

## **PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y REGENERACIÓN DIRECTA A PARTIR DE HOJAS DE *CAPSICUM ANNUUM*.CV. VERANO-1.**

**Arlene Rodríguez Manzano, Amelia Capote Rodríguez y Dayamí Pérez.**

**Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT).**

**Email: [arlene@inifat.co.cu](mailto:arlene@inifat.co.cu)**

### **RESUMEN**

La producción de semilla original de pimiento puede verse afectada debido a que son plantas autógamas facultativas, y la aplicación de las técnicas biotecnológicas en el mejoramiento de esta especie están muy limitadas por la baja capacidad de regeneración que muestran sus células y tejidos cultivados *in vitro*. En este trabajo se estudia el comportamiento en cultivo de tejidos del cultivar Verano 1. Para ello se establecieron protocolos de desinfección de semillas con alcohol y bicloruro de mercurio en diferentes tiempos de exposición y la germinación se realizó en un medio MS modificado. Para la propagación se utilizaron como explantes los ápices y nudos, los cuales se transplantaron a diferentes medios de cultivo MS suplementados con diferentes concentraciones de forma combinada e independiente de 6 bencil amino purina (BAP), ácido indol acético (AIA) y ácido indol butírico (IBA). Además se estudio el efecto de la urea combinada con las auxinas. Por otra parte las hojas se transplantaron a diferentes medios de cultivo suplementados con BAP y AIA en diferentes proporciones y la capacidad morfogenética se evaluó a los dos meses de cultivo. . A los 30 días de cultivo se evaluaron las variables: índice de multiplicación, altura de las plantas y número de nudos. Los datos se sometieron a un análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizado con 12 repeticiones. También se determinó el porcentaje de callos y raíces. La mejor respuesta en la propagación a partir de ápices y nudos se obtuvo con la presencia de AIA combinado con urea.. Se logro la regeneración directa a partir de hojas en los medios de cultivo analizados.

**Palabras claves: pimiento, *in vitro*, morfogénesis, medios, hojas.**

### **PROPAGATION *IN VITRO* AND DIRECT REGENERATION FROM LEAVES IN *CAPSICUM ANNUUM* CV. `VERANO 1`.**

#### **ABSTRACT**

The original seed production in pepper can turns affected because they are facultative autogamous plants, and the biotechnical techniques applications in the improvement of this specie is very limited by drop regeneration capacity show its cells cultivated *in vitro*. In this work studied the behaviour *in vitro* of cultivar `Verano 1`. The protocols used in seed disinfection were with alcohol and bicloruro of mercury in different times and the germination was carried out in modified MS medium. For propagation were used as explants the apices and buds, in MS medium supply with different concentrations combined and independent of BAP, AIA and IBA. Also studied the effect of the urea combined with the auxine. On the other hand the leaves were transfered to different medium supply with BAP and AIA in different proportions and the morphogenetic capacity was evaluated to the two months of cultivation. At the 30 days of cultivation the variables: multiplication index, height of the plants and number of buds were evaluated. The data underwent a variance analysis with totally randomized design with 12

repetitions. It was also determined the percentage of calls and roots. The best answers in the propagation from apices and buds were obtained with the presence of AIA combined with urea and the direct regeneration from leaves was possible in the cultivate medium analyzed

**Key words: pepper, in vitro, morphogenesis, medium, leaves.**

## INTRODUCCION

El pimiento *Capsicum annum* constituye la segunda hortaliza de mayor importancia para Cuba, debido a su gran demanda tanto para el consumo fresco como para el uso industrial (GNAU, 2003).

En el INIFAT existen variedades promisorias donde es importante la obtención de semilla original para su extensión y generalización, sin embargo esta puede verse afectada en muchas ocasiones por el área disponible para la siembra, ya que al ser plantas autógamas facultativas las posibilidades de cruzamientos entre las variedades son altas, por lo que se limita el desarrollo acelerado de los programas de mejoramiento genético a la par de la producción de semilla.

Por otra parte, la aplicación de las técnicas de biotecnología en el mejoramiento de esta especie está muy limitada por la baja capacidad de regeneración que muestran sus células y tejidos cultivados *in Vitro*.

La biotecnología cada día tiene mayor importancia en la obtención de semilla de alta calidad (Rodríguez Manzano y col., 2003) y también es utilizada como un importante instrumento como apoyo a los programas de mejoramiento genético de los cultivos y dentro de ellos las hortalizas constituyen uno de los cultivos donde más se ha trabajado (Capote y col., 2003; 2004).

Es por eso que el objetivo del presente trabajo es estudiar el comportamiento *in vitro* del pimiento tomando como modelo el cv, 'Verano 1', para obtener un método más eficiente de regeneración y propagación *in vitro*, que pueda ser empleado en los programas de mejoramiento de este cultivo.

## MATERIALES Y METODOS.

La desinfección de las semillas de pimiento cv. 'Verano 1' se realizó en condiciones estériles con un tratamiento de alcohol durante 2 minutos y posteriormente con bicloruro de mercurio durante 5, 10 y 15 minutos.

Las semillas se colocaron en un medio de germinación Knop, a la oscuridad. A las cuatro o cinco semanas de germinadas las semillas, los ápices y nudos fueron segmentados y cultivados en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con diferentes concentraciones en forma combinada e independiente de 6 bencil amino purina (BAP), ácido indol acético (AIA) y ácido indol butírico (IBA). Además, se estudió el efecto de la adición de la urea combinada con las auxinas (Tabla 1).

A los 30 días de cultivo se determinó el porcentaje de callos, brotes y se evaluaron las variables; índice de multiplicación, altura de las plantas y número de nudos por tratamiento. Estos datos se sometieron a un análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizado con 12 repeticiones y las diferencias significativas fueron detectadas por una prueba de Duncan 5%.

Para estimular la regeneración directa de plantas a partir de las hojas, estas se colocaron en el medio MS suplementado con BAP y AIA en las proporciones: 1: 1, 1: 1.6 y 1: 2.5.

La capacidad morfogenética de los explantes fue evaluada a los 2 meses de cultivo mediante una escala cualitativa, analizándose para ello el porcentaje de callos (0-no

crecimiento; 1-crecimiento mínimo; 2-crecimiento medio y 3-crecimiento máximo) y el número de brotes (0-no presencia de brotes, 1-de uno a cinco brotes, 2-de cinco a diez brotes y 3-más de 10 brotes).

**Tabla 1. Medios de cultivos empleados para la propagación y obtención de callos a partir de nudos y ápices.**

No	Tipo de medio de cultivo utilizado
1	MS + 0.1 mg/L AIA
2	MS + 0.25 mg/L AIA
3	MS + 0.25 mg/L AIA + 2 mg/L BAP
4	MS + 0.25 mg/L AIA + 3 mg/L BAP
5	MS + 0.5 mg/L AIA
6	MS + 0.5 mg/L AIA + 4 mg/L BAP
7	MS + 0.5 mg/L AIA + 5 mg/L BAP
8	MS + 0.5 mg/L AIA + 6 mg/L BAP
9	MS + 2.5 mg/L AIA + 2.5 mg/L BAP
10	MS + 0.05 mg/L IBA + 0.05 mg/L BAP
11	MS + 1 mg/L IBA
12	MS + 2 mg/L IBA
13	MS + 3 mg/L IBA
14	MS + 2.5 mg/L urea + 0.1 mg/L AIA
15	MS + 5 mg/L urea
16	MS + 5 mg/L urea + 0.1 mg/L AIA
17	MS + 5 mg/L urea + 1 mg/L AIA
18	MS + 5 mg/L urea + 5 mg/L AIA
19	MS + 10 mg/L urea + 1 mg/L AIA
20	MS + 10 mg/L urea + 2 mg/L IBA
21	MS + 10 mg/L urea + 3 mg/L IBA

## RESULTADOS Y DISCUSION.

Se logró la desinfección de las semillas con todos los tratamientos estudiados, por lo que se recomienda el uso del menor tiempo de exposición en bicloruro de mercurio que corresponde a 5 minutos.

En la Tabla 2 se puede observar en el análisis de varianza como los parámetros evaluados: altura de las vitroplantas, número de nudos e índice de multiplicación tuvieron diferencias significativas entre los medios de cultivos empleados.

**TABLA 3. Análisis de varianza realizado con los resultados obtenidos.**

F. variación	G L	CM		
		ALTURA	NUDOS	I.M
Tratamientos	20	2.74 **	10.68 ***	4.89 ***
Error	231	0.37	2.026	0.745
Total	251			

Los resultados obtenidos mostraron que los mayores porcentajes de formación de callos se obtuvieron en los medios suplementados con diferentes concentraciones de BAP, cuando se combinó con AIA (0,25 y 0,5 mg/L) (Tabla 3 y Fig. 1). Cuando se

utilizaron estas concentraciones de AIA de forma independiente se afectó la propagación del material vegetal. Sin embargo, a concentraciones más bajas de AIA (0,1 mg/L) no se estimuló la formación de callos.

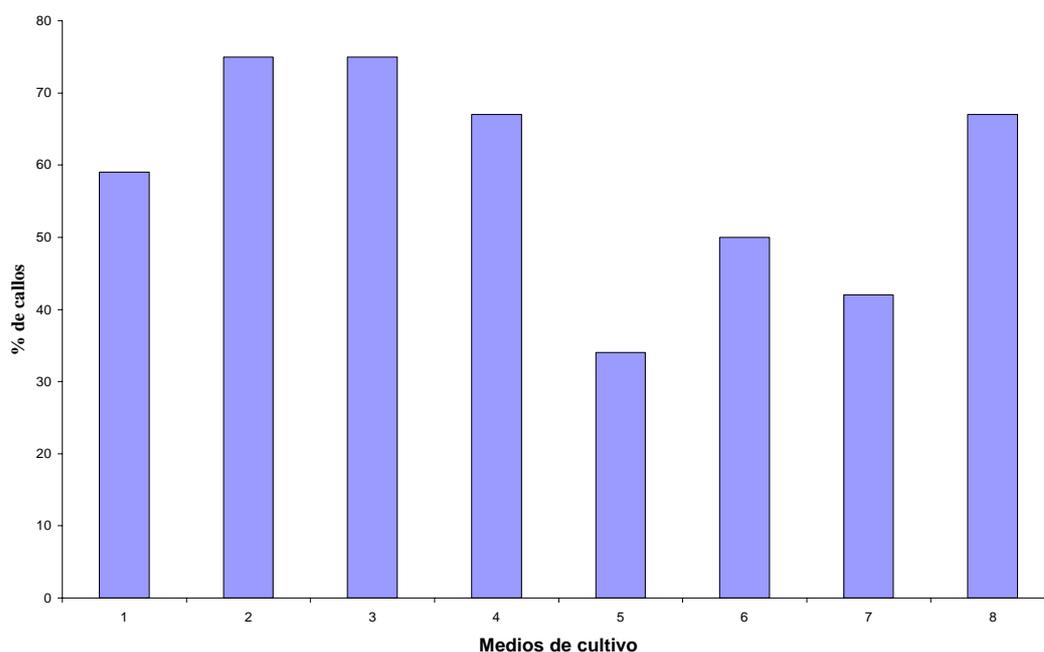
La mejor respuesta en la propagación se obtuvo en los medios MS suplementados con IBA (3mg/L) con urea (10mg/L) con un promedio de 3,25 nudos/explante y un índice de multiplicación (IM) de 2,42. (Tabla 3). Además, con este medio de cultivo simultáneamente se logró la formación de raíces. Este medio de cultivo utilizado no tuvo diferencias significativas en el índice de multiplicación con los medios que se les adicionó 5 mg/l de AIA y 5 mg/l de urea, ni con 1 mg/l de AIA y 10 mg/l de urea.

En general se mostró que los ápices mostraron diferencias con respecto a los nudos en cuanto al alargamiento de los brotes y en el índice de multiplicación, por lo que se requieren trabajos más profundos para el estudio de la interacción del tipo de explante y los medios de cultivo para lograr mejores resultados.

**TABLA 3. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre los índices evaluados (Letras iguales no difieren significativamente entre sí para la prueba de Duncan al 5%).**

MEDIOS	N. NUDOS	ALTURA	I.M
1	2.42abcd	0.91cde	1.17bcde
2	0.92fgh	0.54efghi	0.58def
3	0.00h	0.00i	0.00f
4	0.00h	0.00i	0.00f
5	1.92bcdef	0.46efghi	1.17bcde
6	1.00efgh	0.26fghi	1.00cde
7	0.50gh	0.17ghi	0.42ef
8	0.83fgh	0.17ghi	0.58def
9	0.00h	0.00i	0.00f
10	1.50cdefg	0.83def	1.08bcde
11	1.67cdefg	0.62efgh	1.42bcd
12	1.50cdefg	1.82def	1.17bcde
13	1.42cdefg	1.46ab	1.42bcd
14	1.25defgh	0.59efgh	0.67cdef
15	1.08defgh	0.53efghi	0.67cdef
16	1.00efgh	0.67defgh	0.67cdef
17	1.67cdefg	0.75defg	1.25bcde
18	2.75abc	1.21abcd	1.83 <sup>a</sup> b
19	3.00ab	1.38abc	1.83 <sup>a</sup> b
20	2.33abcde	1.01bcde	1.50bc
21	3.25a	1.57a	2.42 <sup>a</sup>

Fig. 1. Obtención de callos a partir de nudos y ápices



Los números corresponden a los medios de cultivo de la tabla 1, a partir de los cuales se produce la formación de callos. El número 1 corresponde al medio 2; el 2 corresponde al medio 3; el 3 corresponde al medio 4; el 4 corresponde al medio 5; el 5 corresponde al medio 6; el 6 corresponde al medio 7; el 7 corresponde al medio 8 y el 8 corresponde al medio 9

Por otra parte, la respuesta de los folíolos *in vitro* (Tabla 4) en los tres medios de cultivo utilizados mostró mayor porcentaje de callos en los medios 1 y 3 con diferencias significativas con el medio 2. En el caso de la regeneración directa de primordios los medios más efectivos fueron el medio 1 y 2 con diferencias significativas respecto al medio 3. Aunque el medio más efectivo fue el medio MS suplementado con BAP y AIA en una relación de 1: 2,5.

**Tabla 4. Porcentaje de callos y de regeneración de primordios a partir de folíolos en los tres medios de cultivo analizados. Escala cualitativa: Callos (%): 0-no crecimiento, 1-crecimiento mínimo, 2-crecimiento medio, 3-crecimiento máximo. Primordios: 0-no brotes; 1-de uno a cinco brotes, 2-Mayor que 5 brotes hasta diez, 3-mayor que diez brotes).**

MEDIOS BAP/AIA RELACION	CALLOS (%)			PRIMORDIOS (%)			
	0 3	1	2	0	1	2	3
1/2.5	-- --	100	--	12.5	25	12.5	50
1/1.6	62.5 --	25	12.5	12.5 37.5	25		25
1/1.0	-- --	62.5	25.0	75	25	--	--

La adaptación de las vitroplantas se realizó en condiciones controladas en bandejas con materia orgánica y suelo (50% c/u), donde se logró el 85 % de supervivencia de las mismas. Las plantas se desarrollaron hasta la formación, donde fue muy escasa por el ataque de los gorriones en zonas urbanas, lo que evidencia la necesidad de utilizar otras estrategias para la evaluación adecuada de las vitroplantas obtenidas.

## CONCLUSIONES.

- El mejor medio de cultivo para la propagación de los nudos y ápices fue el MS suplementado con 3 mg/L de IBA combinado con 10 mg/L de urea.
- El BAP combinado con el AIA tuvo un efecto negativo en la propagación del cultivar "Verano 1".
- Por primera vez en Cuba se logra la regeneración directa *in vitro* a partir de hojas en el cultivo del pimiento y el mejor medio de cultivo fue el MS suplementado con BAP y AIA (1:2,5).

## REFERENCIAS

- GNAU. Grupo Nacional de Agricultura Urbana.** Informe a la Asamblea Nacional del Poder Popular. Ministerio de Agricultura, La Habana, 88p, 2003.
- Capote A.** Comportamiento *in vitro* de cultivares seleccionados de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). II. Estudio de la callogénesis y rizogénesis espontánea. Revista Jardín Botánico Nacional, 24 (1-2): 219 – 225p, 2003.
- Capote A.** Selección *in vitro* y caracterización de líneas de tomate resistentes a *Alternaria solani*..(Publicación electrónica Memorias del II Congreso de Agricultura Tropical, TROPICO' 2004, C. Habana (Abril/ 04) ISBN 959- 7147- 02-6, 2004.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiolog. Plant.* 15: 473-497.
- Rodríguez-Manzano, A., Servelio Quintero, Ana Julia Rodríguez y Zoila Fundora. Establecimiento *in vitro* de ápices de malanga *Xanthosoma sagittifolium*. Revista Cultivos Tropicales. Vol 24 (3), 5-8, 2003.