

## REGENERACIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS DE CHILE (*Capsicum annuum* L.) MEDIANTE CULTIVO DE COTILEDONES E HIPOCOTILOS

### ***IN VITRO* PLANT REGENERATION OF CHILI PEPPER (*Capsicum annuum* L.) FROM COTYLEDONS AND HYPOCOTYLS CULTURE**

**Alejandrina Robledo Paz<sup>\*</sup> y Guillermo Carrillo Castañeda<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230 Montecillo, Estado de México. Tel. y Fax: 01 (595) 95 2-02-62. Correo electrónico: arobledo@colpos.mx

\* Autor responsable

### **RESUMEN**

Para la aplicación de la biotecnología moderna en un programa de mejoramiento, un requisito importante es contar con un sistema de regeneración *in vitro* de plantas. En esta investigación se desarrolló un protocolo eficiente y reproducible de regeneración *in vitro* de plantas de dos cultivares de chile: Árbol y Mirasol. La respuesta organogénica de hipocotilos y cotiledones, obtenidos de plántulas de 19 días de edad fue analizada en el medio de Murashige y Skoog (MS), complementado con diferentes concentraciones de N<sup>6</sup>-benziladenina (BA) (5.9 µM a 29.3 µM), ácido indol-3-acético (AIA) (0.28 µM a 5.71 µM), ácido  $\alpha$ -nafthalenacético (ANA) (0.16 µM a 0.53 µM) y ácido gibberélico (AG<sub>3</sub>) (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  $5.1 \pm 3.0$  brotes por explante (cotiledón) cuando se adicionó al medio 17.7 µM de BA y 1.71 µM de AIA. Dicha tasa de regeneración es mayor que la reportada por otros autores para diferentes cultivares de chile y distintos tejidos de esta planta. De los brotes regenerados, 70 % llegaron a desarrollarse en plantas en un periodo de 16 semanas, con la morfología normal de una planta de chile, y produjeron frutos normales.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, cultivo *in vitro*, regeneración de plantas, chile, organogénesis

### **SUMMARY**

For modern biotechnology to be applied in a breeding program, an *in vitro* plant regeneration protocol is required. An efficient and reliable protocol for *in vitro* plant regeneration of two chili pepper cultivars, Arbol and Mirasol, was developed in this research. Hypocotyl and cotyledon explants from 19 days-old seedlings were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium, supplemented with different concentrations of N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) (5.9 µM to 29.3 µM), indole-3-acetic acid (IAA) (0.28 µM to 5.71 µM),  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) (0.16 µM to 0.53 µM), and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0.86 µM). All tested combinations of growth regulators induced adventitious shoot formation in both hypocotyl and cotyledon explants. It was possible to produce up to  $5.1 \pm 3.0$  shoots per explant (cotyledon) when 17.7 µM BA and 1.71 µM IAA were used in the culture medium. This regeneration rate is higher than the rates reported for other chili pepper culti-

vars and tissues. Seventy percent of regenerated shoots became plants in 16 weeks; these plants had the normal morphology of a chili pepper plant and produced normal fruits.

**Index words:** *Capsicum annuum*, *in vitro* culture, plant regeneration, chili pepper, organogenesis

### **INTRODUCCIÓN**

El chile (*Capsicum annuum* L.) pertenece a la familia de las solanáceas y se usa como condimento en todo el mundo. Los programas de mejoramiento convencional de esta hortaliza generan variedades resistentes a enfermedades y plagas, o bien de mayor rendimiento; sin embargo, estos métodos son de larga duración y enfrentan problemas de incompatibilidad y esterilidad de los híbridos F1 (Tanksley e Iglesias-Olivas, 1984). Mediante biotecnología se pueden desarrollar procesos de regeneración de plantas *in vitro* altamente eficientes.

Protocolos de regeneración *in vitro* de plantas de chile se han obtenido a partir de brotes adventicios (Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1996; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Pozueta-Romero *et al.*, 2001), de cultivo de protoplastos (Díaz *et al.*, 1988) y de embriogénesis somática (Kintzios *et al.*, 2001). No obstante, la eficiencia de la micropropagación por sí sola, no asegura que las plantas regeneradas sean normales y lleguen a fructificar; en algunos casos sólo se obtienen estructuras rudimentarias que no llegan a desarrollarse en plantas (Liu *et al.*, 1990; Arroyo y Revilla, 1991; Valera-Montero y Ochoa-Alejo, 1992). Esta situación ha limitado la aplicación de tecnologías que permiten la manipulación biotecnológica de chile.

El presente trabajo se llevó a cabo para desarrollar un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* de plantas normales en los cultivares Árbol y Mirasol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y medios de cultivo

Semillas de *C. annuum* de los cultivares Árbol y Mirasol cosechadas en 1991, fueron obtenidas del Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias y del Instituto Tecnológico Agropecuario No. 20.

Los medios de cultivo usados en la presente investigación son variantes del medio MS (1962) y se describen en el Cuadro 1. Los medios A2, B2, C2, D2 y E2 contenían únicamente 10 % de la concentración de auxina en relación a los medios A, B, C, D y E. Todos los medios contenían 0.7 % (p/v) de agar-agar (Merck), purificado y exento de inhibidores. El pH de los medios se ajustó a  $5.8 \pm 0.1$  y fue esterilizado en una autoclave a  $1.05 \text{ kg cm}^{-2}$  y  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min.

*Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo usados para la regeneración de plantas de los cultivares Mirasol y Árbol, a partir de explantes e hipocotilo.*

Medio	Concentración de sales inorgánicas y vitaminas del MS	Sacarosa (mM)	Reguladores de crecimiento ( $\mu\text{M}$ )	$\text{AgNO}_3$ ( $\mu\text{M}$ )
A	100 %	87.6	BA, 5.9 + ANA, 0.16	11.8
B	100 %	87.6	BA, 22.7 ANA, 0.53	11.8
C	100 %	87.6	BA, 8.8 AIA, 5.7	11.8
D	100 %	87.6	BA, 29.3 ANA, 0.53 AIA, 0.28 $\text{AG}_3$ , 0.86	11.8
E	100 %	87.6	BA, 17.7 AIA, 1.7	11.8
F	100 %	87.6		11.8
G	50 %	29.2		
H	100 %	87.6	AIB, 1.4	11.8

MS = Murashige y Skoog (1962); N<sup>6</sup>-benciladenina (BA); ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA); ácido indolacético (AIA); ácido indolbutírico (AIB); ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ); nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ).

### Inducción de organogénesis

Después de ser remojadas en agua corriente durante 24 h, las semillas fueron sumergidas en una solución de Benlate® 1.2 % (p/v) (50 % de benomil) (Dupont) durante 15 min para después ser transferidas a una solución 1.8 % de cloro activo (Cloralex®, México) en la que permanecieron 20 min. Luego las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en frascos de vidrio que contenían 25 mL de medio G en el que fueron incubados durante 19 d, a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y fotoperíodo de 16 h luz (lámparas de luz blanca fría fluorescente, con intensidad lumínica de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8 h de oscuridad. Los cotiledones ob-

tenidos de estas plantas fueron colocados con la superficie abaxial en contacto con el medio de cultivo, después de practicarles una incisión transversal a uno de los bordes del cotiledón. De estas mismas plantas se separaron secciones de hipocotilo de aproximadamente 0.7 cm de longitud, las cuales fueron colocadas verticalmente y en forma invertida a su posición original en la plántula, en el medio de cultivo. Veinte explantes de cotiledón y 20 de hipocotilo fueron cultivados en las condiciones ambientales antes descritas, en frascos de 50 mL que contenían 10 mL de los medios A, B, C, D y E.

Después de cuatro semanas de cultivo, en cada uno de los medios, se cuantificó el número de explantes que formaron brotes. Este primer ensayo permitió seleccionar los dos medios que promovieron la mayor proliferación de brotes y con estos medios se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

### Alargamiento de los brotes adventicios

Cuando los explantes de hipocotilo comenzaron a formar brotes adventicios, fueron invertidos nuevamente para dejar la zona de diferenciación de brotes por arriba del medio de cultivo. Los hipocotilos se colocaron verticalmente en frascos de vidrio con 25 mL de los medios A2, B2, C2, D2 y E2 para promover el alargamiento de brotes. Los cotiledones que formaron brotes se subcultivaron en los mismos medios. Después de cuatro semanas de incubación, los cotiledones y los hipocotilos que mostraron respuesta morfogénica se transfirieron al medio F, en el que permanecieron hasta que los brotes alcanzaron una longitud aproximada de 2 cm. Después de 10 semanas de iniciado el cultivo en los medios de inducción de brotes, se contó el número de brotes desarrollados en cada explante, con una longitud igual o mayor a 4 mm.

### Enraizamiento de brotes

Veinte brotes de los cultivares Árbol y Mirasol, de al menos 2 cm de longitud, fueron cultivados en frascos de vidrio con 25 mL del medio H para inducir la formación de raíces. Los brotes permanecieron en el medio H por una semana y luego fueron transferidos al medio F para promover aún más el crecimiento radical.

### Transferencia a suelo

Las plantas con raíz que habían alcanzado una altura entre 3 y 4 cm se sometieron a un periodo de aclimatación en cuarto de incubación; la aclimatación consistió en mantener destapados los frascos con las plantas durante 24 h. Posteriormente, las plantas fueron sacadas del frasco y se lavaron con agua corriente para eliminar los residuos de medio de cultivo. Las plantas fueron luego sumergidas en una solución de Benlate 1 % (p/v) durante 3 min y transferidas a vasos de unicel de 400 mL de capacidad que contenían

sustrato (mezcla 3 de Sunshine, Sungro, Canadá®), húmedo a capacidad de campo. Las plantas se cubrieron con bolsas de polietileno transparente de 1 kg de capacidad, con dos perforaciones de 1.5 cm de diámetro en los extremos. Las bolsas fueron retiradas 7 d después de haber sido colocadas y desde este momento se aplicaron tres riegos semanales, dos riegos con agua y uno con fertilizante Miracle-Gro® (Scotts Co., EE.UU.) el cual contenía nitrógeno: fósforo: potasio en la proporción 15:30:15.

Después de tres semanas las plantas fueron transferidas a macetas de 6 kg de capacidad y cultivadas en invernadero hasta la producción de frutos y semillas fisiológicamente maduras.

### Análisis estadístico

El diseño usado fue uno completamente aleatorizado con un número variable de repeticiones para el análisis del número de explantes con brotes y para el número de brotes por explante. Se hicieron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey. Los datos fueron analizados con el procedimiento de los modelos lineales generalizados del Sistema de Análisis Estadístico (SAS System for Windows V8, 2000).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La diferenciación de brotes adventicios se logró tanto en hipocotilos como en cotiledones de los cultivares Árbol y Mirasol, en los cinco medios de cultivo probados (A, B, C, D y E) (Cuadro 2). Los medios D y E fueron seleccionados para llevar a cabo las fases siguientes del proceso de regeneración, porque estos medios tendieron a superar a los medios A, B y C en el número de explantes con brotes, tanto en explantes de hipocotilos y como de cotiledones, aunque las diferencias no fueron significativas (Cuadro 2). Los medios D y E no difirieron significativamente en el número de explantes que formaron brotes ni en el número de brotes diferenciados por explante empleado, ni tampoco hubo diferencias significativas entre cultivares y tipo de explante (Cuadro 3). Numéricamente, el cultivar Mirasol en el medio D y con explantes de hipocotilo mostró mayor cantidad de explantes con brotes ( $14.7 \pm 2.3$ ), mientras que este mismo cultivar en el medio E y con explantes de cotiledón mostró el valor más alto de número de brotes por explante ( $5.1 \pm 3.0$ ).

Estas condiciones experimentales permitieron a los tejidos manifestar su potencialidad morfogénica. Los reguladores de crecimiento como BA y AIA promovieron la inducción y crecimiento de brotes adventicios de chile, como ya ha sido demostrado por varios autores (Valera-Montero y Ochoa-Alejo, 1992; Christopher y Rajam, 1996; Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1996); no es sólo su presencia sino

también sus concentraciones que determinan el tipo de respuesta inducida.

Cuadro 2. Respuesta de los explantes de cotiledón e hipocotilo de dos cultivares de chile, después de cuatro semanas de ser crecidos en los medios A (MS + BA, 5.9  $\mu$ M y ANA, 0.16  $\mu$ M), B (MS + BA, 22.7  $\mu$ M y ANA, 0.53  $\mu$ M), C (MS + BA, 8.8  $\mu$ M y AIA, 5.7  $\mu$ M), D (MS + BA, 29.3  $\mu$ M; ANA, 0.53  $\mu$ M; AIA, 0.28  $\mu$ M y AG<sub>3</sub>, 0.86  $\mu$ M) y E (MS + BA 17.7  $\mu$ M y AIA, 1.7  $\mu$ M).

Cultivar	Medio	Número de explantes con brotes $\pm$ ee †	
		Hipocotilo	Cotiledón
Árbol	A	10.0 $\pm$ 0.0 a	9.0 $\pm$ 2.8 a
	B	8.0 $\pm$ 0.0 a	7.0 $\pm$ 0.0 a
	C	9.0 $\pm$ 1.4 a	10.0 $\pm$ 2.8 a
	D	7.0 $\pm$ 1.4 a	15.0 $\pm$ 4.2 a
	E	10.0 $\pm$ 1.4 a	14.0 $\pm$ 0.0 a
	A	9.0 $\pm$ 4.2 a	9.0 $\pm$ 1.4 a
	B	12.0 $\pm$ 2.8 a	13.0 $\pm$ 1.4 a
	C	9.0 $\pm$ 0.0 a	13.0 $\pm$ 1.4 a
	D	11.0 $\pm$ 4.2 a	14.0 $\pm$ 7.0 a
	E	14.0 $\pm$ 2.8 a	13.0 $\pm$ 5.6 a

† Valores promedio de dos experimentos obtenidos después de cuatro semanas de iniciado el cultivo; ee = error estándar.

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMSH= 13.0.

Cuadro 3. Organogénesis en explantes de cotiledón e hipocotilo de dos cultivares de chile cultivados en los medios D (MS + BA, 29.3  $\mu$ M; ANA 0.53  $\mu$ M; AIA, 0.28  $\mu$ M y AG<sub>3</sub>, 0.86  $\mu$ M) y E (MS + BA 17.7  $\mu$ M y AIA, 1.71  $\mu$ M).

Medio de cultivo	Cultivar	Explante	Número de explantes con brotes $\pm$ ee †	Número de brotes por explante $\pm$ ee ‡‡
			†	‡‡
D	Árbol	Cotiledón	8.7 $\pm$ 0.5a	3.4 $\pm$ 1.1a
		Hipocotilo	8.0 $\pm$ 0.0a	4.7 $\pm$ 3.2a
	Mirasol	Cotiledón	10.7 $\pm$ 0.5a	2.3 $\pm$ 1.2a
		Hipocotilo	14.7 $\pm$ 2.3a	4.7 $\pm$ 1.2a
E	Árbol	Cotiledón	12.0 $\pm$ 6.9a	3.0 $\pm$ 0.0a
		Hipocotilo	8.0 $\pm$ 0.0a	3.7 $\pm$ 1.3a
	Mirasol	Cotiledón	10.0 $\pm$ 3.4a	5.1 $\pm$ 3.0a
		Hipocotilo	11.3 $\pm$ 2.9a	3.9 $\pm$ 2.2a
DMSH			8.8	3.4

† Valores promedio de tres experimentos obtenidos después de cuatro semanas de iniciado el cultivo.

‡‡ Valores obtenidos después de 10 semanas de iniciado el cultivo; ee = error estándar.

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

En este trabajo, todos los medios que contenían BA y AIA permitieron la morfogénesis, y la magnitud de respuesta estuvo en función de las concentraciones de los reguladores de crecimiento.

El proceso morfogénico de los explantes de chile comenzó con el aumento en el tamaño del explante, hasta en dos o tres veces. En los cotiledones inició con la formación de un pequeño callo en la zona de incisión, y del callo se diferenciaron los primordios de brote. En el hipocotilo, la zona en contacto con el medio de cultivo fue la que aumentó de tamaño y formó protuberancias de color amarillo claro, a partir de las cuales comenzaron a diferenciarse los primordios de brote que se observaban como pequeñas zonas verdes a las tres semanas de haber iniciado el cultivo. Asimismo, en el extremo opuesto del hipocotilo se observó

el desarrollo de raíces, las cuales crecieron hasta alcanzar el medio de cultivo. Sólo la sección del hipocotilo que se ubicaba por debajo del meristemo apical pudo diferenciar brotes adventicios; las otras secciones sólo formaron callos o raíces, como lo observaron Fari y Czako (1981), quienes explicaron el fenómeno por un gradiente de sustancias de crecimiento, especialmente AIA, desde la base hasta el ápice del hipocotilo, gradiente que es el responsable de las diferencias organogénicas.

La mayoría de los brotes diferenciados sobre el medio E conservaron las características morfológicas de una planta normal de chile, mientras varios de los brotes diferenciados en los medios A, B, C y D mostraron hojas más anchas que los brotes obtenidos en el medio E. Algunos de los explantes cultivados en los medios A, B y C sólo formaron estructuras rudimentarias de hojas.

Los brotes adventicios lograron crecer cuando los hipocotilos y cotiledones se transfirieron a los medios que contenían un nivel reducido de auxinas (A2, B2, C2, D2 y E2) o bien al medio F carente de reguladores de crecimiento (Figura 1A). Cuando los explantes permanecieron en el medio de inducción de brotes por más de cinco semanas, éstos no crecieron y se promovió una rápida proliferación de callo que invadía al explante o el tejido se oscurecía y moría.

Después de que los explantes fueron transferidos a los medios de crecimiento (A2, B2, C2, D2, y E2), se observó un notable desarrollo de los brotes lo que generó una competencia entre ellos que luego restringió su crecimiento. Las estructuras rudimentarias diferenciadas sobre los explantes cultivados en los medios A, B y C no lograron desarrollar plantas, aún después de ser crecidas en los medios A2, B2 y C2.

Para evitar la competencia entre los brotes por espacio y nutrientos, fue necesario seccionar el explante en repetidas ocasiones y distribuir los fragmentos sobre el medio de cultivo. Dicho reacomodo promovió el crecimiento de la mayoría de los brotes diferenciados.

Un fenómeno que se observó en algunos de los brotes que crecieron 2 cm o más, fue la abscisión foliar, la cual les impedía sobrevivir en condiciones de invernadero. Algunos autores (Beyer, 1976; Reid, 1990; Salisbury y Ross, 1994) han asociado la abscisión con la presencia de etileno. Por tal razón se empleó un compuesto inhibidor específico de la acción del etileno, como el ion  $\text{Ag}^+$  que puede interferir con su incorporación a los sitios receptores (Beyer, 1979), como se ha observado en cultivos *in vitro* de maíz (*Zea mays*), *Nicotiana plumbaginifolia*, trigo (*Triticum aestivum*) y cassava (*Manihot esculenta*) (Purnhauser *et al.*, 1987; Vain *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2001), después de agregar de 5.8  $\mu\text{M}$  a 58.0  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  al medio de crecimiento.

En los medios A2, B2, C2, D2 y E2 que contenían  $\text{AgNO}_3$ , se evitó por completo la abscisión foliar de los brotes (Figura 1B), lo que permite suponer que efectivamente el etileno está involucrado en la pérdida de las hojas de las plantas regeneradas.

Asimismo, se observó la formación espontánea de raíces en 50 % de los brotes cuando éstos se cultivaron sobre el medio F, y de hasta 80 % cuando los brotes se cultivaron en el medio H que contenía AIB y luego fueron transferidos al medio F (Cuadro 4). La formación de raíces en el medio F ocurrió sin una fase intermedia de callo, mientras que en los brotes cultivados en el medio H se indujo la formación de callo en la base del brote en contacto con el medio de cultivo, a partir del cual se diferenció el sistema radical después de haber transferido el brote a un medio libre de reguladores de crecimiento.

Cuadro 4. Efecto del medio H ( $MS + AIB, 1.4 \mu\text{M}$ ) en el enraizamiento de brotes adventicios de los cultivares Mirasol y Árbol, obtenidos en los medios D ( $MS + BA, 29.3 \mu\text{M}$ ; ANA, 0.53  $\mu\text{M}$ ; AIA, 0.28  $\mu\text{M}$  y  $\text{AG}_3, 0.86 \mu\text{M}$ ) y E ( $MS + BA 17.7 \mu\text{M}$  y AIA, 1.7  $\mu\text{M}$ ).

Cultivar	Medio	Número de brotes con raíces + ee †
Mirasol	F	11.0 ± 1.7 ab
	H	16.0 ± 2.0 a
Árbol	F	9.3 ± 2.3 b
	H	14.6 ± 2.5 ab

† Valores promedio de tres experimentos obtenidos después de tres semanas de iniciar el cultivo en presencia de AIB.

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMHS = 5.6

Las raíces inducidas por el medio H fueron más cortas y más gruesas que las que se desarrollaron en forma espontánea en el medio F. La presencia del sistema radical tuvo un efecto promotor sobre el crecimiento de la parte aérea, pues en cuanto la raíz apareció se aceleró el crecimiento aéreo. La presencia de la radícula parece ser crítica para el desarrollo de los brotes cuando todavía están unidos al explante original (hipocotilo), como ya había sido observado por Valera-Montero y Ochoa-Alejo (1992) y Pozueta-Romero *et al.* (2001).

Las plantas que fueron transferidas al suelo y mantenidas en el cuarto de incubación, lograron aclimatarse durante la primera semana del transplante, pues presentaron una apariencia vigorosa después de haber retirado la bolsa de polietileno que las cubría. Estos resultados concuerdan con los reportados por Estrada-Luna *et al.* (2001) quienes estudiaron los cambios fisiológicos que ocurren durante la aclimatación de plantas de chile Mulato micropropagadas, ya que después de 7 d mostraron ajustes fisiológicos que fueron críticos para su sobrevivencia. Despues de ser transferidas al invernadero las plantas tuvieron una alta tasa de sobrevivencia (90 %), continuaron su crecimiento normal con la morfología típica de la planta de chile (Figura 1C), y después de 4 a 5 meses comenzaron a formar flores a partir

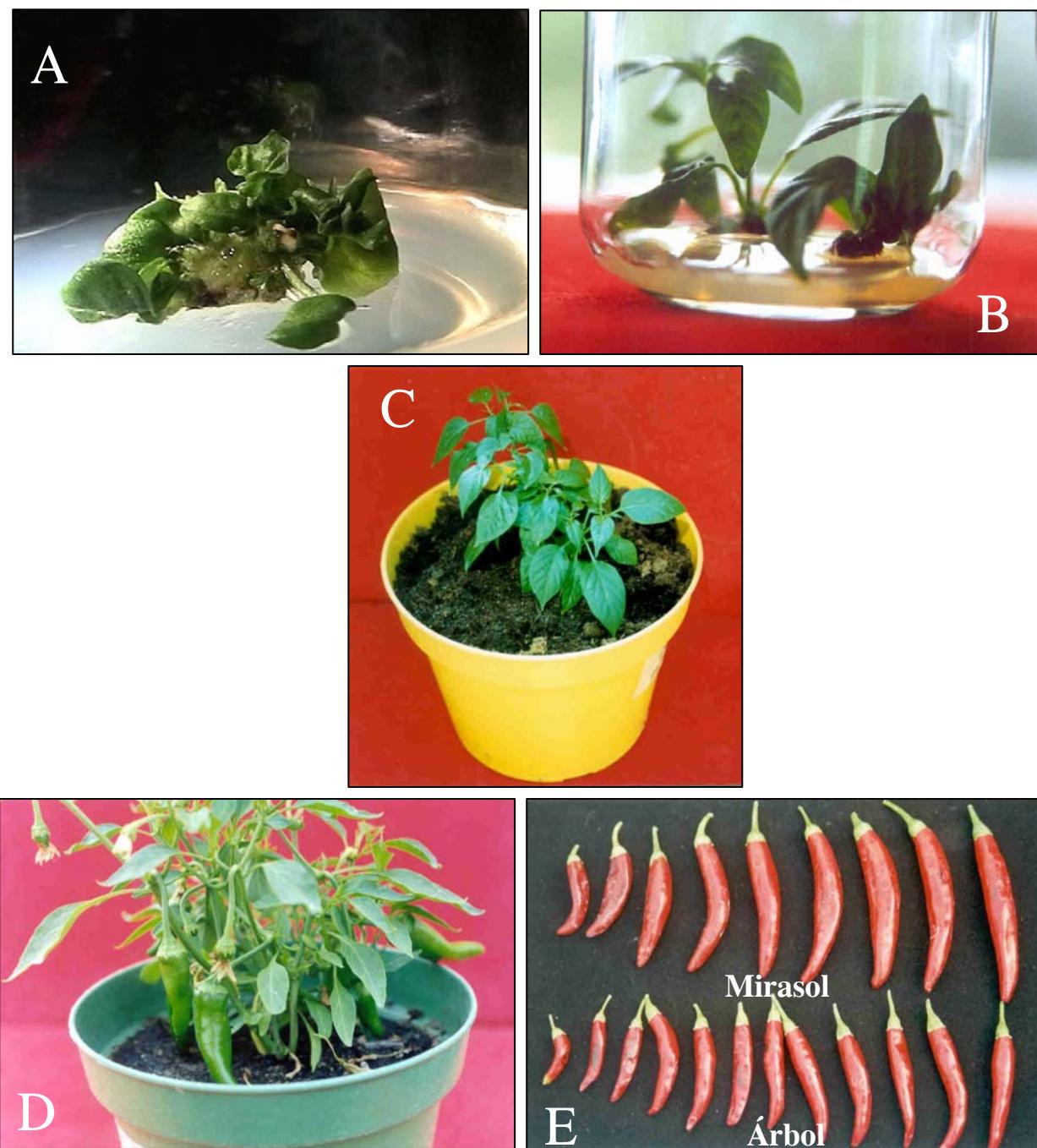


Figura 1. Regeneración in vitro de plantas de chile a partir de hipocotilos obtenidos de plántulas de 19 días de edad. A) Brotes adventicios después de 10 semanas de iniciar el cultivo en el medio D ( $29.3 \mu M$  de BA,  $0.53 \mu M$  de ANA,  $0.28 \mu M$  de AIA y  $0.86 \mu M$  de AG<sub>3</sub>). B) Plantas una vez que los brotes adventicios formaron raíces en un medio libre de reguladores de crecimiento (medio F). C) Plantas transferidas al suelo y crecen en condiciones de invernadero. D) Plantas con frutos después de cinco meses de ser transferidas a invernadero. E) Frutos en madurez fisiológica

de las cuales se desarrollaron frutos normales (Figura 1D), que alcanzaron su madurez fisiológica (Figura 1E).

En otros trabajos en los que se ha reportado la regeneración *in vitro* de plantas de chile de distintos cultivares, no se

hace referencia a la eficiencia de regeneración del protocolo establecido o únicamente utilizan criterios cualitativos evaluados *in vitro*, lo cual no garantiza el éxito de las plantas una vez que son crecidas en condiciones de invernadero o de campo. De hecho, muy pocos autores han seguido el

desarrollo de las plantas regeneradas hasta la madurez fisiológica y la producción de frutos (Vagera y Havranek, 1985; Arroyo y Revilla, 1991; Ezura *et al.*, 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Kim *et al.*, 1997).

Al calcular la eficiencia de regeneración *in vitro*, con base en el número de explantes que forman brotes y en el número de brotes por explante, se encontró que de 100 explantes de hipocotilo de la variedad Mirasol, cultivados *in vitro* en el medio E, se podrían obtener hasta 345 brotes, que corresponde a la máxima eficiencia de regeneración del protocolo desarrollado aquí. Esta eficiencia de regeneración es mayor que la de otros autores, quienes también utilizaron hipocotilos y lograron obtener 287 brotes a partir de 100 explantes (Ezura *et al.*, 1993).

De los brotes regenerados, 70 % llegaron a desarrollar plantas de más de 6 cm de longitud en un período de 16 semanas, momento en el cual tuvieron la capacidad para establecerse en el suelo y continuar su crecimiento hasta producir frutos normales.

La eficiencia del protocolo desarrollado aquí fue determinada tomando en cuenta criterios de generados del cultivo *in vitro*, así como del comportamiento de las plantas regeneradas en el invernadero. Entonces, que este protocolo podría ser usado exitosamente para la regeneración de plantas de otros cultivares de chile, así como para generar material con el que se pueda llevar a cabo la manipulación biotecnológica de esta planta.

## CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo reproducible y eficiente para la regeneración *in vitro* de plantas de chile de los cultivares Árbol y Mirasol. Este protocolo permitió regenerar plantas a partir de distintos tejidos, en un período de 16 semanas. Dichas plantas tuvieron un alto potencial de sobrevivencia en condiciones de invernadero. La aplicación de esta metodología asegura la regeneración de plantas normales de chile con capacidad para producir frutos que forman semillas maduras.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por el financiamiento al proyecto I-37361, y al Dr. Eduardo Espitia Rangel por su asesoría en el análisis estadístico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo R, M A Revilla (1991)** *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyls segments in two bell pepper cultivars. Plant Cell Rep. 10: 414-416.
- Beyer E M (1976)** A potent inhibitor of ethylene action in plants. Plant Physiol. 58: 268-271.
- Beyer E M Jr. (1979)** Mechanism of action of ethylene: biological activity of deuterated ethylene and evidence against isotopic exchange and cis-trans-isomerisation. Plant Physiol. 63: 169-173.
- Buyukalaca S, F Mavituna (1996)** Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46: 227-235.
- Christopher T, M V Rajam (1996)** Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46: 245-250.
- Díaz I, R Moreno, J B Power (1988)** Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum*. Plant Cell Rep. 7: 210-210-212.
- Estrada-Luna A A, F T Davies Jr., J N Egilla (2001)** Physiological changes and growth of micropaginated chile ancho pepper plants during acclimatization and post-acclimatization. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 66: 17-24.
- Ezura H, S Nishimiya, M Kasumi (1993)** Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper. Plant Cell Rep. 12: 676-680.
- Fari M, M Czako (1981)** Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured *in vitro*. Scientia Hort. 15: 207-213.
- Kim S J, S J Lee, B D Kim, K H Paek (1997)** Satellite-RNA-mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). Plant Cell Rep. 16: 825-830.
- Kintzios S, J B Drossopoulos, C Lymeropoulos (2001)** Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 67: 55-62.
- Liu W, W A Parrot, D F Hildebrand, G B Collins, E G Williams (1990)** *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. Plant Cell Rep. 9: 360-364.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Pozueta-Romero J, G Houlné, L Cañas, R Schantz, J Chamorro (2001)** Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 67: 173-180.
- Purnhauser L, P Medgyesy, M Czako, P J Dix, L Marton (1987)** Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO<sub>3</sub>. Plant Cell Rep. 6: 1-4.
- Ramírez-Malagón R, N Ochoa-Alejo (1996)** An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. Plant Cell Rep. 16: 226-231.
- Reid M S (1990)** The functioning of hormones in plant growth and development: In: Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. P. J. Davies (ed). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp: 257-279.
- Salisbury F B, C W Ross (1994)** Fisiología Vegetal. V. González Velázquez (trad). Grupo Editorial Iberoamérica. México, D. F. 759 p.
- Tanksley S, E Iglesias-Olivas (1984)** Inheritance and transfer of multiple flower character from *Capsicum chinense* into *C. annuum*. Euphytica 33: 769-772.
- Vagera J, P Havranek (1985)** *In vitro* induction of androgenesis in *Capsicum annuum* L. and its genetic aspects. Biol. Plant. 27: 10-21.
- Vain P, H Yean, P Flament (1989)** Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO<sub>3</sub>. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 18: 143-151.
- Valera-Montero L, N Ochoa-Alejo (1992)** A novel approach for chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. Plant Sci. 84: 215-219.
- Zhang P, S Phansiri, J Puonti-Kaerlas (2001)** Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 67: 47-54.