

GERMINACIÓN *in vitro* DE CHILE CHILTEPÍN (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) Y REGENERACIÓN POR ORGANOGÉNESIS

In vitro SEED GERMINATION OF CHILTEPIN PEPPER (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) AND PLANT REGENERATION VIA ORGANOGENESIS

José N. Beltrán-Burboa¹, María Cristina G. López-Peralta^{2*}, Eleodoro Hernández-Meneses¹, Nicacio Cruz-Huerta¹

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, ²Genética. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP 56230. (cristy@colpos.mx).

RESUMEN

El chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) es una especie que se recolecta de plantas silvestres y enfrenta presión antropogénica por su extracción irracional. Por la germinación baja de sus semillas, la demanda creciente del fruto y prácticas de manejo agronómico la especie podría verse amenazada en corto plazo. El objetivo de este estudio fue establecer las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de chile chiltepín y la organogénesis. Con las técnicas *in vitro* es posible incrementar los porcentajes de germinación e inducir la morfogénesis a partir de plántulas. El diseño de los experimentos fue completamente al azar con 5 o 10 repeticiones y las unidades experimentales fueron semillas y explantes. Las semillas se desinfectaron con NaOCl 20% (v/v) por 15 min. Los efectos de la concentración de AG₃ se evaluaron en la germinación y alargamiento de brotes *in vitro*, combinaciones de BAP y AIA en la inducción y multiplicación de brotes y concentraciones de AIB en su enraizamiento. La germinación *in vitro* fue 90% al sumergir las semillas en 5.7 mM de AG₃ por 30 min y adicionado al medio MS con 50% de concentración de sales. Los brotes se generaron desde segmentos nodales de plántulas *in vitro* con 11.1 mM de BAP y 2.8 mM de AIA. La multiplicación de brotes se obtuvo con estas mismas combinaciones de reguladores de crecimiento. El alargamiento de los brotes se favoreció en medio MS con 11.5 mM de AG₃ y el enraizamiento se indujo con 10.0 y 12.5 mM de AIB. El ácido giberélico mejora la germinación de semillas de chile chiltepín y la organogénesis se establece desde segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro*.

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

ABSTRACT

Chiltepín pepper (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) is a spice collected from wild plants under anthropogenic pressure due to irrational extraction. The low germination of its seeds, the growing demand for fruit, and the agricultural practices could threaten this species in the short term. This study aimed to establish the optimal conditions for *in vitro* germination and organogenesis of chiltepín pepper. Using *in vitro* techniques, it is possible to increase the germination percentages and induce the morphogenesis from seedlings. The design of the experiments was completely randomized with 5 or 10 repetitions, and the experimental units were seeds and explants. Seeds were disinfected with 20% NaOCl (v/v) for 15 min. We evaluated the effects of the GA₃ concentration on *in vitro* germination and shoot lengthening; we also studied combinations of BAP and IAA on shoot induction and multiplication, as well as concentrations of IBA on rooting. By immersing seeds in 5.7 mM GA₃ for 30 min and cultivating them in MS medium with 50% salt concentration added with GA₃, we achieved an *in vitro* germination of 90%. Shoots were generated from nodal segments of *in vitro* seedlings with 11.1 mM BAP and 2.8 mM IAA. Shoot multiplication was obtained with these same combinations of plant growth regulators. Shoot lengthening was favored in MS medium with 11.5 mM GA₃, and rooting was induced with 10.0 and 12.5 mM IBA. Gibberellic acid improves chiltepín pepper seed germination, and organogenesis from nodal segments from *in vitro* germinated seedlings is possible.

Keywords: gibberellic acid, phytogetic, micropropagation, morphogenesis, wild.

INTRODUCTION

Pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the most important horticultural spices in Mexico. Around 150 000 ha are grown, producing

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2018. Aprobado: septiembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 195-208. 2019.

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las especias hortícolas más importante en México. Alrededor de 150 000 ha se cultivan y producen más de 2×10^6 t anuales de chile seco y verde. Las variedades más cultivadas son el jalapeño, serrano, poblano, pimiento morrón y habanero (Aguirre y Muñoz, 2015). En la gastronomía mexicana sus frutos frescos o secos proporcionan color, sabor y aroma. En México se distribuye gran diversidad de chiles (Aguilar, 2012), incluido el chile chiltepin (*C. annuum* L. var. *glabriusculum*). En el estado de Sonora, el chiltepin prospera sólo en forma silvestre en las regiones Sur, Centro y Zona Serrana Oriental. Prospera en orillas de arroyos y cañadas del matorral desértico, matorral espinoso, selva baja caducifolia y encinares (Coronado *et al.*, 2013).

El chiltepin es un recurso fitogenético silvestre cuyos frutos se recolectan de mayo a agosto. Su cultivo como hortaliza es difícil porque no está definido su manejo agronómico. En 2006 se recolectaron más de 100 t de chile chiltepin (Robles y Garza, 2015); sin embargo, la recolección de frutos es una práctica de aprovechamiento irracional porque causa una reducción irreversible de las poblaciones naturales y condena a la especie a su desaparición (Coronado *et al.*, 2013). También la deforestación matarrasa del matorral, para uso agrícola y pecuario, elimina poblaciones naturales (Araiza *et al.*, 2011). Aunado a estos factores, las semillas presentan problemas de germinación en su ambiente natural y su diseminación depende de las aves (Bañuelos *et al.*, 2008).

El bajo porcentaje de germinación (20%) del chiltepin se atribuye a la latencia de la semilla; sin embargo, no hay una limitante que impida la absorción de agua (Cano *et al.*, 2015). En algunas variedades de chile se han reportado tratamientos de acondicionamiento por inmersión con nitrato de potasio (KNO_3) (Prado *et al.*, 2015), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Sandoval *et al.*, 2018) o ácido giberélico (GA_3) (García *et al.*, 2010; Araiza *et al.*, 2011) para romper la latencia e incrementar la cantidad de plantas.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ofrece técnicas biotecnológicas para solucionar problemas de reproducción natural de ciertas especies. En el género *Capsicum* se han establecido protocolos de propagación *in vitro* para diferentes especies y variedades. La organogénesis se ha inducido con segmentos noda-

more than 2×10^6 t of dried and green pepper per year. The most cultivated varieties are jalapeño, serrano, poblano, bell pepper, and habanero (Aguirre and Muñoz, 2015). In Mexican cuisine, its fresh or dried fruit provide color, flavor, and aroma. In Mexico exists a wide variety of peppers (Aguilar, 2012), including chiltepin pepper (*C. annuum* L. var. *glabriusculum*). In the state of Sonora, chiltepin grows only wild in the Southern, Central, and the Sierra Oriental regions. It usually thrives on the banks of streams and ravines of the desertic shrubland, spiny shrubland, deciduous lowland forest, and holm oak forests (Coronado *et al.*, 2013).

Chiltepin is a wild phylogenetic resource; the harvest of its fruits occurs from May to August. It is challenging to cultivate chiltepin as a vegetable because its agronomic management is not defined. In 2006, more than 100 t of chiltepin pepper were harvested (Robles and Garza, 2015); however, fruit harvesting is an irrational exploitation practice because it irreversibly reduces natural populations and condemns the species to its disappearance (Coronado *et al.*, 2013). Also, the shrubland clearcut, for agricultural and livestock use, depletes natural populations (Araiza *et al.*, 2011). In addition, seeds have germination problems in their natural environment, and their dissemination depends on birds (Bañuelos *et al.*, 2008).

The low germination percentage (20%) of chiltepin is attributed to seed latency; however, no limitation prevents water absorption (Cano *et al.*, 2015). In some pepper varieties, immersion conditioning treatments were reported with potassium nitrate (KNO_3) (Prado *et al.*, 2015), hydrogen peroxide (H_2O_2) (Sandoval *et al.*, 2018), or gibberellic acid (GA_3) (García *et al.*, 2010; Araiza *et al.*, 2011), to interrupt the latency and increase the number of plants.

In vitro plant tissue cultures offer biotechnological techniques that solve natural reproduction problems of individual species. *In vitro* propagation protocols are established for different species and varieties of the genus *Capsicum*. Organogenesis was induced with nodal segments (Kehie *et al.*, 2012), and somatic embryogenesis from leaves and cotyledons of *in vitro* germinated seedlings (Venkataiah *et al.*, 2016). This study aimed to determine the optimal conditions of plant growth regulators in the MS culture medium for the *in vitro* germination and

les (Kehie *et al.*, 2012) y la embriogénesis somática a partir de hojas y cotiledones de plántulas germinadas *in vitro* (Venkataiah *et al.*, 2016). El objetivo de este estudio fue determinar las condiciones óptimas de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo MS para la germinación *in vitro* y la regeneración de plantas de chile chiltepín por organogénesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y desinfección

Semillas sanas de tamaño uniforme se sumergieron en agua para separar por flotación las que tenían embrión de las vacías. Las semillas se colocaron en bolsitas de tela fina de 6×4 cm largo/ancho para desinfectarlas con hipoclorito de sodio comercial (NaOCl, Cloralex[®], 20 % v/v) y Tween[®] 20 (0.5% v/v) por 15 min en agitación continua. Después se les dio una inmersión en solución fungicida de benomilo (Benlate[®] 50%) y captan (CaptAgro[®] 50%) (4 g L⁻¹ c/u) por 10 min en agitación continua. Al término de cada paso desinfectante se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril.

Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962) se utilizó 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); y 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 potenciómetro (Thermo Scientific[®] modelo Orion 3 Star) antes de agregar el agar. Para las etapas de germinación, inducción, multiplicación y elongación de brotes se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 10 mL de medio de cultivo; para la etapa de enraizamiento fueron frascos de 110 mL con 30 mL de medio. La esterilización se hizo en autoclave vertical (AESA[®] 300) a 120 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min. Todos los cultivos se incubaron en un cuarto de incubación con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad proporcionado por lámparas de luz blanca LED (Ligh-Emitting Diode) con emisión de 45 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa, temperatura de 26±2 °C y humedad relativa de 30%.

Germinación *in vitro*

Efecto de inmersión en ácido giberélico (AG₃)

La respuesta de germinación *in vitro* de semillas se evaluó al tiempo de inmersión y a la concentración de AG₃. Grupos de 20

the regeneration of chiltepin pepper plants by organogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and disinfection

Healthy seeds of uniform size were submerged in water to separate by flotation the empty ones from the ones with embryos. Seeds were placed in thin cloth bags of 6×4 cm length/width for disinfection with commercial sodium hypochlorite (NaOCl, Cloralex[®], 20% v/v) and Tween[®] 20 (0.5% v/v) during 15 min in continuous agitation. Seeds were then immersed in a fungicide solution of benomyl (Benlate[®] 50%) and captan (CaptAgro[®] 50%) (4 g L⁻¹ each) for 10 min in continuous agitation. At the end of each disinfection step, seeds were rinsed five times with sterile distilled water.

Culture medium and incubation conditions

Basal MS medium (Murashige y Skoog, 1962) was used with sucrose (30 g L⁻¹), myoinositol (100 mg L⁻¹), nicotinic acid (0.5 mg L⁻¹), pyridoxine (0.5 mg L⁻¹), glycine (0.5 mg L⁻¹), and thiamine (0.1 mg L⁻¹); solidified with agar-agar (Merck[®], 8.5 g L⁻¹). We adjusted the pH of the medium to 5.7 with 1N NaOH or HCl using a potentiometer (Thermo Scientific[®], Orion 3 Star model) before adding the agar. For the germination, induction, multiplication, and shoot lengthening stages, we used glass flasks of 45 mL capacity with 10 mL of culture medium; for the rooting stage we used 110 mL capacity flasks with 30 mL of medium. We sterilized in a vertical autoclave (AESA[®] 300) at 120 °C and 1.5 kg cm⁻² of pressure for 20 min. All cultures were incubated in an incubation room with a 16/8 h light/dark photoperiod provided by white LED (Ligh-Emitting Diode) light lamps with emission of 45 μmol m⁻² s⁻¹ of luminous intensity, temperature of 26±2 °C, and relative humidity of 30%.

In vitro germination

Effect of immersion in gibberellic acid (GA₃)

The *in vitro* germination response of seeds was evaluated at the time of immersion and the concentration of GA₃. We placed groups of 20 disinfected seeds in cloth bags and submerged them in 0, 2.8, and 5.7 μM GA₃ during 30 and 60 min. We placed four seeds per flask containing MS medium with 50% concentration of inorganic salts without plant growth regulators. Daily, during 30 d, we quantified the number of germinated seeds in order to calculate the percentage (%).

semillas desinfectadas se colocaron en bolsitas de tela y se sumergieron en 0, 2.8 y 5.7 μM de AG_3 durante 30 y 60 min. Cuatro semillas por frasco se establecieron en medio MS con 50% de la concentración de sales inorgánicas sin reguladores de crecimiento. Cada día, durante 30 d se cuantificó el número de semillas germinadas para obtener el porcentaje (%).

Efecto del AG_3 en inmersión y en el medio de cultivo

Semillas desinfectadas y sumergidas en 5.7 μM de AG_3 por 30 min se sembraron en medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con 0, 2.8 y 5.7 μM de AG_3 . Cada tercer día, durante un mes, se cuantificó el número de semillas germinadas para obtener el porcentaje de germinación (%).

Inducción y multiplicación de brotes

Tipo de explante y concentración de 6-bencilaminopurina (BAP)

Para inducir la organogénesis se evaluaron ápices de brote y segmentos nodales de 1 cm de longitud con yemas axilares disecados de plántulas germinadas *in vitro* de seis semanas de edad y 6 cm de altura. Ambos explantes se cultivaron en medio MS con BAP (13.3, 26.6, 39.9 y 53.2 μM). A las cuatro semanas se cuantificó el porcentaje de brotación (número de explantes que generaron brotes) y el número de brotes por explante.

Efecto del BAP y ácido indolacético (AIA)

Segmentos nodales de 1 cm de longitud con dos yemas laterales, disecados de plántulas germinadas *in vitro* de seis semanas de edad y 7 cm de altura, se cultivaron en medio MS con 11.1 μM de BAP y cinco concentraciones de AIA (0, 0.5, 1.4, 2.8 y 4.2 μM). A las cuatro semanas se cuantificó la brotación (%), número de brotes por explante y la longitud de brotes (mm). Para la fase de multiplicación se cultivaron explantes con cinco brotes con 0.5 cm de longitud, procedentes de la etapa de inducción, en la mejor combinación de BAP y AIA resultante de la fase de inducción.

Alargamiento de brotes

Grupos de nueve brotes de 0.5 cm de longitud obtenidos en la etapa de multiplicación se cultivaron en medio MS con AG_3 a diferentes concentraciones (2.8, 5.7, 8.6 y 11.5 μM) con un subcultivo en los mismos tratamientos a las tres semanas. Después de seis semanas se midió la longitud de los brotes (cm).

Effect of GA_3 in immersion and culture medium

Seeds, disinfected and submerged in 5.7 μM GA_3 for 30 min, were established in MS medium with 50% concentration of salts, added with 0, 2.8, and 5.7 μM GA_3 . Every third day, for one month, we quantified the number of germinated seeds in order to obtain the germination percentage (%).

Induction and multiplication of shoots

Explant type and concentration of 6-benzylaminopurine (BAP)

To induce organogenesis, we evaluated the shoot apices and nodal segments of 1 cm of length with axillary buds dissected from *in vitro* germinated seedlings of six weeks of age and 6 cm of height. Both explants were cultivated in MS medium with BAP (13.3, 26.6, 39.9, and 53.2 μM). At four weeks, we quantified the shooting percentage (number of explants that generated shoots) and the number of shoots per explant.

Effect of BAP and indoleacetic acid (IAA)

Nodal segments of 1 cm of length with two lateral buds, dissected from *in vitro* germinated seedlings of six weeks of age and 7 cm of height, were cultivated in MS medium with 11.1 μM BAP and five concentrations of IAA (0, 0.5, 1.4, 2.8, and 4.2 μM). At four weeks, we calculated the shooting percentage (%), number of shoots per explant, and shoot length (mm). For the multiplication stage, we cultivated explants with five shoots of 0.5 cm of length, obtained from the induction stage, in the best resulting combination of BAP and from the induction stage.

Shoot lengthening

We cultivated groups of nine shoots of 0.5 cm of length, obtained during the multiplication stage, in MS medium with different concentrations of GA_3 (2.8, 5.7, 8.6, and 11.5 μM) with a subculture in the same treatments at three weeks. After six weeks, we measured the length of the shoots (cm).

In vitro rooting

Shoots of 3 cm of length (one shoot per flask) were cultivated in MS medium with indolebutyric acid (IBA; 5.0, 7.5, 10.0, and 12.5 μM), we included a control group without plant growth regulators, giving a total of five treatments. At four weeks, we quantified the rooting percentage (number of shoots that

Enraizamiento *in vitro*

Brotos de 3 cm de longitud (un brote por frasco) se cultivaron en medio MS con ácido indolbutírico (AIB; 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 μM) y un testigo sin reguladores de crecimiento, dando un total de cinco tratamientos. A las cuatro semanas se cuantificó el porcentaje de enraizamiento (número de brotes que generaron raíz), número de raíces, se midió la longitud de raíces (cm) y se verificó la presencia de pelos radicales.

Análisis estadístico

Los experimentos se establecieron en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento en germinación y diez repeticiones por tratamiento en inducción y multiplicación de brotes, elongación y enraizamiento. Con los datos de cada variable se realizó un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación *in vitro*

Tratamientos de inmersión en AG_3

Las concentraciones de AG_3 , tiempos de inmersión y la interacción de ambos factores afectaron la germinación ($p \leq 0.05$). El mayor porcentaje (85%) se obtuvo en semillas sumergidas en 2.8 y 5.7 mM de AG_3 por 30 min (Cuadro 1). La germinación inició a los 12 d en semillas sumergidas en 5.7 mM AG_3 en

developed roots) and the number of roots, we also measured the length of roots (cm) and verified the presence of root hairs.

Statistical analysis

The design of the experiments was completely randomized with five repetitions per treatment during germination and ten repetitions per treatment during shoot induction and multiplication, lengthening and rooting. With data of each variable, we performed an analysis of variance with the statistical program SAS (SAS Institute, 2003), and for the comparison of means we used the Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro germination

Immersion treatments in GA_3

The concentration of GA_3 , the time of immersion, and the interaction between both factors affected the germination ($p \leq 0.05$). The highest percentage (85%) was obtained in seeds submerged in 2.8 and 5.7 mM GA_3 for 30 min (Table 1). Germination started after 12 d in the seeds that were immersed in 5.7 mM GA_3 compared to the treatment without GA_3 in which occurred after 21 d. GA_3 concentration was the factor that showed a greater effect on germination.

The endogenous and exogenous conditions conducive to germination allow the embryo to overcome the resting phase and start the growth that will form a new individual (Seguí, 2010). Usually, under natural conditions, chiltepin germination is

Cuadro 1. Respuesta a la inmersión en AG_3 y tiempos de inmersión en la germinación *in vitro* de Chile chiltepin después de 30 d de cultivo.

Table 1. Response to the immersion in GA_3 and times of immersion in the *in vitro* germination of chiltepin pepper after 30 d of culture.

AG_3 (μM)	Tiempo (min)	Germinación (%)
0	30	50.0 c
0	60	55.0 bc
2.8	30	85.0 a
2.8	60	55.0 bc
5.7	30	85.0 a
5.7	60	75.0 ab
	DMS	24.4

Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). AG_3 : ácido giberélico; DMS: diferencia mínima significativa. ❖ Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$). GA_3 : gibberellic acid; DMS: minimum significant difference.

comparación con el tratamiento sin AG_3 que ocurrió después de 21 d. La concentración de AG_3 fue el factor que mostró mayor efecto sobre la germinación.

Las condiciones endógenas y exógenas propicias para la germinación permiten al embrión superar la fase de reposo e iniciar el crecimiento que formará un nuevo individuo (Seguí, 2010). La germinación del chiltepín en condiciones naturales normalmente es baja; las investigaciones se han enfocado en promoverla o estimularla en condiciones *in vivo* y no existen reportes sobre la germinación *in vitro* de esta especie.

La respuesta promovida por el AG_3 se debe a la acción de las giberelinas en la movilización de reservas necesarias en la germinación; inducen la síntesis de amilasas y glucanasas que hidrolizan el almidón en azúcares simples requeridos para el crecimiento del embrión (Seguí, 2010). En chiltepín se han evaluado tratamientos de inmersión en AG_3 para estimular la germinación *in vivo*. García *et al.* (2010) reportaron 82% de germinación en semillas sumergidas en $1445 \mu\text{M}$ de AG_3 en comparación con 33% sin AG_3 . En otro estudio, Mireles *et al.* (2015) reportaron 75% de germinación en semillas sumergidas en $14\ 450 \mu\text{M}$ de AG_3 . En contraste, con esta misma concentración de AG_3 , Cano *et al.* (2015) obtuvieron 90% de germinación solo en una de 16 recolecciones de chile piquín, y se determinó que el genotipo influyó en la respuesta. Las concentraciones empleadas en este estudio fueron bajas comparadas con los estudios de Cano *et al.* (2015) y Mireles *et al.* (2015) porque 85% de la germinación se obtuvo con 2.89 y $5.78 \mu\text{M}$ de AG_3 que equivalieron al 0.02 y 0.04% de la dosis óptima reportada por esos autores. En ambas concentraciones de AG_3 la mayor germinación se presentó con 30 min de inmersión y esta respuesta puede relacionarse con la viabilidad de las semillas. Saldívar *et al.* (2010) observaron que en *Jaltomata procumbens* la inmersión en AG_3 por 12 y 24 h no tuvo efecto significativo en la germinación en comparación con las concentraciones de AG_3 aquí usadas.

Efecto del AG_3 en inmersión y en el medio de cultivo

El AG_3 adicionado al medio de cultivo afectó la germinación ($p \leq 0.05$). Los mayores porcentajes (90%) se obtuvieron en semillas sumergidas por 30 min en $5.7 \mu\text{M}$ de AG_3 y establecidas en el medio de cultivo con esta misma concentración. En contraste,

low; research has focused on promoting or stimulating germination under *in vivo* conditions, but there are no reports of *in vitro* germination in this species.

GA_3 promotes this response because it mobilizes the reserves necessary for germination; gibberellins induce the synthesis of amylases and glucanases, which hydrolyze starch into simple sugars that are necessary for the embryo growth (Seguí, 2010). In chiltepín, immersion treatments in GA_3 stimulate *in vivo* germination. García *et al.* (2010) reported a germination percentage of 82% in seeds immersed in $1445 \mu\text{M}$ GA_3 compared with 33% without GA_3 . In another study, Mireles *et al.* (2015) reported 75% of germination in seeds submerged in $14\ 450 \mu\text{M}$ of GA_3 . In contrast, with this same concentration of GA_3 , Cano *et al.* (2015) obtained 90% of germination in only one of 16 collections of piquín hot pepper and they determined that the genotype influenced the response. The concentrations used in this study were low compared to the studies of Cano *et al.* (2015) and Mireles *et al.* (2015), since we obtained 85% of germination with 2.89 and $5.78 \mu\text{M}$ GA_3 , equivalent to 0.02 and 0.04% of the optimal dose reported by these authors. In both concentrations of GA_3 , we observed the highest germination percentage with 30 min of immersion and this response can be related to the viability of the seeds. Saldívar *et al.* (2010) observed that in *Jaltomata procumbens*, the immersion in GA_3 during 12 and 24 h had no significant effect on the germination compared to the concentrations of GA_3 used in this study.

Effect of GA_3 on the immersion and the culture medium

GA_3 added to the culture medium significantly affected the germination ($p \leq 0.05$). The highest percentages (90%) were obtained in the seeds submerged for 30 min in $5.7 \mu\text{M}$ GA_3 and established in the culture medium with this same concentration. In contrast, the response without GA_3 was 60% (Table 2). Germination started 12 d after incubating in the medium with $5.7 \mu\text{M}$ GA_3 (Figure 1A) with a 30 min immersion, as compared to the seeds without GA_3 that started at day 15.

GA_3 is the most used gibberellin for *in vitro* propagation. It promotes the lengthening of the internodes and induces the latency disruption of

la respuesta sin AG₃ fue 60% (Cuadro 2). La germinación inició el día 12 después de la siembra en el medio con 5.7 μM de AG₃ (Figura 1A) con 30 min de inmersión, en comparación con las semillas sin AG₃ que inició el día 15.

La giberelina AG₃ es la más utilizada en la propagación *in vitro*. Promueve el alargamiento de entrenudos e induce la ruptura de latencia de semillas (Sharry *et al.*, 2015). Su uso es común en tratamientos pre-germinativos en condiciones *in vivo* e *in vitro*. En *Centaurea zeybekii* la germinación *in vitro* aumentó con tratamientos de inmersión en 2.8 μM de AG₃ (Kurt y Erdag, 2009), lo cual es similar a los resultados de este estudio. Además, en esta investigación se demostró que el AG₃ también favoreció la ruptura de latencia cuando se adiciona al medio de cultivo. En *Givotia rottleriformis* Griff Samuel *et al.* (2009) obtuvieron 79% de germinación en medio MS con 50% de concentración de sales y 28.9 μM de AG₃. En el presente estudio se determinó que el AG₃ en el medio de cultivo promueve la germinación *in vitro* de chiltepin y en la literatura no se encontró un estudio similar.

Inducción y multiplicación de brotes

Tipo de explante y concentraciones de BAP

El tipo de explante, las concentraciones de BAP y la interacción de ambos factores sólo afectaron el número de brotes por explante ($p \leq 0.05$), pero no hubo efecto de los tratamientos en la brotación. Tanto en los ápices de brote como en los segmentos nodales la

seeds (Sharry *et al.*, 2015). Its use is common in pre-germinative treatments under *in vivo* and *in vitro* conditions. In *Centaurea zeybekii*, Kurt and Erdag (2009) increased *in vitro* germination with immersion treatments in 2.8 μM GA₃, similar to the results in this study. In this research, we showed that GA₃ also favored latency disruption when added to the culture medium. In *Givotia rottleriformis*, Griff Samuel *et al.* (2009) obtained 79% of germination in MS medium with 50% concentration of salts and 28.9 μM GA₃. In this study, we determined that GA₃ added to the culture medium promotes *in vitro* germination of chiltepin, and we found no similar study on the literature.

Shoot induction and multiplication

Explant type and concentrations of BAP

The explant type, the concentrations of BAP, and the interaction between both factors only affected the number of shoots per explant ($p \leq 0.05$); treatments showed no influence on shooting. In both, shoot apices and nodal segments, shooting percentage was 100% in the four concentrations of BAP evaluated. However, the highest number of shoots per explant (4.4 shoots) was induced in nodal segments, with 13.3 μM BAP (Table 3).

The successful establishment of *in vitro* cultures depends on the selection of the appropriate explant. The apical and axillary meristems are ideal for *in vitro* morphogenesis (Mroginsky *et al.*, 2010), although its use depends on the species under study. In different

Cuadro 2. Germinación *in vitro* de semillas de chile chiltepin con AG₃ en inmersión y adicionado al medio de cultivo MS después de 30 d de cultivo.

Table 2. *In vitro* germination of chiltepin pepper seeds with GA₃ during immersion and added to the MS culture medium after 30 d of culture.

Inmersión en 5.7 μM de AG ₃ (min)	AG ₃ adicionado al medio de cultivo (μM)	Germinación (%)
30	0	60.0 bc
60	0	35.0 c
30	2.8	65.0 ab
60	2.8	60.0 bc
30	5.7	90.0 a
60	5.7	90.0 a
	DMS	26.7

Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). AG₃: ácido giberélico; DMS: diferencia mínima significativa. ✦ Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$). GA₃: gibberellic acid; DMS: minimum significant difference.

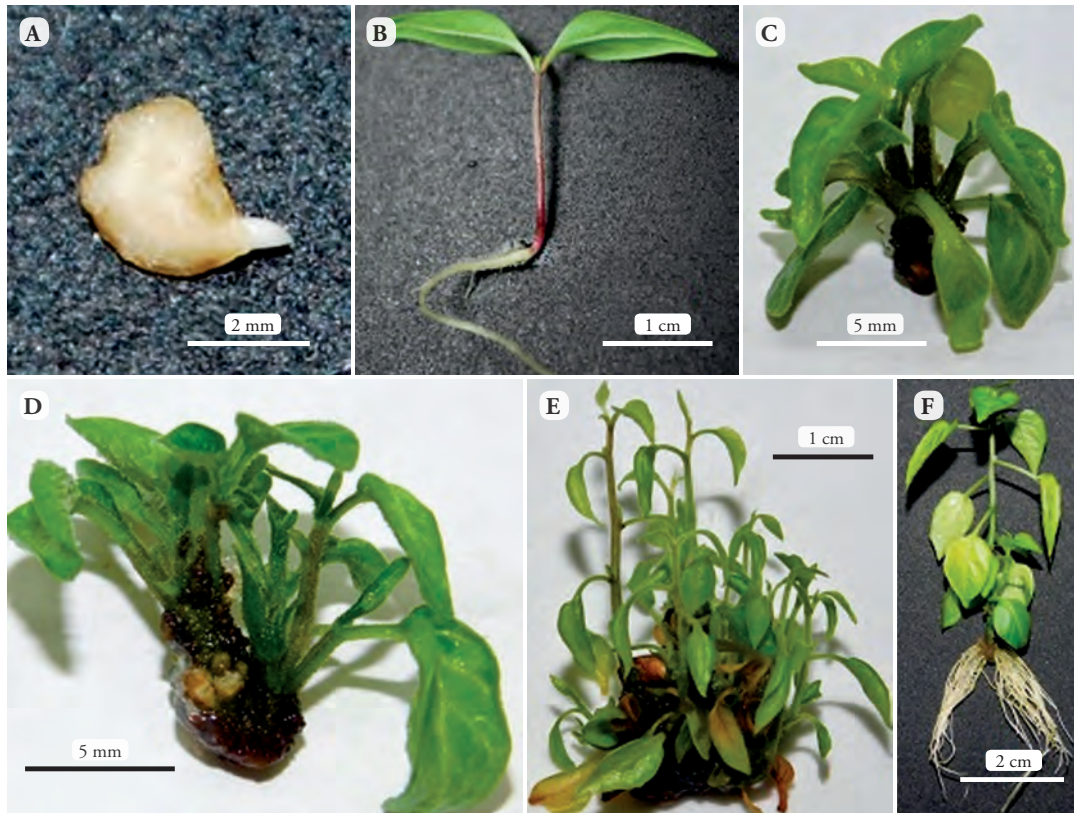


Figura 1. Germinación *in vitro* de chiltepin y regeneración de plantas por organogénesis. A) Germinación a los 12 d en medio MS con 50% de concentración de sales y $5.7 \mu\text{M}$ de GA_3 . B) Plántula de dos semanas de edad cultivada con $5.7 \mu\text{M}$ de GA_3 . C) Inducción de brotes en segmentos nodales con $11.1 \mu\text{M}$ de BAP y $2.8 \mu\text{M}$ de AIA. D) Multiplicación de brotes con $11.1 \mu\text{M}$ de BAP y $2.8 \mu\text{M}$ de AIA. E) Alargamiento de brotes cultivados con $11.5 \mu\text{M}$ de GA_3 por seis semanas. F) Planta enraizada con $12.5 \mu\text{M}$ de AIB después de cuatro semanas.

Figure 1. *In vitro* seed germination of chiltepin pepper and regeneration of plants by organogenesis. A) Germination at 12 d in MS medium with 50% concentration of salts and $5.7 \mu\text{M}$ of GA_3 . B) Seedling of two weeks of age cultivated with $5.7 \mu\text{M}$ of GA_3 . C) Shoots induction in nodal segments with $11.1 \mu\text{M}$ of BAP and $2.8 \mu\text{M}$ of IAA. D) Shoots multiplication with $11.1 \mu\text{M}$ of BAP and $2.8 \mu\text{M}$ of IAA. E) Lengthening of shoots cultivated with $11.5 \mu\text{M}$ of GA_3 for six weeks. F) Rooted plant with $12.5 \mu\text{M}$ of IBA after four weeks.

brotación fue 100% en las cuatro concentraciones de BAP evaluadas. Sin embargo, el mayor número de brotes por explante (4.4 brotes) se indujo en segmentos nodales con $13.3 \mu\text{M}$ de BAP (Cuadro 3).

El establecimiento exitoso de los cultivos *in vitro* depende de la elección del explante apropiado. Los meristemos apicales y axilares son los ideales en la morfogénesis *in vitro* (Mroginsky *et al.*, 2010), aunque su empleo depende de la especie en estudio. En diferentes especies de *Capsicum* la organogénesis se ha establecido a partir de varios explantes cultivados con diferentes reguladores de crecimiento. Valadez *et al.* (2009) obtuvieron 8.3 brotes desde hipocotilos en medio MS con $17.8 \mu\text{M}$ de BAP y $1.7 \mu\text{M}$ AIA. El

Capsicum species, organogenesis was established from several explants cultivated with diverse plant growth regulators. Valadez *et al.* (2009) obtained 8.3 shoots from hypocotyls in MS medium with $17.8 \mu\text{M}$ BAP and $1.7 \mu\text{M}$ IAA. The culture of *Capsicum* spp. nodal segments in MS medium, with $1.7 \mu\text{M}$ thidiazuron (TDZ), produced 13.0 shoots per explant (Kehie *et al.*, 2012).

The *in vitro* morphogenic responses are determined, in a great measure, by the plant growth regulators added to the culture medium, cytokinins and auxins specifically. Cytokinins stimulate cell division and differentiation, and auxins stimulate cellular lengthening (Mroginsky *et al.*, 2010). In

Cuadro 3. Respuesta del tipo de explante y BAP en la inducción de brotes *in vitro* de chile chiltepín después de 28 d de cultivo.

Table 3. Response of the explant type and BAP in the *in vitro* shoot induction of chiltepín pepper after 28 d of culture.

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

Medias con diferentes letras en cada columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). BAP: 6-bencilaminopurina y DMS: diferencia mínima significativa. ❖ Means with different letters in each column are statistically different ($p \leq 0.05$). BAP: 6-benzylaminopurine and DMS: minimum significant difference.

cultivo de segmentos nodales de *Capsicum* spp. en medio MS con $1.7 \mu\text{M}$ de thidiazuron (TDZ) produjo 13.0 brotes por explante (Kehie *et al.*, 2012).

Las respuestas morfológicas *in vitro* las determinan, en gran medida, los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo, específicamente citocininas y auxinas. Las citocininas estimulan la división y diferenciación celular y las auxinas el alargamiento celular (Mroginsky *et al.*, 2010). En el presente estudio se observó que la cantidad de brotes por explante fue menor conforme aumentó la concentración de BAP. Dicha respuesta pudo ser producto del efecto combinado del genotipo, el tipo de explante y el regulador de crecimiento. Otroshy *et al.* (2011) obtuvieron el mayor número de brotes en hipocotilos de *Capsicum annuum* L. en medio MS con $26.6 \mu\text{M}$ de BAP, misma concentración en la cual se logró el mayor número de brotes en este estudio.

Efecto del $11.1 \mu\text{M}$ de BAP y concentraciones de AIA en segmentos nodales con yemas axilares

Los segmentos nodales cultivados con $11.1 \mu\text{M}$ de BAP en la inducción de brotes se definieron como el explante ideal y la mejor dosis de citocinina. La concentración de AIA afectó ($p \leq 0.05$) el número de brotes por explante y la longitud de brotes; sin embargo, no tuvo efecto en la brotación. El mayor

en este estudio, we observed that the number of shoots per explant was lower as the concentration of BAP increased. This response could be the product of the combined effect of the genotype, the explant type, and the plant growth regulator. Otroshy *et al.* (2011) obtained the highest number of shoots in *Capsicum annuum* L. hypocotyls in MS medium with $26.6 \mu\text{M}$ BAP, the same concentration in which we obtained the highest number of shoots in this study.

Effect of 11.1 mM BAP and concentrations of IAA on nodal segments with axillary buds

Nodal segments cultivated with $11.1 \mu\text{M}$ BAP during shoot induction were defined as the ideal explant and the best cytokinin dose. The concentration of IAA affected ($p \leq 0.05$) the number of shoots per explant and the length of the shoots; however, it did not change shooting. We observed the highest number of shoots per explant (6.6) and shoot length (8.1 mm) with $2.8 \mu\text{M}$ IAA and $11.1 \mu\text{M}$ BAP (Figure 1C) (Table 4).

The number of shoots per explant was directly proportional to the concentration of IAA evaluated and stabilized with 2.8 and $4.2 \mu\text{M}$. The number of shoots observed was similar to other studies, where the combination of $2.8 \mu\text{M}$ IAA with doses of BAP promoted a better response. In *Capsicum chinense*

número de brotes por explante (6.6) y longitud de brote (8.1 mm) se obtuvo con 2.8 μM de AIA y 11.1 μM de BAP (Figura 1C) (Cuadro 4).

El número de brotes por explante fue directamente proporcional con la concentración de AIA evaluada, y se estabilizó con 2.8 y 4.2 μM . La cantidad de brotes obtenida coincide con otros estudios, donde la combinación de 2.8 μM de AIA con dosis de BAP promovieron la mejor respuesta. En hipocotilos de *Capsicum chinense* Jacq (Naga chilli) se obtuvieron 5.4 brotes por explante en medio MS con 22.2 μM de BAP y 2.8 μM de AIA (Raj *et al.*, 2015). Esta respuesta fue similar a la obtenida en la presente investigación, pero con concentraciones de BAP y AIA 50% menor. En otras especies como tomate de árbol [*Solanum betaceum* (cav.) Sendt.] se obtuvieron 11.6 brotes a partir de hipocotilos cultivados en medio MS con 13.3 μM de BAP y 2.8 μM (Criollo *et al.*, 2016), lo cual supera la cantidad de brotes obtenida en este estudio.

En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* no se pueden usar protocolos generalizados para cualquier especie o grupo de plantas. La respuesta morfogénica está determinada por la especie o variedad y las condiciones de medio de cultivo. Las variedades silvestres no responden igual a las líneas comerciales ya que cada línea o recolecta puede mostrar afinidad por algún regulador del crecimiento en particular (Namitha y Negi, 2013).

Para la etapa de multiplicación los brotes se transfirieron a un medio de cultivo fresco con las mismas concentraciones de BAP y AIA. De forma consistente, las combinaciones de 2.8 μM de AIA y 11.1 μM

Jacq (Naga chilli) hypocotyls, 5.4 shoots per explant were obtained in MS medium with 22.2 μM BAP and 2.8 μM IAA (Raj *et al.*, 2015). This response was like the one obtained in the present study, but with 50% lower concentrations of BAP and IAA. In other species, like tree tomato [*Solanum betaceum* (cav.) Sendt.], 11.6 shoots were obtained from hypocotyls cultivated in MS medium with 13.3 μM BAP and 2.8 μM IAA (Criollo *et al.*, 2016), and this number exceeds the number of shoots obtained in the present study.

For *in vitro* plant tissue culture, generalized protocols cannot be used for any species or group of plants. The species or variety, as well as the culture medium conditions, determine the morphogenic response. The response of wild varieties is different from the response of commercial lines, as each line or harvest can show an affinity for a specific plant growth regulator (Namitha and Negi, 2013).

For the multiplication stage, shoots were transferred to fresh culture medium with the same concentrations of BAP and IAA. Consistently, combinations of 2.8 μM IAA and 11.1 μM BAP generated the best response with 9.9 shoots per explant after three weeks of culture (Figure 1D). The number of shoots increased as the concentration of IAA increased, but stabilized with 4.2 μM .

In *C. annuum* cv. Mareko Fana, shoots obtained during the induction stage were cultivated in MS medium with 13.3 μM BAP and 9.2 μM KIN, and produced 9.2 shoots per explant (Hailu *et al.*, 2015). This response is similar to the number of

Cuadro 4. Inducción de brotes *in vitro* en segmentos nodales de chile chiltepin con AIA y 11.1 μM de BAP después de 28 d de cultivo.

Table 4. *In vitro* shoot induction in nodal segments of chiltepin pepper with IAA and 11.1 μM BAP after 28 d of culture.

AIA (μM)	Brotación (%)	Brotos por explante (Núm.)	Longitud de brote (mm)
0	100 a	5 bc	5 bc
0.5	100 a	4.4 c	4.8 c
1.4	100 a	5.4 b	6.6 ab
2.8	100 a	6.6 a	8.1a
4.2	100 a	6.5 a	6.9 a
DMS	0	0.61	1.62

Medias con diferentes letras en cada columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$), BAP: 6-bencilaminopurina, AIA: ácido indolacético; DMS: diferencia mínima significativa.

❖ Means with different letters in each column are statistically different ($p \leq 0.05$). BAP: 6-benzylaminopurine; IAA: indoleacetic acid; DMS: minimum significant difference.

de BAP produjeron la mejor respuesta con 9.9 brotes por explante después de tres semanas de cultivo (Figura 1D). La cantidad de brotes aumentaron conforme se incrementó la concentración de AIA, pero se estabilizó con 4.2 μM .

En *C. annuum* cv. Mareko Fana, los brotes obtenidos en la etapa de inducción se cultivaron en medio MS con 13.3 μM de BAP y 9.2 μM de KIN y produjeron 9.2 brotes por explante (Hailu *et al.*, 2015). Esta respuesta es similar con la cantidad de brotes obtenida en el presente estudio en medio MS con 11.1 μM de BAP y 4.2 μM de AIA. En *C. chinense* Jacq. cv. Naga chilli se logró mayor cantidad de brotes (8.3) en la etapa de multiplicación, pero con 35.5 μM de BAP (Kehie *et al.*, 2012). En *Solanum caripense* Dunal la multiplicación se obtuvo con segmentos de tallo cultivados en medio MS con 2.2 μM de BAP y 2.8 μM de AIA (Morales y Vaca, 2016).

Elongación de brotes

Las concentraciones de AG_3 afectaron la longitud de los brotes ($p \leq 0.05$). La mayor longitud (36 mm) se obtuvo en brotes con 11.5 μM de AG_3 después de seis semanas de cultivo (Cuadro 5; Figura 1E). El presente estudio demostró la efectividad del AG_3 en la germinación *in vitro* de chile chiltepín y también está documentado que promueve el alargamiento de brotes y raíces, solo o combinado con otros reguladores de crecimiento. En *C. annuum* cv. Dalle Khursani 5.7 μM de AG_3 y 2.8 μM de AIA favorecieron brotes

shoots observed in the present study in MS medium with 11.1 μM BAP and 4.2 μM IAA. A study with *C. chinense* Jacq. cv. Naga chilli, reported a higher number of shoots (8.3) during the multiplication stage, but with 35.5 μM BAP (Kehie *et al.*, 2012). In *Solanum caripense* Dunal, multiplication was accomplished with stem segments cultivated in MS medium with 2.2 μM BAP and 2.8 μM IAA (Morales and Vaca, 2016).

Shoot lengthening

GA_3 concentrations affected the shoot length ($p \leq 0.05$). The highest length (36 mm) was obtained in the shoots cultivated with 11.5 μM GA_3 after six weeks (Table 5; Figure 1E). This study proved the effectiveness of GA_3 in the *in vitro* germination of chiltepín pepper, and it is documented that it promotes the lengthening of shoots and roots, alone or combined with different plant growth regulators. In *C. annuum* cv. Dalle Khursani, 5.7 μM GA_3 and 2.8 μM IAA induced shoots of 3.1 cm (Bhutia *et al.*, 2018). In four different *Capsicum* varieties, shoot lengthening was accomplished in MS medium with 2.8 μM GA_3 (Valadez *et al.*, 2009). This response differs from the results obtained in the present study since that same concentration of GA_3 did not favor the shoot lengthening of chiltepín. This response may be closely related to the genotype, since within *C. annuum* show a wide genetic variability, even at the botanical variety level.

Cuadro 5. Alargamiento de brotes (mm) de chile chiltepín con AG_3 a las tres y seis semanas de cultivo.

Table 5. Shoot lengthening (mm) of chiltepín pepper with GA_3 at three and six weeks of culture.

AG_3 (μM)	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 son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). AG_3 : ácido giberélico; DMS: diferencia mínima significativa. ❖ Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$). GA_3 : gibberellic acid; DMS: minimum significant difference.

de 3.1 cm (Bhutia *et al.*, 2018). En otras cuatro variedades de *Capsicum* se logró la elongación de los brotes en medio MS con 2.8 μM de AG₃ (Valadez *et al.*, 2009). Esta respuesta difiere de los resultados de este estudio, ya que esa misma concentración de AG₃ no favoreció el alargamiento de los brotes de chiltepín. Esta respuesta puede estar estrechamente relacionada con el genotipo, ya que dentro de la especie *C. annuum* existe amplia variabilidad genética, incluso a nivel de variedad botánica.

Enraizamiento

Las concentraciones de AIB afectaron el porcentaje de enraizamiento y número de raíces ($p \leq 0.05$), pero no la longitud de las mismas. En los brotes cultivados con 10.0 y 12.5 μM de AIB el enraizamiento fue de 80% (Cuadro 6) mientras que la mayor cantidad de raíces (39.2) se produjo con 12.5 μM de AIB (Figura 1F). A su vez, las raíces principales generaron raíces secundarias y en ambas se formaron pelos radicuales, principalmente en las de mayor tamaño.

Las auxinas estimulan la elongación celular y el enraizamiento en el cultivo de tejidos vegetales (Sharry *et al.*, 2015). El enraizamiento *in vitro* de plantas de *Capsicum* se ha establecido con diferentes auxinas y concentraciones. En *C. chinense* cv. Bhut jalakia se indujeron 16.6 raíces por planta con 7.5 μM de AIB (Gogoi *et al.*, 2014). Esta respuesta difiere de

Rooting

IBA concentrations affected the rooting percentage and the number of roots, but not their lengths ($p \leq 0.05$). In shoots cultivated with 10.0 and 12.5 μM of IBA, rooting was 80% (Table 6), while the highest number of roots (39.2) was obtained with 12.5 μM of IBA (Figure 1F). In turn, the main roots generated secondary roots, and both formed root hairs, mainly the bigger ones.

Auxins stimulate cellular lengthening and rooting in plant tissue culture (Sharry *et al.*, 2015). *In vitro* rooting of *Capsicum* plants is established with different auxins and concentrations. In *C. chinense* cv. Bhut jalakia, 16.6 roots per plant were induced with 7.5 mM IBA (Gogoi *et al.*, 2014). This response differs from the results obtained in this research, where we obtained the double of roots per chiltepin plant with the same concentration of IBA. The effectiveness of IAA was also reported for pepper rooting. In *C. chinense* Jacq. cv. Naga chilli, rooting was induced with 5.7 mM IAA (Kehie *et al.*, 2012) and in *C. frutescens* L. with 6.2 mM IAA (Orlinska and Nowaczyk, 2015). As in the other stages of organogenesis, rooting is a morphogenic response that depends on the genotype. In this study, we observed that chiltepin plants form adventitious roots with IBA.

Cuadro 6. Enraizamiento *in vitro* de brotes de chile chiltepín con AIB a las cuatro semanas de cultivo.

Table 6. *In vitro* rooting of chiltepin pepper shoots with IBA at four weeks of culture.

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 estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

[¶]Los datos se transformaron para su análisis estadístico ($\sqrt{y+0.5}$). AIB: ácido indolbutírico; DMS: diferencia mínima significativa. ❖ Means with different letters in each column are statistically different ($p \leq 0.05$). [¶]Data transformed for statistical analysis ($\sqrt{y+0.5}$). IBA: indolebutyric acid; DMS: minimum significant difference.

los resultados obtenidos en la presente investigación en la cual se obtuvo el doble de raíces por planta de chiltepín con la misma concentración de AIB. También se ha reportado la efectividad del AIA para el enraizamiento de Chile. En *C. chinense* Jacq. cv. Naga chilli se indujo con 5.7 μM de AIA (Kehie *et al.*, 2012) y en *C. frutescens* L. con 6.2 μM de AIA (Orlinska y Nowaczyk, 2015). Al igual que en las otras etapas de la organogénesis, el enraizamiento es una respuesta morfogénica dependiente del genotipo. En el presente estudio se observó que las plantas de chiltepín forman raíces adventicias con el AIB.

CONCLUSIONES

La germinación baja en Chile chiltepín se puede incrementar con la inmersión de semillas en ácido giberélico. La regeneración de plantas por organogénesis se logra a partir de plántulas germinadas *in vitro* y con reguladores de crecimiento. Este protocolo puede contribuir al desarrollo de estrategias de rescate, conservación y aprovechamiento comercial de esta variedad silvestre de Chile y superar los problemas de extracción irracional.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por las facilidades otorgadas para la investigación y al CONACYT por el apoyo económico otorgado en los estudios de Maestría.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, R., V. H. 2012. Cultivo de Chile en México. Rev. Fitotec. Mex. 35: 264-264.
- Aguirre, H., E., y V. Muñoz O. 2015. El Chile como alimento. Ciencia 66: 16-23.
- 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. Rev. Colomb. Biotecnol. 13: 170-175.
- Bañuelos, N., P. L. Salido, y A. Gardea. 2008. Etnobotánica del chiltepín: Pequeño gran señor en la cultura de los sonorenses. Estudios Soc. 16: 177-205.
- Bhunia, K. L., N. T. Meetei, and V. K. Khanna. 2018. *In vitro* direct regeneration of Dalle Khursani (*Capsicum annuum*) from salicylic acid treated explants. J. Pharmacog. Phytochem. 7: 1008-1012.
- 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*). Bot. Sci. 93: 175-184.

CONCLUSIONS

The low germination observed in Chile pepper can be increased by immersing its seeds in gibberellic acid. Plant regeneration by organogenesis is accomplished with *in vitro* germinated seedlings and with plant growth regulators. This protocol can contribute to the development of rescue, conservation, and commercial exploitation strategies of this wild variety of pepper and overcome irrational extraction problems.

—End of the English version—



- Coronado, G., M. A., A. Córdova, Y., M. García P., V. G. Santiago, H., y R. A. Vásquez, N. 2013. Estrategias de mercado para productos elaborados a base de chiltepín en la Sierra de Sonora. Rev. Mex. Agroneg. 17: 359-370.
- Criollo, E., H., K. Insuasti, y W. Delgado. 2016. Regeneración *in vitro* de plántulas de tomate de árbol [*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.]. Rev. Colomb. Ciencias Hortíc. 10: 252-261.
- 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. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 1: 203-216.
- 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.
- 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. Am. J. Plant Sci. 6: 1435-1443.
- 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.
- Kurt, S., and B. Erdag. 2009. *In vitro* germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*. Biologia 64: 97-101.
- 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 Agríc. Pec. 1: 99-106.
- Morales, S., J. M., y I. A. Vaca, S. 2016. Propagación *in vitro* de tzimbalo (*Solanum caripense* Dunal). Rev. Tecnol. ESPOL-RTE. 29: 89-104.
- 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.

- 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. *Turk. J. Biol.* 39: 60-68.
- Otroshy, M., K. Moradi, M. K. Nekouei, and P. C. Struik. 2011. Micropropagation of pepper (*Capsicum annuum* L.) through *in vitro* direct organogenesis. *Asian J. Biotechnol.* 3: 38-45.
- Prado, U. G., L. C. Lagunes, E., E. García, L., C. C. Bautista, M., W. Camacho, C., F. Mirafuentes, G., y V. H. Aguilar R. Modificar el orden 2015. Germinación de semillas de chiles silvestres en respuesta a tratamientos pre-germinativos. *Ecosist. Rec. Agropec.* 2: 139-149.
- Raj, R. P., V. D. Glint, and K. N. Babu. 2015. *In vitro* plant regeneration in *Capsicum chinense* Jacq. (Naga Chili). *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 3: 30-33.
- 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. *Rev. Mex. Agroneg.* 19: 1230-1240.
- 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.) J.L Gentry. *Agron. Mesoam.* 21: 327-331.
- Samuel, K., D. Debashish, B. Madhumita, G. Padmaja, S. Ram P., V. Bhaskara R., and P. S. Rao. 2009. *In vitro* germination and micropropagation of *Givotia rottleriformis* Griff. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 45: 466-473.
- Sandoval, R., A., A. Tapia, G., M. Cabrera, de la F., J. A. González, E., y A. Benavides, M. 2018. Edad, beneficio y ácido giberélico afectan la germinación de planta de chile piquín. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 20: 4199-4209.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT User's Guide. (Release 9.1). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Seguí, 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.
- 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.
- Venkataiah, P., P. Bhanuprakash, S. S. Kalyan, and K. Subhash. 2016. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *J. Genetic Eng. Biotechnol.* 14: 55-60.