma forma en que yo lo hice y me apoyo en diferentes situaciones.

A todo el personal del laboratorio de Biotecnología del Colegio de Postgraduados, por todos los momentos que pasamos juntos, por su apoyo y su carisma.

A mis amigos, con quienes compartí el gusto por el rey de los deportes durante mi estancia en Texcoco, por su amistad y apoyo y, sobre todo, por esos momentos que pasamos juntos.

A Pancha (mi gata), quien fuera mi única compañera en muchos momentos críticos y por su cariño (violentamente demostrado) durante mis años de estudiante.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
2.1 Generales.....	3
2.2 Específicos	3
2.3 Hipótesis	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1 Origen e importancia del chile	4
3.2 Descripción botánica.....	4
3.3 Cultivo del chiltepín.....	6
3.3.1 Requerimientos ambientales.....	6
3.3.2 Plagas y enfermedades.....	6
3.3.3 Comercialización	8
3.4 Propagación del chile chiltepín.....	9
3.4.1 Propagación Sexual	9
3.4.2 Propagación asexual	10
3.5 Morfogénesis.....	10
3.5.1 Morfogénesis <i>in vitro</i>	10

3.5.2 Organogénesis	11
3.5.3 Embriogénesis somática	12
3.6 Factores que influyen en la morfogénesis <i>in vitro</i>	12
3.6.1 Medio de cultivo	12
3.6.2 Explante	12
3.6.3 Reguladores de crecimiento.....	13
3.6.4 Genotipo	14
3.6.5 Temperatura.....	15
3.6.6 Luz	15
3.6.7 Humedad.....	15
3.7 Cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Capsicum</i>	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Material vegetal	20
4.2 Medio de cultivo	20
4.3 Condiciones de incubación	21
4.4 Establecimiento del cultivo aséptico.....	21
4.4.1 Tratamientos	21
4.4.2 Variables cuantificadas.....	23
4.4.3 Diseño experimental y análisis estadístico	23
4.5 Germinación <i>in vitro</i>	24
4.5.1 Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂), consistencia del medio de cultivo y temperatura	24
4.5.2 Empleo del ácido Giberélico (AG ₃) en tratamientos de acondicionamiento por inmersión de semillas de chile chiltepín.....	27
4.5.3 Uso del Ácido Giberélico (AG ₃) en tratamientos de acondicionamiento por inmersión de semillas de chile chiltepín y adicionado al medio de cultivo	28

4.6 Morfogénesis <i>in vitro</i> por organogénesis.....	30
4.6.1 Inducción de brotes.....	30
4.6.2 Multiplicación de brotes	34
4.6.3 Alargamiento de brotes.....	35
4.6.4 Enraizamiento <i>in vitro</i>	36
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1 Establecimiento de cultivo aséptico.....	37
5.2 Germinación <i>in vitro</i>	38
5.2.1 Efecto del H ₂ O ₂ ; consistencia del medio de cultivo y temperatura.....	38
5.2.2 Tratamientos de acondicionamiento por inmersión con AG ₃	42
5.2.3 Efecto de tratamientos de acondicionamiento por inmersión en AG ₃ y adicionado al medio de cultivo	45
5.3 Morfogénesis <i>in vitro</i> por organogénesis.....	49
5.3.1 Inducción de brotes.....	49
5.3.2 Multiplicación de brotes	58
5.3.3 Alargamiento de brotes.....	60
5.3.4 Enraizamiento <i>in vitro</i>	62
VI. CONCLUSIONES	67
VII. RECOMENDACIONES.....	68
VIII. LITERATURA CITADA.....	69
IX. APENDICE.....	81

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Relación de tratamientos con diferentes concentraciones de NaOCl y tiempo de inmersión para la desinfección de semillas de chile chiltepín evaluados para el establecimiento del cultivo aséptico.....	23
Cuadro 2. Relación de tratamientos del tiempo de inmersión en H ₂ O ₂ , consistencia del medio de cultivo MS y temperatura de incubación para evaluar su efecto en la germinación <i>in vitro</i> de chile chiltepín.....	25
Cuadro 3. Relación de tratamientos del tiempo de inmersión de semillas de chile chiltepín en AG ₃ para evaluar su efecto en la germinación <i>in vitro</i>	28
Cuadro 4. Relación de tratamientos del tiempo de inmersión de semillas de chile chiltepín en AG ₃ y adicionado al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en la germinación <i>in vitro</i>	29
Cuadro 5. Relación del tipo de explante y diferentes concentraciones de BAP adicionadas al medio de cultivo MS evaluadas en la inducción de brotes de chile chiltepín.	30
Cuadro 6. Relación de tiempo de incubación, concentraciones de BAP + 0.57 µM de AIA adicionadas al medio MS para evaluar su efecto en la inducción de brotes en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín.	32
Cuadro 7. Relación de 11.1 µM de 6-bencilaminopurina (BAP) y concentraciones de AIA adicionadas al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en la inducción de brotes en segmentos nodales de chile chiltepín.	33
Cuadro 8. Relación de 11.1 µM de BAP y concentraciones de AIA adicionados al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en la multiplicación de brotes de chile chiltepín.	34
Cuadro 9. Relación de diferentes concentraciones de AG ₃ adicionadas al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en el alargamiento de brotes de chile chiltepín.	35
Cuadro 10. Relación de diferentes concentraciones de AIB adicionadas al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en el enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de chile chiltepín.....	36
Cuadro 11. Efecto del H ₂ O ₂ , consistencia del medio de cultivo y temperaturas de incubación sobre la germinación <i>in vitro</i> de chile chiltepín después de 30 días.	39

Cuadro 12. Efecto de tiempos de inmersión en H ₂ O ₂ , consistencia del medio de cultivo MS y temperaturas de incubación sobre la germinación <i>in vitro</i> de chile chiltepín después de 30 días.	41
Cuadro 13. Efecto de concentraciones de AG ₃ y tiempos de inmersión sobre la germinación <i>in vitro</i> de las semillas de chile chiltepín después de 30 días.....	42
Cuadro 14. Efecto del AG ₃ en tratamientos de acondicionamiento con tiempos de inmersión sobre la germinación <i>in vitro</i> de chile chiltepín después de 30 días.	43
Cuadro 15. Efecto de tiempos de inmersión y concentración de AG ₃ adicionado al medio de cultivo MS sobre la germinación <i>in vitro</i> de chile chiltepín después de 30 días.	46
Cuadro 16. Efecto del AG ₃ en tratamientos de acondicionamiento por inmersión y en medio de cultivo MS sobre la germinación <i>in vitro</i> de semillas de chile chiltepín después de 30 días.	46
Cuadro 17. Efecto de tipos de explantes de chile chiltepín y concentraciones de BAP sobre la inducción de brotes <i>in vitro</i> después de cuatro semanas.	49
Cuadro 18. Efecto de tipos de explantes de chile chiltepín y concentraciones de BAP en la inducción de brotes <i>in vitro</i> después de cuatro semanas de cultivo.	50
Cuadro 19. Efecto de tiempos de incubación (semanas) y concentraciones de BAP + 0.57 µM de AIA en la inducción de brotes en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín.	53
Cuadro 20. Efecto de dos tiempos de incubación (semanas) y cinco concentraciones de BAP + 0.57 µM de AIA en la inducción de brotes en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín.	54
Cuadro 21. Efecto de cinco concentraciones de AIA y de 11.1 µM de BAP en la inducción de brotes <i>in vitro</i> en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín después de cuatro semanas de cultivo.	56
Cuadro 22. Efecto de 11.1 µM de BAP y cinco concentraciones de AIA en la multiplicación de brotes <i>in vitro</i> de chile chiltepín después de tres semanas.	58
Cuadro 23. Efecto del AG ₃ en la longitud de brotes (mm) de chile chiltepín a las tres y seis semanas de cultivo.	61
Cuadro 24. Efecto del ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de chile chiltepín.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Chile chiltepín (<i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>). a) Planta con frutos, b) Flor, c) Semillas. (CONAFOR, 2009).	5
Figura 2. Fructificación de chile chiltepín (<i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>). a) Frutos maduros, b) Frutos inmaduros de color verde (CONAFOR, 2009).	6
Figura 3. Diagrama de flujo establecido para la morfogénesis <i>in vitro</i> de chile chiltepín.	19
Figura 4. Semillas de chile chiltepín empleadas para la germinación <i>in vitro</i> . a) Frutos secos; b) Semillas extraídas de forma manual.	20
Figura 5. Establecimiento del cultivo aséptico de semillas de chile chiltepín. a) Semillas seleccionadas y separadas en sacos pequeños de tela; b) Frascos con semillas y detergente en agitación continua; c) Frascos con gasas y ligas para retirar el detergente y aplicar enjuagues. ...	22
Figura 6. Inmersión de las semillas de chile chiltepín en H ₂ O ₂ al 3 %. a) Preparación del H ₂ O ₂ 3 %; b) Sacos de semillas sumergidas en H ₂ O ₂	26
Figura 7. Desinfección y siembra de semillas de chile chiltepín para evaluar la germinación <i>in vitro</i> . a) Tratamiento de desinfección con NaOCl; b) Papel absorbente esterilizado; c) Frascos con puente de papel Heller; d) Frasco con semillas sembradas en medio líquido.	26
Figura 8. Plántula de chile chiltepín de 6 semanas de edad germinada <i>in vitro</i> donadora de explantes. a) Plántula con hojas. b) Plántula desprovista de hojas; c) Explante de segmentos nodales con yemas axilares de 1 cm de longitud. Ya=yema axilar.	31
Figura 9. Comportamiento de la germinación en semillas de chile chiltepín tratadas con AG ₃ en dos tiempos de inmersión.	44
Figura 10. Inicio de la germinación de semillas de chile chiltepín sumergidas por 60 min en 5.78 μM de AG ₃ después de 15 días.	44
Figura 11. Inicio de germinación en semillas de chile chiltepín en tratamientos de acondicionamiento por inmersión en AG ₃ y adicionado al medio de cultivo. SRCV: sin reguladores de crecimiento vegetal.	47

Figura 12. Explantes de chile chiltepín evaluados en la inducción de brotes de chile chiltepín. a) Ápice de brote; b) Segmentos nodales con yema lateral; c) Segmentos de hojas y d) Tallos necrosados después de 12 días de cultivo.	51
Figura 13. Organogénesis en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín. a) Explante sin clorosis cultivado por cuatro semanas con 11.1 µM de BAP y 0.5 µM de AIA b) Explante con clorosis cultivado por seis semanas con 8.8 µM de BAP y 0.5 µM de AIA.....	55
Figura 14. Segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín cultivados <i>in vitro</i> en diferentes concentraciones de AIA. a) Relación del número de brotes. B). Relación de la longitud de brotes	57
Figura 15. Segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín cultivados <i>in vitro</i> . a) explante cultivado con AIA (4.2 µM) y BAP (11.1 µM), b) explante cultivado con AIA (2.8 µM) y BAP (11.1 µM).....	57
Figura 16. Multiplicación de brotes a partir de grupo de brotes de chile chiltepín después de tres semanas de cultivo. a) Explante cultivado con 11.1 µM de BAP y 2.8 µM de AIA, b) Explante cultivado con 11.1 µM de BAP y 4.2 µM de AIA.	59
Figura 17. Relación del número de brotes en diferentes concentraciones de AIA en la etapa de multiplicación en conjuntos de brotes de chile chiltepín.	59
Figura 18. Alargamiento de brotes de chile chiltepín después de seis semanas de cultivo. a) Brotes cultivados con 11.5 µM de AG ₃	61
Figura 19. Porcentaje de enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de chiltepín cultivados con diferentes concentraciones de Ácido Indolbutírico (AIB) durante tres semanas.	63
Figura 20. Enraizamiento de plántulas de chile chiltepín. a) plántula enraizada con 10.0 µM de AIB después de cuatro semanas. b) Raíces generadas en plántula de chiltepín tratada con 7.5 µM de AIB después de cuatro semanas. Rp = raíz principal; Rs = raíz secundaria; Pr = pelos radicales.....	64
Figura 21. Diagrama de flujo de los resultados más significativos para la morfogénesis <i>in vitro</i> de chile chiltepín.	66

I. INTRODUCCIÓN

En México, el chile es la especie hortícola que ha tenido mayor crecimiento, al pasar de 85 mil hectáreas anuales cultivadas en la década de 1980, a más de 145 mil ha en el año 2011 (Garzón, 2012). México se considera centro de origen de algunas especies cultivadas; se identifica una gran diversidad de tipos de chile que se distribuyen por todo el territorio nacional (Chew *et al.*, 2008). En el año 2014, México fue líder en exportación de chile con un comercio de 845 mil toneladas, que generaron divisas cercanas a 560 millones de dólares (SAGARPA, 2015).

El chile es una de las especias cultivadas más importantes en México y el mundo; sus frutos se consumen tanto en fresco como seco, para proporcionar color, sabor y aroma en la gastronomía (Aguilar, 2012). Además de su valor alimenticio, también posee algunas propiedades medicinales (Días, 1977; Morales, 1986). Dentro de la gran variedad de chiles se encuentran diferentes grados de picor y sabores, pero todos se emplean en la dieta diaria de la población (Rodríguez, 2005). Los chiles más consumidos generalmente son cultivados, como el Anaheim, Jalapeño, Habanero, Serrano, entre otros, aunque también hay algunas especies de alto consumo cuyos frutos se colectan de plantas semidomesticadas y silvestres (Bañuelos *et al.*, 2008).

El chile es un producto de exportación en México, donde más de 600 mil toneladas de chile verde se envían al extranjero (FAOSTAT, 2009). En la Comarca Lagunera, el cultivo de chile es la tercera hortaliza de importancia en cuanto a la superficie sembrada, después del melón y sandía. En el año 2006, se establecieron 1,385 ha con un valor de producción de \$17,779,600 (SAGARPA, 2006; INIFAP, 2008). En Sinaloa, en el año 2016 se sembraron 15,105 ha de chile que representaron 21.7 % de la superficie total sembrada con hortalizas en el Estado, con un valor de producción total de \$3,388 millones de pesos (CODESIN, 2017).

A pesar de la falta de registros oficiales, en el año 2006 se reportó la recolección de más de 100 toneladas de chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Sin embargo, esta cantidad varía considerablemente porque las sequías (prolongadas en primavera y verano) y heladas (extremas en invierno) disminuyen las poblaciones silvestres (Robles y Garza, 2015). Así, en el 2010 la colecta de chiltepín solo alcanzó 77.3 t, y para 2011 colapsó hasta 46.7 t. Esta situación propició incrementos importantes en los precios por kg; pasaron de \$600.00 en el año 2006 a \$800.00 en 2010 y \$1,200.00 en el 2011 (Robles y Garza, 2011).

La Comisión Nacional Forestal (CONAFOR, 2010) reportó que los nombres comunes del chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) se relacionan con los lugares de distribución: chiltepín, chile de monte y chile piquín. Los nombres científicos sinónimos son: *Capsicum aviculare* L., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. y *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*. Este último es el que Gentry (1942) identificó para el estado de Sonora, México.

En Sonora, el chile chiltepín es un arbusto que solo prospera de forma silvestre en las regiones del sur, centro, y la zona serrana oriental del estado. Crece en las orillas de los arroyos y a lo largo de cañadas del matorral desértico, matorral espinoso, selva baja caducifolia y encinares. Es un recurso fitogenético silvestre que se aprovecha en los meses de mayo a agosto, cuando se presenta la fructificación. Su cultivo como hortaliza es complicado porque no se han podido establecer sus requerimientos agronómicos y culturales. Los recolectores solo acuden a las zonas donde crecen las plantas y cortan el 50% de los frutos, en el mejor de los casos, o su totalidad. Esta práctica de extracción irracional ocasiona la disminución irreversible de poblaciones naturales y condena a la especie a su desaparición (Coronado *et al.*, 2013). También la deforestación de grandes extensiones de matorral con métodos de matarrasa para uso agrícola y pecuario eliminan las poblaciones naturales (Araiza *et al.*, 2011; Medina *et al.*, 2010).

Aunado a estas prácticas, las semillas presentan bajos porcentajes de germinación, ya que en su hábitat natural es necesario que sean ingeridas por aves, cuyo paso por el tracto digestivo contribuye a la germinación (Arcia, 1985; Bañuelos *et al.*, 2008). Estas limitantes no permiten estimar las poblaciones naturales de la especie. Por otro lado, mediante las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se pueden desarrollar protocolos de propagación para especies que enfrentan problemas en su reproducción natural. De esta manera se podrían evaluar técnicas *in vitro* para solucionar la problemática de sobreexplotación del chile chiltepín en su estado silvestre y conservar el germoplasma nativo.

Por los antecedentes mencionados, se definió el presente estudio para identificar las condiciones de la germinación *in vitro* y morfogénesis *in vitro* de chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*).

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Generales

- Establecer las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*).
- Desarrollar un sistema eficiente para la morfogénesis *in vitro* por organogénesis directa de chile chiltepín.

2.2 Específicos

- Definir el método de desinfección superficial de semillas de chile chiltepín para el establecimiento del cultivo aséptico.
- Determinar las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de semillas de chile chiltepín.
- Establecer las condiciones óptimas de cultivo y de reguladores de crecimiento para la inducción y multiplicación de brotes a partir de diferentes tipos de explantes (yemas, hojas y tallo) de chile chiltepín.
- Definir las condiciones de cultivo y de reguladores de crecimiento óptimas para el enraizamiento *in vitro* de plantas de chile chiltepín.

2.3 Hipótesis

La germinación *in vitro* y las respuestas morfogénicas del chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) dependen del tipo de explante, así como de las combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento utilizadas en cada una de las etapas de la ruta morfogénica por organogénesis directa.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Origen e importancia del chile

El centro de origen y domesticación del chile (*Capsicum annuum* L.) es Mesoamérica, específicamente México y Guatemala. En México la distribución de *C. annuum* var. *annuum* es nacional y agrupa la mayoría de los tipos cultivados (Medina *et al.*, 2010). El chile chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser y Pickersgill), es un arbusto de amplia distribución, se encuentra desde Norte América hasta Centroamérica; en la parte norte de México se encuentra en los estados de Coahuila, Tamaulipas y Nuevo León (donde es llamado chile piquín) hasta Sonora, Sinaloa y Baja California (Miranda *et al.*, 2006).

El chile chiltepín, como componente de la vegetación del matorral submontano del noreste de México, es una planta anual que también crece de manera continua en zonas tropicales (Moreno *et al.*, 2012). Es una especie de importancia socioeconómica por el valor alimenticio de sus frutos (Rodríguez, 2005), y posee propiedades medicinales (Días, 1977; Morales, 1986). Específicamente se le han atribuido propiedades para tratar problemas cardiovasculares, enfermedades crónico-degenerativas, estimulante, digestivo y colerético, así como su capacidad de reducir los riesgos de contraer cáncer y como bactericida (Moreno *et al.*, 2012).

3.2 Descripción botánica

El chile chiltepín está clasificado como *Capsicum annuum* L., var. *glabriusculum* (Heiser y Pickersgill, 1969) aunque es causa de múltiples controversias entre taxónomos, quienes han dado a esta variedad distintos nombres, como los enlista Long (1998): *minus* (Figuerhut); *baccatum* (Terpó); *minimum* (Heiser y Pickersgill); *aviculare* (D'Arcy y Eshbaugh) y variedad *glabriusculum* (Heiser y Pickersgill) (Araiza *et al.*, 2011).

El chile chiltepín es un arbusto anual o perenne profusamente ramificado, que puede alcanzar 2 m de altura. Es de tallos delgados que con frecuencia se trepan sobre otros arbustos. Generalmente es una planta compacta redonda de 1.5 m de diámetro; con hojas de pecíolos delgados de 1 a 2.5 cm de largo (Figura 1a), estrechamente alados, limbos ovados a lanceolado-ovados, de 1 a 4 cm de ancho, y de 2 a 6 cm de largo; flores solitarias con cáliz de 1.5 a 2 mm de largo, corola blanca de 6 a 9 mm de diámetro (Figura 1b); los frutos son bayas globosas o elipsoidales, de 6 a 8 mm

de diámetro, rojos al madurar; las semillas son amarillas de 2.5 a 3 mm (Figura 1c) (Coronado *et al.*, 2013).



Figura 1. Chile chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). a) Planta con frutos, b) Flor, c) Semillas. (CONAFOR, 2009).

En estado inmaduro el fruto es de color verde oscuro debido a la alta concentración de clorofila (Figura 2b); sin embargo, al madurar se torna de color rojo, por la acumulación de pigmentos rojos conocidos como licopersinas (Figura 2a). Las plantas de chile chiltepín alcanzan su madurez reproductiva entre los seis y diez meses de edad. La floración comienza durante los meses de mayo y dura hasta agosto, y la fructificación es de junio a octubre. El chile chiltepín crece bajo protección de árboles en sitios montañosos cercanos a márgenes de arroyos y cañadas (Gentry, 1942; Nabhan, 1985; Nabhan *et al.*, 1990; Araiza *et al.*, 2011).



Figura 2. Fructificación de chile chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*). a) Frutos maduros, b) Frutos inmaduros de color verde (CONAFOR, 2009).

3.3 Cultivo del chiltepín

3.3.1 Requerimientos ambientales

La planta vive en lugares serranos, pues depende de una temperatura entre 15 y 30 °C, luz (fotoperiodo de 14 horas oscuridad y 10 horas luz) y humedad relativa entre 75-100% (Villalón *et al.*, 2002). El chile chiltepín prospera principalmente en suelos de tipo vertisol y rendzinas, de texturas migajón-arcillosa, profundas, bien drenadas, con alto contenido de materia orgánica y pendientes menores de 8%, en vegas de escurrimientos naturales en época de lluvias. Las poblaciones naturales del chile chiltepín se localizan principalmente en altitudes menores a los 1,300 m, con precipitaciones pluviales anuales de más de 500 mm y temperatura media anual entre 21 y 24 °C con baja probabilidad de ocurrencia de heladas (Medina *et al.*, 2010).

3.3.2 Plagas y enfermedades

El chile, en general, es un cultivo susceptible a daños por enfermedades bióticas y no bióticas en cualquier etapa de su desarrollo. Las enfermedades bióticas son causadas por hongos, bacterias, nematodos y virus. Las enfermedades no bióticas o no infecciosas, son causadas por factores externos como temperatura, luz, humedad del suelo y desbalance nutricional (INIFAP, 2008).

En los últimos años, la rentabilidad del cultivo ha sido seriamente amenazada por diversos factores, entre ellos los problemas fitosanitarios, que reducen los rendimientos y, por ende, la economía de los agricultores.

Entre los problemas fitosanitarios de importancia destacan las plagas de paratrioza, el picudo del chile, los pulgones (*Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Aphis gossypii*), Thrips (*Frankliniella occidentalis*) y mosquita blanca (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*). Muchos de ellos son vectores de virus que afectan gravemente al cultivo (INIA, 2010).

Entre las enfermedades sobresalen la secadera del chile, la cenicilla, bacteriosis y la marchitez por *Phytophthora*. Aunque no todas las enfermedades se presentan en las diferentes regiones donde se cultiva el chile, éstas reducen la producción y calidad del fruto, por lo que su diagnóstico es el primer paso para el manejo adecuado de las mismas (INIFAP, 2008).

INIFAP (2008) hace un listado de las principales enfermedades que afectan al cultivo de chile:

- **Marchitez por *Phytophthora*.** Su agente causal es *Phytophthora capsici* L., un hongo que puede ocasionar daños de hasta el 80% del cultivo en las regiones productoras. Se presenta como una marchitez leve en la planta hasta convertirse en severa a los tres o cuatro días. En el tallo, en el área del cuello, se puede observar un necrosamiento muy marcado. Las plantas enfermas presentan una banda parda oscura que ciñe el cuello, debido a esto, se marchitan y mueren. En las hojas y ramas se presentan lesiones como tizones de colores verde amarillento y después color café. En los frutos se presentan manchas acuosas de color verde claro cubiertas por el micelio del hongo. Los frutos afectados permanecen adheridos a la planta. Las semillas también son afectadas, al abrir el fruto se detecta micelio sobre las semillas podridas (Mendoza y Pinto, 1985; Romero, 1988; Mendoza, 1999; Velázquez *et al.*, 2003; Velázquez *et al.*, 2002).
- **Mancha foliar por *Alternaria*.** Es ocasionada por el hongo *Alternaria spp.* Los primeros síntomas se presentan como pequeñas manchas circulares de 0.5 mm de diámetro de apariencia acuosa que posteriormente se tornan de color café oscuro, rodeado de un halo verde o amarillento. Estas manchas crecen rápidamente y pueden cubrir toda la hoja. En estas lesiones se observan anillos concéntricos oscuros, característicos de la enfermedad y en donde existe una gran producción de esporas que se dispersan por el viento y la lluvia (García, 1984; Mendoza, 1993; Mendoza, 1999). Este hongo también se ha encontrado en

el fruto, como lesiones de color negro; sin embargo, no se ha determinado su presencia en esas lesiones ya sea como patógeno o como contaminante, ya que requiere de heridas en el fruto para que el hongo pueda infectarlo (Velázquez *et al.*, 2002).

- **Cenicilla.** Su agente causal es el hongo *Leveillula taurica* (Lev.) G. Arnaud u *Oidiopsis taurica* (E. S. Salmon). Sus síntomas se presentan principalmente en las hojas inferiores; el hongo produce pequeñas manchas de color blanco de apariencia polvosa compuesta de esporas que emergen de las estructuras del hongo. Estas manchas pueden cubrir por completo la lámina foliar (Castillo, 1987). Las hojas infectadas se tornan cloróticas, después café o gris claro y mueren. Las orillas de las hojas se enrollan hacia arriba y dejan al descubierto las fructificaciones del hongo (Mendoza y Pinto, 1985; Mendoza, 1999).
- **Virus Mosaico del Pepino (CMV).** Pertenece al grupo de los cucumovirus. Las razas de CMV difieren en rango de hospedantes y métodos de transmisión (Conti *et al.*, 2000; Murphy, 2003). Los síntomas se muestran como un achaparramiento severo; forraje amarillento con apariencia correosa; las hojas son más angostas y los frutos presentan malformaciones.

3.3.3 Comercialización

En el estado de Sonora la comercialización del chile chiltepín es una actividad que se restringe al ámbito local; se considera una actividad agrícola relativamente joven, ya que hace 30 años aproximadamente, la recolección de estos frutos se hacía sólo con fines de autoconsumo (Bañuelos *et al.*, 2008). El desplazamiento de la población originaria de Sonora hacia las distintas regiones del Noroeste, aunado a su creciente popularidad y lo atractivo de los precios de esta hortaliza en el mercado, entre otros factores, propiciaron un aumento en la recolección del fruto con fines comerciales, convirtiéndose en una actividad económica importante para ciertas regiones del estado de Sonora (Robles y Garza, 2015).

Como en cualquier actividad comercial, los intermediarios han desempeñado una función clave, pues son un factor importante en la identificación del mercado. La presencia del chile chiltepín en el segmento de los restaurantes, en el mercado de las salsas, además del desplazamiento del picante hacia otros estados del país, es debido en parte a la acción de estos intermediarios que, de manera empírica, han empezado a cubrir dicha demanda (Robles y Garza, 2015).

Usar el chile chiltepín como condimento en los alimentos tiene cierta ventaja en relación con otros chiles, ya que este brinda un sazón picante pero conservando el sabor original de los platillos. Es común para los sonorenses comer este condimento: verde fresco, en conserva con vinagre o simplemente con sal gruesa y ajo, rojo seco, en salsa, en pasta y hasta molido con sal en diferentes platillos (Coronado *et al.*, 2013).

3.4 Propagación del chile chiltepín

3.4.1 Propagación Sexual

Durante los últimos años se han realizado algunos experimentos sobre la propagación del chile chiltepín con el objetivo de obtener mayor cantidad de plantas por medio de tratamientos de acondicionamiento por inmersión a la semilla. García *et al.* (2010) evaluó muestras de 50 semillas que se sumergieron durante 24 h en 14,450 μM de AG₃ (Cyto-Gibb® y Bio Gibb®); a 28 °C y fotoperiodo de 8 h. Se observó que el efecto de Cyto-Gibb sobre la germinación fue mayor (82%) comparado con Bio Gibb (68%) y el testigo (33%).

Araiza *et al.* (2011) evaluó la inmersión de las semillas de chile chiltepín en una solución de AG₃ (1,156 μM) durante 20 horas. Después fueron sembradas en charolas con capacidad de 500 plántulas con sustrato de vermiculita. El porcentaje de germinación obtenido fue del 97% entre la tercera y cuarta semana de su siembra. En otro estudio, Parra (2006) evaluó diferentes concentraciones de AG₃ (5,780; 8,670 y 11,560 μM) para promover la germinación. Las semillas se colocaron en charolas de 200 cavidades en las cuales se utilizó musgo humedecido como sustrato. El tratamiento con 11,560 μM de AG₃ promovió 75% de la germinación después de 20 días de la siembra.

González *et al.* (2015) probó Biozyme TF® (1.6 % v/v) con diferentes tiempos de inmersión de la semilla de chile chiltepín (0, 12, 18, 24 h). Las semillas se sembraron en charolas de polietileno transparentes las cuales se llenaron con sustrato Cosmopeat® (sustrato grado hortícola) humedecido. En los resultados se observó que 12 h de inmersión con 1.6% de Biozyme TF® favorecieron el 61.5% de germinación, mientras que los tratamientos de 18 y 24 h se incrementaron a 83.3 y 86.6%, respectivamente.

Cano *et al.* (2015) evaluó el efecto de 14,450 μM de AG₃ en tratamientos de inmersión durante 24 h sobre diferentes colectas de chile piquín provenientes de siete estados de México y del sur

de Estados Unidos. Las semillas se colocaron en cajas Petri sobre toallas de papel humedecido con agua destilada. Como resultado se logró elevar la tasa promedio de germinación hasta 59% en 14 de las 16 colectas a los 21 días después de la siembra, y la respuesta estuvo estrechamente relacionada con el origen de las colectas. Así mismo, Ramírez (2017), siguió la misma metodología en semillas extraídas de frutos de 55 colectas de diferentes regiones de México y una de Estados Unidos, de las cuales, solo se pudo producir plántula de 34 colectas debido a fallas en la germinación de las 21 restantes.

3.4.2 Propagación asexual

No se han reportado estudios de propagación vegetativa para el chile chiltepín. La mayoría de los estudios sobre esta especie han abordado la inducción de la germinación de semillas. De generarse este tipo de reproducción en esta especie, se abriría un umbral para la multiplicación de la misma, ya que ayudaría al incremento de la población de plantas en las diferentes regiones de recolección.

3.5 Morfogénesis

Se denomina morfogénesis a los cambios morfológicos que ocurren, como resultado de cambios estructurales y/o de organización durante el desarrollo de un organismo. En este sentido la totipotencia de las células vegetales permite inducir la formación de estructuras y órganos *de novo*. Por lo tanto, la morfogénesis *in vitro* consiste en la obtención de órganos o embriones a partir de un explante (Sharry *et al.*, 2015).

3.5.1 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis *in vitro* puede definirse como la génesis o iniciación de la forma y función de los organismos vivos. Su estudio tiene como objetivo fundamental identificar los procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que conducen a la aparición de nuevas estructuras organizadas en el cuerpo de la planta. También se define como el desarrollo biológico junto con el control del crecimiento celular y la diferenciación celular (Pierick, 1990; Taiz y Zeiger, 2006).

La morfogénesis *in vitro* depende de la capacidad de las células somáticas, particularmente las de tejido parenquimatoso para regenerar una planta completa. Dichas células son totipotentes y son las más abundantes en las primeras etapas del crecimiento de las plantas, por lo que el cultivo *in vitro* de tejidos jóvenes presenta mayores posibilidades de regeneración. La morfogénesis *in vitro*

se lleva a cabo mediante la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en el cual el desarrollo (crecimiento y diferenciación) de las plantas se efectúa mediante condiciones controladas de asepsia, en un medio de cultivo artificial y definido, con el balance de reguladores de crecimiento y otros suplementos orgánicos e inorgánicos. También incluye el control estricto de factores ambientales (luz y temperatura) que inciden en la generación de un óptimo desarrollo, a fin de lograr las respuestas morfogénicas requeridas a partir de un explante adecuado (Laux y Jürgens, 1997).

3.5.2 Organogénesis

La organogénesis consiste en la formación de *novo* de órganos (raíces y/o brotes adventicios) a partir de explantes cultivados *in vitro* (Torrey, 1966). Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división (Bernal, 2013). La organogénesis *in vitro* puede inducirse a través de meristemas preexistentes (directa) o mediante la formación de órganos *de novo* (directa o indirecta).

La propagación de brotes preformados consiste en la multiplicación de plantas a partir de yemas axilares preexistentes y no es más que la aceleración *in vitro* del crecimiento de los meristemas. En este caso, las condiciones *in vitro* estimulan el desarrollo de las yemas axilares, permitiendo la formación de una planta por cada yema. La eficiencia de este sistema estriba en que el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares preexistentes en el explante; por otro lado, el sistema presenta la ventaja de que los individuos regenerados muestran una gran estabilidad genética. También es posible obtener la formación de yemas *de novo* a partir de tejido no meristemático, mediante organogénesis directa; éstas se originan de una célula o un pequeño grupo de ellas, cuando se cultivan explantes en medios con elevadas concentraciones de citocininas (Sharry *et al.*, 2015).

La propagación vía organogénesis indirecta ocurre cuando primeramente se origina un callo y a partir de él se diferencian órganos. En la organogénesis indirecta los callos pueden formar brotes y raíces. La capacidad morfogénica o competencia de estos callos está en función del balance de reguladores de crecimiento adicionado al medio de cultivo (Woodward, 1997).

3.5.3 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la capacidad que poseen ciertas células vegetales de formar embriones por un proceso semejante a la embriogénesis cigótica. Esto no sucede únicamente en cultivos *in vitro*, ya que es relativamente frecuente en algunas familias de plantas, fenómeno conocido como apomixis (Radice, 2004). Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa y la indirecta. En la embriogénesis somática directa, los embriones aparecen directamente sobre el explante original. En la embriogénesis somática indirecta, los embriones se originan a partir de un callo o de un cultivo de células embriogénicas en suspensión (Pérez *et al.*, 1999).

Durante la embriogénesis somática los embriones pasan por una serie de fases intermedias denominadas globular, corazón y torpedo que son similares a las que ocurren en la embriogénesis cigótica (Radice, 2004).

3.6 Factores que influyen en la morfogénesis *in vitro*

3.6.1 Medio de cultivo

Los medios de cultivo son soluciones acuosas donde se desarrollan células o tejidos vegetales. El desarrollo de éstos solo ocurre en presencia de los nutrientes requeridos (que dependen del microorganismo o tipo de células o tejido en particular). La composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al explante y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural. Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y reguladores de crecimiento (Tirado y Perea, 2011).

3.6.2 Explante

El tratamiento de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que ésta se encuentre y la parte de la cual se tome el explante determinarán la respuesta morfogénica en condiciones *in vitro* (Bernal, 2013).

La elección del explante constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada, esto debido a que algunos explantes suelen ser más susceptibles a la formación de callo, o bien, de brotes dependiendo de la especie (Litz y Jarret, 1991).

3.6.3 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son los compuestos más importantes que se adicionan a un medio de cultivo. De los objetivos de la investigación dependerá el tipo y dosis de regulador de crecimiento que se agregará al medio de cultivo. Los reguladores se dividen en compuestos con actividad de tipo auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno; también se agrupan en retardantes e inhibidores del crecimiento (Sharry *et al.*, 2015).

Las **auxinas** estimulan el alargamiento celular y promueven la división celular en cultivos de tejidos. Normalmente, se adicionan combinadas con citocininas durante la etapa de multiplicación o sin ellas, en la etapa de enraizamiento.

Las **citocininas** son utilizadas para estimular la división celular, especialmente al combinarlas con auxinas. Altas concentraciones inducen la formación de brotes adventicios e inhiben la formación de raíces, promueven la multiplicación de tallos y proliferación de yemas laterales, a través de la disminución de la dominancia apical. Por otra parte, las citocininas permiten retardar el proceso de envejecimiento celular e influyen en el transporte de auxinas. Dentro de las citocininas naturales se encuentra la *Zeatina*, que se extrae del endospermo del maíz, y 6 isopentanol adenina (2IP), aislada de *Clostridium tumerfaciens*, ésta produce un sobre crecimiento de los tejidos. Citocininas sintéticas son: 6-benciladenina (BA) o también conocida como bencilanimopurina (BAP); la cinetina (CIN o KIN) también conocida como 6-furfurylamino purina (FAP). La cinetina fue la primera citocinina identificada a partir de síntesis por la degradación térmica del ADN (Sharry *et al.*, 2015).

Las **giberelinas** son dipertenos (con C20 o C19), derivados de la vía isoprenoide, con una estructura básica denominada esqueleto gibánico o giberelano; la giberelina más difundida es el AG₃ – o ácido giberélico. Las giberelinas provocan el alargamiento celular; eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla de cereales mediante la inducción de la producción de la α – amilasa; inducen la floración de plantas de días largos; eliminan la latencia de las yemas y semillas e intervienen en la tuberización; entre otras (Bernal, 2013).

Brasinoesteroides (BR). Los brasinoesteroides más ampliamente distribuidos en las plantas son los que poseen 28 átomos de carbono (C28), grupo en que el brasinólido es el representante más activo. En los primeros momentos de su descubrimiento, los BR no recibieron gran aceptación como hormonas esenciales del desarrollo de las plantas, porque su actividad es similar a la de

otras fitohormonas (Clouse, 1996). Los estudios efectuados con los brasinoesteroides han demostrado sus efectos múltiples en la elongación de los tallos, la actividad en la fotomorfogénesis, la inhibición del crecimiento de la raíz, la senescencia, la división celular, la inducción de la biosíntesis del etileno, el desarrollo vascular y reproductivo, el crecimiento del tubo polínico, la polarización de la membrana y el bombeo de protones, las relaciones fuente/demanda, la modulación del estrés, entre otros (Clouse y Sasse, 1998; Mazorra y Nuñez, 2008).

El **ácido abscísico** (ABA) es un sesquiterpenoide particularmente importante en la respuesta a estrés y desempeña un papel importante en procesos fisiológicos, cuyos efectos varían dependiendo del tejido y estado de desarrollo de la planta. Entre sus múltiples funciones, se incluye la inducción de síntesis de proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant), con lo cual se promueve la tolerancia del embrión a la deshidratación y acumulación de proteínas de almacenamiento. Además se le atribuye el mantenimiento de la latencia de semillas; en hipocótilos, epicótilos y coleótilos inhibe el crecimiento y elongación; y en hojas promueve su senescencia (Finkelstein *et al.* 2008).

El **etileno** es un gas incoloro, es una molécula orgánica con actividad biológica, producida por todas las plantas, algunos hongos, levaduras y bacterias (Srivastava, 2002). Dentro de sus funciones fisiológicas más investigadas, se encuentran las relacionadas con la abscisión de hojas, marchitamiento de flores, maduración de frutos y otros procesos relacionados con el envejecimiento, pues se plantea su participación en la degradación de clorofila y peroxidación de lípidos de membranas. También favorece la epinastia de hojas, la germinación de semillas, pone fin a la latencia de brotes y promueve la síntesis de enzimas relacionadas con defensa a patógenos, daños mecánicos o en situaciones de estrés, entre otros (Santner y Estelle, 2009).

3.6.4 Genotipo

Es un factor determinante y es la razón por la cual no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que tanto los medios como las condiciones de cultivo deben ser específicos para cada situación en particular (Bernal, 2013).

El genotipo de la célula, tiene mecanismos reguladores de la información genética que causan que la morfogénesis sea inactiva y se pierda por completo durante el subcultivo, esto genera diferencias en la regeneración de plantas. A su vez, esta diversidad de respuesta entre las distintas

taxas pueden reflejarse en los requerimientos nutricionales y hormonales necesarios para la diferenciación (Sharry *et al.*, 2015).

La manipulación del medio de cultivo y de las condiciones ambientales conduce a que las células competentes muestren su capacidad intrínseca para el desarrollo organizado, que es el reflejo de una activación selectiva de genes. Esta activación se manifiesta a través de cambios bioquímicos, biofísicos, fisiológicos y estructurales del tejido cultivado *in vitro* (Brown y Thorpe, 1986).

3.6.5 Temperatura

La temperatura de incubación de los cultivos es un factor importante, cuanto más se asemejen las condiciones *in vitro* a las óptimas de crecimiento de la especie estudiada, mayor será la respuesta esperada (Bernal, 2013).

Se ha establecido que, para un desarrollo óptimo del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, la temperatura debe oscilar entre 26 ± 3 °C. En temperaturas mayores a 30 °C y por debajo de 21 °C, se genera una influencia negativa en el desarrollo. Diferentes temperaturas tienen un efecto pronunciado sobre el contenido de ácidos grasos en los cultivos (Endress, 1994; Razdan, 2003).

3.6.6 Luz

Para propósitos generales se sugiera utilizar, en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes que brinden entre 18.52 y 74.07 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperiodo Luz/oscuridad de 16/8 h (Litz y Jarret, 1991).

3.6.7 Humedad

La humedad relativa (HR) se define como la cantidad de vapor de agua contenida en el ambiente. Dentro de los frascos de cultivo se estima que la HR llega hasta 100%, sin embargo, esta dependerá del sello o de la cobertura del envase empleado. Porcentajes o niveles bajos de HR pueden producir un aumento en la concentración de compuestos del medio, lo que puede provocar niveles tóxicos (Bernal, 2013).

3.7 Cultivo *in vitro* del género *Capsicum*

Protocolos de regeneración *in vitro* de plantas de chile se han obtenido a partir de brotes adventicios (Ramírez y Ochoa, 1996; Pozueta *et al.*, 2001), cultivo de protoplastos (Díaz *et al.*,

1988) y de embriogénesis somática (Kintzios *et al.*, 2001). En esta última, Venkataiah *et al.* (2016) utilizó explantes de hojas y cotiledones de *Capsicum baccatum*, para inducir la formación de callo embriogénico. Se utilizó medio MS basal y varias concentraciones de sacarosa (1.0-10.0%). El pH de los medios de cultivo fue de 5.8, gelificado con 0.8% de agar Difco Bacto. Los medios fueron adicionados con 2,4-D (2.2 a 22.6 μM) y cinetina (2.3 μM). Para la maduración de los embriones se utilizaron diferentes tipos de reguladores de crecimiento en distintas concentraciones: ABA (0.3, 1.9, 3.8 y 7.6 μM); AG₃ (0.2, 1.4, 2.8 y 5.7 μM); CIN (0.4, 2.3, 4.6 y 9.2 μM); BAP (0.4, 2.2, 4.4 y 8.8 μM). La mayor respuesta en la inducción de embriones somáticos se obtuvo cuando los explantes se cultivaron en medio MS suplementado con 9.0 μM de 2,4-D y 2.3 μM de CIN a los 15 días de cultivo.

Estos protocolos se han desarrollado evaluando diferentes tipos de explante, por ejemplo, Valadez *et al.* (2009) utilizó embriones, cotiledones e hipocotilos y los cultivó en medio MS con 3 % de sacarosa, 11.8 μM de AgNO₃, 0.7 % de agar-agar, con pH de 5.7, adicionado con tres concentraciones de BAP + AIA (13.3 + 1.1 μM ; 17.8 + 1.7 μM ; 22.2 + 1.7 μM). Todos los medios evaluados favorecieron a la proliferación de brotes adventicios. Los tratamientos con 13.3 μM de BAP + 1.1 μM de AIA y 17.8 μM de BAP + 1.7 μM AIA promovieron los mayores porcentajes de explantes con formación de brotes (59.8% y 62.5%, respectivamente). Cuando se utilizaron los embriones como explantes, produjeron la mejor respuesta en términos del porcentaje de explantes que formaron brotes (89.7 %); mientras que, los hipocotilos generaron el mayor número de brotes por explante (8.3).

En otro estudio, Santana *et al.* (2005) utilizaron como explantes segmentos nodales de chile habanero y encontraron que la mayor formación de brotes se obtuvo con los explantes de 25 días de edad (7-8 brotes por explante) con 3.4 μM de TDZ, las plantas obtenidas con este tratamiento fueron más vigorosas y presentaron una morfología normal.

Para lograr la organogénesis directa de diferentes variedades de *Capsicum* se han utilizado diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento y las más utilizadas han sido citocininas y auxinas. Por ejemplo, Sanatombi y Sharma (2008) emplearon explantes de hojas, cotiledones e hipocotilos de las variedades Umorok y Chienpgui de *Capsicum chinense* para evaluar el efecto de seis diferentes concentraciones de BAP y AIA en la formación de brotes. El explante de hoja de variedad Umorok, tuvo la mejor respuesta en el tratamiento con las concentraciones de 8.4 μM

de BAP y 1.0 μM de AIA (10.7 ± 1.92 brotes por explante). En otro estudio, Valadez *et al.* (2009) observaron la mejor respuesta en cuanto a la formación de brotes en los explantes de hipocotilo de *Capsicum chinense* (14.6 brotes por explante) en un medio MS adicionado con 0.1 μM de AIA y 2.2 μM de BAP. Las plantas obtenidas tuvieron un 95% de supervivencia en la etapa de aclimatación. De igual forma, Kehie *et al.* (2012) desarrollaron una metodología a partir de segmentos nodales de *Capsicum* spp. cultivados en concentraciones de TDZ (0.1 a 3.1 μM) y BAP (0.4 a 7.1 μM). La mayor formación de brotes (13 ± 0.7 brotes por explante) se obtuvo con 1.7 μM de TDZ, seguido del tratamiento con 3.5 μM de BAP (10 ± 0.37 brotes).

Robledo y Carrillo (2004) desarrollaron un protocolo de regeneración *in vitro* de plantas de dos tipos de chile: Árbol y Mirasol. La respuesta organogénica de hipocotilos y cotiledones, obtenidos de plántulas de 19 días de edad fue analizada en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BAP (5.9 μM a 29.3 μM), AIA (0.28 μM a 5.71 μM), ácido α -naftalenacético (ANA) (0.16 μM a 0.53 μM) AG₃ (0.86 μM). Todas las combinaciones de reguladores de crecimiento probadas promovieron la formación de brotes adventicios tanto en los explantes de hipocotilo como en los de cotiledón. Fue posible obtener hasta 5.1 ± 3.0 brotes por explante (cotiledón) cuando se adicionó al medio 17.7 μM de BAP y 1.71 μM de AIA.

Otra de las variables evaluadas en diferentes experimentos para la micropropagación del género *Capsicum* ha sido el porcentaje de sales minerales contenidas en el medio. Por ejemplo, Grozeva y Todorova (2015), utilizaron hipocotilos y cotiledones de dos variedades comerciales de chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) y los establecieron en medio MS con diferentes concentraciones de sales minerales (100%, 50% y 25%) suplementado con BAP (13.3 μM), AIA (1.7 μM) y AG₃ (0.8 μM). En ambas variedades la frecuencia de regeneración varió de 0% a 48.3%. El mayor porcentaje de explantes de cotiledones regenerados en la variedad Yasen F1 se logró en el medio MS (100%) con 48.3 % mientras que en la variedad Kurtovska Kapia 1619 se logró una regeneración del 33.3% en el medio MS al 50% de concentración de sales. Del mismo modo, Jimarez (2014) utilizó embriones e hipocotilos de chile habanero (*Capsicum chinense*) como explantes y los cultivó en medio MS con diferentes concentraciones de sales (100%, 50%, 25%) y sacarosa (30 g L⁻¹, 15 g L⁻¹, 7.5 g L⁻¹ y 3.25 g L⁻¹) adicionados con BAP (17.7 μM), AIA (1.7 μM), AgNO₃ (11.76 μM). Los explantes de hipocotilo que tuvieron mayor porcentaje de formación de primordios de brote se presentaron en los medios MS al 50% y 25% adicionados con 15 g L⁻¹ de sacarosa (21.66%).

Una gran variedad de especies, cultivares y genotipos del género *Capsicum* han sido objeto de estudios utilizando el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Hailu *et al.* (2015) utilizó explantes de segmentos de tallo y segmentos nodales en la inducción de organogénesis directa para la propagación de *Capsicum annuum* cultivar Mareko Fana. En este experimento utilizó un medio de cultivo básico de MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP (6.6, 13.3, 19.9, 26.6 y 33.3 μM) en combinación con AIA (2.8 μM) y logró un máximo de 9.2 brotes por explante en segmentos nodales y 8.6 brotes en explantes de tallo con 13.3 μM de BAP y 2.8 μM de AIA. De igual forma, Raj *et al.* (2015) establecieron un protocolo de regeneración *in vitro* para *Capsicum chinense* Jacq. Naga Chili, uno de los cultivares de Chile más picantes en el mercado. Para este estudio utilizaron un medio básico MS suplementado con ocho diferentes combinaciones de BAP (8.8-31.0 μM) y AIA (0-2.8 μM) para la inducción de brotes y seis combinaciones de BAP (4.4-13.3 μM) y ANA (5.3 μM) para la formación de callo, donde el máximo número de brotes lo obtuvieron en el medio suplementado con BAP (22.2 μM) y AIA (2.8 μM) y el mayor porcentaje de inducción de callo se obtuvo en el medio suplementado con BAP (13.3 μM) y ANA (5.3 μM). En otro estudio, Orlinska y Nowaczyk (2015) utilizaron cuatro genotipos de *Capsicum* spp. (California Wonder, ATZxSono F1, Jalapeño y SF-9) para evaluar su efectividad en la propagación *in vitro*. Utilizaron un medio básico MS suplementado con diferentes reguladores de crecimiento (2.0 g L⁻¹ de ácido 2-N-morpholine etanesulfónico, 9.9 μM de AgNO₃, 2.2 μM de AIA y 26.6 μM de BAP). La organogénesis fue efectiva en tres de los cuatro genotipos utilizados, siendo el porcentaje más bajo de efectividad el correspondiente al genotipo SF-9, siendo los explantes de germinados de semilla decapitados los que obtuvieron el mayor número de brotes.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, ubicado en el edificio de Genética, del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados.

Las fases de la ruta morfogénica se describen en la Figura 3.

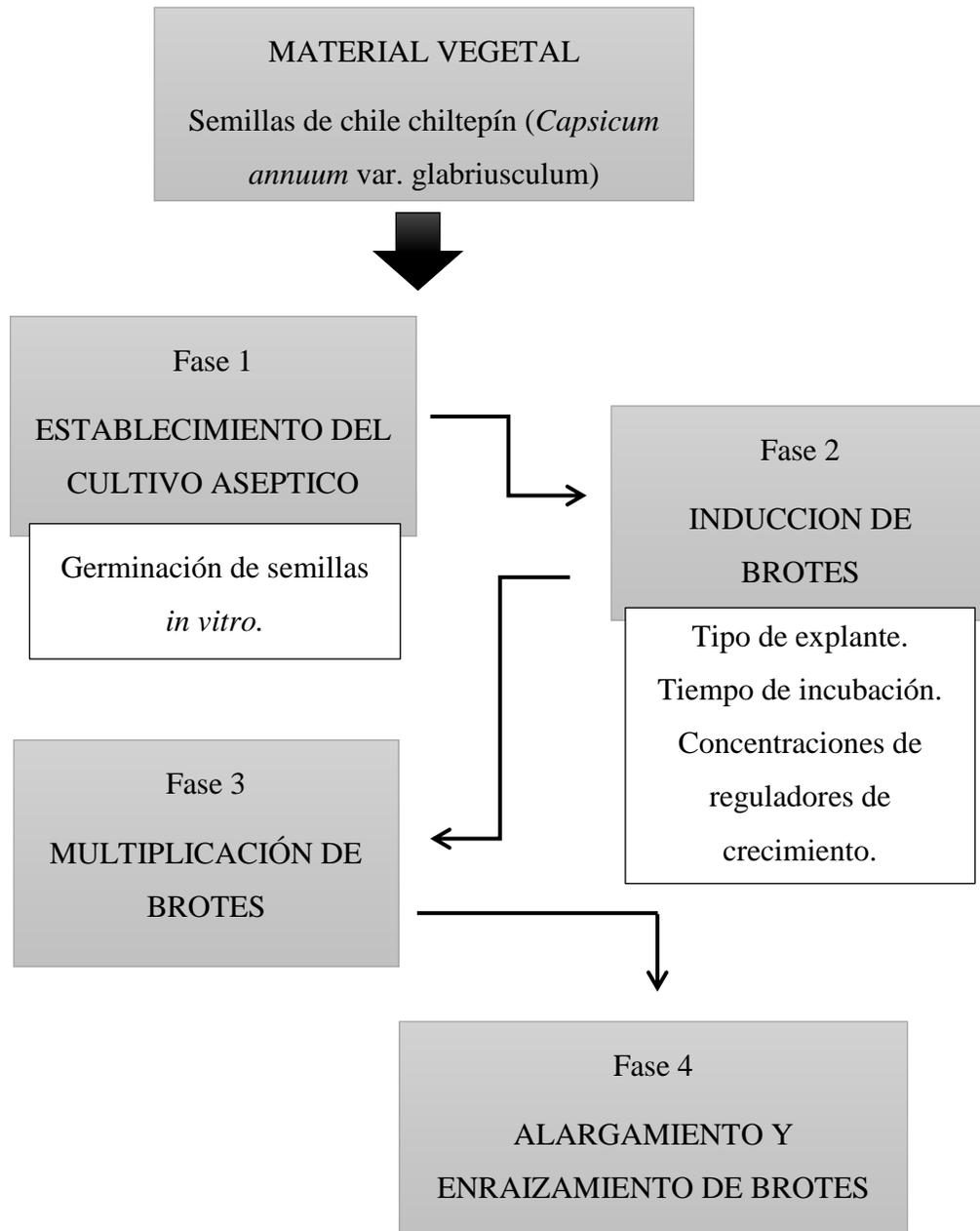


Figura 3. Diagrama de flujo establecido para la morfogénesis *in vitro* de chile chiltepín.

4.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado fueron semillas de chile chiltepín (*C. annuum* L. var. *glabriusculum*) que se extrajeron de frutos maduros y secos de forma manual con pinzas de disección y bisturí. Los frutos se adquirieron en un mercado público de la ciudad de Los Mochis, Sinaloa y son producto de la recolección que hacen productores en el municipio del Fuerte en la zona norte del estado de Sinaloa (Figura 4). Los frutos se colocaron en una bolsa de plástico hermética y se mantuvieron en refrigeración a 6 °C durante dos meses. De dichos frutos se extrajeron las semillas que se utilizaron durante la investigación.



Figura 4. Semillas de chile chiltepín empleadas para la germinación *in vitro*. a) Frutos secos; b) Semillas extraídas de forma manual.

4.2 Medio de cultivo

Se utilizó el medio básico de Murashige y Skoog (1962, MS) adicionado con sacarosa (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), ácido nicotínico (0.5 mg L⁻¹), piridoxina (0.5 mg L⁻¹), glicina (0.5 mg L⁻¹) y tiamina (0.1 mg L⁻¹) (Apéndice 1). Se solidificó con agar-agar (Merck®, 8.5 g L⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N en un potenciómetro (Thermo Scientific® modelo Orion 3 Star) antes de adicionar el agar. El medio se sirvió en frascos de vidrio de diferente capacidad de acuerdo con cada etapa del proceso de morfogénesis *in vitro*; de igual forma, varió

la cantidad de medio servida por frasco. La esterilización se hizo en un autoclave vertical (AESAR[®] 300) a 120 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min.

4.3 Condiciones de incubación

Los frascos de cultivo con el material vegetal sembrado se mantuvieron en un cuarto de incubación con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad proporcionado por lámparas de luz blanca LED (Light-Emitting Diode) con emisión de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, temperatura de 26 ± 2 °C y humedad relativa de 30%.

4.4 Establecimiento del cultivo aséptico

4.4.1 Tratamientos

Se seleccionaron semillas sanas de tamaño uniforme y se desecharon las que presentaron manchas, daño mecánico o deformaciones. Se extrajeron de forma manual de los frutos secos con ayuda de pinzas de disección y bisturí. Posteriormente se hizo una prueba de inmersión en agua para eliminar las semillas que flotarían, pues se consideraron como vanas. Las semillas se colocaron en sacos pequeños de tela fina para facilitar la aplicación de los tratamientos de desinfección (Figura 5a). Los sacos con semillas se colocaron en frascos de 45 mL de capacidad y se les agregó detergente en polvo y agua de la llave (Figura 5b). Se taparon y agitaron continuamente durante 5 min; después, se colocó una gasa ajustada con una liga para lavar y filtrar los sacos con las semillas (Figura 5c). El detergente se retiró con agua de la llave y luego se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y se llevaron a la campana de flujo laminar. Los tratamientos de desinfección se hicieron con hipoclorito de sodio comercial (NaOCl, Cloralex[®]) más Tween[®] 20 como agente surfactante (0.5 % v/v) y dos tiempos de inmersión (Cuadro 1).



Figura 5. Establecimiento del cultivo aséptico de semillas de chile chiltepín. a) Semillas seleccionadas y separadas en sacos pequeños de tela; b) Frascos con semillas y detergente en agitación continua; c) Frascos con gasas y ligas para retirar el detergente y aplicar enjuagues.

Cuadro 1. Relación de tratamientos con diferentes concentraciones de NaOCl y tiempo de inmersión para la desinfección de semillas de chile chiltepín evaluados para el establecimiento del cultivo aséptico.

Tratamiento (Núm.)	NaOCl (%)	Tiempo de inmersión (min)	Semillas (Núm.)
1	20	15	50
2	20	20	50
3	30	15	50
4	30	20	50

NaOCl: Hipoclorito de sodio comercial

Los tratamientos se aplicaron en agitación continua y cumplido el tiempo las semillas se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Posteriormente se sumergieron en una solución fungicida compuesta por Benlate (i.a. benomil 50%) + Captan (i.a. captan 50%) (4 g L⁻¹ de producto comercial de cada uno) adicionada con 0.5 % v/v de Tween[®] 20 durante 10 minutos en agitación continua y se enjuagaron cinco veces en agua destilada estéril. Las semillas se sembraron en grupos de cinco en cada frasco de 45 mL con 10 mL de medio MS con 50% de la concentración de sales inorgánicas y sumergiéndolas a 1 mm de profundidad.

4.4.2 Variables cuantificadas

Cada tercer día, por un periodo de dos semanas, se cuantificaron los porcentajes de supervivencia y contaminación por hongos o bacterias.

4.4.3 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento. Se consideró como unidad experimental cada frasco con las cinco semillas sembradas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey (P≤0.05).

4.5 Germinación *in vitro*

4.5.1 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), consistencia del medio de cultivo y temperatura

4.5.1.1 Tratamientos

Se evaluaron tratamientos de inmersión con H₂O₂ (3 %); las semillas se colocaron en sacos de tela para sumergirlas en la solución de H₂O₂ (3 %) durante 3, 6, 12 y 24 h manteniendo agitación continua; después de acuerdo a los tiempos de inmersión establecidos se fueron retirando de los tratamientos (Cuadro 2, Figura 6a, b). Una vez concluidos los tratamientos en H₂O₂, las semillas se colocaron en un frasco de vidrio esterilizado de 100 mL de capacidad y se llevaron a la campana de flujo laminar. La desinfección de las semillas se hizo con NaOCl (20 % v/v) y Tween[®] 20 (0.5 % v/v) durante 15 min; posteriormente se hicieron cinco enjuagues con agua destilada estéril (Figura 7a-d).

Cuadro 2. Relación de tratamientos del tiempo de inmersión en H₂O₂, consistencia del medio de cultivo MS y temperatura de incubación para evaluar su efecto en la germinación *in vitro* de chile chiltepín.

Tratamiento (Núm.)	H₂O₂ (h)	Consistencia del medio	Temperatura de incubación (°C)
1	3	Semisólido	26
2	3	Semisólido	30
3	6	Semisólido	26
4	6	Semisólido	30
5	12	Semisólido	26
6	12	Semisólido	30
7	24	Semisólido	26
8	24	Semisólido	30
9	3	Líquido	26
10	3	Líquido	30
11	6	Líquido	26
12	6	Líquido	30
13	12	Líquido	26
14	12	Líquido	30
15	24	Líquido	26
16	24	Líquido	30

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno al 3 %; MS: Murashige y Skoog (1962).

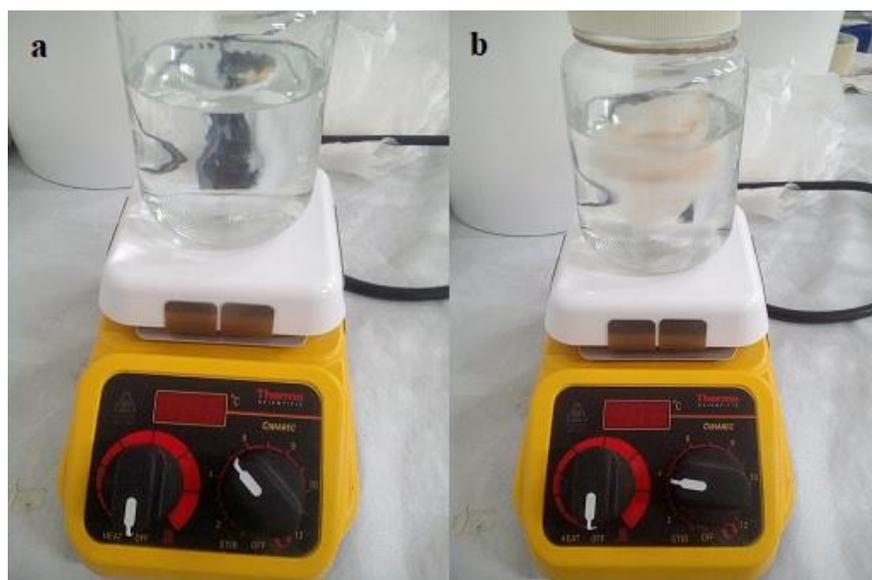


Figura 6. Inmersión de las semillas de chile chiltepín en H_2O_2 al 3 %. a) Preparación del H_2O_2 3 %; b) Sacos de semillas sumergidas en H_2O_2 .

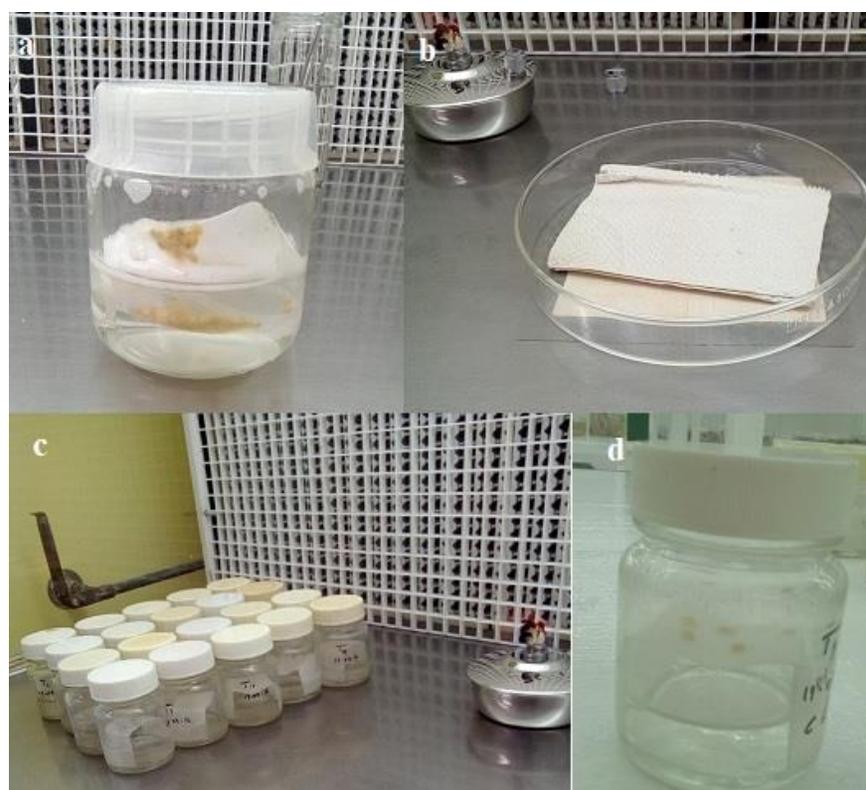


Figura 7. Desinfección y siembra de semillas de chile chiltepín para evaluar la germinación *in vitro*. a) Tratamiento de desinfección con NaOCl; b) Papel absorbente esterilizado; c) Frascos con puente de papel Heller; d) Frasco con semillas sembradas en medio líquido.

De forma paralela se evaluó la consistencia semisólida y líquida del medio de cultivo MS con 50% de la concentración de sales inorgánicas así, las semillas se sembraron en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad que contenían 10 mL de medio MS semisólido con 50% de la concentración de sales inorgánicas colocándolas en la superficie del medio. En el caso del medio líquido, las semillas se colocaron en la parte superior de puentes de papel filtro (puente de Heller) ubicados en frascos de 45 mL con 10 mL de medio MS con 50% de la concentración de sales inorgánicas. También se evaluaron dos temperaturas de incubación (26 y 30 °C) para determinar su efecto sobre la germinación. Los frascos con las semillas se mantuvieron en incubación con fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y dos condiciones de temperatura de 26±1 y 30 ±1 °C.

4.5.1.2 Variables cuantificadas

Se registró el inicio de la germinación (días) y porcentaje de germinación cada cuatro días, durante un período de cuatro semanas.

4.5.1.3 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x2x2 (cuatro tiempos de inmersión, dos consistencias de medio de cultivo y dos temperaturas de incubación), dando un total de 16 tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento; se consideró como unidad experimental cada frasco con cinco semillas sembradas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.5.2 Empleo del ácido Giberélico (AG₃) en tratamientos de acondicionamiento por inmersión de semillas de chile chiltepín

4.5.2.1 Tratamientos

Las semillas de chile chiltepín se desinfectaron con NaOCl (20%) y Tween[®] 20 (0.5 % v/v) durante 15 min se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y se colocaron en dos tratamientos de acondicionamiento por inmersión con AG₃ (2.8 y 5.7 μM) durante 30 y 60 min; como testigo se usó agua destilada esterilizada (Cuadro 3). Después se colocaron sobre papel adsorbente esterilizado para retirar el exceso de humedad y se sembraron en medio de cultivo MS con 50% de la concentración de sales inorgánicas sin reguladores de crecimiento.

Cuadro 3. Relación de tratamientos del tiempo de inmersión de semillas de chile chiltepín en AG₃ para evaluar su efecto en la germinación *in vitro*.

Tratamiento (Núm.)	Inmersión en AG ₃		Tiempo (min)
	μM	mg L ⁻¹	
1	0	0	30
2	0	0	60
3	2.8	1	30
4	2.8	1	60
5	5.7	2	30
6	5.7	2	60

AG₃: Ácido Giberélico.

4.5.2.2 Variables cuantificadas

Diariamente, durante un periodo de 30 días, se cuantificó el porcentaje de germinación para determinar la germinación total y acumulada y la velocidad de germinación (días).

4.5.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2 (tres concentraciones de AG₃ y dos tiempos de inmersión), dando como resultado seis tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento; se consideró como unidad experimental cada frasco con las cuatro semillas sembradas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey (P≤0.05).

4.5.3 Uso del Ácido Giberélico (AG₃) en tratamientos de acondicionamiento por inmersión de semillas de chile chiltepín y adicionado al medio de cultivo

4.5.3.1 Tratamientos

Las semillas de chile chiltepín se desinfectaron con NaOCl (20%) y Tween[®] 20 (0.5 % v/v) por 15 min, se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se sumergieron durante 30 y 60 min en una solución de 5.7 μM de AG₃. Después se colocaron sobre papel adsorbente esterilizado para

retirar el exceso de humedad y se sembraron en los tratamientos indicados en el Cuadro 4. Se utilizó el medio de cultivo MS con 50% de la concentración de sales inorgánicas y adicionado con AG₃ (2.8 y 5.7 μM) y un testigo sin reguladores de crecimiento.

Cuadro 4. Relación de tratamientos del tiempo de inmersión de semillas de chile chiltepín en AG₃ y adicionado al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en la germinación *in vitro*.

Tratamiento (Núm.)	Tiempo de inmersión en AG ₃ (min)	Medio MS conAG ₃	
		mg L ⁻¹	μM L ⁻¹
1	30	0	0
2	60	0	0
3	30	1	2.8
4	60	1	2.8
5	30	2	5.7
6	60	2	5.7

AG₃: Ácido Giberélico; MS: Murashige y Skoog (1962).

4.5.3.1 Variables cuantificadas

Diariamente, durante un periodo de 30 días, se cuantificó el porcentaje de germinación para determinar la germinación total, acumulada y velocidad de germinación (días).

4.5.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3 (dos tiempos de inmersión y tres concentraciones de AG₃ adicionado al medio de cultivo), dando un total de seis tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento. Se consideró como unidad experimental cada frasco con las cuatro semillas sembradas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.6 Morfogénesis *in vitro* por organogénesis

4.6.1 Inducción de brotes

4.6.1.1 Evaluación del tipo de explante y concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP)

4.6.1.1.1 Tratamientos

En primera instancia se evaluó la respuesta morfogénica de diferentes tipos de explantes: ápices de brote, segmentos nodales con yemas axilares, segmentos de hoja y tallo (Figura 8). Los explantes se disecaron de plántulas germinadas *in vitro* de seis semanas de edad y 6 cm de altura. Se usó el medio de cultivo MS adicionado con BAP (Cuadro 5). Los explantes se colocaron en frascos de 45 mL de capacidad con 10 mL de medio de cultivo y se colocaron en un cuarto de incubación a 26 ± 2 °C y fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Cuadro 5. Relación del tipo de explante y diferentes concentraciones de BAP adicionadas al medio de cultivo MS evaluadas en la inducción de brotes de chile chiltepín.

Tratamiento (Núm.)	Explante (Tipo)	BAP	
		μM	mg L^{-1}
1	Ápice de brote	13.32	3
2	Ápice de brote	26.64	6
3	Ápice de brote	39.96	9
4	Ápice de brote	53.28	12
5	Segmentos nodales	13.32	3
6	Segmentos nodales	26.64	6
7	Segmentos nodales	39.96	9
8	Segmentos nodales	53.28	12
9	Segmentos de hoja	13.32	3
10	Segmentos de hoja	26.64	6
11	Segmentos de hoja	39.96	9
12	Segmentos de hoja	53.28	12
13	Segmentos de tallo	13.32	3
14	Segmentos de tallo	26.64	6
15	Segmentos de tallo	39.96	9
16	Segmentos de tallo	53.28	12

BAP: 6-Bencilaminopurina; MS: Murashige y Skoog (1962).

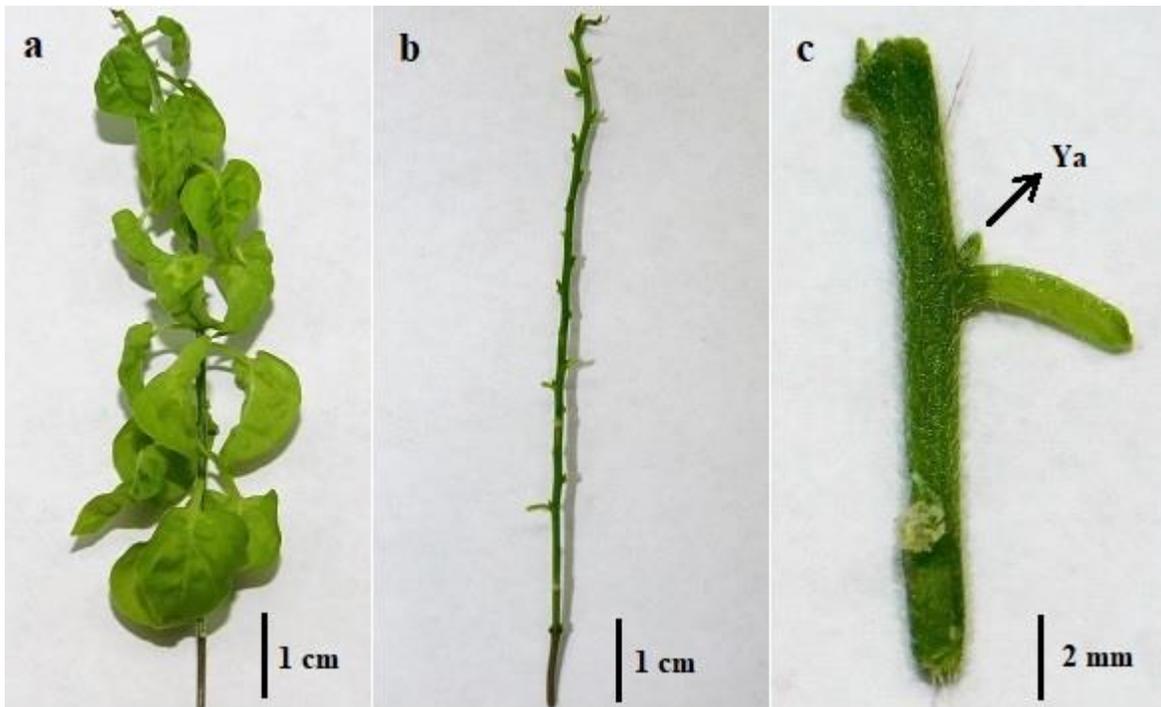


Figura 8. Plántula de chile chiltepín de 6 semanas de edad germinada *in vitro* donadora de explantes. a) Plántula con hojas. b) Plántula desprovista de hojas; c) Explante de segmentos nodales con yemas axilares de 1 cm de longitud. Ya=yema axilar.

4.6.1.1.2 Variables cuantificadas

A las cuatro semanas se cuantificó el porcentaje de brotación (definido como el número de explantes que generaron brotes) así como el número de brotes por explante y porcentaje de supervivencia.

4.6.1.1.3 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x4 con cuatro tipos de explante y cuatro concentraciones de BAP, dando un total de 16 tratamientos con 10 repeticiones por tratamiento y se consideró como unidad experimental cada frasco de medio de cultivo con un explante. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.6.1.2 Evaluación de concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0.57 μM Ácido Indolacético (AIA) en segmentos nodales con dos yemas axilares

4.6.1.2.1 Tratamientos

A partir de plántulas germinadas *in vitro* de seis semanas de edad y 7 cm de longitud se disecaron segmentos nodales de 1 cm de longitud con dos yemas laterales (Figura 7a-c). Estos explantes se cultivaron en medio MS adicionado con cinco concentraciones de BAP combinadas con 0.57 μM de AIA (Cuadro 6). Los explantes se colocaron en frascos de 45 mL de capacidad con 10 mL de medio de cultivo y se mantuvieron en un cuarto de incubación durante cuatro y seis semanas a una temperatura de 26 ± 2 °C y fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Cuadro 6. Relación de tiempo de incubación, concentraciones de BAP + 0.57 μM de AIA adicionadas al medio MS para evaluar su efecto en la inducción de brotes en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín.

Tratamiento (Núm.)	Tiempo de incubación (semanas)	BAP		AIA	
		mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM
1	4	0.5	2.22	0.1	0.57
2	4	1.0	4.44	0.1	0.57
3	4	1.5	6.66	0.1	0.57
4	4	2.0	8.88	0.1	0.57
5	4	2.5	11.1	0.1	0.57
6	6	0.5	2.22	0.1	0.57
7	6	1.0	4.44	0.1	0.57
8	6	1.5	6.66	0.1	0.57
9	6	2.0	8.88	0.1	0.57
10	6	2.5	11.1	0.1	0.57

BAP: 6-Bencilaminopurina; AIA: Ácido Indolacético; MS: Murashige y Skoog (1962).

4.6.1.2.2 Variables cuantificadas

A las cuatro y seis semanas se cuantificó el número de explantes con brote (brotación, %), número de brotes por explante; y longitud de brotes (mm).

4.6.1.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2x5 (dos periodos de incubación y cinco combinaciones de Reguladores del Crecimiento adicionados al medio de cultivo), dando un total de 10 tratamientos con 15 repeticiones por tratamiento. Se consideró como unidad experimental cada frasco con un explante. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.6.1.3 Evaluación de 11.1 μM de 6-bencilaminopurina (BAP) y concentraciones de Ácido Indolacético (AIA) en segmentos nodales con dos yemas axilares

4.6.1.3.1 Tratamientos

A partir de plántulas germinadas *in vitro* de seis semanas de edad y 7 cm de longitud se disecaron segmentos nodales de 1 cm de longitud con dos yemas laterales. Estos explantes se cultivaron en medio MS adicionado con 11.1 μM de BAP y cuatro concentraciones de AIA (Cuadro 7); como testigo se utilizó un medio de cultivo sin AIA. Los explantes se establecieron en frascos de 45 mL de capacidad con 10 mL de medio de cultivo y se incubaron durante cuatro semanas a 26 ± 2 °C y fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Cuadro 7. Relación de 11.1 μM de 6-bencilaminopurina (BAP) y concentraciones de AIA adicionadas al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en la inducción de brotes en segmentos nodales de chile chiltepín.

Tratamientos (Núm.)	BAP		AIA	
	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM
1	2.5	11.1	0	0
2	2.5	11.1	0.1	0.57
3	2.5	11.1	0.25	1.42
4	2.5	11.1	0.5	2.85
5	2.5	11.1	0.75	4.27

BAP: 6-Bencilaminopurina; AIA: Ácido Indolacético; MS: Murashige y Skoog (1962).

4.6.1.3.2 Variables cuantificadas

A las cuatro semanas se cuantifico el número de explantes con brote (brotación, %), número de brotes por explante y la longitud de brotes (mm).

4.6.1.3.3 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Las unidades experimentales fueron cada frasco de medio de cultivo con un explante. Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.6.2 Multiplicación de brotes

4.6.2.1 Evaluación de 11.1 μM de 6-bencilaminopurina (BAP) y concentraciones de Ácido Indolacético (AIA)

4.6.2.1.1 Tratamientos

Explantes con cinco brotes de 0.5 cm de longitud cultivados durante cuatro semanas se transfirieron a frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 10 mL de medio MS adicionado con 11.1 μM de BAP y cinco concentraciones de AIA (Cuadro 8). Los explantes con brotes se cultivaron durante tres semanas a 26 ± 2 °C y fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Cuadro 8. Relación de 11.1 μM de BAP y concentraciones de AIA adicionados al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en la multiplicación de brotes de chile chiltepín.

Tratamientos (Núm.)	BAP		AIA	
	mg L ⁻¹	μM	mg L ⁻¹	μM
1	2.5	11.1	0	0
2	2.5	11.1	0.1	0.57
3	2.5	11.1	0.25	1.42
4	2.5	11.1	0.5	2.85
5	2.5	11.1	0.75	4.27

BAP: 6-Bencilaminopurina; AIA: Ácido Indolacético; MS: Murashige y Skoog (1962).

4.6.2.1.2 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Después de tres semanas se cuantificó el porcentaje de brotación, número de brotes por explante y la longitud de los brotes (mm). El experimento se estableció en un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento, las unidades experimentales fueron cada frasco con un explante con cinco brotes y se sometieron a un análisis de varianza usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

4.6.3 Alargamiento de brotes

4.6.3.1 Tratamientos

Explantos con nueve brotes de 0.5 cm de longitud con tres semanas de incubación en el medio de multiplicación se subcultivaron a medio MS fresco con diferentes concentraciones de AG₃ (Cuadro 9). Los brotes se establecieron en frascos de 45 mL de capacidad con 10 mL de medio de cultivo y se cultivaron durante tres semanas a 26 ± 2 °C y fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Después de ese periodo, nuevamente se subcultivaron a medio de cultivo MS fresco con las mismas concentraciones de AG₃ y se cultivaron durante tres semanas más.

Cuadro 9. Relación de diferentes concentraciones de AG₃ adicionadas al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en el alargamiento de brotes de chile chiltepín.

Tratamientos (Núm.)	AG ₃	
	mg L ⁻¹	μM
1	0	0
2	1	2.8
3	2	5.7
4	3	8.6
5	4	11.5

AG₃: Ácido Giberélico; MS: Murashige y Skoog (1962).

4.6.3.2 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Después de seis semanas se cuantificó la longitud de los brotes (cm). El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento. Las unidades experimentales fueron cada frasco con un explante con nueve brotes. Se hizo un análisis de varianza usando el programa de análisis estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y la comparación de medias se hizo con la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

4.6.4 Enraizamiento *in vitro*

4.6.4.1 Tratamientos

Se seleccionaron brotes de 3 cm de longitud y se cultivaron en frascos de vidrio de 110 mL de capacidad con 25 mL de medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de AIB (Cuadro 10). Se incubaron durante cuatro semanas a 26 ± 2 °C y fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Cuadro 10. Relación de diferentes concentraciones de AIB adicionadas al medio de cultivo MS para evaluar su efecto en el enraizamiento *in vitro* de brotes de chile chiltepín.

Tratamientos (Núm.)	AIB	
	mg L ⁻¹	μM
1	0	0
2	1.0	5.0
3	1.5	7.5
4	2.0	10.0
5	2.5	12.5

AIB: Ácido Indolbutírico; MS: Murashige y Skoog (1962).

4.6.4.2 Variables cuantificadas y análisis estadístico

A las cuatro semanas se cuantificó el porcentaje de enraizamiento, número de raíces, longitud de raíces (cm) y presencia de pelos adsorbentes. El diseño experimental fue completamente al azar y cada tratamiento estuvo compuesto por diez repeticiones, cada unidad experimental fue un frasco con una plántula. El análisis de los datos se hizo con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Establecimiento de cultivo aséptico

Para establecer el cultivo aséptico de las semillas de chile chiltepín primero fue necesario desarrollar un método de desinfección eficiente. Para ello se evaluaron dos concentraciones de NaOCl comercial (20 y 30%, v/v; 1 y 1.5% de cloro activo) y dos tiempos de inmersión (15 y 20 min). Las diferencias estadísticas detectadas no fueron significativas ($P \leq 0.05$), todos los tratamientos probados resultaron efectivos para el establecimiento del cultivo aséptico de las semillas. Sin embargo, se definió como mejor tratamiento la menor concentración de NaOCl (20% v/v) y menor tiempo de inmersión (15 min) con la finalidad de reducir posibles daños a las semillas.

En diferentes especies vegetales, incluida *Capsicum* spp, se han establecido protocolos de desinfección exitosos usando como desinfectante NaOCl en un rango de concentración de cloro activo de 2.0-5.0 % y tiempos de inmersión similares a los evaluados en este estudio. Hailu *et al.*, (2015) estableció la desinfección superficial de las semillas de *Capsicum annuum* L. cultivar Mareko Fana aplicando tratamientos de inmersión en NaOCl (2-4% cloro activo) durante 10-25 min. En chile piquín, Mireles *et al.* (2015) lograron la desinfección de las semillas lavándolas con agua corriente y 10 % (v/v) de NaOCl durante 20 min.

En otras especies como *Alnus acuminata*, Araya *et al.* (2000) reportaron la desinfección superficial de las semillas con 2.5 % de cloro activo de NaOCl durante 15 min; con este método obtuvieron 100 % de semillas libres de contaminación. En otro estudio, Plana *et al.* (2003) logró la desinfección de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill var. Amalia) con 3 % de cloro activo de NaOCl en tratamientos de inmersión de 15 min. En semillas de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), Contreras y Almeida (2003) establecieron el cultivo aséptico con 4 % de NaOCl durante 15 min; lograron 98 % de semillas libres de contaminación. Estos métodos de desinfección demuestran que el NaOCl es efectivo para la desinfección superficial de semillas en diferentes especies y por ello es uno de los desinfectantes más empleado.

El establecimiento del cultivo aséptico requiere, en principio, la selección del explante. Cuando se parte de semillas, éstas se pueden desinfectar superficialmente y germinar en condiciones de asepsia. Para evitar la contaminación de los cultivos por microorganismos es necesario conocer el material vegetal y los posibles contaminantes específicos (Mroginski *et al.*, 2010).

El objetivo de los métodos de desinfección superficial es eliminar microorganismos sin causar daños a los explantes. Entre los compuestos más utilizados se encuentra el NaOCl (1-3 % cloro activo); hipoclorito de calcio (del 6-12%), cloruro de mercurio (0.1-1.5 %), etanol (70 %), así como la adición de un surfactante (tween-20; 0.01-0.1 %) para romper la tensión superficial y permitirle al explante un mejor contacto con el desinfectante. También se puede utilizar H₂O₂, nitrato de plata, entre otros, cuya selección y concentración se definen en función del tipo de explante (Mroginski *et al.*, 2010)

El NaOCl se considera uno de los desinfectantes más efectivos porque tiene una fuerte capacidad oxidante que lo vuelve altamente reactivo con aminoácidos, ácidos nucleicos, aminas y amidas. En presencia de agua, reacciona para formar ácido hipocloroso (HOCl), que es la forma con mayor potencial de óxido-reducción y más efectiva como desinfectante (Smith, 2013).

5.2 Germinación *in vitro*

5.2.1 Efecto del H₂O₂; consistencia del medio de cultivo y temperatura

Las semillas sumergidas en H₂O₂ (3 %; 3, 6, 12, 24 h); sembradas en dos consistencias de medio de cultivo (semisólido y líquido) e incubadas en dos condiciones de temperatura (26 y 30 °C) mostraron resultados estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$). De acuerdo con el análisis de varianza, el tiempo de inmersión en H₂O₂, la consistencia del medio, las tres interacciones doble y la triple interacción tuvieron un efecto significativo sobre la germinación *in vitro* de chile chiltepin. La temperatura fue el único factor que no tuvo efecto significativo (Apéndice 2).

Los valores más altos de germinación (32%) se obtuvieron en los tratamientos con 3 h de inmersión en H₂O₂ sembradas en medio semisólido e incubadas en 26 y 30 °C (Cuadro 11); en estos tratamientos la germinación inició a los 14 días después de la siembra. Los tratamientos con mayor tiempo de inmersión mostraron germinación baja, incluso fue nula después de 30 días.

Cuadro 11. Efecto del H₂O₂, consistencia del medio de cultivo y temperaturas de incubación sobre la germinación *in vitro* de chile chiltepín después de 30 días.

H ₂ O ₂ (h)	Consistencia del medio de cultivo	Temperatura (°C)	Germinación acumulada (%)
3	Sólido	26	32.0 a
		30	32.0 a
	Líquido	26	16.0 abc
		30	4.0 bc
6	Sólido	26	16.0 abc
		30	20.0 ab
	Líquido	26	20.0 ab
		30	4.0 bc
12	Sólido	26	0.0 c
		30	8.0 bc
	Líquido	26	0.0 c
		30	16.0 abc
24	Sólido	26	4.0 bc
		30	0.0 c
	Líquido	26	0.0 c
		30	0.0 c
DMS			16.3

Medias con diferentes letras son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); DMS: Diferencia Mínima Significativa; H₂O₂: Peróxido de hidrógeno; MS: Murashige y Skoog (1962).

El H₂O₂ es un antiséptico eficaz en la desinfección de semillas y también aumenta la germinación debido a que reblandece la testa, aumenta su permeabilidad y permite la entrada de agua y oxígeno con mayor facilidad (Liyunga *et al.*, 2006). Sin embargo, se observó que el H₂O₂ retrasó la germinación conforme se incrementó el tiempo de inmersión de las semillas. La efectividad del H₂O₂ es variable porque las semillas responden de diferente manera de acuerdo con la concentración y tiempo de exposición (Salisbury y Ross, 2000). Cano *et al.* (2015), sugiere que la germinación de semillas de chile piquín no es afectada por alguna barrera física que impida la absorción de agua, por lo tanto, las bajas tasas de germinación de la semilla son atribuibles a la latencia.

El efecto del H₂O₂ (3%) se ha evaluado en la germinación de semillas de diferentes especies con tratamientos pre-germinativos, donde los tiempos de inmersión han variado desde 2 hasta 24 h. En el género *Capsicum* varios estudios han evaluado la inmersión en H₂O₂ y su efecto en la germinación de semillas de diferentes variedades comerciales. En *Capsicum annuum* cv. California Wonder el H₂O₂ (3 %) por 24 h redujo la germinación (Yadab *et al.*, 2011). En 16 diferentes colectas de variedades silvestres de Chile piquín 24 h de inmersión en H₂O₂ tuvieron un efecto negativo, solo se obtuvo la germinación en dos colectas, sin embargo el promedio de germinación no varió en comparación con el testigo el cual fue menor de 20 % (Cano *et al.*, 2015). Esta respuesta fue similar a los resultados obtenidos en esta investigación donde el H₂O₂ tuvo efecto inhibitorio de la germinación. Estos estudios indican que el H₂O₂ tiene un efecto inhibitorio de la germinación de diferentes variedades del género *Capsicum*.

El H₂O₂ está clasificado como un intermediario estable relacionado con los radicales libres de oxígeno. Este grupo de especies químicas son generados a partir de la reducción o metabolismo del H₂O₂. Los radicales libres son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen en diferentes mecanismos a nivel celular, entre ellas las reacciones de oxidación, por lo que producen un daño oxidativo a las células al interactuar con las principales biomoléculas de un organismo (Venereo, 2002). Este modo de acción explicaría el efecto negativo observado en la germinación de Chile chiltepín cuando se aumentó el tiempo de inmersión a 6, 12 y 24 h.

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con lo reportado en semillas de caoba (*Swietenia macrophylla*), las cuales se trataron con H₂O₂ 3% durante dos horas. El porcentaje de germinación promedio fue de 28%, menor que el testigo sin H₂O₂ (62%) (López *et al.*, 2011). De igual forma en semillas de chicozapote (*Manilkara zapota*) reportaron que un tratamiento pre-germinativo con H₂O₂ 3 % durante 4 h no incrementó la germinación ya que fue similar al testigo sin H₂O₂ (62%) (Pérez *et al.*, 2010).

La consistencia de los medios de cultivo tuvo un efecto significativo en la germinación. Aunque los porcentajes fueron bajos, la mayor germinación (14.0 %) se obtuvo en el medio de cultivo semisólido mientras que en el medio líquido fue solo 7.5 % (Cuadro 12). No existen registros de investigaciones en semillas del género *Capsicum* en los cuales se haya evaluado el efecto de la consistencia de un medio líquido sobre la germinación de las semillas ya que la gran mayoría se

han hecho en medio de cultivo gelificado con agar, el cual, sirve como sustrato a la plántula resultante dándole un mejor anclaje al medio.

Cuadro 12. Efecto de tiempos de inmersión en H₂O₂, consistencia del medio de cultivo MS y temperaturas de incubación sobre la germinación *in vitro* de chile chiltepín después de 30 días.

Fuente de variación	Germinación (%)
Tiempos de inmersión (h)	
3	21.0 a
6	15.0 a
12	6.0 b
24	1.0 b
DMS	6.0
Medio de cultivo	
Semisólido	14.0 a
Líquido	7.5 b
DMS	3.2
Temperatura (° C)	
26°	11.0 a
30°	10.5 a
DMS	3.2

Medias con diferentes letras son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); DMS: Diferencia Mínima Significativa; H₂O₂: Peróxido de hidrógeno; MS: Murashige y Skoog (1962).

En otras especies como arándano (*Vaccinium consanguineum*), se evaluó el efecto de la consistencia del medio de cultivo semisólido y líquido con puente de papel (Heller) en la multiplicación *in vitro* donde después de tres semanas los explantes mostraron oxidación e incluso senescencia en el medio líquido (Jiménez y Abdelnour, 2017). En sábila (*Aloe barbadensis* Mill.) se comparó el medio de cultivo líquido con el medio gelificado en las diferentes etapas de la micropropagación y no se encontraron diferencias significativas en el número de brotes obtenidos (De Vilchez *et al.*, 2015).

La temperatura no tuvo efecto sobre la germinación, los porcentajes en ambas temperaturas fueron similares (Cuadro 13). En estudios realizados en semillas de chiltepín para la evaluación de la germinación *in vivo*, se han hecho en condiciones de invernadero donde la temperatura

oscila entre los 30-35 °C (Araiza *et al.*, 2011; Ramírez, 2008). En semillas de chile chiltepín, se evaluó el efecto de la fluctuación de la temperatura (25-30 °C) y una temperatura fija (25 °C) en cámaras de incubación. Se encontró que hubo mayor porcentaje y velocidad de germinación en las temperaturas fluctuantes (López *et al.*, 2017).

Otra forma en la que se ha evaluado el efecto de la temperatura en la germinación han sido los tratamientos hidrotérmicos, los cuales, favorecen el vigor de las semillas de chile piquín (García *et al.*, 2010). En otro estudio se logró romper la latencia en semillas de chile piquín por medio de tratamientos hidrotérmicos con agua a 50 °C por 6 minutos en combinación con AG₃ (Mireles *et al.*, 2015).

5.2.2 Tratamientos de acondicionamiento por inmersión con AG₃

Con el objetivo de incrementar los bajos porcentajes de germinación obtenidos con los tratamientos de H₂O₂, se evaluó el efecto del AG₃ (2.89 y 5.78 µM) y dos tiempos de inmersión (30 y 60 min). En los porcentajes de germinación se observaron efectos significativos por las concentraciones de AG₃, los tiempos de inmersión y la interacción de ambos factores (P≤0.05, Apéndice 3).

Los mayores valores de germinación se obtuvieron con 5.78 µM de AG₃ con 80 %, en comparación con el testigo en agua destilada esterilizada donde fue de 52.5 % (Cuadro 14). En cuanto a los tiempos de inmersión, el mayor porcentaje se obtuvo de semillas sumergidas por 30 minutos con 73.3 % mientras que con 60 min fue de 61.6 % (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto de concentraciones de AG₃ y tiempos de inmersión sobre la germinación *in vitro* de las semillas de chile chiltepín después de 30 días.

Fuente de variación	Germinación (%)
Concentración AG₃ (µM)	
0	52.5 b
2.89	70.0 a
5.78	80.0 a
DMS	13.9
Tiempo de inmersión (min)	
30	73.3 a
60	61.6 b
DMS	9.4

Medias con diferentes letras son significativamente diferentes (P≤0.05); DMS: Diferencia Mínima Significativa; AG₃: Ácido Giberélico.

En la interacción de AG₃ y tiempos de inmersión, los valores más altos de germinación se obtuvieron con 30 min de inmersión en 2.89 y 5.78 μM de AG₃ con 85 % en comparación con el testigo con inmersión en agua destilada por 30 min con 50 % (Cuadro 14).

Cuadro 14. Efecto del AG₃ en tratamientos de acondicionamiento con tiempos de inmersión sobre la germinación *in vitro* de chile chiltepín después de 30 días.

AG ₃ (μM)	Tiempo (min)	Germinación (%)
0	30	50.0 c
	60	55.0 bc
2.89	30	85.0 a
	60	55.0 bc
5.78	30	85.0 a
	60	75.0 ab
DMS		24.4

Medias con diferentes letras son significativamente diferentes (P≤0.05). DMS: Diferencia Mínima Significativa; AG₃: ácido Giberélico.

Los tiempos de inmersión no tuvieron un efecto marcado en la germinación *in vitro*. En ambas concentraciones de AG₃ (2.83 y 5.78 μM) con 60 min de inmersión los porcentajes de germinación fueron menores que con 30 min. En contraste, las semillas tratadas con agua destilada aumentaron 5 % la germinación conforme aumentó el tiempo de inmersión de 30 a 60 min. La germinación inició a los 12 días en los tratamientos con 5.78 μM AG₃ en comparación con el agua destilada que fue 21 después de la siembra (Figura 9).

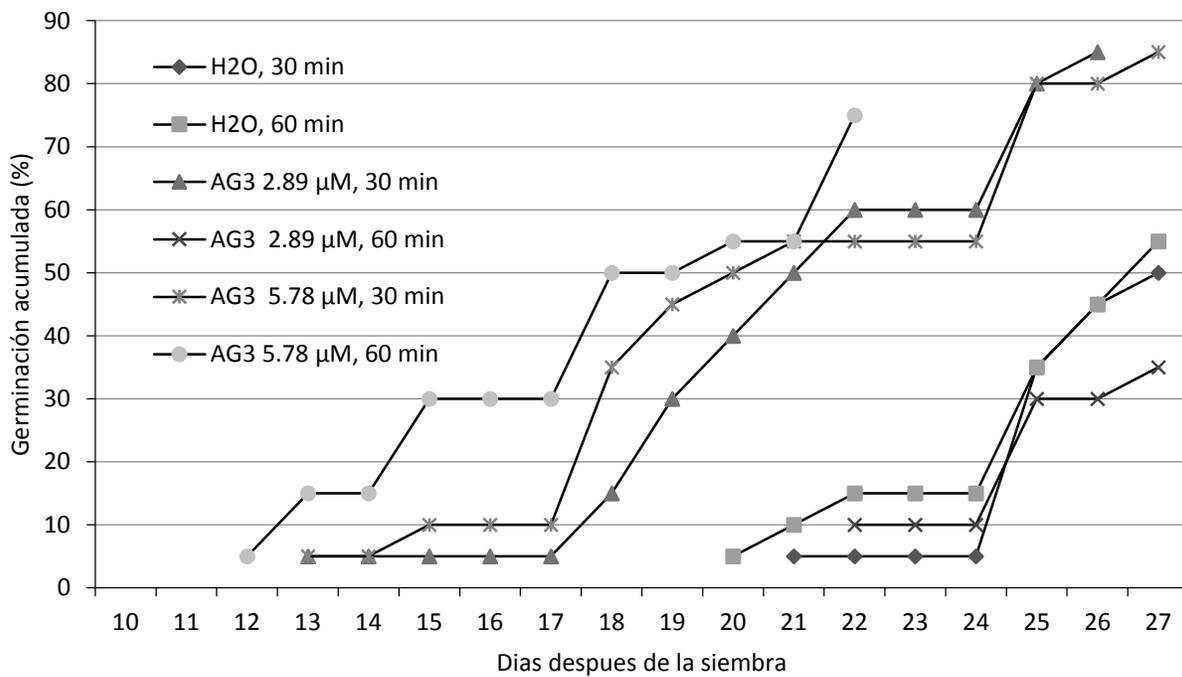


Figura 9. Comportamiento de la germinación en semillas de chile chiltepin tratadas con AG₃ en dos tiempos de inmersión.



Figura 10. Inicio de la germinación de semillas de chile chiltepin sumergidas por 60 min en 5.78 μM de AG₃ después de 15 días.

Los tratamientos con AG₃ aumentaron notablemente la germinación en comparación con los tratamientos de inmersión en H₂O₂, el cual resultó inhibitorio en chile chiltepín. La respuesta promovida por el AG₃ se debe a que las giberelinas tienen un papel importante para la movilización de reservas necesarias en la germinación, inducen la síntesis de enzimas (amilasas y glucanasas) que hidrolizan el almidón en azúcares simples que son requeridas para el crecimiento del embrión (Seguí, 2010).

En chile ancho (*Capsicum annuum*) del híbrido “Caballero” se logró un 90.1 % de germinación cuando las semillas se trataron con una solución de 1,445 µM de AG₃ durante nueve horas (Cortez *et al.*, 2011). En otras especies, como *Alnus acuminata*, el AG₃ favoreció 80 % la germinación en comparación con el testigo sin tratamientos pre germinativos que fue de 20 % (Araya *et al.*, 2000).

En *Jaltomata procumbens* se observó que el tiempo de inmersión de 12 y 24 h no tuvo mayor efecto en comparación con las concentraciones de AG₃ usadas (Saldívar *et al.*, 2010). Esto coincide con los resultados obtenidos en esta investigación donde el mayor efecto se logró con las concentraciones de AG₃ y no con el tiempo de inmersión.

5.2.3 Efecto de tratamientos de acondicionamiento por inmersión en AG₃ y adicionado al medio de cultivo

Con la finalidad de incrementar el porcentaje de germinación se evaluaron dos tiempos de inmersión (30 y 60 min) de las semillas en una solución de 5.78 µM de AG₃ y se sembraron en medio de cultivo MS con 50% de las sales inorgánicas adicionado con 2.89 y 5.78 µM de AG₃. Los tiempos de inmersión, el AG₃ adicionado al medio y la interacción de ambos factores tuvieron un efecto significativo sobre la germinación ($P \leq 0.05$; Apéndice 4). Los mayores valores de germinación se obtuvieron de semillas sumergidas por 60 min y cultivadas con 5.78 µM de AG₃ (Cuadro 15).

Cuadro 15. Efecto de tiempos de inmersión y concentración de AG₃ adicionado al medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de chile chiltepín después de 30 días.

Fuente de variación	Germinación (%)
Tiempo de inmersión (min)	
30	53.3 b
60	80.0 a
DMS	10.3
Concentración AG₃ (μM)	
0	60.0 b
2.89	62.5 ab
5.78	77.5 a
DMS	15.2

Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); DMS: Diferencia Mínima Significativa; AG₃: Ácido Giberélico; MS: Murashige y Skoog (1962).

En la combinación del tiempo de inmersión con la dosis de AG₃ del medio de cultivo, los porcentajes de germinación más altos se alcanzaron con 5.78 μM de AG₃ (90 %), ya sea con 30 o 60 min de inmersión (Cuadro 16). En comparación con el testigo en medio MS sin reguladores de crecimiento con tiempo de inmersión de 30 min el cual fue de 60 %.

Cuadro 16. Efecto del AG₃ en tratamientos de acondicionamiento por inmersión y en medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de semillas de chile chiltepín después de 30 días.

Inmersión en 5.78 μM de AG ₃ (min)	AG ₃ en medio de cultivo (μM)	Germinación (%)
30	0	60.0 bc
60	0	35.0 c
30	2.89	65.0 ab
60	2.89	60.0 bc
30	5.78	90.0 a
60	5.78	90.0 a
DMS		26.7

Medias con diferentes letras son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). DMS: Diferencia Mínima Significativa; AG₃: Ácido Giberélico; MS: Murashige y Skoog (1962).

La germinación inició a partir del día 12 después de la siembra en el medio de cultivo con 5.7 μM de AG₃ y sumergidas durante 30 y 60 min, en comparación con el testigo con 60 min de inmersión y sembrado en medio MS sin reguladores de crecimiento que inició el día 18 (Figura 11).

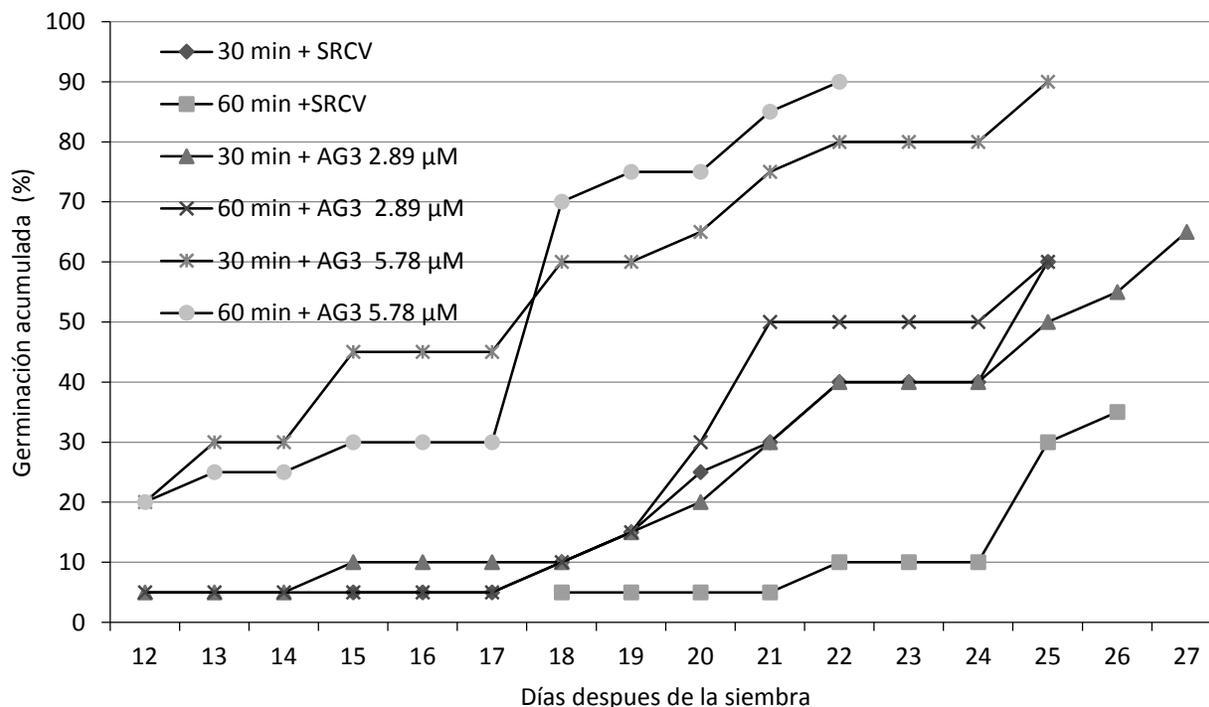


Figura 11. Inicio de germinación en semillas de chile chiltepin en tratamientos de acondicionamiento por inmersión en AG₃ y adicionado al medio de cultivo. SRCV: sin reguladores de crecimiento vegetal.

La germinación es el proceso final del ciclo de una semilla. Una vez que todas las condiciones endógenas y exógenas son propicias, el embrión supera la fase de reposo y retoma un crecimiento que dará lugar a un nuevo individuo (Seguí, 2010). Es un evento complejo regulado por una variedad de genes y eventos fisiológicos que son difíciles de separar (Koornnef, *et al.*, 2002).

La latencia se describe como una característica de la semilla que define la condición requerida para la germinación y por tanto, cualquier elemento que amplíe los requerimientos ambientales para la germinación es un factor de liberación de la latencia. Los factores ambientales que controlan la latencia son principalmente la luz, la temperatura, la humedad y la duración del almacenamiento (Finch y Leubner, 2006). Walck *et al.* (2011) indican que los factores críticos para el inicio y ruptura de la latencia son la temperatura y la disponibilidad de agua.

Desde hace décadas se ha propuesto que las giberelinas tienen un papel clave en el control de la germinación y, por ello, se han utilizado ampliamente para promoverla o inducirla en diversas especies (Mehanna *et al.*, 1985; Karssen *et al.*, 1989; Baskin y Baskin, 1998; Tigabu y Odén, 2001).

En Chile chiltepín se han hecho diferentes estudios para estimular la germinación *in vivo* usando el AG₃ como agente inductor en tratamientos de acondicionamiento por inmersión; las concentraciones han sido de 1,156 a 14,450 µM y tiempos de inmersión de 24 h. García *et al.* (2010), evaluaron el efecto de dos productos comerciales (Cyto-Gibb® y Bio Gibb®) en tratamientos de inmersión con 1,445 µM de AG₃, alcanzaron hasta 82 % de germinación en comparación con el testigo sin AG₃ con 33%.

En otro estudio se reportó 75 % de germinación en semillas de Chile piquín con tratamientos de inmersión en una solución de 14,450 µM de AG₃ (Mireles *et al.*, 2015). Esta misma concentración se evaluó en tratamientos de inmersión en 16 colectas de Chile piquín; se determinó que existe una gran variación entre las colectas, y que solo en una de ellas se logró 90 % de germinación (Cano *et al.*, 2015). Se ha reportado que en Chile chiltepín el AG₃ estimula la germinación porque interviene en la activación de enzimas que inducen la movilización de reservas (Bewley y Black, 2012).

En Chile chiltepín la germinación que se alcanza en condiciones naturales normalmente es baja y por ello gran parte de las investigaciones se han enfocado en promoverla o estimularla. En consecuencia, estos estudios se han orientado a la germinación *in vivo* y no existen reportes de estudios sobre la germinación *in vitro* de esta especie. Es por ello que la presente investigación evaluó tratamientos de acondicionamiento por inmersión con AG₃. Las concentraciones empleadas se consideran relativamente bajas comparadas con los estudios de Cano *et al.* (2015) y Mireles *et al.* (2015) por que el 90 % de germinación se obtuvo con 5.7 µM de AG₃ que equivale al 0.04 % de la dosis óptima reportada por dichos autores. Además, es el primer reporte donde se determinó que la adición del AG₃ al medio de cultivo resulta eficiente para promover la germinación de Chile chiltepín al incrementar el porcentaje de germinación hasta 90 % y no se encontró ningún otro estudio en el cual se haya evaluado la adición de AG₃ en medio de cultivo para promover la germinación en alguna otra variedad del género *Capsicum*.

5.3 Morfogénesis *in vitro* por organogénesis

5.3.1 Inducción de brotes

5.3.1.1 Tipo de explante y concentraciones de BAP

Para inducir la organogénesis se evaluaron concentraciones de BAP (13.3, 26.6, 39.9 y 53.2 μM) en el medio de cultivo MS y cuatro tipos de explante (ápice de brote, segmentos nodales con yemas axilares, segmentos de hoja y segmentos de tallo) disecados de plantas germinadas *in vitro*. El tipo de explante, las concentraciones de BAP y la interacción de ambos factores tuvieron un efecto significativo sobre el número de brotes por explante, ($P \leq 0.05$; Apéndice 5).

De los tipos de explante evaluados el que tuvo mayor efecto fue el explante de segmentos nodales con yemas axilares con un promedio de 4.02 brotes por explante en comparación de los explantes de ápices de brote los cuales promediaron 2.47 brotes (Cuadro 17). Los segmentos de hoja y tallo no mostraron ningún efecto organogénico.

En cuanto a la concentración de BAP, la que tuvo mayor efecto fue 26.6 μM con un promedio de 1.75 brotes, en comparación con la concentración de 53.2 μM la cual mostró un promedio de 1.5 brotes.

Cuadro 17. Efecto de tipos de explantes de chile chiltepín y concentraciones de BAP sobre la inducción de brotes *in vitro* después de cuatro semanas.

Fuente de variación	Brotes (Núm.)
Tipo de explante	
Ápice de brote	2.4 b
Segmento nodal con yemas axilares	4.0 a
Segmento de hoja	0 c
Segmento de tallo	0 c
DMS	0.2
Concentración BAP (μM)	
13.3	1.57 ab
26.6	1.75 a
39.9	1.67 ab
53.2	1.50 b
DMS	0.2

Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); BAP: 6-Bencilaminopurina.

La brotación fue de 100 % en explantes de ápice y segmentos nodales con yemas axilares en las cuatro concentraciones de BAP evaluadas, sin embargo, el mayor número de brotes por explante (4.4 brotes) se obtuvo en los segmentos nodales con yemas axilares con 13.3 μM de BAP (Cuadro 18).

Cuadro 18. Efecto de tipos de explantes de chile chiltepín y concentraciones de BAP en la inducción de brotes *in vitro* después de cuatro semanas de cultivo.

Explante (tipo) [¶]	BAP (μM)	Brotes por explante (Núm.)	Brotación (%)
Ápice	13.3	1.9 d	100 a
	26.6	2.7 c	100 a
	39.9	2.8 c	100 a
	53.2	2.5 c	100 a
Segmentos nodales	13.3	4.4 a	100 a
	26.6	4.3 a	100 a
	39.9	3.9 ab	100 a
	53.2	3.5 b	100 a
DMS		0.59	0

Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); BAP: 6-Bencilaminopurina; DMS: Diferencia Mínima Significativa. [¶]Los valores de hoja y tallo no se incluyen porque la respuesta fue nula.

En los segmentos nodales con yemas axilares las concentraciones de BAP tuvieron un efecto inverso sobre el número de brotes; conforme se incrementó la dosis éstos disminuyeron. En contraste, los explantes de ápices produjeron más brotes conforme aumentaron las concentraciones de BAP. Sin embargo, la cantidad de brotes fue menor y se definió a los segmentos nodales con yemas axilares como el mejor explante para la inducción de brotes.

Los segmentos de hoja y tallo (Figura 12a, b) no mostraron respuesta organogénica en ninguna de las concentraciones de BAP evaluadas. A partir del día 12 después del establecimiento del cultivo los explantes de hoja empezaron a oscurecerse hasta cubrirse por completo (Figura 12c). Los explantes de tallo presentaron un adelgazamiento en uno de los extremos a partir del noveno día; el oscurecimiento se presentó después del día 12 en los extremos de los explantes (Figura 12d).



Figura 12. Explantes de chile chiltepín evaluados en la inducción de brotes de chile chiltepín. a) Ápice de brote; b) Segmentos nodales con yema lateral; c) Segmentos de hojas y d) Tallos necrosados después de 12 días de cultivo.

Los procesos morfogénicos están relacionados estrechamente con el genotipo, desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* a la proliferación de callo o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos. A esto debe sumarse el efecto de las condiciones del medio de cultivo que pueden, o no, estimular la respuesta morfogénica buscada (Radice, 2010). En este caso los explantes de segmentos de hoja y tallo no contaban con las condiciones adecuadas para la proliferación de nuevos órganos a partir de ellos. Es posible que se genere una respuesta organogénica a través de estos explantes con la utilización de otros tipos de reguladores de crecimiento. Sin embargo, para los fines de este estudio se descarta el uso de estos explantes debido a la nula respuesta a los tratamientos utilizados.

La evaluación de los explantes de chile chiltepín tuvo la finalidad de determinar el ideal para inducir la organogénesis. Varios factores se deben tomar en cuenta para elegir el explante

apropiado y establecer el cultivo *in vitro* con éxito. Entre ellos se encuentra la edad fisiológica porque entre más joven e indiferenciado sea el explante mejor será su respuesta *in vitro*. En general, los meristemos apicales y axilares son los ideales y los más ampliamente utilizados en gran número de especies (Mroginski *et al.*, 2010), aunque su empleo dependerá de la especie en estudio.

En diferentes especies del género *Capsicum* se ha establecido la organogénesis a partir de varios explantes y con diferentes reguladores de crecimiento. En explantes de cotiledones de las variedades de *Capsicum spp.* Mirasol y Árbol se obtuvieron hasta 5.1 brotes en medio MS con 17.7 μM de BAP y 1.7 μM de AIA (Robledo y Carrillo, 2004). Resultados similares (5.5 brotes por explante) se obtuvieron en otro estudio con ápices de brote de *Capsicum chinense* Jacq. cultivados en medio MS pero con 31.0 μM de BAP y 4.64 μM de KN (Sanatombi y Sharma, 2008).

Los reguladores de crecimiento determinan en gran medida el tipo de respuesta morfogénica *in vitro*. En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas y/o citocininas (Mroginski *et al.*, 2010). Las citocininas son reguladores que estimulan principalmente la división y diferenciación celular aunque también participan en una amplia gama de procesos fisiológicos durante el desarrollo de las plantas. En el cultivo de tejidos son utilizadas para estimular la división celular y la formación de brotes adventicios especialmente al combinarlas con auxinas. (Boeri, 2015).

5.3.1.2 Efecto de concentraciones de BAP y 0.5 μM AIA en segmentos nodales con yemas axilares

Con el objetivo de incrementar el número de brotes en explantes de chile chiltepín, se evaluaron cinco concentraciones de BAP (2.2, 4.4, 6.6, 8.8 y 11.1 μM) en combinación con AIA (0.5 μM) adicionados al medio de cultivo MS y cultivados durante dos periodos de tiempo (cuatro y seis semanas). El periodo de incubación no tuvo efecto significativo sobre las variables. Sin embargo, las concentraciones de reguladores de crecimiento sí afectó el número de brotes por explante y la longitud de brotes; la interacción de los factores solo tuvo efecto significativo en el número de brotes ($P \leq 0.05$; Apéndice 6).

No hubo diferencias entre los efectos en las variables de brotes por explante y longitud de brotes por parte de los tiempos de incubación de acuerdo a la prueba de comparación de medias Tukey (Cuadro 19).

En cuanto a las concentraciones de reguladores de crecimiento, el mayor efecto en la variable de brotes por explante se dio en la concentración de 8.8 μM de BAP y 0.5 μM de AIA con 5.83 brotes (Cuadro 19). En cuanto a la longitud de los brotes, se vio principalmente afectado por las concentraciones de 2.2 μM de BAP en combinación con 0.5 μM de AIA con 5.2 mm.

Cuadro 19. Efecto de tiempos de incubación (semanas) y concentraciones de BAP + 0.57 μM de AIA en la inducción de brotes en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín.

Fuente de variación	Brotos por explante (Núm.)	Longitud de brotes (mm)
Tiempo de incubación (semanas)		
4	4.4 a	4.2 a
6	4.4 a	4.6 a
DMS	0.42	0.53
BAP + AIA (μM)		
2.2 + 0.5	2.9 d	5.2 a
4.4 + 0.5	4.0 c	4.5 ab
6.6 + 0.5	5.0 ab	4.1 ab
8.8 + 0.5	5.8 a	4.9 a
11.1 + 0.5	4.3 bc	3.4 b
DMS	0.93	1.17

Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); BAP: 6-Bencilaminopurina; AIA: Ácido Indolacético; DMS: Diferencia Mínima Significativa.

La brotación promedio de todos los tratamientos fue de 100% a excepción del tratamiento con 2.2 μM de BAP y 0.5 μM de AIA con seis semanas de cultivo que tuvo un 93%. El mayor número de brotes (5.93) se obtuvo en el tratamiento con cuatro semanas de incubación en medio de cultivo adicionado con 8.8 μM de BAP y 0.5 μM . En contraste con el promedio más bajo (2.87) del tratamiento con 2.2 μM de BAP y 0.5 μM de AIA cultivado por cuatro semanas (cuadro 20).

Cuadro 20. Efecto de dos tiempos de incubación (semanas) y cinco concentraciones de BAP + 0.57 μ M de AIA en la inducción de brotes en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín.

Tiempo de incubación (semanas)	BAP (μ M)	AIA (μ M)	Brotes por explante (Núm.)	Brotación (%)	Longitud de brotes (mm)
4	2.2	0.5	2.8 e	100 a	5.2 a
	4.4	0.5	3.9 cde	100 a	3.9 a
	6.6	0.5	5.0 abc	100 a	3.6 a
	8.8	0.5	5.9 a	100 a	5.2 a
	11.1	0.5	4.4 bcd	100 a	3.5 a
6	2.2	0.5	3.2 de	93.0 a	5.5 a
	4.4	0.5	4.2 cde	100 a	5.1 a
	6.6	0.5	5.0 abc	100 a	4.6 a
	8.8	0.5	5.7 ab	100 a	4.7 a
	11.1	0.5	4.2 cde	100 a	3.3 a
DMS			1.53	9.5	1.94

Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); BAP: 6-Bencilaminopurina; AIA: Ácido Indolacético; DMS: Diferencia Mínima Significativa.

Respecto la longitud de brotes no hubo efectos significativos por parte de la interacción de los factores en esta variable, los valores más altos se obtuvieron en el tratamiento con seis semanas de incubación en medio de cultivo adicionado con 2.2 μ M de BAP y 0.5 μ M de AIA con 5.5 mm. En contraste con el promedio más bajo el cual fue de 3.33 mm correspondiente al tratamiento con seis semanas de incubación en medio adicionado con 11.1 μ M de BAP y 0.5 μ M de AIA (Cuadro 20).

El número de brotes por explante incrementó conforme la concentración de BAP fue en aumento. Este comportamiento tiene la misma tendencia en ambos periodos de incubación, teniendo en ambos casos, el mayor número de brotes en la concentración de 8.8 μ M de BAP. Esto indica que, en explantes de segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín y, en combinación con 0.5 μ M de AIA, la mejor concentración de BAP para la inducción de brotes es 8.8 μ M.

Los brotes obtenidos en los explantes que se incubaron durante seis semanas, (comparativamente con los de cuatro semanas (Figura 13a)) mostraron necrosis, la cual inició como una clorosis en las hojas a partir de la quinta semana después del establecimiento del cultivo (Figura 13b). El

mayor porcentaje de oscurecimiento fue en el 30% de los explantes de los tratamientos en medio de cultivo adicionado con 2.2 μM de BAP y 0.5 μM de AIA; y el tratamiento en medio de cultivo adicionado con 8.8 μM de BAP y 0.5 μM de AIA al finalizar el periodo de incubación. Esto revela que periodos mayores a cuatro semanas de incubación pueden perjudicar a los brotes obtenidos dando inicio a la senescencia de los mismos.



Figura 13. Organogénesis en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín. a) Explante sin clorosis cultivado por cuatro semanas con 11.1 μM de BAP y 0.5 μM de AIA b) Explante con clorosis cultivado por seis semanas con 8.8 μM de BAP y 0.5 μM de AIA.

Las citocininas, junto con las auxinas, son el grupo de reguladores de crecimiento más efectivo para la inducción de la organogénesis *in vitro*, de manera que, el factor crítico para disparar los acontecimientos del desarrollo está en la relación auxinas/citocininas, más que por las cantidades de cada una (Fernández *et al.*, 2006).

Entre los diferentes tipos de citocininas que existen, BAP es una de las más utilizadas en cultivo de tejidos vegetales y, con la cual, se han hecho una serie de experimentos utilizando diferentes concentraciones en diferentes explantes del genero *Capsicum* (Robledo y Carrillo, 2004; Gayathri, *et al.*, 2015; Raj *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en esta investigación difieren de los reportados en cotiledones de chile piquín donde se logró obtener hasta 8.1 brotes en un medio básico MS adicionado con 17.7 μM de BAP en combinación con 1.7 μM de AIA (Valadez *et al.*, 2009).

En otro estudio se reportó haber generado brotes a partir de explantes de segmentos nodales de *Capsicum annuum* cultivar Mareko Fana cultivados en un medio MS adicionado con 13.3 μM de BAP y 9.2 μM de Cinetina, obteniendo hasta 9.2 brotes por explante (Hailú *et al.*, 2015).

5.3.1.3 Efecto de 11.1 μM BAP y concentraciones de AIA en segmentos nodales con yemas axilares

Con el objetivo de aumentar el número de brotes en explantes de segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín, se evaluaron cinco concentraciones de AIA (0, 0.5, 1.4, 2.8 y 4.2 μM) en combinación con BAP (11.1 μM) adicionados al medio MS. Las concentraciones de reguladores de crecimiento evaluadas tuvieron un efecto significativo sobre el número de brotes por explante y longitud de brotes ($P \leq 0.05$; Apéndice 7).

El promedio de brotación en todos los tratamientos fue de 100 %. Los valores más altos de brotes por explante se obtuvieron con 2.8 μM de AIA y 11.1 μM de BAP (Cuadro 21).

Cuadro 21. Efecto de cinco concentraciones de AIA y de 11.1 μM de BAP en la inducción de brotes *in vitro* en segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín después de cuatro semanas de cultivo.

AIA (μM)	Brotos por explante (Núm.)	Brotación (%)	Longitud de brotes (mm)
0	5.0 bc	100 a	5.0 bc
0.5	4.4 c	100 a	4.8 c
1.4	5.4 b	100 a	6.6 ab
2.8	6.6 a	100 a	8.1 a
4.2	6.5 a	100 a	6.9 a
DMS	0.617	0	1.62

Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); BAP: 6-Bencilaminopurina; AIA: Ácido Indolacético; DMS: Diferencia Mínima Significativa

La mayor longitud de brotes se obtuvo en los explantes cultivados con 2.8 μM de AIA y 11.1 μM de BAP con 8.1 mm; en comparación con el promedio más bajo de 4.8 mm con 0.5 μM de AIA y 11.1 μM de BAP (Cuadro 21).

El número de brotes por explante aumentó conforme fue mayor la concentración de AIA, con excepción de 4.2 μM , donde se mantuvo en comparación con el tratamiento de 2.8 μM de AIA. Esto indica que concentraciones de AIA mayores a 2.8 μM , en combinación con 11.1 μM de BAP, la cantidad de brotes por explante ya no se incrementa (Figura 14).

El mismo comportamiento se observó en la variable de longitud de brotes donde el tamaño de los brotes se vio afectado en concentraciones mayores de 2.8 μM de AIA en combinación con 11.1 μM de BAP (Figura 15).

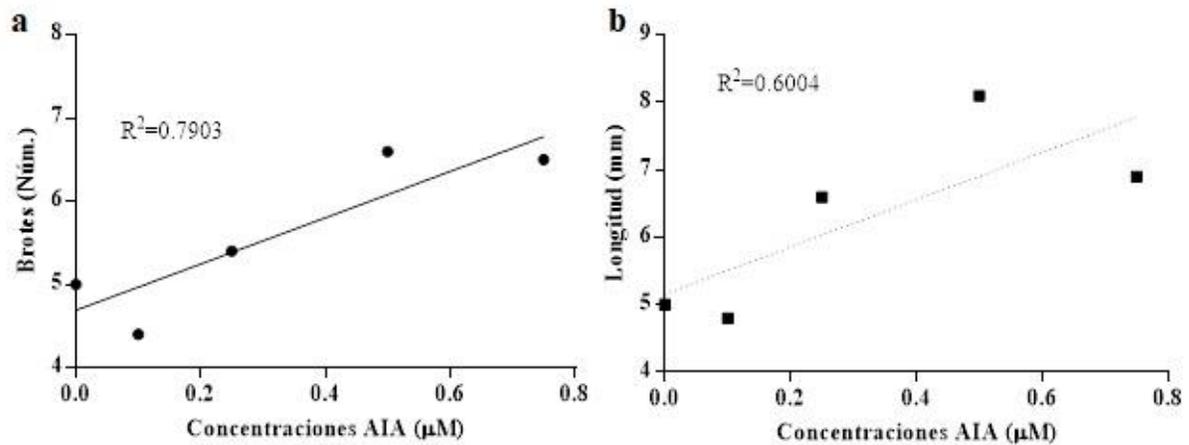


Figura 14. Segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín cultivados *in vitro* en diferentes concentraciones de AIA. a) Relación del número de brotes. b). Relación de la longitud de brotes



Figura 15. Segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín cultivados *in vitro*. a) explante cultivado con AIA (4.2 μM) y BAP (11.1 μM), b) explante cultivado con AIA (2.8 μM) y BAP (11.1 μM).

En diferentes estudios se reporta que, al igual que en esta investigación, la mayor cantidad de brotes se obtienen a partir de concentraciones de AIA de 2.8 μM en combinación con diferentes dosis de BAP. En explantes de *Capsicum chinense* Jacq. (Naga chilli) cultivados en medio MS

adicionado con 22.2 μM de BAP y 2.8 μM de AIA, se obtuvieron 5.4 brotes por explante (Raj *et al.*, 2015). Estos mismos promedios se obtuvieron en esta investigación con concentraciones de BAP 11.1 μM y AIA 1.4 μM , sin embargo, no fueron los más altos.

Los resultados obtenidos en esta investigación, difieren por los reportados en explantes de hipocotilo de *Capsicum frutescens* cultivados en medio MS adicionado con 22.2 μM de BAP y 0.5 μM de AIA, con lo cual produjeron 5 brotes por explante (Chee *et al.*, 2018). En tomate de árbol [*Solanum betaceum* (cav.) Sendt.], Criollo *et al.* (2016) obtuvieron 11.6 brotes en explantes de hipocotilo cultivados en medio MS con 13.3 μM de BAP y 2.8 μM .

5.3.2 Multiplicación de brotes

5.3.2.1 Efecto de 11.1 μM BAP y AIA en brotes de chile chiltepín

Los brotes obtenidos en la etapa de inducción se usaron para la multiplicación. Con el objetivo de incrementar el número de brotes se evaluaron concentraciones de AIA (0, 0.5, 1.4, 2.8 y 4.2 μM) en combinación con BAP (11.1 μM) en medio MS. Las combinaciones de BAP y AIA tuvieron un efecto significativo sobre las variables de brotes por explante y longitud de brotes ($P \leq 0.05$; Apéndice 8). La brotación promedio de todos los tratamientos fue de 100 %. La mayor cantidad de brotes (9.9 brotes) se obtuvo con 2.8 μM de AIA y 11.1 μM de BAP. En contraste, el promedio más bajo se presentó con 0.5 μM de AIA y 11.1 μM con 5.6 brotes (Cuadro 22).

Cuadro 22. Efecto de 11.1 μM de BAP y cinco concentraciones de AIA en la multiplicación de brotes *in vitro* de chile chiltepín después de tres semanas.

AIA (μM)	Brotes por explante (Núm.)	Brotación (%)	Longitud de brotes (mm)
0	7.2 b	100 a	6.4 bc
0.5	5.6 c	100 a	4.9 c
1.4	7.9 b	100 a	7.6 ab
2.8	9.9 a	100 a	8.2 a
4.2	9.3 a	100 a	8.3 a
DMS	0.88	0	1.72

Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); BAP: 6-Bencilaminopurina; AIA: Ácido Indolacético; DMS: Diferencia Mínima Significativa.

Respecto a la longitud de brotes, los valores más altos se presentaron en el tratamiento con 2.8 y 4.2 μM de AIA con 11.1 μM de BAP con 8.2 y 8.3 mm (Figura 16), seguido por 1.4 μM de AIA con 11.1 μM de BAP con 7.6 mm (Cuadro 2).

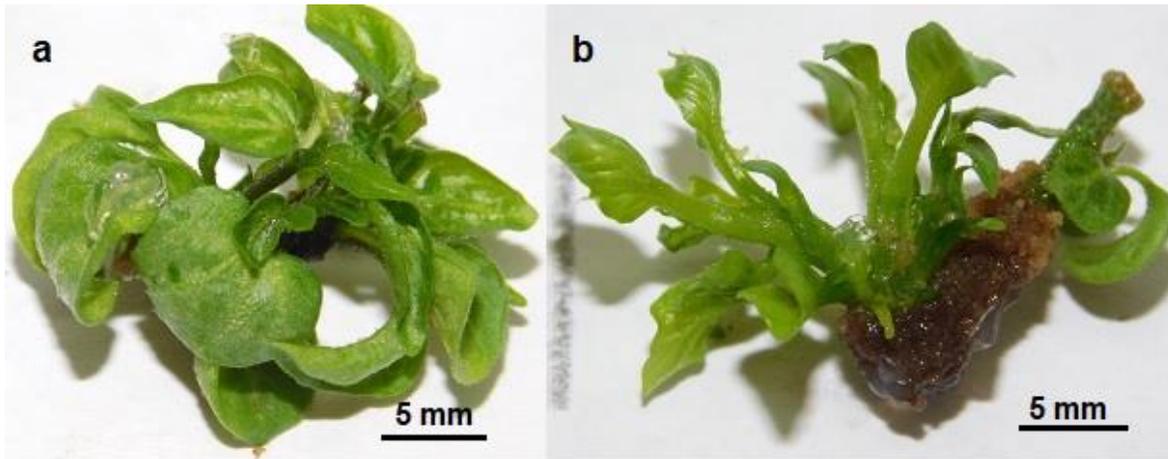


Figura 16. Multiplicación de brotes a partir de grupo de brotes de chile chiltepin después de tres semanas de cultivo. a) Explante cultivado con 11.1 μM de BAP y 2.8 μM de AIA, b) Explante cultivado con 11.1 μM de BAP y 4.2 μM de AIA.

Se observó que conforme aumentaron las concentraciones de AIA también lo hizo el número de brotes, con excepción del tratamiento con 4.2 μM (Figura 17). Esto indica que la multiplicación *in vitro* en conjuntos de brotes de chile chiltepin no aumenta en concentraciones de AIA mayores de 2.8 μM combinadas con 11.1 μM de BAP.

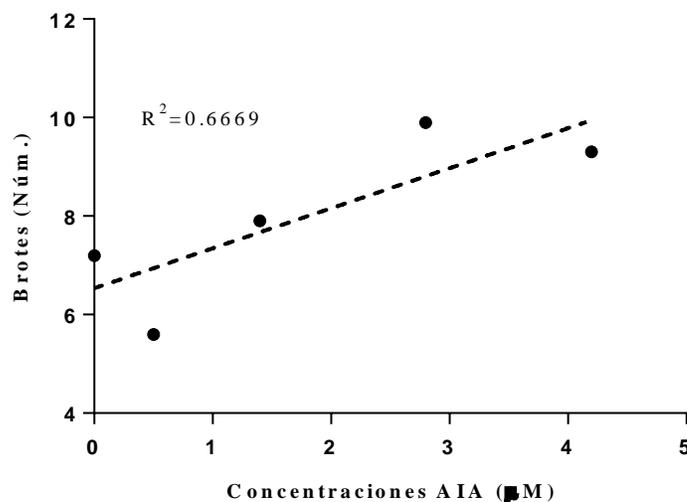


Figura 17. Relación del número de brotes en diferentes concentraciones de AIA en la etapa de multiplicación en conjuntos de brotes de chile chiltepin.

En el trabajo con el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* no existen protocolos estandarizados que se puedan aplicar para un mismo grupo de plantas. Esto se debe a que la respuesta morfológica varía por la especie o variedad utilizada y las condiciones de medio de cultivo. Las variedades silvestres no responden igual a las líneas comerciales ya que cada línea o colecta puede mostrar afinidad por algún regulador del crecimiento en particular (Namitha y Negi, 2013).

En *Capsicum annuum* L. cultivar Mareko Fana los brotes obtenidos en etapa de inducción, cultivados en medio MS con 13.3 μM de BAP y 9.2 μM de KIN, produjeron 9.2 brotes por explante (Hailú *et al.*, 2015). Esta respuesta es similar a los resultados obtenidos en esta investigación con los brotes cultivados en medio MS con 11.1 μM de BAP y 4.2 μM de AIA.

En *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga chilli se logró la multiplicación de brotes con medio MS y 35.5 μM de BAP donde se obtuvieron 8.3 brotes por explante (Kehie *et al.*, 2012). Esta respuesta fue menor a los promedios obtenidos en esta investigación, además las concentraciones de BAP utilizadas fueron tres veces mayores a las utilizadas en este estudio.

En otras especies de solanáceas se han establecido protocolos de multiplicación exitosos. En segmentos de tallo de *Solanum caripense* Dunal, se logró la multiplicación *in vitro* en medio MS adicionado con 2.2 μM de BAP y 2.8 μM de AIA (Morales y Vaca, 2016). Así mismo, en *Solanum dolichosepalum*, se reportó la multiplicación de micro tallos a partir de segmentos nodales cultivados en medio MS con 2 % de sacarosa adicionado con 0.1 μM de AIA y 0.08 μM de BA (Cárdenas *et al.*, 2016).

5.3.3 Alargamiento de brotes

Para promover el crecimiento de los brotes de chile chiltepín obtenidos en la etapa de multiplicación se evaluaron cuatro concentraciones de AG₃ (2.8, 5.7, 8.6 y 11.5 μM) en el medio de cultivo. Las concentraciones de AG₃ tuvieron un efecto significativo sobre la longitud de los brotes ($P \leq 0.05$; Apéndice 9). La mayor longitud se logró en los brotes cultivados con 11.5 μM de AG₃ después de seis semanas de cultivo; alcanzaron 36 mm de longitud (Cuadro 23).

Cuadro 23. Efecto del AG₃ en la longitud de brotes (mm) de chile chiltepín a las tres y seis semanas de cultivo.

AG ₃ (μ M)	Tres semanas	Seis semanas
0	6.4 b	6.5 c
2.8	5.0 b	5.0 c
5.7	8.0 b	14.9 b
8.6	8.9 b	13.5 b
11.5	15.5 a	36.6 a
DMS	4.27	6.29

Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$); DMS: Diferencia Mínima Significativa; AG₃: Ácido Giberélico.

Se observó que la longitud de los brotes se incrementó a medida que aumentó la concentración de AG₃; 11.5 μ M favoreció el mayor tamaño de brotes (Figura 18). Solo la concentración de 2.8 μ M no mostró aumento en el tamaño de los brotes, comportamiento similar al testigo sin reguladores de crecimiento.



Figura 18. Alargamiento de brotes de chile chiltepín después de seis semanas de cultivo. a) Brotes cultivados con 11.5 μ M de AG₃.

Las giberelinas son esenciales en el desarrollo de las plantas, participan en la germinación, crecimiento del tallo, expansión foliar, elongación de la raíz, entre otros aspectos (Shimada *et al.*, 2008). En el cultivo de tejidos vegetales las giberelinas, solas o en combinación con otros reguladores del crecimiento, promueven o inducen la elongación de brotes y raíces. En *Capsicum annuum* L. se promovió el alargamiento de brotes con 5.7 μM de AG_3 y 2.8 μM de AIA, se aumentó la longitud de los brotes a 3.1 cm (Bhutia *et al.*, 2018), similar a los resultados obtenidos en este experimento con el doble de la concentración de AG_3 y sin la adición de AIA.

En *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naranja, se reportó el alargamiento de brotes obtenidos a partir de explantes de embriones maduros cultivados en medio MS suplementados con 2.8 μM de AG_3 y 11.7 μM de AgNO_3 durante 12 semanas (Barrales *et al.*, 2015).

En otro estudio con cuatro variedades de *Capsicum* se logró la elongación de los brotes en medio MS con 2.8 μM de AG_3 (Valadez *et al.*, 2009), lo cual difiere con los resultados obtenidos en esta investigación ya que las mismas concentraciones de AG_3 no indujeron la elongación de los brotes de chile chiltepín.

En otras especies como *Andrographis paniculata* se indujo la elongación de los brotes en un medio de cultivo MS adicionado con 2.8 μM de AG_3 con dos semanas de cultivo (Purkayastha *et al.*, 2008). Estas variaciones indican que la respuesta de las especies está mediado por la composición genética del explante y el tipo y concentración de reguladores del crecimiento empleados (Radice, 2010).

5.3.4 Enraizamiento *in vitro*

Se evaluaron cinco concentraciones de ácido indolbutírico (AIB, 0, 5.0, 7.5, 10 y 12.5 μM) con el objetivo de estimular la formación de raíces en brotes de chiltepín. Las concentraciones de AIB tuvieron efectos significativos sobre el enraizamiento y el número de raíces ($P \leq 0.05$; Apéndice 10). El mayor porcentaje de enraizamiento se logró en los brotes cultivados con 10.0 y 12.5 μM de AIB con 80 % cada uno. En comparación con el testigo sin reguladores de crecimiento el cual solo obtuvo 40 % de plántulas enraizadas (Cuadro 24).

Cuadro 24. Efecto del ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento *in vitro* de brotes de chile chiltepín.

AIB (μM)	Enraizamiento (%)	Raíces [¶] (Núm.)	Longitud de raíz [¶] (cm)
0	40.0 b	1.40 b	1.38 a
5	60.0 ab	1.87 b	1.27 a
7.5	60.0 ab	3.78 ab	1.66 a
10	80.0 a	3.33 ab	1.60 a
12.5	80.0 a	4.82 a	1.58 a
DMS	36	2.63	0.72

Medias con diferentes letras en cada columna son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$). [¶] Los datos fueron transformados para su análisis estadístico ($\sqrt{y+0.5}$); DMS: Diferencia Mínima Significativa; AIB: Ácido Indolbutírico.

En enraizamiento inició a los siete días en los brotes cultivados con 5.0 y 7.5 μM de AIB. Sin embargo, solo alcanzaron un máximo de 60 % de enraizamiento. La mejor respuesta se obtuvo con 10.0 y 12.5 μM de AIB que iniciaron el enraizamiento el día 11 y alcanzaron la máxima respuesta (80%) a los 18 y 21 días, respectivamente (Figura 19).

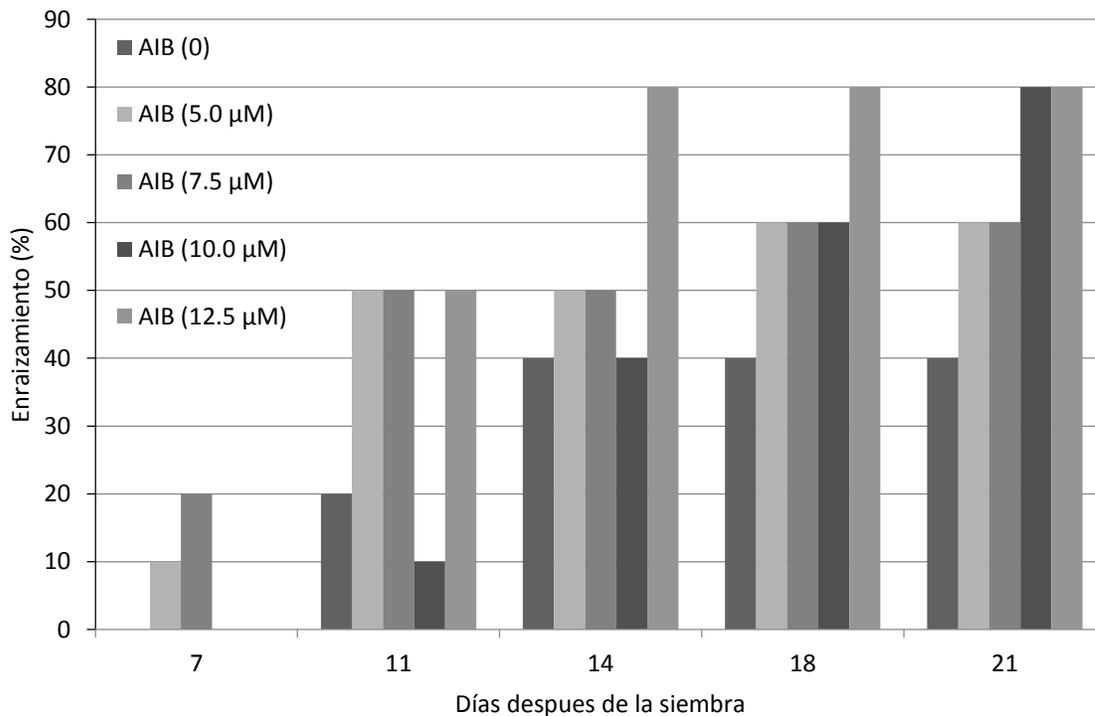


Figura 19. Porcentaje de enraizamiento *in vitro* de brotes de chiltepín cultivados con diferentes concentraciones de Ácido Indolbutirico (AIB) durante tres semanas.

La mayor cantidad de raíces se produjo en las plántulas cultivadas con 12.5 μM de AIB donde se obtuvieron 39.2 raíces (entre raíces principales y secundarias). En contraste, el medio sin reguladores de crecimiento solo produjo 6.0 raíces por plántula (Cuadro 25). Se observó que de las raíces principales se formó gran número de raíces secundarias; en ambas hubo presencia de pelos radicales, principalmente en las más grandes (Figura 20).



Figura 20. Enraizamiento de plántulas de chile chiltepín. a) plántula enraizada con 10.0 μM de AIB después de cuatro semanas. b) Raíces generadas en plántula de chiltepín tratada con 7.5 μM de AIB después de cuatro semanas. Rp = raíz principal; Rs = raíz secundaria; Pr = pelos radicales.

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas. Se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleoptilos, formación de raíces adventicias, entre otras (McSteen y Zhao, 2008).

En variedades del género *Capsicum* el enraizamiento de plántulas se ha establecido con diferentes auxinas y concentraciones. El enraizamiento de *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga chilli se indujo en medio MS con 5.7 μM de AIA (Kehie *et al.*, 2011). De igual forma, en *Capsicum frutescens* L. se reportó el enraizamiento en medio MS con 6.2 μM de AIA (Orlinska y Nowaczyk, 2015). En otro estudio se reportó el enraizamiento de plántulas de *Capsicum chinense* cv. Bhut jalakia en medio MS con 7.5 μM de AIB, con un promedio de 16.6 raíces por plántula (Gogoi *et al.*, 2014), distinto a los resultados obtenidos en esta investigación donde se obtuvo el doble de raíces por plántula de chile chiltepín con la misma concentración de AIB.

En otras especies de solanáceas, como tomate de árbol (*Solanum betaceum*), el enraizamiento de brotes se obtuvo con 5.7 μM de AIA en combinación con 13.3 μM de BAP (Criollo *et al.*, 2016). En *Physalis peruviana* L. se logró el enraizamiento de plántulas sin auxinas en el medio MS con las sales inorgánicas reducidas al 50% (Montiel *et al.*, 2011).

Los resultados más significativos en cada una de las fases de la morfogénesis *in vitro* se muestran en la Figura 21.

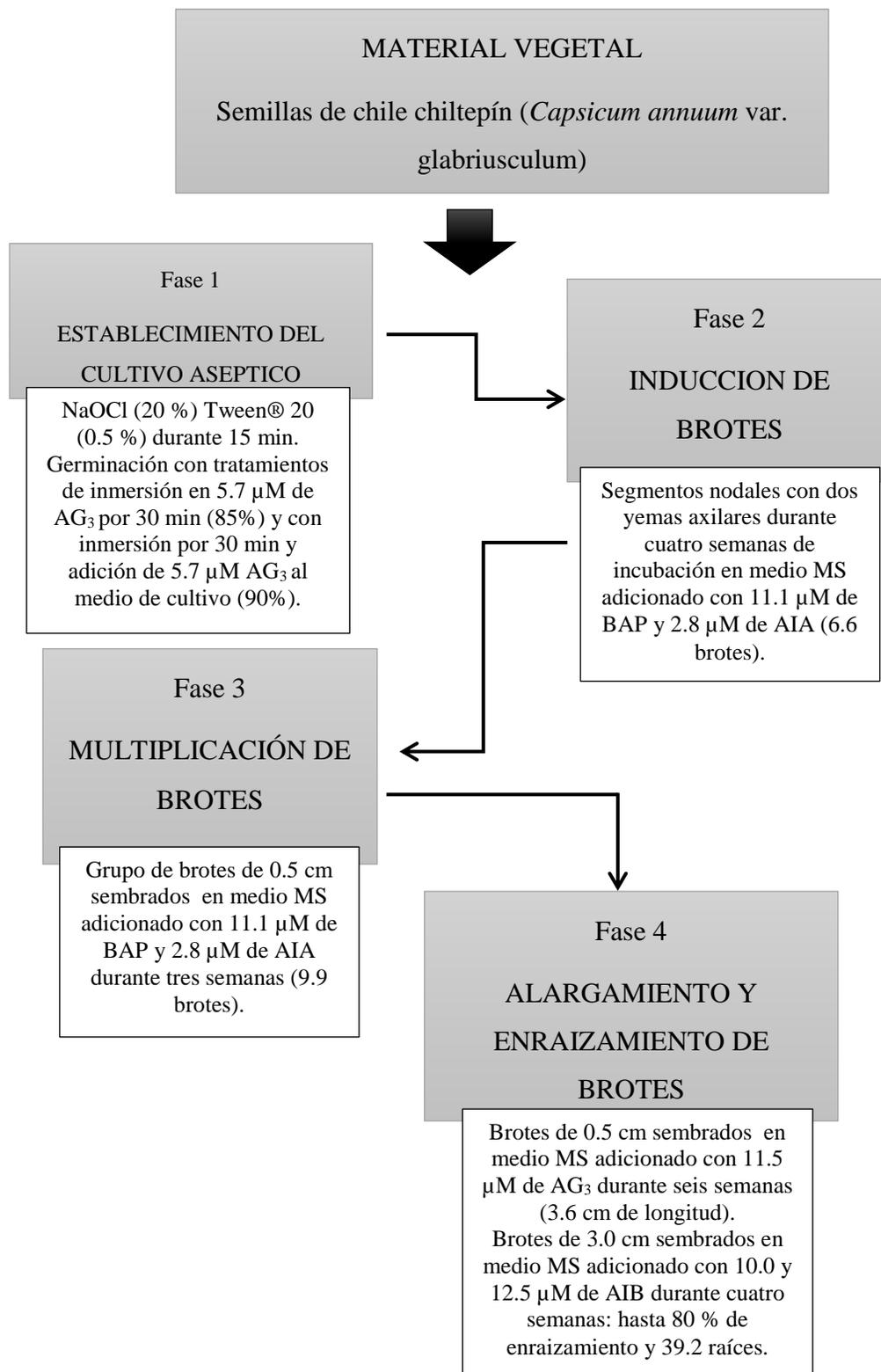


Figura 21. Diagrama de flujo de los resultados más significativos para la morfogénesis *in vitro* de chile chiltepin.

VI. CONCLUSIONES

- El establecimiento del cultivo aséptico de semillas de chile chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) se logra con 20 % de hipoclorito de sodio comercial y 0.5 % v/v de Tween® 20 durante 15 min.
- La germinación *in vitro* se inhibe con la inmersión de semillas en 3 % de H₂O₂ por más de tres horas.
- La inmersión de semillas por 30 min en 5.78 µM de AG₃ indujo 85 % de germinación *in vitro* y cuando además se adicionó 5.78 µM de AG₃ al medio MS con 50 % de concentración de sales, la germinación aumentó a 90 %.
- Los periodos de incubación mayores a cuatro semanas pueden ser perjudiciales para los explantes en inducción de brotes, ya que pueden causar necrosis en los tejidos.
- La inducción de 6.6 brotes se logró a partir de segmentos nodales disecados de plántulas germinadas *in vitro* con dos yemas axilares y cultivados en medio MS con 11.1 µM de BAP y 2.8 µM de AIA a las cuatro semanas de cultivo.
- La mejor multiplicación de brotes se obtiene en medio MS con 11.1 µM de BAP y 2.8 µM de AIA a las tres semanas, logrando 9.9 brotes por explante.
- El alargamiento de brotes se promovió en medio MS con 11.5 µM de AG₃ a las seis semanas de cultivo, alcanzando brotes de 36.6 mm de longitud.
- El enraizamiento *in vitro* de brotes se logra en medio MS adicionado con 10.0 y 12.5 µM de AIB a las cuatro semanas, obteniendo más de 36 raíces por plántula.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros métodos para homogenizar la velocidad de germinación de las semillas de chile chiltepín.
- Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* a partir de explantes de cotiledones o hipocotíleos para inducir la regeneración *in vitro* de chile chiltepín.
- Hacer un análisis financiero para evaluar los costos de producción de plántulas *in vitro* de chile chiltepín.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar R., V. H. 2012.** Cultivo de chile en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35: 264-264.
- Araiza L., N., E. Araiza L., y J. G. Martínez M. 2011.** Evaluación de la germinación y crecimiento de plántula de Chiltepín (*Capsicum annuum* L variedad glabriusculum) en invernadero. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13: 170-175.
- Araya V., E., L. Gómez A., N. Hidalgo D., y R. Valverde C. 2000.** Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de Jaul (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense*, 24:75-80.
- Arcia G., D. 1985.** Evaluación financiera y económica de un sistema agroforestal en el Estado de Quintana Roo. Tesis de M. C., Programa Forestal, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, 168 p.
- Bañuelos N., P. Salido., y A. Gardea. 2008.** Etnobotánica del chiltepín: Pequeño gran señor en la cultura de los sonorenses. *Estudios Sociales (Hermosillo, Son.)*, 16: 177–205.
- Barrales L., A., A. Robledo P., C. Trejo, E. Espitia R., and J. L. Rodriguez. 2015.** Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. Plantlets. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 51: 274-283.
- Baskin C.C., and J. M. Baskin. 1998.** *Seeds: Ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination.* Elsevier. 627 p.
- Bernal L. M. 2013.** Módulo de Mejoramiento Genético Vegetal. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia. 176 p.
- Bewley, J. D., and M. Black. 2012.** *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: volume 2: viability, dormancy, and environmental control.* Springer Science and Business Media. 359 p.

- Bhutia, K. L., N. T. Meetei, and V. K. Khanna. 2018.** *In vitro* direct regeneration of Dalle Khursani (*Capsicum annuum*) from salicylic acid treated explants. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7: 1008-1012.
- Boeri P. 2015.** Nutrientes para las plantas de probeta. Plantas de probeta, manual para la propagación de las plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. 234 p.
- Brown D. C., and T. A. Thorpe. 1986.** Plant regeneration by organogenesis. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, 3: 49-65.
- Cano V., A., M. López P., H. A. Zavaleta M., N. Cruz H., I. Ramírez R., A. Gardea B., y V. A. González H. 2015.** Variación en grados de latencia en semillas entre colectas de Chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). Botanical Sciences, 93: 175-184.
- Cárdenas B., C. A., J. C. Pacheco M. y A. L. L. Valenzuela. 2016.** Propagación *in vitro* de *Solanum dolichosepalum* (Solanaceae). Ciencia en Desarrollo, 7: 9-22.
- Castillo, T. J. 1987.** Micología general. Editorial Limusa. México. pp. 97-100
- Chee, M. J. Y., G. W. Lycett, and C. F. Chin. 2018.** Development of a direct transformation method by GFP screening and *in vitro* whole plant regeneration of *Capsicum frutescens* L. Electronic Journal of Biotechnology, 34: 51-58.
- Chew V., Y., A. Rodríguez, y M. Jiménez, F. 2008.** Principales enfermedades del Chile (*Capsicum annuum* L.). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Norte Centro. Matamoros, Tamaulipas. Folleto técnico No. 15: 32 p.
- Clouse S., D., and J. Sasse. 1998.** Brassinosteroids, Essential regulators of plant growth and development. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49: 427-451.
- Clouse S. D. 1996.** Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. Plant J., 10: 1-8.
- CODESIN. 2017.** Reporte sobre la agricultura en Sinaloa al año 2016. Consejo para el desarrollo económico en Sinaloa. Disponible en <http://sinaloaennumeros.com/reporte-sobre-la-agricultura-en-sinaloa-al-ano-2016/>

- CONAFOR. 2009.** Técnicas para el establecimiento y producción del chiltepín silvestre bajo un sistema agroforestal en Sonora, México. Folleto técnico. 41 p.
- CONAFOR. 2010.** Fichas de información comercial de productos forestales. Chile chiltepín. <http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/fichas-de-informacion-comercial-productos-forestales.pdf>
- Conti M., D. Gallitelli, V. Lisa, O. Lovisolo, G. P. Martelli, A. Rogozzino, G. L. Rana y C. Volvas. 2000.** Principales virus de las plantas hortícolas. Ediciones Mundi-Prensa Libros. Bayer, S. P. A. España. 205 p.
- Contreras, I., y Almeida, J. 2003.** Micropropagación del tomate de árbol [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.], solanacea silvestre usada en la alimentación humana. Revista Forestal Venezolana, 47: 9-13.
- Coronado G., M. A., A. Cordova Y., M. García P., V. G. Santiago H. y R. A. Vázquez N. 2013.** Estrategias de mercado para productos elaborados a base de chiltepín en la Sierra de Sonora. Revista Mexicana de Agronegocios, 17: 359-370.
- Cortez B., E., J. G. Rivera R., E. Andrio E., R. G. Guevara G., L. Guevara O., F. Cervantes O., y M. Mendoza E. 2011.** Osmocondicionamiento de la semilla de chile ancho y su efecto en el vigor. Universidad y Ciencia, 27: 345-349.
- Criollo E, H., K. Insuasti, y W. Delgado. 2016.** Regeneración *in vitro* de plántulas de tomate de árbol [*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.]. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 10: 252-261.
- De Vilchez, A., R. N., J. A Vilchez P., S. León S., A. R. Nava F., L. J. Martínez F., and M. A. Molina P. 2015.** Liquid medium culture: an approach for the commercial micropropagation of aloe (*Aloe barbadensis* Mill.). Revista Colombiana de Biotecnología, 17: 24-31.
- Días J., L. 1977.** Uso de plantas medicinales de México. Instituto Mexicano para el Estudio de Plantas Medicinales, México. 329 p.
- Díaz I., R. Moreno, and J. B. Power. 1988.** Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annum*. Plant Cell Reports, 7: 210-212.

- Endress R. 1994.** Plant Cell Biotechnology. Springer-Verlag. Washington, D.C. 330 p.
- FAOSTAT. 2009.** Exportaciones: País por producto. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma, Italia.
- Fernández B., M. L., L. Centeno, A. Rodríguez y R. Urdas. 2006.** Citocininas y organogénesis del tallo *in vitro*. Fitohormonas: metabolismo y modo de acción. pp. 8-27.
- Finch S., W. E., and G. Leubner M. 2006.** Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501–523.
- Finkelstein R., W. Reeves, T. Ariizumi, and C. Steber. 2008.** Molecular aspects of seed dormancy. *Plant Biology*, 59: 387 p.
- García A., M. 1984.** Patología vegetal práctica, 2ª edición. Editorial Limusa. México. 144 p.
- García F., A., S. Montes, J. A. Rangel, E. García, y M. Mendoza. 2010.** Respuesta fisiológica de la semilla chile piquín [*Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill] al ácido giberélico e hidrotermia. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1: 203-216.
- Garzón T., J. A. 2012.** Enfermedades del chile y tomate en México. Bayer de México S.A. de C.V. División Bayer CropScience. Ficha técnica. 48 p.
- Gayathri, N., M. Gopalakrishnan, and T. Sekar. 2015.** *In vitro* micropropagation of *Capsicum Chinense* Jacq.(Naga King Chili). *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5: 13-18.
- Gentry H., S. 1942.** Río Mayo plants. *Carn. Inst. Wash. Publ.* 527: 328 p.
- Gogoi, S., S. Acharjee, and J. Devi. 2014.** *In vitro* plantlet regeneration of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Bhut jalakia: hottest chili of northeastern India. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50: 235-241.
- González N., J. Vera R., C. G. Baños E., S. Espino H., y P. De la Cruz E. 2015.** Germinación del chile amashito (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) en el sureste mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11: 2211-2218.

- Grozeva S., and V. Todorova. 2015.** *In vitro* regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.) and characterization of plant–regenerants. *Electronic Journal of Biology*, 11: 17-22.
- Hailu T., B. Abera, and J. Daksa. 2015.** *In vitro* direct organogenesis protocol for mass propagation of an elite ethiopian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivar: Mareko Fana. *American Journal of Plant Sciences*, 6: 1435-1443.
- Heiser, C. B., and B. Pickersgill. 1969.** Names for the cultivated *Capsicum* species (Solanaceae). *Taxon*, 18: 277-283.
- INIA. 2010.** Manejo de plagas y enfermedades del pimiento, implementando criterios de producción limpia. Informativo No 33. 8 p.
- INIFAP. 2008** Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). Campo Experimental La Laguna. Matamoros, Coahuila, México. Folleto técnico número 15. 32 p.
- Jimarez M., M. J. 2014.** Regeneración de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) a partir de cultivos hidropónicos *in vitro*. Tesis presentada como requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencias. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Texcoco, estado de México. 116 p.
- Jiménez B., V., y A. Abdelnour E. 2017.** Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). *Revista Tecnología en Marcha*, 31: 144-159.
- Karszen, C. M., S. Zagorski, J. Kepczynski and S. P. C. Groot. 1989.** Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany*, 63: 71-80.
- Kehie, M., S. Kumaria, and P. Tandon. 2012.** *In vitro* plantlet regeneration from nodal segments and shoot tips of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili. *Biotech*, 2: 31-35.
- Kintzios S., J. B. Drossopoulos, and C. Lympieropoulos. 2001.** Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 55-62.
- Koornneef, M., L. Bentsink, and H. Hilhorst. 2002.** Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 33-36.

- Laux T., and G. Jurgens. 1997** Embryogenesis: a new start in life. *The Plant Cell*, 9: 989-1000.
- Litz R., y R. Jarret. 1991.** Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. In CIAT. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Colombia. pp 111-120.
- Liyunga K. P., P. Matakala, R. Chintu, C. Joao., G. Fernando, G. Sileshi, F. K. Akinnifes I., and O. C. Ajayi. 2006.** *Agroforestry options manual: a trainers' guide*, s.l.: World Agroforestry Centre ICRAF, 39 p.
- Long J. 1998.** *Capsicum* y cultura: la historia del chilli. México, D. F., Fondo de Cultura Económica. 410 p.
- López E., R. G., E. R. López H., T. Hernández M., A. Charrez C., Y. G. Guzmán, N. A. Muñoz J., and J. A. Ortiz Q. 2017.** Effects of temperature wild chili pepper (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) germination grown under two light conditions. *Acta Agronómica*, 66: 69-74.
- López F., D. A., C. O. García, y R. G. Ramírez E. 2011.** Germinación y crecimiento de plántulas de caoba (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) en condiciones de vivero. *Lacandonia*, 5: 13-20.
- Mazorra L., M., M. Núñez. 2008.** Estado actual sobre el conocimiento de la biosíntesis y los mecanismos moleculares de acción de los brasinoesteroides en las plantas. *Cultivos Tropicales*, 29: 91-105.
- McSteen, P., and Y. Zhao. 2008.** Plant hormones and signaling: common themes and new developments. *Developmental Cell*, 14: 467-473.
- Medina M., T., H. Villalón M., M. P. Hernández J., G. Sánchez R. y S. Salinas H. 2010.** Avances y perspectivas de investigación del chile piquín en Tamaulipas, México. *Ciencia UAT*, 4: 16-21.
- Mehanna H., T., C. Martin G. and C. Nishijima. 1985.** Effects of temperature, chemical treatments and endogenous hormone content on peach seed germination and subsequent seedling growth. *Scientia Horticulturae*, 27: 63-73.

- Mendoza Z., C. 1993.** Diagnóstico de enfermedades fungosas. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de parasitología agrícola. Chapingo, México. pp 90-94.
- Mendoza Z., C. 1999.** Enfermedades fungosas de Hortalizas y fresa. Hortalizas, plagas y enfermedades. Editorial Trillas. México. pp 36-40.
- Mendoza Z., C., y C. Pinto. 1985.** Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, Mexico. 311 p.
- Miranda H., L. Villarruel, F. Ibarra, L. Gastelum, y A. Morales. 2006.** Distribución y factores ambientales asociados al chiltepín silvestre en Sonora. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. pp 504-513.
- Mireles R., E., N. L. Moctezuma B., S. Castro N., R. Salazar H., H. Lucio C., y C. Pérez J. 2015.** Preacondicionamiento en la germinación de cuatro colectas de chile piquín (*Capsicum annuum* var. *aviculare*) de Tamaulipas, México. Acta Agrícola y Pecuaria, 1: 99-106.
- Montiel M., O., M. C. Pastelín S., E. Ventura Z., O. Castañeda C., M. T. González A., M. Guevara V., y C. Díaz R. 2011.** Alargamiento y enraizamiento de vitroplantas de cereza del Perú (*Physalis peruviana* L.). Tropical and Subtropical Agroecosystems, 13: 537-542.
- Morales C., A. 1986.** Ecología y productividad del chiltepín (*Capsicum baccatum* L) bajo condiciones silvestres en la región del Río Sonora, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. 84 p.
- Morales S., J. M., I. Vaca S. 2016.** Propagación *in vitro* de tzímalo (*Solanum caripense* Dunal). Revista tecnológica ESPOL-RTE, 29: 89-104.
- Moreno S., M. Salcedo S., L. Cárdenas M., L. Hernández J., y A. Núñez M. 2012.** Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*. Polibotánica, 34: 191-204.
- Mroginsky, L., P. Sansberro y E. Flashland. 2010.** Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 648 p.

- Murashige, T., and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-493.
- Murphy K., F. 2003.** Cucumber mosaic virus. *Compendium of pepper diseases*. APS Press. pp. 29-31.
- Nabhan G. 1985.** For the bird: the red-hot mother of chiles. *Gathering the desert*. Tucson, Arizona, The University of Arizona Press, pp. 123-133.
- Nabhan G., M. Slater, and L. Yarger. 1990.** New crops small farmers in marginal lands, wild chiles as a case study. *Agroecology and Small Farm Development*, EUA, pp. 19-34.
- Namitha, K. K., and P. S. Negi. 2013.** Morphogenetic potential of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. Arka Ahuti to plant growth regulators. *Notulae Scientia Biologicae*, 5: 220-225.
- Orlinska, M. and P. Nowaczyk. 2015.** *In vitro* plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology*, 39: 60-68.
- Parra C., G. 2006.** Efecto del ácido giberélico sobre la capacidad de germinación de semillas de chiltepín (*Capsicum frutescens*). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Sonora. Ciudad Obregón, Sonora, México. 70 p.
- Pérez M., A. G., C. O. García, L. M. Méndez C., R. G. Ramírez E., y R. P. López. 2010.** Germinación de semillas de chicozapote [*Manilkara zapota* (L.) P. Royen Sapotáceas]. *Lacandonia*, 4: 17-22.
- Pérez M., B., E. Martin, R. Ramírez, G. Núñez H., y N. Ochoa. 1999.** Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 179 pp.
- Pierick R. 1990.** Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 326 p.
- Plana D., M. Álvarez, M. Florido, M. Lara R., y C. Cabrera J. 2003.** Actividad biológica del Pectimorf en la morfogénesis *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) var. Amalia. *Cultivos Tropicales*, 24: 29-34.

- Pozueta J., G. Houlne, L. Canas, R. Schantz, and J. Chamarro. 2001.** Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 173-180.
- Purkayastha, J., T. Sugla, A. Paul, S. Solleti, and L. Sahoo. 2008.** Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: a valuable medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44: 442-447.
- Radice S. 2004.** Morfogénesis *in vitro*. *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Capítulo I. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp. 26-33.
- Radice S. 2010.** Morfogénesis. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp. 26-33.
- Raj, R. P., V. D. Glint, and K. N. Babu. 2015.** *In vitro* plant regeneration in *Capsicum chinense* Jacq. (Naga Chili). *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 3: 30-33.
- Ramírez M., M. 2008.** Chile piquín. Tecnología para incrementar germinación y conservar especies silvestres de Chile piquín. Ficha tecnológica por sistema producto. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, INIFAP/CIRNE. 23 p.
- Ramirez O., G. 2017.** Diversidad morfológica, fisiológica y climática en colectas de Chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduado. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 82 p.
- Ramirez R., and N. Ochoa. 1996.** An improved and reliable chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Reports*, 16: 226-231.
- Razdan M., K. 2003.** Introduction to plant tissue culture. 2nd ed. Science Publishers. Inc. Enfield, NH, USA. 388 p.
- Robledo A., y G. Carrillo. 2004.** Regeneración *in vitro* de plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocótilos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27: 121-126.
- Robles J., M., y C. Garza M. 2011.** Nuevas condicionantes en las organizaciones de los sistemas alimentarios: el caso del sistema vid de mesa de Sonora. Bienestar y desarrollo en el siglo XXI. Coord. Luis Huesca CIAD-COLEF, Ed. Díaz de Santos. 27 p.

- Robles J., M., y C. Garza M. 2015.** Restricciones de mercado y condicionantes a la organización en la comercialización de chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) en el mercado norteamericano. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 19: 1230-1240.
- Rodríguez del B., L. A. 2005.** Preferencia del consumidor por el chile piquín en comparación con otros chiles en el Noreste de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11: 279-281.
- Romero C., S. 1988.** Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. Dirección del Patronato Universitario, Chapingo, Edo. de México. pp. 67-69.
- SAGARPA. 2015.** México, líder mundial en exportación de chile. Comunicado de prensa num. 721/15. 2 p.
- SAGARPA. 2006.** Resumen agrícola de la Región Lagunera durante 2006. In: *El Siglo de Torreon. Suplemento Especial*. 1 de Enero de 2007. 96 p.
- Saldívar I., P., A. Laguna C., F. Gutiérrez R., y M. Domínguez G. 2010.** Ácido giberélico en la germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) JL Gentry. *Agronomía Mesoamericana*, 21: 327-331.
- Salisbury F., y C. Ross. 2000.** Fisiología de las plantas, (Tr.) A. Alonso, 1a. ed., Edit. Paraninfo Thomson Learning, España, 988 p.
- Sanatombi K., and G. J. Sharma. 2008.** *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants. *Biologia Plantarum*, 52: 141-145.
- Sanatombi K., and G. J. Sharma. 2008.** *In vitro* propagation of *Capsicum chinense* Jacq. *Biologia Plantarum*, 52: 517–520.
- Santana N., A. Canto, F. Barahona, M. Montalvo, P. Y. Zapata, A. Solís, and M. Miranda. 2005.** Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience*, 40: 1829-1831.

- Santner A., and M. Estelle. 2009.** Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459: 1071-1078.
- SAS institute. 2003.** SAS/STAT User's Guide. (Release 9.1). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Segui S., J. M. 2010.** La semilla. *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas.* Universidad Politécnica de Valencia. 441 p.
- Sharry S., E., M. Adema, y W. Abedini. 2015.** Plantas de probeta. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Universidad Autónoma de la Plata. 234 p.
- Shimada, A., M. Ueguchi T., T. Nakatsu, M. Nakajima, Y. Naoe, H. Ohmiya, and M. Matsuoka. 2008.** Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature*, 456: 26-27.
- Smith, R. H. 2013.** Plant tissue culture. Techniques and experiments. Third edition. Elsevier. 183 p.
- Srivastava L., M. 2002.** Crecimiento y Desarrollo de plantas: Hormonas y ambiente natural. Amsterdam. Academic Press. 140 p.
- Taiz L., and E. Zeiger. 2006.** Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 720 p.
- Tigabu M., and P. C. Oden. 2001.** Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. *Seed Sci. Technol.*, 29: 11-20.
- Tirado A., y M. Perea. 2011.** Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*: Manual de prácticas de laboratorio. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia), Facultad de Ciencias. pp. 21-27.
- Torrey, J. G. 1966.** The initiation of organized development in plants. *Advan. Morphogenesis* 5: 39-91.
- Valadez B., M. G., G. A. Aguado S., G. Carrillo C., V. H. Aguilar R., E. Espitia R., S. Montes H., and A. Robledo P. 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.

Velazquez V., R., M. Medina M., y J. Mena. 2002. Guía para identificar y manejar las principales enfermedades paracitarias del chile en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto técnico No. 20. SAGARPA-INIFAP-CIRNOC- Campo Experimental Pabellon. Aguascalientes. 41 p.

Velazquez V., R., M. Medina M., y J. Mena. 2003. La pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México.. Estudios Básicos. Folleto científico No. 14. SAGARPA-INIFAP-CIRNOC- Campo Experimental Pabellon. Aguascalientes. 26 p.

Venero G., J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31: 126-133.

Venkataiah P., P. Bhanuprakash, S. S. Kalyan, and K. Subhash. 2016. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14: 55-60.

Villalón M., H., T. Medina M., J. L. Rodríguez B., O. Pozo C., F. Garza O., R. López L., J. M. Soto R., M. Lara V., and R. López A. 2002. Wild chili pepper: a potential forest resource for sustainable management in northeastern México. Proc. 16th. International Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas, México. 15 p.

Walck, J. L., S. N. Hidayati, K. W. Dixon, K. Thompson, and P. Poschlod. 2011. Climate change and plant regeneration from seed. *Global Change Biology*, 17: 2145–2161.

Woodward, B. 1997. Micropropagation. Advanced tissue culture course. UNESCO/BAC BETCEN, Biotechnology Division ACR- Roodeplaat. Pretoria. 186 p.

Yadav, P. V., M. Kumari, and Z. Ahmed. 2011. Seed priming mediated germination improvement and tolerance to subsequent exposure to cold and salt stress in *Capsicum*. *Research Journal of Seed Science*, 4: 125-136.

IX. APENDICE

1. Composición química del medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962).

SALES INORGANICAS	
Macronutrientes	
	mg L ⁻¹
NH₄NO₃	1650
KNO₃	1900
CaCl₂ 2H₂O	440
MgSO₄ 7H₂O	370
KH₂PO₄	170
Micronutrientes	
KCl	0.83
H₃BO₃	6.2
MnSO₄ H₂O	15.6
ZnSO₄ 7H₂O	8.6
Na₂MoO₄ 7H₂O	0.25
CuSO₄ 5H₂O	0.025
CoCl₂ 6H₂O	0.025
Na₃EDTA	37.3
FeSO₄ 7H₂O	27.8
ó EDTA	50
Vitaminas	
Myo-inositol	100
ácido Nicotínico	0.5
Piridoxina.HCl	0.5
Tiamina.HCl	0.1
Sacarosa	30

2. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza de cuatro tiempos de inmersión en H₂O₂ al 3%; dos consistencias de medio de cultivo MS al 50 % de sales inorgánicas y dos temperaturas de incubación en la germinación del chile chiltepin después de 30 días.

Fuente de variación	Germinación (%)
H ₂ O ₂	0.1605*
Medio de cultivo	0.0845*
Temperatura	0.0050 NS
H ₂ O ₂ *Medio	0.1073*
H ₂ O ₂ *Temperatura	0.0845*
Medio*Temperatura	0.0325*
H ₂ O ₂ *Medio*Temperatura	0.0626*
Error	0.0052
CV	67.4
R ²	0.7365
Media	0.1075

NS= No significativo (P >0.05),*= Significativo (P ≤0.05), C.V= Coeficiente de variación.

3. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza de tres concentraciones de ácido AG₃ en dos tiempos de inmersión en la germinación *in vitro* de chile chiltepín después de 30 días.

Fuente de variación	Germinación (%)
Concentración AG ₃	0.1937*
Tiempo	0.1020*
Concentración*Tiempo	0.1287*
Error	0.0156
CV	18.51
R ²	0.6319
Media	0.675

NS= no significativo (P >0.05),*= significativo (P ≤0.05), C.V= Coeficiente de variación.

4. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza de dos tiempos de inmersión en AG₃ y adicionado al medio de cultivo en la germinación *in vitro* de chile chiltepín después de 30 días.

Fuente de variación	Germinación (%)
Tiempo	0.5333*

AG ₃ adicionado al medio	0.0895*
Tiempo*AG ₃	0.2183*
Error	0.0187
CV	20.53
R ²	0.7081
Media	0.6666

NS= No significativo (P >0.05),*= Significativo (P≤0.05), C.V= Coeficiente de variación.

5. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza de cuatro concentraciones de BAP en la inducción de brotes *in vitro* en cuatro tipos de explante de chile chiltepín después de cuatro semanas.

Fuente de variación	BE (Núm.)	Br (%)
Explante	156.85*	13.33
BAP	1.450*	0
Explante*BAP	32.03*	2.666*
error	0.1458	0
CV	23.5	0
R ²	0.9581	1
Media	1.625	0.5

NS= No significativo (P >0.05),*= Significativo (P≤0.05), C.V= Coeficiente de variación.

6. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza de cuatro concentraciones BAP adicionadas con AIA en la inducción de brotes *in vitro* en explantes de segmentos nodales con dos yemas axilares cultivadas en cuatro y seis semanas.

Fuente de variación	BE (Núm.)	Br (%)	LB (mm)
Tiempo	0.0066 NS	0.006 NS	3.840 NS
Trat RCV	35.41*	0.006 NS	14.77*
Tiempo*Trat RCV	15.88*	0.006 NS	8.9303*
Error	1.699	0.006	2.734
CV	29.4	8.219	37.13
R ²	0.3754	0.0604	0.1735
Media	4.433	0.9933	4.453

NS= No significativo (P >0.05),*= Significativo (P≤0.05), C.V= Coeficiente de variación; BE: Brotes por explante; Br: Brotación; LB: Longitud de Brotes

7. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza de diferentes concentraciones de AIA adicionadas con 11.1 µM de BAP en la inducción de brotes *in vitro* sobre explantes de segmentos nodales con yemas axilares de chile chiltepín después de cuatro semanas.

Fuente de variación	BE (Núm.)	Br (%)	Long. (mm)
Concentraciones BAP+AIA	9.12*	0	19.07*

Error	0.2311	0	1.603
CV	8.615	0	20.16
R ²	0.9134	0	0.604
Media	5.58	1	6.28

NS= No significativo (P >0.05),*= Significativo (P≤0.05), C.V= Coeficiente de variación; BE: Brotes por explante; Br: Brotación; LB: Longitud de Brotes.

8. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza de diferentes concentraciones de AIA adicionadas con 11.1 µM de BAP en la multiplicación de brotes *in vitro* de chile chiltepín después de tres semanas.

Fuente de variación	BE(Núm.)	Long(mm)
Concentraciones RCV	29.27*	20.57*
Error	0.47	1.803
CV	8.591	18.96
R ²	0.943	0.6033
Media	7.98	7.08

NS= No significativo (P >0.05),*= Significativo (P≤0.05), C.V= Coeficiente de variación; BE: Brotes por Explante; LB: Longitud de Brotes.

9. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza de diferentes concentraciones de AG₃ en el alargamiento de brotes de chile chiltepín.

Fuente de variación	Longitud de brotes (mm)	
	3 semanas	6 semanas
Tratamientos AG ₃	166.23*	1606.7*
Error	11.07	24.05
CV	38.07	32.09
R ²	0.672	0.9022
Media	8.74	15.28

NS= No significativo (P >0.05),*= Significativo (P≤0.05), C.V= Coeficiente de variación

10. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza de diferentes concentraciones de AIB sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes de chile chiltepín.

Fuente de variación	E (%)	R (Núm.)	LR (cm)
Tratamientos AIB	0.2800*	19.67*	0.2760 NS

Error	0.08	4.2112	0.3163
CV	44.19	67.39	37.43
R ²	0.75	0.5282	0.5132
Media	0.64	3.0451	1.5026

NS= No significativo ($P > 0.05$), *= Significativo ($P \leq 0.05$), C.V= Coeficiente de variación; E: Enraizamiento; R: Raíces; LR: Longitud de Raíces.