



## ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

### *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF *CAPSICUM BACCATUM* VAR. *PENDULUM*

### MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE “AJÍ MIRASOL”, *CAPSICUM BACCATUM* VAR. *PENDULUM*

Antonietta Gutierrez-Rosati<sup>1</sup> & Betsabe Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad- CIRGEBB, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.  
Av. La3 Molina s/n, La Molina, Lima 12 – Perú.  
antonietta@lamolina.edu.pe

The Biologist (Lima), 14(2), jul-dec: 171-181.

## ABSTRACT

This study established the protocol for the introduction and *in vitro* micropropagation of “Ají Mirasol”, *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, by using mature sexual seeds. *C. baccatum* var. *pendulum* seeds from various sources were used: seeds sold commercially and seeds extracted from fresh fruits purchased from two different fruit markets. The optimal protocol for seed disinfection used 2% concentration of sodium hypochlorite, as a sterilizing solution, in which seeds are immersed for 20 minutes. Germination of seeds and *in vitro* micropropagation of *Capsicum baccatum* were done using Murashige and Skoog (MS, 1962) medium, and explants were grown at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  under an 8:16 h photoperiod.

**Keywords:** Ají mirasol – *Capsicum baccatum* – *in vitro* micropropagation

## RESUMEN

El estudio logró establecer el protocolo de introducción a condiciones *in vitro* y la micropropagación del “Ají Mirasol”, *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, mediante la germinación *in vitro* de semillas sexuales maduras. Se utilizaron semillas de *C. baccatum* var. *pendulum* de varios orígenes: semillas expendidas comercialmente y semillas frescas extraídas de frutos adquiridos en dos mercados de verduras frescas. El protocolo de desinfección de semillas, utiliza como solución esterilizadora el hipoclorito de sodio al 2% de concentración, al cual se sumergen las semillas durante 20 min. Las semillas germinaron en un 100% y las yemas lograron desarrollarse eficazmente (micropropagación) en el medio de Murashige y Skoog (MS, 1962), cultivadas a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y 8/16 h de fotoperiodo.

**Palabras clave:** Ají escabeche – *Capsicum baccatum* – *in vitro* micropropagación

## INTRODUCCIÓN

Los ajíes, también denominados “Chilis” en algunos países de América, pertenecen a la familia Solanaceae, género *Capsicum*. El género *Capsicum* consta de cerca de 25 especies silvestres y cinco especies que han sido colectadas y domesticadas (Andrews 1984, Sanatombi & Sharma 2007). A nivel mundial son cinco las especies más cultivadas: *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*,

*Capsicum pubescens*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum annuum*, la última de las cuales agrupa la mayor diversidad de ajíes cultivados o silvestres (Hernández 1982, Alfonso 1993).

*Capsicum baccatum* var. *pendulum*, conocido con los nombres comunes de: Ají Escabeche, Ají Amarillo, Aji Cristal, Aji Verde, Cuerno de Oro o Cumbai (Fig. 1) es originario de Perú, en donde tiene uso ancestral, desde hace 8500 años aC (Eshbaugh 1968, 1970).



Figura 1. “Ají escabeche” *Capsicum baccatum* var. *pendulum*.

Su ancestro silvestre es *C. baccatum* var. *baccatum*, conocido como Arivivi, es común en Bolivia y el norte de Argentina y con poblaciones atípicas en Perú y Paraguay (Russo 2012). *Capsicum baccatum* var. *pendulum* tiene una enorme importancia económica, por su comercialización como producto fresco, seco, o como fuente de colorantes naturales, de los cuales se elaboran pinturas y cosméticos. También es fuente de extracción de capsaicina y otros compuestos

fitoquímicos que tienen un efecto benéfico sobre la salud (Guzmán & Paredes 1998). Según Dillard & Germán (2000), dentro de los compuestos que se extraen del ají se encuentran los ácidos fenólicos, de los cuales se sabe reducen el riesgo de contraer cáncer, problemas cardiovasculares y otras enfermedades crónicas degenerativas.

Adicionalmente existen reportes que indican que el ají es usado en la elaboración de

medicamentos en forma de cremas y pastas, utilizados para aliviar dolores musculares causados por la artritis, elaboración de shampoo y píldoras en base a capsaicina (Maga 1975, Baum 1981).

El cultivo de *Capsicum* destaca por su facilidad de adaptarse a diversos climas, así como a la pequeña y mediana producción ya que no requiere de técnicas muy avanzadas para su cultivo (Hernández 1982, Alfonso 1993). La producción y productividad del ají en general y del ají escabeche en particular afrontan serias dificultades. Las semillas son germinadas en almácigos, período en el cual deben adoptarse enormes cuidados ya que las plántulas son muy susceptibles al ataque de hongos, bacterias y virus que pueden originar gran cantidad de pérdidas.

Una enfermedad común a nivel de almácigos es el ataque de un complejo de hongos (*Pythium* spp, *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp.), enfermedad conocida como “damping-off”. En el campo, el cultivo puede ser atacado por insectos como “el picudo” (*Anthonomus eugenii* C.), el cual daña los frutos produciendo su caída (Uvalle 1985, DeWitt & Bosland 1993). Otro problema que afronta el agricultor es la pobre disponibilidad de semilla de calidad en el mercado local. Muchos agricultores utilizan semilla de frutos cosechados en la campaña anterior con la consiguiente pérdida de uniformidad y baja productividad, producto de la heterocigosidad de las semillas F<sub>2</sub> de plantas alógamas.

La utilización de una herramienta biotecnológica como es el cultivo de tejidos *in vitro* para la multiplicación de genotipos élites, F1, de *C. baccatum* var. *pendulum* podría ser una buena alternativa para el control y diseminación de enfermedades que se presentan en las diferentes etapas del cultivo y la disponibilidad de semillas y/o plántulas de buena calidad.

Si bien la literatura hace referencia al cultivo de tejidos y regeneración de plántulas *in vitro* de diferentes especies del género *Capsicum* (Sanatombi & Sharma 2007, Swamy *et al.* 2014), no se han encontrado estudios de cultivo de tejidos en *C. baccatum* var. *pendulum*.

Las respuestas morfogénicas de las células y tejidos vegetales y por ende, la capacidad regenerativa de los mismos, son genotipo dependiente. Es por ello que los medios de cultivo reportados en la literatura para otras especies no necesariamente darán respuesta positiva en *C. baccatum* var. *pendulum*. Es por ello que el presente estudio parte con la experimentación con medios básicos y en base a la respuesta observada, suplementar la fórmula con fitohormonas, hasta conseguir la formulación y estandarización de protocolos de introducción y multiplicación *in vitro* de la variedad *pendulum* de *C. baccatum*.

Sanatombi & Sharma (2007) con *Capsicum annum* L. cv. 'Morok Amuba' mencionan la utilización de medios de cultivo diferentes para las fases de inducción de yemas, elongación y proliferación de brotes así como el enraizamiento. Para la inducción de yemas utilizaron el medio MS suplementado con zeatina (Zea), seguido de 6-benzylaminopurina (BAP) en combinación con AIA (indole-3-ácido acético). El enraizamiento fue inducido utilizando el medio MS suplementado con IBA. Swamy *et al.* (2014), trabajando la propagación *in vitro* de cinco variedades de *C. annum*, lograron germinar semillas en medio MS suplementado con BAP y ANA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético) o AIA. Las plántulas fueron luego micropropagadas en medio MS suplementado con BAP y AIA.

Se ha trabajado la producción *in vitro* de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. utilizando el medio MS suplementado con citoquininas y auxinas. Se registró la

producción de yemas con BAP, 2.4.D (ácido 2,4-dichlorophenoxyacético) y ANA, y para lograr el enraizamiento de los brotes se empleó el medio MS suplementado con IBA (Sanatombi & Sharma 2008, Gayathri *et al.* 2015). Orlinska & Nowaczyk (2015), trabajando con cuatro genotipos de *Capsicum*, 3 genotipos de *C. annuum* y un cruce interespecífico de (*C. frutescens* L. × *C. annuum*), obtuvo las mejores respuestas de regeneración utilizando el medio MS suplementado con IAA (indole-3-acetic acid).

El trabajo de investigación ejecutado, se desarrolla con una especie no antes trabajada *in vitro*, y siendo originaria y muy importante para los trabajos de mejoramiento genético en Perú, se torna de importancia los resultados, ya que permite contar con protocolos para la introducción y multiplicación *in vitro* de plántulas y establecimiento de bancos genéticos. En el proceso de estudio, se consideró importante adoptar protocolos sencillos, posibles de ser replicados por cualquier laboratorio y programa de mejoramiento genético. Con éste aporte se pretenden establecer una base biotecnológica para el desarrollo de plantas con resistencia a agentes bióticos y abióticos; así como favorecer algunas características hortícolas como es la mejora de la productividad, tan importante en las especies cultivadas.

El objetivo del estudio fue establecer un protocolo para la introducción *in vitro* de *C. baccatum* var. *pendulum*, así como los medios para su micropropagación, utilizando como fuente vegetal semillas sexuales de diferentes procedencias.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Durante el mes de setiembre del año 2015 se obtuvo material vegetal consistente en: (1) Semillas comerciales marca ALABAMA de *C.*

*baccatum* var. *pendulum* (Código de laboratorio - A1). Según la descripción del producto, estas fueron tratadas con fungicida de acuerdo a estándares internacionales; (2) Sernillas extraídas de frutos frescos de *C. baccatum* var. *pendulum* comprados en SUPERMERCADO (Código de laboratorio-A2); y, (3) Semillas extraídas de frutos frescos de *C. baccatum* var. *pendulum* comprados en mercado local de expendio (Código de laboratorio-A3).

Los frutos fueron llevados al laboratorio en donde se lavaron y se procedió a extraer las semillas, lavarlas y desinfectarlas. Las semillas fueron sometidas a dos diferentes tratamientos de desinfección a fin de determinar el protocolo de introducción de material vegetal a condiciones *in vitro*. Los dos tratamientos de desinfección de semillas probados se basaron en la utilización de dos concentraciones diferentes del agente esterilizante: 1.-Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 2% y 2.- Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 5%. Para ambos tratamientos las semillas se lavaron tres veces con agua jabonosa, luego se sumergieron en alcohol al 70% durante 5 seg, enseguida se sumergieron en una de las dos concentraciones de solución de NaClO (2% y 5%) que contenía 2 gotas de tween 20. En estas soluciones desinfectantes permanecieron durante 20 min con agitación continua. Transcurrido éste tiempo se realizó tres enjuagues de las semillas con agua destilada estéril y se sembraron en condiciones de asepsia en Cámara de Flujo Laminar sobre medio Murashige & Skoog (MS) (1962), a razón de 5 a 8 semillas por frasco. Los frascos fueron cultivados a 20±2°C de temperatura y 8/16h de fotoperiodo y una intensidad luminosa de 2000 lux generados por tubos fluorescentes día de 30 Watts.

Las evaluaciones llevadas a cabo fueron número de semillas germinadas, describiendo porcentaje de germinación a lo largo del tiempo. Una vez germinadas las semillas y

desarrollada la primera hoja verdadera, se procedió a seccionarlas transversalmente bajo condiciones de asepsia, se eliminó la raíz y se obtuvieron los explantes: A. epicótilo con

yemas terminales y sin hojas cotiledonales; B. epicótilos sin yemas terminales y con hojas cotiledonales y C. epicótilos sin yemas terminales y sin hojas cotiledonales (Fig. 2.).



**Figura 2.** Explantes cortados. **A.** epicótilo con yemas terminales y sin hojas cotiledonales, **B.** epicótilos sin yemas terminales y con hojas cotiledonales y **C.** epicótilos sin yemas terminales y sin hojas cotiledonales.

Los diferentes explantes fueron sembrados sobre medio sólido de MS, y se incubaron a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y 8/16h fotoperiodo y una intensidad luminosa de 2000 lux. Se evaluó la sobrevivencia de los explantes, el crecimiento de parte aérea y radicular y buena arquitectura de la planta, así como número de días que toma la planta para alcanzar su máximo desarrollo, encontrándose lista para su micropropagación. Las plántulas, fueron seccionadas en microesquejes que contenían yemas apicales o axilares, sembradas sobre medio de MS, bajo las mismas condiciones ambientales que los explantes.

## RESULTADOS

### Desinfección de las semillas

Los dos tratamientos utilizados para la desinfección de semillas de *C. baccatum* var.

*pendulum* dieron buenos resultados; cero (0%) de contaminación; por dicha razón y a fin de elegir uno de ellos, se tomó en consideración la conveniencia de utilización de menor cantidad del agente químico, asimismo se evaluaron algunos parámetros como la velocidad en la germinación a través del conteo de número de semillas germinadas a los 4, 7, 8, 9, 10, 11 y 14 días después de la siembra (Tabla 1), se consideró la emergencia del hipocotilo para la identificación de la germinación, pudiéndose observar que las semillas alcanzan un porcentaje de germinación mayor al 90% entre el séptimo y octavo día de sembradas.

Un dato adicional observado en los registros es que las semillas extraídas de frutos frescos, (A2 y A3) germinan mucho más rápido respecto a las semillas secas comerciales (A1). (Fig. 3-4 y Tabla 1).

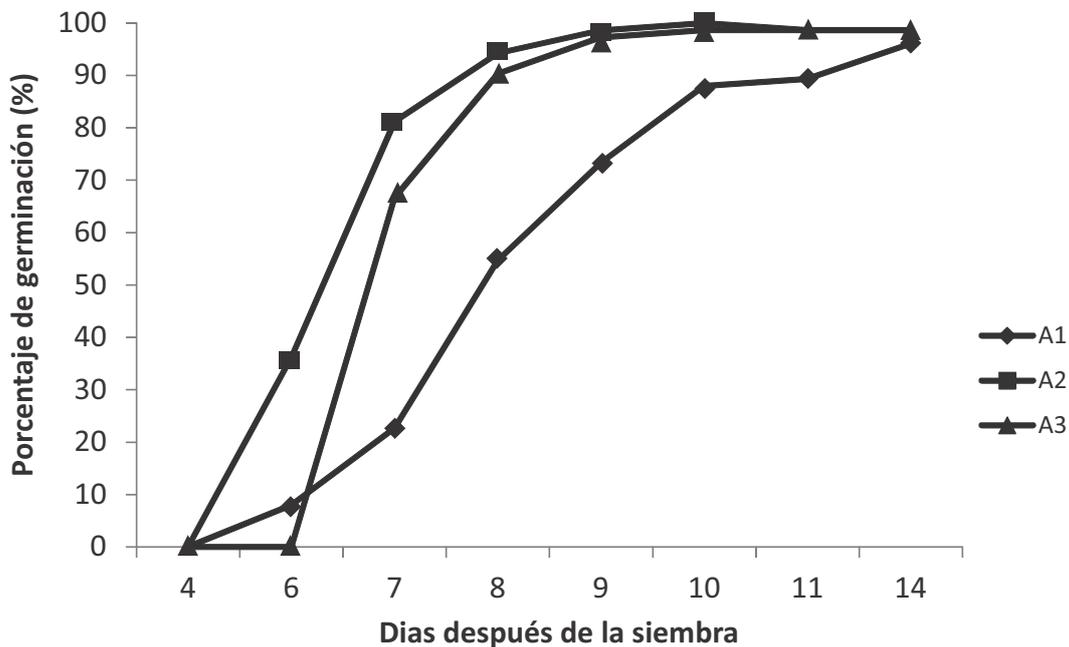


Figura 3. Porcentaje de germinación de A1, A2 y A3 con el tratamiento de 2% de NaClO.

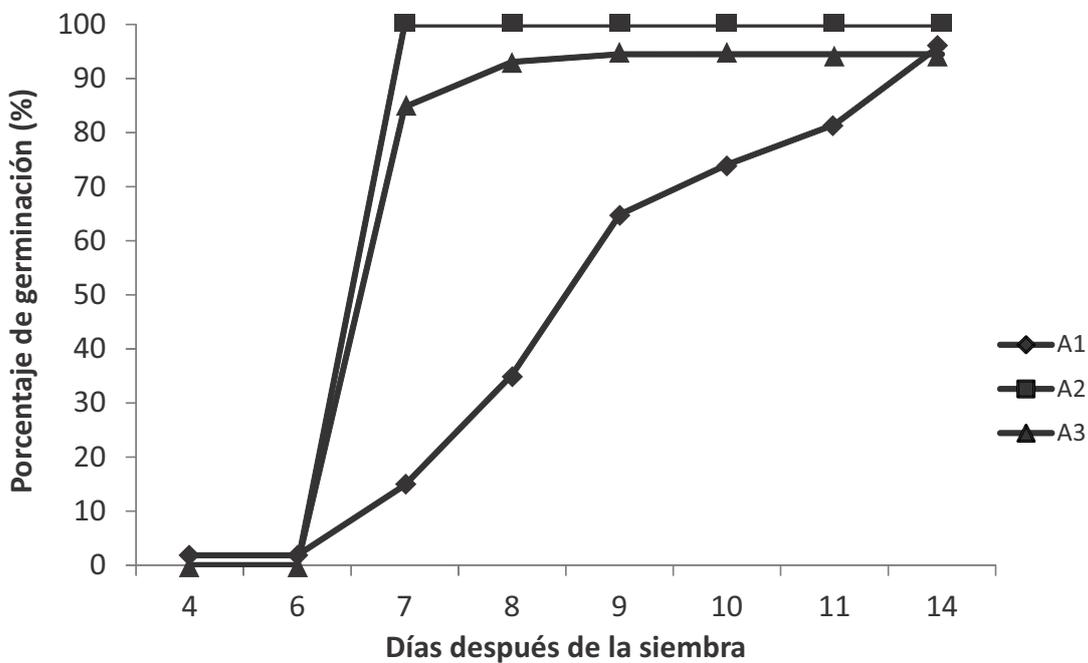


Figura 4. Porcentaje de germinación de A1, A2 y A3 con el tratamiento de 5% de NaClO.

**Tabla 1.** Número de semillas A1, A2 y A3 germinadas después de la siembra, con tratamientos de 2% y 5 % de NaClO.

Días	Número total de semillas		Número de semillas germinadas															
			4		6		7		8		9		10		11		14	
Semillas	2%	5%	2%	5%	2%	5%	2%	5%	2%	5%	2%	5%	2%	5%	2%	5%	2%	5%
A1	75	54	-	1	6	1	17	8	41	19	55	35	66	40	67	44	72	52
A2	69	9	-	-	25	-	56	9	65	9	68	9	69	9	69	9	69	9
A3	72	72	-	-	-	-	48	61	65	67	70	68	71	68	71	68	71	68

**Micropropagación *in vitro***

Las plántulas desarrolladas a partir de la siembra de semillas *in vitro*, crecieron óptimamente en el medio MS. Luego de la

germinación, se esperó el desarrollo de la primera hoja verdadera (Fig. 5), señal para proceder a realizar la primera propagación.

**Figura 5.** Germinación *in vitro*, semillas de *C. baccatum* var. *pendulum*.

Las plántulas fueron seccionadas, eliminando la parte radicular, generando explantes conformados por: A. epicótilos sin

cotiledones, B. epicótilos sin yema terminal, C. epicótilos sin cotiledones y yema terminal (Fig. 6).



**Figura 6.** Siembra de explantes A, B y C en medio MS 1962.

Los explantes colocados en medio MS, desarrollaron adecuadamente y al cabo de 20 días de sembrados alcanzaron una altura entre 12 a 15 cm, con cinco a seis entrenudos y con una perfecta arquitectura de planta, listas para ser nuevamente micropropagadas (Fig. 7). Las plántulas con 20 días de edad fueron

seccionadas bajo condiciones de asepsia, cada explante estuvo conformado por una yema, sea ésta apical o axilar, las mismas que desarrolló formando una plántula adulta. De ésta forma se mantuvo un ritmo de micropropagación cada 20 a 22 días con una tasa promedio de seis explantes por plántula.



**Figura 7.** Plántula de *C. baccatum* var. *pendulum*, obtenida de la germinación de semilla *in vitro* en medio Murashige y Skoog (MS).

## DISCUSIÓN

Para la esterilización de las semillas sexuales a ser introducidas a condiciones *in vitro* se probaron dos tratamientos, los cuales se diferencian en la concentración de la solución desinfectante (NaClO). Ambos tratamientos dieron buenos resultados, por lo que no fue necesario utilizar tratamientos más fuertes e invasivos como ser el uso de soluciones bactericidas y/o fungicidas (Sanatombi & Sharma 2008, Gayathri *et al.* 2015) o la utilización de solución de Cloruro de Mercurio (Sanatombi & Sharma 2008).

De los tratamientos de desinfección de semilla utilizados (2% y 5%); se eligió aquel que utiliza 2% de hipoclorito de sodio, debido a que siendo la menor concentración de sustancia esterilizadora, el tratamiento es menos invasivo para la semilla. Por otro lado, según registro (Tabla 1), se pudo observar que el incremento de hipoclorito de sodio de 2% a 5% tiene un ligero efecto negativo sobre la germinación de las semillas.

Las semillas extraídas de frutos frescos presentan una viabilidad del 100%, mientras

que las semillas comerciales registraron un porcentaje de viabilidad del 96%, decremento probablemente debido al tiempo que tiene la semilla de guardada. A diferencia de lo reportado por diferentes autores quienes hicieron germinar las semillas en papel filtro, en el trabajo de investigación las semillas fueron sembraron sobre MS, a fin de asegurar que las plántulas tuvieran un sustrato rico y desarrollaran en excelente estado fisiológico para las subsiguientes etapas de multiplicación. Asimismo las semillas germinaron baso fotoperíodo (16/8 h luz) y no en oscuridad como lo indican (Sanatombi & Sharma 2008, Gayathri *et al.* 2015).

Para la germinación de las semillas, no se utilizó ningún agente para la ruptura de dormancia y/o uso de reguladores de crecimiento como se menciona en la literatura para otras especies (Swamy *et al.* 2014). Las semillas, lograron germinar adecuadamente sobre el medio de MS. El mismo medio permitió el crecimiento y desarrollo de plántulas, las que mostraron una adecuada arquitectura de la parte aérea y radicular (Figuras 8 y 9).



Figura 8. Plántulas desarrolladas. A. Parte aérea. B. Parte radicular.

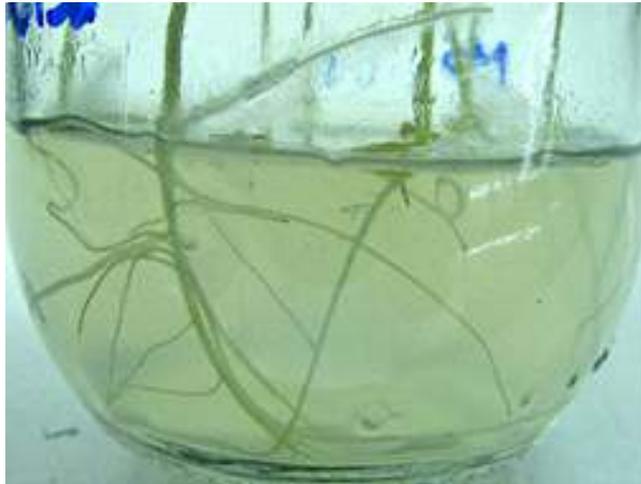


Figura 9. Plántula luego de 20 días de propagada.

Una forma eficiente de introducir *C. baccatum* var. *pendulum* a condiciones *in vitro* es a través de la germinación *in vitro* de semillas sexuales. El tratamiento óptimo para la esterilización de la semillas y que además es el menos invasivo consiste en: extracción de semillas de frutos frescos; lavado de semillas con agua jabonosa; enjuague con abundante agua de caño; lavado de semillas con alcohol al 70% durante 5 seg; sumergir semillas en solución esterilizante de 2% hipoclorito de sodio NaClO, con dos gotas de Tween 20, durante 20 min; enjuagar semillas con agua destilada estéril por tres veces. Para la germinación de las semillas no es necesario colocarlas en oscuridad o utilizar tratamientos alguno para romper dormancia. Los explantes crecen y forman plantas vigorosas al ser cultivadas sobre medio MS, a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura y 8/16h de fotoperiodo y una intensidad luminosa de 2000 lux. Los explantes forman plantas vigorosas y se encuentran listas para el siguiente ciclo de propagación a los 22 días de sembrados. El medio MS ha mostrado ser el adecuado tanto para la germinación de las semillas como para el establecimiento y multiplicación de plántulas *in vitro* de *C. baccatum* var. *pendulum*, y no requiere la adición de reguladores de crecimiento en el medio de micropropagación *in vitro*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso, J. 1993. *Cultivo de chile tabasco. Guía sobre la producción de chile tabasco para exportación*. Fundación Hondureña de investigaciones agrícolas, San Pedro Sula, Honduras, HN. pp. 9-15.
- Andrews, J. 1984. *Peppers: The domesticated Capsicums*. University of Texas Press, Austin, Texas. pp. 14-17.
- Baum, S.J. 1981. *Introducción a la química orgánica y biología*. Compañía editorial continental, México, MX. pp. 286-288.
- DeWitt, D. & Bosland, P. 1993. *The Pepper Garden, from the sweetest bell to the Hottest Habanero*. Ten Speed Press, Berkeley California, US. pp. 23-220.
- Dillard, C.J. & German, J.B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1744-1756.
- Eshbaugh, W.A. 1968. A nomenclatural note on the genus *Capsicum*. *Taxon*, 17: 51-52.
- Eshbaugh, W.A. 1970. A biosystematics and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). *Brittonia*, 22: 31-43.
- Gayathri, N.; Gopalakrishnan, M. & Sekar, T.

2015. *In vitro* micropropagation of *Capsicum Chinense* Jacq. (Naga King Chili). Asian Journal of Plant Science and Research, 5: 13-18.
- Guzmán, S. & Paredes, O. 1998. *Functional products of plant indigenous to Latin America: Amaranth, quinoa, common beans and botanicals*. In: *Functional Foods- Biochemical & Processing Aspects*. Mazza, G. (Eds.). Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA. pp. 293-328.
- Hernández, A. 1982. *Influencia de la densidad de población sobre el rendimiento de la calidad del chile (Capsicum annuum L)*. Tesis Ingeniería Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, MX. 59 p.
- Sanatombi, K. & Sharma, G. 2008. *In vitro* propagation of *Capsicum chinense* Jacq. *Biologia Plantarum*, 52: 517-522.
- Maga, JA. 1975. *Capsicum*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 6:177-199.
- Orlinska, M. & Nowaczyk, P. 2015. *In vitro* plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology*, 39:60-68.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Russo, V.M. 2012. *Peppers: botany, production and uses*. USDA/ARS. pp. 21-24.
- Sanatombi, K. & Sharma, G.J. 2007. Micropropagation of *Capsicum annuum* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 35: 57-64.
- Swamy, S.; Krupakar, A.; Chandran, D.S. & Koshy, E.P. 2014. Direct regeneration protocols of five *Capsicum annuum* L. varieties. *African Journal of Biotechnology*, 13: 307-312.
- Uvalle, G.C. 1985. *Técnicas de producción de cultivo de chile habanero en la zona henequenera*. Tesina de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario (ITA). No.2 . Conkal, Yuc. MX. 43 p.

Received April 17, 2016.  
Accepted July 11, 2016.