

## Micropropagación del pimiento cultivar 'YAMIL' a partir de semillas con el empleo del bioestimulador del crecimiento QuitoMax®

Humberto Izquierdo Oviedo<sup>1</sup> †, Víctor Manuel Calaña Janeiro<sup>2</sup>,  
Lluvia de Abril A Soriano Melgar<sup>3</sup>,  Marian Rodríguez Hernández<sup>1</sup>,  
Yaritza Rodríguez Llanes<sup>4</sup>, Idalmis de la C Hernández Escobar<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Carretera a Tapaste Km 3 ½, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba

<sup>2</sup> Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez

Carretera a Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Blvd. Enrique Reyna Hermosillo No. 140 Col.,  
San José de los Cerritos, Saltillo, CP 25294, Coahuila de Zaragoza, México

<sup>4</sup> Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, Mérida, México

<sup>5</sup> Unidad Docente William Soler, Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana (UNAH)  
Carretera Bejucal-Quivicán Km 33 ½, Quivicán, CP 33500, Mayabeque, Cuba

 marian@inca.edu.cu

### RESUMEN

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es una especie de gran demanda y se emplea como condimento, es rico en licopeno y antioxidantes. En particular, el cultivar 'YAMIL', obtenido mediante el Programa de Mejoramiento Genético del Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliانا Dimitrova de Mayabeque, Cuba, tiene un buen comportamiento ante los efectos del cambio climático y las enfermedades fitopatógenas. En este trabajo se evaluó el efecto del producto QuitoMax® durante la propagación *in vitro* y aclimatación de plántulas de pimiento cultivar 'YAMIL' a partir de semillas. El bioestimulador se aplicó a diferentes concentraciones (1 a 10 mg/L), solo o en combinación con 6-BAP (2 mg/L); en la fase de aclimatación se trató a las raíces de las plántulas y 15 días después de plantadas se les asperjó a las concentraciones mencionadas. En esta fase se realizó el mismo procedimiento con el ácido indol acético (AIA; 2 mg/L). Se empleó un diseño completamente aleatorizado, los datos se procesaron por ANOVA simple y las medias se diferenciaron mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se demostró una buena respuesta de los explantes frente al bioestimulador, con independencia de la concentración, los mejores resultados obtenidos con el medio de cultivo MS basal suplementado con 1 mg/L de QuitoMax®. En la aclimatización de las plántulas, los mejores resultados se obtuvieron mediante la inmersión de las raíces y la posterior aspersión de las plántulas con QuitoMax® a igual concentración que en la fase *in vitro*. El QuitoMax® favoreció tanto *in vitro* como en la fase de aclimatación las diferentes variables evaluadas.

**Palabras clave:** Aclimatación, *Capsicum annuum* L., quitosano, propagación *in vitro*

### ABSTRACT

**Micropropagation of 'YAMIL' pepper cultivar from seeds using the QuitoMax® growth biostimulator.** Pepper (*Capsicum annuum* L.) is a species of great demand condiment; it is rich in lycopene and antioxidants. 'YAMIL', is a pepper cultivar recently obtained through the Genetic Improvement Program at "Liliana Dimitrova" Horticultural Research Institute in Mayabeque, Cuba, of good performance against the effects of climate change and phytopathogenic diseases. This work was aimed to evaluate the effect of QuitoMax® at *in vitro* propagation and acclimatization phases on seedlings of 'YAMIL' pepper cultivar. During the *in vitro* phase, the growth biostimulator was applied at different concentrations (1-10 mg/L) alone or in combination with 6-BAP (2 mg/L). At acclimatization, plantlets' roots were embedded in this product and 15 days after planting they were sprayed at the same concentrations. In this phase the same procedure was carried out with indole acetic acid (IAA; 2 mg/L). A completely randomized design was used, data were processed by simple ANOVA and the means were differentiated using the Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). A good response of explants was demonstrated using this growth biostimulator, regardless the concentration used. Best results were attained with basal culture medium MS supplemented with 1 mg/L QuitoMax®. In the acclimatization phase, best results were obtained when the roots were immersed and subsequently sprayed with QuitoMax® (1 mg/L) at the same concentration as in the *in vitro* phase. The use of QuitoMax® both *in vitro* and in the acclimatization phase favored the different variables evaluated.

**Keywords:** Acclimatization, *Capsicum annuum* L., chitosan, *in vitro* propagation

#### How to cite (Vancouver style):

Izquierdo-Oviedo H, Calaña-Janeiro VM, Soriano-Melgar LAA, Rodríguez-Hernández M, Rodríguez-Llanes Y, Hernández-Escobar IC. Micropropagación del pimiento cultivar 'YAMIL' a partir de semillas con el empleo del bioestimulador del crecimiento QuitoMax®. Biotecnol Apl. 2021;38(4):4201-7.

### Introducción

El género *Capsicum* pertenece a la familia de las solanáceas, que incluye el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), la papa (*Solanum tuberosum* L.), el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), entre otros. Existen

aproximadamente 22 especies silvestres y cinco especies domesticadas, estas son: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense* y *Capsicum pubescens* [1].

1. Bruneton, J. Estructura de la capsaicina y sus aplicaciones para el dolor. Tesis de Maestría en Fotoquímica. Angers: Universidad de Angers; 2013.



Publicación libre de costo  
para el autor  
No article processing charges

Hay evidencias arqueológicas en yacimientos ubicados en el suroeste de Ecuador, de que el género *Capsicum* fue cultivado hace más de 6000 años y es uno de los primeros cultivos en América que se autopolinizan. Este género se cultivó en diferentes lugares de Sudamérica y Centroamérica. La primera expedición de Cristóbal Colón los encontró en el mar Caribe, y los llamó “pimientos” por su sabor, parecido al de la pimienta negra europea [2, 3]. Se cultivan con éxito en muchos países [4], donde el continente que tiene mayor extensión de terreno dedicada a este cultivo es Asia, y son China, Turquía e Indonesia los principales productores [5].

Esta es la segunda hortaliza de mayor importancia para Cuba y el mundo, debido a su gran demanda tanto para el consumo fresco como para el uso industrial [6]. Además, se puede emplear como planta medicinal y como condimento. La superficie cosechada y en producción en el 2016 fue de 185 743 ha con una producción agrícola de 2 384 823 t de alimento para un rendimiento agrícola de 12.84 t/ha, de ellos 6111 ha corresponden al cultivo del pimiento con una producción agrícola de 70 956 t, para un rendimiento agrícola de 11.61 t/ha [5].

Los pimientos contienen un porcentaje escaso de proteínas (0.89 %) e hidratos de carbono (4.43 %), y apenas grasa (0.19 %), por ello aportan solo 27 kcal/100 g. Contienen pequeñas cantidades de vitaminas del grupo B, E y todos los minerales, pero en su composición destaca la provitamina A en los pimientos rojos, que además son una fuente importante de licopeno, el cual es un potente antioxidante [6, 7].

Según Rodríguez *et al.* [8], ‘YAMIL’, es un cultivar de pimiento de polinización abierta, que presenta buena adaptación climática y, se recomienda para la época de invierno (desde el 15 de septiembre hasta el 15 de febrero), alcanza una altura entre 45-65 cm. Posee buena cobertura de follaje, que permite proteger a los frutos de los golpes de sol y de los depredadores. Florecen a los 29 días después del trasplante (ddt), logra su floración masiva a los 34 ddt, a los 59 días tiene frutos verdes, a los 81 ddt, alcanzan la madurez fisiológica y se tornan de color rojo intenso en su madurez para consumo. La masa oscila entre 200-230 g y tiene de seis o siete frutos por planta, el rendimiento es de 30 t/ha y es resistente a potyvirus. Posee una acidez (0.16 %), sólidos solubles totales (4.5-4.6 °Brix), pH de 5,5-5,6 y 170-175 mg/100 g de contenido de vitamina C.

La micropropagación en el pimiento es de gran importancia, ya que se obtienen plántulas idénticas a la progenitora en un menor tiempo y con una elevada calidad fitosanitaria. El empleo de semillas registradas durante la propagación *in vitro* facilita que todo el potencial genético de la planta se trasmite a la descendencia sin temor a perder las plantaciones por problemas climatológicos. Esto sucede en ocasiones en los países tropicales y subtropicales por la incidencia en los países de ciclones y huracanes que devastan los cultivos.

La aplicación de técnicas biotecnológicas tiene grandes ventajas, ya que en un espacio reducido se pueden obtener miles de plántulas con una elevada calidad fisiológica y fitosanitaria, que no se obtiene en la propagación de este y otros cultivos en condiciones de campo.

En tal contexto, la aplicación de quitosanos en medios de cultivos constituye una alternativa favorable para la propagación *in vitro* de plantas. Estos mejoran significativamente el desarrollo caulinar y radicular en las plántulas en general, y de la orquídea *Catleya* spp. en un corto plazo [9]. Así mismo, desarrollan una actividad antifúngica en diferentes cultivos [10, 11]. Uno de dichos compuestos es el QuitoMax®, bioestimulador del crecimiento obtenido a partir de quitina de origen marino [12] que se emplea como alternativa para favorecer el crecimiento y desarrollo tanto *in vitro* como *ex vitro* del vegetal. El QuitoMax® incrementa el rendimiento agrícola en diferentes condiciones de cultivo e induce mecanismos de defensa en las plantas [10, 13].

Por tales razones, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del producto QuitoMax® durante la propagación *in vitro* y aclimatización de plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar ‘YAMIL’ a partir de semillas.

## Materiales y métodos

### Instalaciones

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos el Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque, Cuba.

### Propagación *in vitro*

#### Material vegetal

Se emplearon semillas certificadas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) del cultivar ‘YAMIL’ de la campaña 2016-2017, que se desinfectaron según la metodología de Calaña *et al.* [14]. Después de germinadas las plántulas *in vitro*, se tomaron segmentos nodales de entre 1-1.5 cm de longitud.

#### Medio de cultivo

Se empleó como medio de cultivo basal las sales de Murashige y Skoog (MS) [15], que se suplementaron con tiamina HCl (0.4 mg/L), mioinositol (100 mg/L), sacarosa (30 g/L) y agar (6.5 g/L). El pH del medio se ajustó a  $5.8 \pm 0.2$  antes de la esterilización en autoclave a 1.5 atmósferas de presión y 121 °C de temperatura durante 20 min. En todos los casos se emplearon 10 mL de medio de cultivo por frasco.

Los tratamientos fueron los siguientes: 1: MS solo.- Control Absoluto; 2: MS + 6-Bencilamino-purina (6-BAP; 2 mg/L); 3: MS + QuitoMax® (1 mg/L); 4: MS + QuitoMax® (5 mg/L); 5: MS + QuitoMax® (10 mg/L).

#### Condiciones de cultivo

Todos los frascos con los explantes se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C, a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos entre 60-65  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  y humedad relativa entre 75-80 %.

#### Evaluaciones

A los 30 días, se evaluó el porcentaje de supervivencia, para lo cual se contó el total de plántulas vivas con respecto al total de plántulas que se implantaron

2. Carrizo C, Barfuss MHJ, Sehr EM, Barboza GE, Samuel R, Moscone EA, *et al.* Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals Bot.* 2016;118(1):35-51.

3. Barbero GF, de Aguiar AC, Carrera C, Olachea Á, Ferreira-González M, Martínez J, Palma M, *et al.* Evolution of capsaicinoids in Peter Pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) during fruit ripening. *Chem Biodivers.* 2016;13(8):1068-75.

4. Álvarez de Morales M. Procesos biológicos implicados en el control de la maduración y la calidad de frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.): proteómica funcional y antioxidantes (Tesis de Doctorado). Granada: Universidad de Granada; 2015.

5. FAOSTAT. Anuario de Producción. Roma: FAO; 2018.

6. Baenas N, Belović M, Ilic N, Moreno DA, García-Viguera C. Industrial use of pepper (*Capsicum annuum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food Chem.* 2019;274:872-85.

7. Carvalho AV, de Andrade R, de Oliveira A, de Almeida R, Moresco KS, de Souza TC. Bioactive compounds and antioxidant activity of pepper (*Capsicum* spp.) genotypes. *J Food Sci Technol.* 2015;52(11):7457-64.

8. Rodríguez Y, Depestre T, Rodríguez SR, Camejo CM. ‘YAMIL’, nueva variedad de pimiento para campo abierto. Cuba: El Productor. 2015.

9. Vera KE. Uso de quitosano en medios de cultivo para el desarrollo en la propagación *in vitro* de la orquídea *Catleya* spp. (Tesis de Diploma). Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil; 2017.

10. Rodríguez AT, Jatomea MP, Bautista S, Cortez MO, Ramírez MÁ. Actividad antifúngica *in vitro* de quitosanos sobre *Bipolaris oryzae* patógeno del arroz. *Acta Agron.* 2016;65(1):12-20.

11. Rodríguez D. Determinación preliminar del efecto *in vitro* de nanopartículas de quitosano-*Protopis glandulosa* para inhibir *Candida albicans*. *Rev Cienc Farm Biomed.* 2018;30:8-12.

12. Falcón AB, Costales D, González-Peña D, Nápoles MC. Nuevos productos naturales para la agricultura: las oligosacarinas. *Cult Trop.* 2015;36:111-29.

13. Moreno XA, Lobelle L, González J. Efecto de los bioestimulantes Biobras-16 y Quitomax sobre el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad ‘Delicias-364’ en la agricultura suburbana de Aguada de Pasajeros. *Rev Científica Agroecosist.* 2018;6(2):151-60.

14. Calaña-Janeiro VM, Izquierdo-Oviedo H, González-Cepero MC, Rodríguez-Llanes Y, Rodríguez-Hernández M, Horta-Fernández D. Desinfección de semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar ‘YAMIL’ para su implantación *in vitro*. *Cult Trop.* 2019;40(3): e07.

15. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962;15(3):473-97.

en el medio de cultivo. Para determinar la formación de nuevos brotes, se contó el número de brotes que emitió cada explante y posteriormente se calculó la media para cada uno de los tratamientos. Para establecer el número de raíces por plántula, se contó el total de raíces de cada plántula por tratamiento y posteriormente se obtuvo la media. La longitud de las raíces por plántula (cm) se midió con un papel de filtro milimetrado la longitud de las raíces de cada tratamiento y posteriormente se calculó la media. El vigor de las plántulas se determinó mediante la escala propuesta por Izquierdo *et al.* [16].

En el momento de la transferencia de las plántulas a la fase de aclimatación se evaluó la masa fresca (g) y la masa seca de las plántulas (g).

#### Diseño experimental y análisis de los datos

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con 15 frascos por tratamiento con dos semillas (explantes) por frasco, y el mismo se repitió tres veces en el tiempo. Los datos se procesaron mediante un Análisis de Varianza de Clasificación Simple (ANOVA) con el programa SPSS 11.5 para Windows (SPSS, Microsoft Inc., Chicago, IL) y la comparación entre las medias se realizó de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). En todos los casos, se comprobó previamente la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de varianza [17].

#### Aclimatación de las plántulas

##### Material vegetal

Se emplearon plántulas de pimiento provenientes de la fase de multiplicación *in vitro* (tercer subcultivo), obtenidas en un medio de cultivo MS + 6-BAP (2 mg/L) y sin raíces.

Las plántulas provenientes del cultivo *in vitro* se plantaron en bandejas de polietileno de 70 alvéolos, que tenían una capacidad de 115 cm<sup>3</sup> y contenían un sustrato compuesto por materia orgánica (cachaza) y suelo Ferralítico Rojo compactado eútrico [18], en una proporción en volumen de 75 y 25 %, respectivamente. A las plántulas se les garantizó el riego por nebulización en los primeros 10 días, para lograr una elevada humedad relativa (85-90 %). Para el sombreo se utilizó una malla negra (70 % de reducción de luz solar). Las características químicas del sustrato se muestran fueron: como sustrato se empleó una mezcla de cachaza:suelo (75:25 %), pH 7.1; 13.01 % de microorganismos; 2700 ppm de fósforo; 4.92 cmol/kg de potasio; 28.9 cmol/kg de calcio; 8.39 cmol/kg de magnesio y 0.46 cmol/kg de sodio.

Se realizó la inmersión de las raíces de las plántulas durante 15 min (I), y 15 días después de la plantación, se realizó la aspersión foliar (A) de las mismas a razón de 2 mL por plántula.

Los tratamientos fueron los siguientes: 1: Control (sin I + A); 2: I + A con ácido indol acético (AIA; 2 mg/L); 3: I + A con QuitoMax® (1 mg/L); 4: I + A con QuitoMax® (5 mg/L); 5: I + A con QuitoMax® (10 mg/L).

#### Evaluaciones

A los 7, 14, 21 y 28 días, se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas, de manera similar a lo

descrito previamente; Altura de la planta (cm), medida con una regla graduada desde la base del tallo hasta la última hoja extendida; Número de raíces por planta, mediante el conteo del número de raíces y posterior cálculo de la media para cada tratamiento; Longitud de las raíces por planta (cm), medida con una regla graduada desde la base del tallo donde se insertan las raíces hasta la raíz de mayor longitud; Vigor de la planta, determinada mediante apreciación visual y establecida según la escala propuesta por Izquierdo *et al.* [16] (1, Poco vigoroso; 2, Vigoroso; 3, Muy vigoroso; contenido de clorofila a (mg/g MS); contenido de clorofila b (mg/g MS) y contenido de feopigmentos (mg/g MS).

Las variables fisiológicas (contenido de clorofila a, b y feopigmentos) se determinaron por medio de la metodología de Parsons *et al.* [19] en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 640.

#### Diseño experimental y análisis de los datos

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con 20 plántulas por tratamiento, y el experimento se repitió tres veces. El procesamiento de los datos, la comparación entre las medias, así como la verificación de la distribución normal y la homogeneidad de varianza, se realizaron como se describió previamente.

## Resultados y discusión

### Propagación *in vitro*

El porcentaje de supervivencia de las plántulas *in vitro* de pimiento (*C. annuum* L.) cultivar 'YAMIL' no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. En sentido general, la supervivencia de las plántulas fue elevada, entre 90-100 %. Resultados similares fueron obtenidos por Izquierdo *et al.* [16] al evaluar explantes *in vitro* de *C. annuum* L. var. 'glabriusculum' de 30 días de edad con el empleo de Pectimorf®. Esos investigadores informaron un 100 % de supervivencia de los explantes con el empleo de ese bioestimulador a concentraciones de 1 y 5 mg/L. Otro estudio mostró que un medio de cultivo MS suplementado con quitosano (150 mg) y agua de coco (250 mL) para explantes de orquídeas *Cattleya* spp. promovió un mayor porcentaje de mortalidad entre los tratamientos con menor cantidad de quitosano y agua de coco. El mejor índice de supervivencia fue de 97.14 % [20].

Con respecto al número de brotes por explante, en las plántulas de pimiento (*C. annuum* L.) cultivar 'YAMIL' se detectó diferencias significativas entre los tratamientos que se evaluaron en el 1er subcultivo (30 días), 2do subcultivo (60 días) y 3er subcultivo (90 días) (Tabla 1). Los mejores resultados se obtuvieron, por lo general, cuando se empleó el QuitoMax® en las diferentes concentraciones. El tratamiento 3 (MS + QuitoMax®; 1 mg/L) fue el mejor con 3.30 brotes por explante (30 días), 3.60 brotes por explante (60 días) y 4.00 brotes por explante (90 días). El tratamiento 4 (MS + QuitoMax®, 5 mg/L) tuvo muy buenos resultados en el 2do subcultivo (3.95 brotes por explante) y no se diferenciaron estadísticamente del tratamiento 3. Los resultados más bajos fueron para las plántulas del tratamiento 1 (control absoluto).

16. Izquierdo H, Alcaraz L, Rodríguez-Álvarez M. Micropropagación de chiltepin (*Capsicum annuum* L. cv. 'glabriusculum') mediante el empleo de una oligosacarina de origen péctico. *Acta Universitaria*. 2017;27(5):34-43.

17. Cochran W, Cox G. *Diseños experimentales*. Ciudad México: Ed. Trelas; 1990.

18. Hernández AJ, Pérez MJ, Bosch DI, Castro NS. Clasificación de los suelos de Cuba. San José de las Lajas: Ediciones INCA; 2015.

19. Parsons TR, Maita Y, Lalli CM. *A manual of chemical and biological methods for sea water analysis*. Oxford: Pergamon Press; 1984.

20. Valencia JE. Potencialidades del uso de quitosano y agua de coco como promotores del crecimiento *in vitro* de la orquídea *Cattleya* sp. (Trabajo de Diploma). Universidad de Granada; 2016.



Otros autores [21] informaron resultados similares al evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo y fitohormonas en la inducción de brotes y regeneración de plántulas provenientes de *C. annuum* var. 'annuum' (Jalapeño y Serrano), *C. annuum* var. 'glabriusculum' (piquín) y *C. chinense* (Habanero). Además, Li et al. [22] informaron un alto porcentaje de regeneración de brotes a partir de explantes de cotiledones de pimiento en un medio MS suplementado con 0.5 mg/dm de thidiazuron. Igualmente, Sanatombi y Sharma [23] concluyeron que la variedad 'Morok Amuba' generaba el mayor número de brotes por explante (4.7) en un medio de cultivo con elevada concentración de zeatina (10 mg/L), pero sin diferencias estadísticamente significativas de los tratamientos que estaban suplementados con 6-BAP (5 mg/L) + AIA (1 mg/L) y 6-BAP (10 mg/L) + AIA (1 mg/L), con 4.4 y 3.8 brotes por explante, respectivamente. Esta respuesta diferencial puede deberse a la especie, al tipo de explante, los reguladores del crecimiento y las concentraciones de los mismos.

Por otra parte, Vera [9] encontró un efecto promotor del crecimiento en explantes de orquídea *Catteya* spp. (3.82 brotes) al suplementar el medio de cultivo con quitosano, con el estímulo adicional del desarrollo caulinar y radicular de las plántulas. No obstante, Valencia [20] informó que un medio de cultivo MS enriquecido con quitosano y agua de coco aplicado a explantes de orquídeas generó los mejores resultados en todas las variables evaluadas al utilizar el tratamiento con 150 mg de quitosano y 250 mL de agua de coco. Además se obtuvieron tres brotes por frasco al aplicar estas concentraciones, las más elevadas. Tales resultados pudieron deberse a la interacción que ocurre entre el quitosano, el agua de coco (con alto contenido de auxinas, citoquininas y otros nutrientes) y las hormonas, que intervienen en un incremento en el número de brotes por explante (estímulo de la división celular y del crecimiento de las plántulas). Esos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo con el cultivar de pimiento 'YAMIL'.

La Figura 1 muestra los resultados relacionados con la evaluación de las diferentes variables morfológicas *in vitro* en las plántulas de pimiento (*C. annuum* L.) cultivar 'YAMIL'; con diferencias significativas entre los tratamientos.

En cuanto al número de las raíces, las plántulas tratadas con QuitoMax® alcanzaron los mejores resultados (tratamientos 3, 4 y 5), sin diferencias estadísticas entre ellas, y superaron a las de los tratamientos 1 y 2. Resultados similares se obtuvieron con la longitud de las raíces, pero el tratamiento 3 fue el mejor, ya que la longitud promedio fue de 3.54 cm, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de los tratamientos. De igual forma, las plántulas del tratamiento 3 fueron muy vigorosas, y se diferenciaron estadísticamente de las del resto de los tratamientos.

Manzano et al. [24] obtuvieron resultados similares al evaluar la propagación de ápices y nudos de *C. annuum* L., variedad 'Verano-1', implantados en medios de cultivo MS suplementados con diferentes concentraciones de 6-BAP, AIA y ácido indolbutírico (AIB), de forma combinada e independiente. La mejor respuesta la obtuvieron con AIB (3 mg/L) con urea (10 mg/L), y se obtuvieron las plantas más vigorosas.

Tabla 1. Número de brotes por explante durante el cultivo *in vitro* de las plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL' en tres tiempos de subcultivo y tratamiento con QuitoMax®\*

Variantes de medios de cultivo	Número de brotes por explante en el subcultivo		
	1 (30 d)	2 (60 d)	3 (90 d)
MS	0.60 d	0.75 d	0.85 e
MS + 6-BAP (2 mg/L)	1.25 c	1.50 c	1.80 d
MS + QuitoMax® (1 mg/L)	3.30 a	3.60 a	4.00 a
MS + QuitoMax® (5 mg/L)	1.90 b	3.95 a	2.45 c
MS + QuitoMax® (10 mg/L)	2.10 b	2.60 b	2.80 b
EEx	0.09***	0.15***	0.08***
DE	0.99	1.39	1.11

\* Se estudió un total de 60 explantes del experimento en las tres repeticiones. EEx: error estándar de la media. DE: desviación estándar. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ; \*\*\* muy significativo para  $p < 0.001$ ). MS: Medio basal de sales de Murashige y Skoog, control absoluto de medio al emplearse solo.

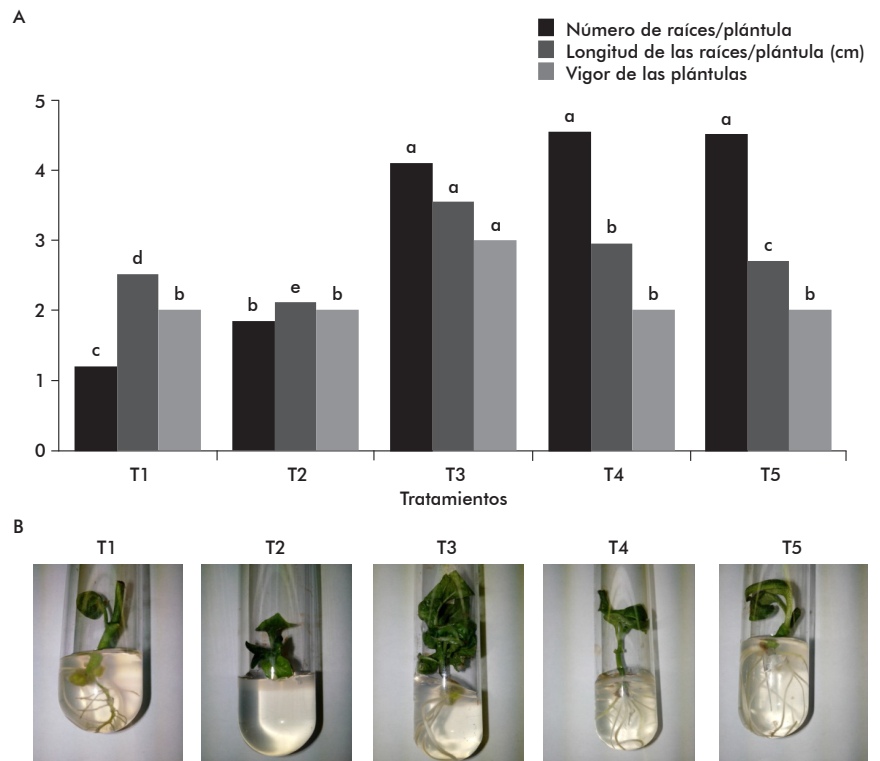


Figura 1. Parámetros de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL', en el 3er subcultivo de multiplicación, a los 90 días ( $n = 60$ , total de explantes del experimento en las tres repeticiones) tras el tratamiento con QuitoMax®. A) Número de raíces (EEx = 0.12\*\*\*, DE = 1.53), longitud de las raíces (EEx = 0.04\*\*\*, DE = 0.51) y vigor de las plántulas (EEx = 0.00\*\*\*, DE = 0.40). B) Muestras de plantas de pimiento en cada tratamiento. Tratamientos: T1, medio Murashige y Skoog (MS); T2, MS + 6-bencilaminopurina (6-BAP; 2 mg/L); T3, MS + QuitoMax® (1 mg/L); T4, MS + QuitoMax® (5 mg/L); T5, MS + QuitoMax® (10 mg/L). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ , \*\*\* significativo para  $p < 0.001$ ). EEx: error estándar de la media. DE: desviación estándar.

Además, con este medio de cultivo simultáneamente se formaron más raíces (entre 4-5).

También se obtuvo con un producto a base de quitosano el incremento en la biomasa y el número de brotes de raíces de *Vitis vinifera* L. en condiciones *in vitro* [25]. Por otra parte, Vera [9] informó que la aplicación

21. Valadez MG, Aguado GA, Carrillo G, Aguilar VH, Espitia E, Montes S, et al. *In vitro* propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper (*Capsicum* spp.) plants from commercially important genotypes. *In Vitro Cell Develop Biol Plant*. 2009;45(6):650-8.

de quitosano como regulador del crecimiento y como suplemento del medio de cultivo MS en explantes de orquídeas *Cattleya* spp. permitió obtener 2.96 raíces por explante, con una longitud de 2.26 cm. En este mismo género, Valencia [20] informó que cuando se suplementó el medio de cultivo basal MS con quitosano y agua de coco en explantes protocormos de orquídea, se obtuvieron plántulas más vigorosas y con una longitud de 4.50 cm como promedio.

Por otra parte, Marrero *et al.* [26], observaron que la aplicación del hidrolizado de quitosana al medio de cultivo modificó el crecimiento radical en plántulas *in vitro* de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). Este efecto se manifestó con un incremento de la longitud radical a la concentración de 5 mg/L, mientras que en las plántulas *in vitro* crecidas en el medio de cultivo con las concentraciones de 1 y 10 mg/L no se encontró respuesta en cuanto a la coloración de sus hojas y el vigor, ya que las mismas manifestaron un color verde oscuro y una buena apariencia.

Erazo [27] encontró efectos positivos en el crecimiento y número de raíces en las distintas concentraciones al evaluar el efecto de oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos en la morfogénesis de plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., en comparación con el tratamiento control. Sin embargo, Méndez [28] no encontró resultados positivos para el establecimiento *in vitro* del plátano ‘Dominicano Hartón’ (*Musa* AAB Simmonds), con cinco dosis de quitosano en el rango 2.5-20 g/L, para las variables número de hojas, desarrollo de las raíces y longitud de las plántulas.

Según nuestros resultados, para la micropropagación del pimiento (*C. annum* L.) cultivar ‘YAMIL’ se recomienda el empleo del medio de cultivo basal MS suplementado con QuitoMax® (1 mg/L).

Los resultados de la masa fresca y seca de las plántulas de pimiento (*C. annum* L.) cultivar ‘YAMIL’ se muestran en la Figura 2. Como se puede observar, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Para el caso de la masa fresca, las plántulas del tratamiento 2 (MS + 6-BAP, 2 mg/L) alcanzaron los mejores resultados al finalizar el tercer subcultivo *in vitro* (90 días). Para la masa seca, las plántulas del tratamiento 3 (MS + QuitoMax®, 1 mg/L) con 0.0984 g superaron a las del resto de los tratamientos.

De forma similar, Ospina y Rubiano [29] obtuvieron mayores tasas de crecimiento y masa seca en plántulas de plátano con la aplicación de biorreguladores a base de extractos vegetales y metabolitos microbianos, en relación a otros biorreguladores probados y el tratamiento control. Sus resultados evidenciaron el efecto positivo de los biorreguladores para potenciar el crecimiento de plántulas de plátano bajo condiciones de vivero. Esto puede deberse a que estos productos presentan concentraciones adecuadas de componentes bioquímicos y sustancias reguladoras de crecimiento que promueven un mejor desempeño fisiológico de las plantas. En este sentido, se ha sugerido que, si bien la actividad de las hormonas vegetales está controlada por la expresión de genes a diferentes niveles, hay genes de plantas que se activan en presencia de hormonas vegetales específicas. Por lo tanto, estimular la expresión génica puede ser una forma efectiva para mejorar la

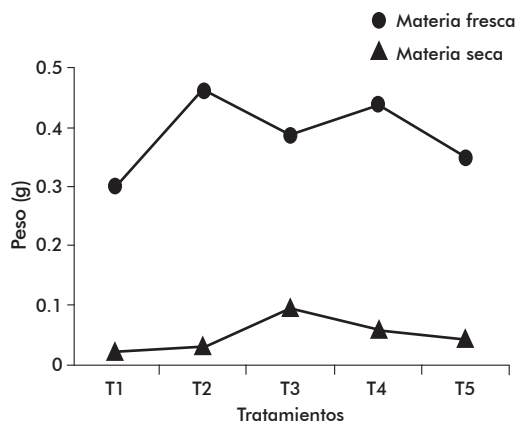


Figura 2. Parámetros de masa fresca (EEx = 0.12\*\*\*; DE = 1.53) y masa seca (EEx = 0.04\*\*\*; DE = 0.51) de las plántulas de pimiento (*Capsicum annum* L.) cultivar ‘YAMIL’, al finalizar el 3er subcultivo de multiplicación, tras el tratamiento con QuitoMax®. Se muestran los resultados a los 90 días y antes del trasplante a la fase de aclimatación (n = 60, total de explantes del experimento en las tres repeticiones). Tratamientos: T1, medio Murashige y Skoog (MS); T2, MS + 6-bencilaminopurina (6-BAP; 2 mg/L); T3, MS + QuitoMax® (1 mg/L); T4, MS + QuitoMax® (5 mg/L); T5, MS + QuitoMax® (10 mg/L). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey (p ≤ 0.05, \*\*\* significativo para p < 0.001).

germinación de las semillas y el crecimiento inicial de las plántulas [30].

Específicamente, los biorreguladores influyen en el crecimiento de las plantas y el metabolismo del nitrógeno, fundamentalmente debido a su contenido en hormonas, aminoácidos y otras moléculas de señalización.

### Aclimatación de las plántulas

Los resultados relacionados con el porcentaje de supervivencia de las plantas de pimiento (*C. annum* L.) cultivar ‘YAMIL’ se reflejan en la tabla 2. Como se puede observar, se estimaron diferencias significativas entre los tratamientos a los 7, 14, 21 y 28 días.

Tabla 2. Supervivencia de las plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) cultivar ‘YAMIL’, a los 7, 14, 21 y 28 días durante la fase de aclimatación tras el tratamiento con QuitoMax®\*

Variantes de medios de cultivo	Supervivencia de las plántulas (%)			
	7 d	14 d	21 d	28 d
Control (sin I + A)	60 d	60 c	65 c	70 c
I + A con AIA (2 mg/L)	85 b	90 ab	90 ab	90 ab
I + A con QuitoMax® (1 mg/L)	100 a	100 a	100 a	100 a
I + A con QuitoMax® (5 mg/L)	90 ab	90 ab	90 ab	90 ab
I + A con QuitoMax® (10 mg/L)	80 b	80 b	85 b	85 b
EEx	2.23***	2.24***	2.24**	3.16*
DE	14.18	12.69	10.59	9.18

\* I: Inmersión de las raíces de las plántulas 15 minutos. A: Aspersión foliar de las plántulas 15 días después de la plantación. AIA: ácido indolacético. n: total de 60 plántulas del experimento en las dos repeticiones. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey (p ≤ 0.05) (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001).

22. Li D, Zhao K, Xie B, Zhang B, Luo K. Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Rep.* 2003;21(8):785-8.

23. Sanatombi K, Sharma GJ. Micropropagation of *Capsicum annum* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanicae Cluj-Napoca.* 2007;3(1):57-64.

24. Manzano AR, Capote A, Pérez D. Propagación *in vitro* y regeneración directa a partir de hojas de *Capsicum annum*. CV. Verano-1. Agrotecnia de Cuba. 2005;1:36-42.

La supervivencia de las plantas fue elevada en el tratamiento 3 (I + A con QuitoMax®, 1 mg/L), con el 100 % de supervivencia y, en ese mismo período de tiempo, las plantas que se obtuvieron con el tratamiento 1 (Control) fueron las de peores resultados.

Orlinska y Nowaczyk [31] informaron una supervivencia similar entre 85-95 % en cuatro genotipos de *Capsicum*. Resultados similares a los anteriores con respecto a la supervivencia de las plántulas han sido expuestos por otros autores en diferentes especies del género *Capsicum* [85-90 %] [23, 24]. Además, Robledo y Carrillo [32] obtuvieron un 70 % de supervivencia a las 16 semanas en plantas de Chile (*C. annuum* L.), previamente propagadas mediante cultivo de cotiledones e hipocotilos. Izquierdo et al. [33] obtuvieron un 90 % de supervivencia a las concentraciones de 1 y 5 mg/L, al evaluar la influencia de un oligogalacturónico en la aclimatación de plántulas *in vitro* de banano (*Musa* spp.) clon 'FHIA-18' (AAAB).

Como se puede observar, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para la altura y vigor de plantas de pimiento (*C. annuum* L.) cultivar 'YAMIL'. El mejor tratamiento fue el 3 (I + A con QuitoMax®, 1 mg/L), con 3.99 cm de altura y las mismas fueron muy vigorosas (alcanzaron un valor de 3). Los resultados más bajos de manera general lo obtuvieron las plantas del tratamiento 1 (Control, sin I + A), como se muestra en la Figura 3.

Resultados similares en *C. annuum* L. fueron observados por Robledo y Carrillo [32], con plantas de apariencia vigorosa durante la fase de aclimatación, cuando las mismas se mantuvieron en una cámara de crecimiento y 16 semanas después se transfirieron a suelo, donde alcanzaron 6 cm de longitud sin el empleo de biorregulador del crecimiento alguno.

Izquierdo et al. [17] observaron resultados diferentes en la altura de plántulas de chiltepin en la fase de aclimatación con el empleo de un oligogalacturónico a dosis de 1, 5 y 10 mg/L. La altura con el empleo de este bioestimulador a las diferentes dosis evaluadas fue menor que en el tratamiento control y el tratamiento suplementado con 6-BAP.

Además, en condiciones de campo y en casas de cultivo, se ha evaluado el efecto del bioproducto QuitoMax® y de la quitosana a diferentes concentraciones, en el crecimiento, desarrollo y rendimiento de varios cultivos de interés agrícola. De hecho, se obtuvieron resultados positivos, lo que demuestra la característica estimuladora de estos productos en el crecimiento y establecimiento de las plantas [34-37].

La Figura 4 muestra los resultados relacionados con el número y longitud de raíces por planta de pimiento (*C. annuum* L.) cultivar 'YAMIL'. Como se puede observar, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos para las dos variables evaluadas.

Las plantas alcanzaron los mejores resultados con los tratamientos 2 (I + A con AIA, 2 mg/L) y 3 (I + A con QuitoMax®, 1 mg/L), con 4.09 y 4.08 raíces por planta, y 4.12 y 4.28 cm de longitud de las raíces, respectivamente. Los resultados más bajos de manera general se obtuvieron con las plantas del tratamiento 1 (Control, sin I + A).

Resultados similares a los nuestros fueron informados para el cultivo del tomate (*Solanum*

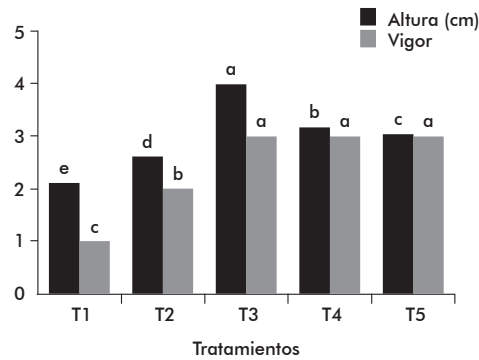


Figura 3. Parámetros de altura ( $EEx = 0.03^{***}$ ;  $DE = 0.64$ ) y vigor ( $EEx = 0.00^{***}$ ;  $DE = 0.80$ ) de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL' durante la fase de aclimatación, a los 28 días ( $n = 60$ , total de explantes del experimento en las tres repeticiones) tras el tratamiento con QuitoMax®. I, Inmersión de las raíces durante 15 minutos; A, Aspersión foliar de las plántulas 15 días después de la plantación. Tratamientos: T1, Control (sin I + A); T2, I + A con ácido indolacético (2 mg/L); T3, I + A con QuitoMax® (1 mg/L); T4, I + A con QuitoMax® (5 mg/L); T5, I + A con QuitoMax® (10 mg/L). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ , \*\*\* significativo para  $p < 0.001$ ).

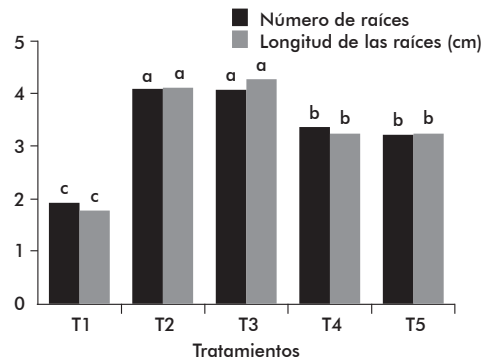


Figura 4. Parámetros de número ( $EEx = 0.05^{***}$ ;  $DE = 0.81$ ) y longitud de las raíces ( $EEx = 0.06^{***}$ ;  $DE = 0.92$ ) por planta de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL' durante a la fase de aclimatación a los 28 días ( $n = 60$ , total de explantes del experimento en las tres repeticiones). I, Inmersión de las raíces durante 15 minutos; A, Aspersión foliar de las plántulas 15 días después de la plantación. Tratamientos: T1, Control (sin I + A); T2, I + A con ácido indolacético (2 mg/L); T3, I + A con QuitoMax® (1 mg/L); T4, I + A con QuitoMax® (5 mg/L); T5, I + A con QuitoMax® (10 mg/L). Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ , \*\*\* significativo para  $p < 0.001$ ).

*lycopersicum* L.) variedad 'Mara' en condiciones de campo. El efecto combinado de la aplicación por imbibición de las semillas y aspersión foliar del bioproducto QuitoMax® a diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 g/L) generó valores favorables en la longitud radical a las concentraciones evaluadas [37].

Asimismo, Izquierdo et al. [16] observaron que el mayor número y longitud de las raíces en plántulas de chiltepin en la fase de aclimatación se obtuvo con el tratamiento con 10 mg/L de Pectimorf®.

25. Ait E, Eullaffroy P, Clément C, Vernet G. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Rep.* 2004;22(8):608-14.

26. Marrero MT, Reynaldo I, Cabrera G, Martínez M. Hidrolizado de quitosana como estimulador del crecimiento de vitroplantas de naranjo agrio (*Citrus aurantium*). *Cult Trop.* 1997;18(1):38-9.



Las respuestas mostradas por las distintas variables de crecimiento pudieran ser explicadas a partir de la capacidad de QuitoMax® para estimular el crecimiento de las plántulas, lo que también mantiene una estrecha relación con las concentraciones empleadas, el tamaño molecular y la forma de aplicación del producto al cultivo, que incluye el tiempo de contacto con el órgano que percibe la aplicación. En este caso, en la semilla se estimuló la velocidad de germinación y se aceleró el crecimiento. Se ha demostrado que las quitosanas estimulan los niveles de proteínas en las hojas, así como los niveles enzimáticos, y la resistencia basal de las plantas [12, 31, 34].

De igual forma, los resultados relacionados con el contenido de clorofilas a, b y feopigmentos en las plántulas de pimiento (*C. annuum* L.) cultivar 'YAMIL' se muestran en la tabla 3. Como se puede apreciar, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas para los diferentes tratamientos en todas las variables evaluadas.

En todos los casos, los mejores resultados lo alcanzaron las plantas que se aclimataron con QuitoMax®; las plantas del tratamiento 3 (I + A con QuitoMax®, 1 mg/L) superaron las del tratamiento control (Control, sin I + A).

Cuando se empleó el QuitoMax® (1-10 mg/L), el contenido de clorofilas a y b, así como el de feopigmentos de las plantas de pimiento (*C. annuum* L.) cultivar 'YAMIL', fueron superiores a los informados por otros autores. Estos resultados son inéditos en *Capsicum* spp., pero en otras especies no, tal es el caso de las hojas de banano (*Musa* spp.) que presentaron un mayor contenido de clorofilas cuando fueron tratadas con esta oligosacarina (1 mg/L) [33]. Por otra parte, el aumento del contenido de clorofilas foliares totales pudiera contribuir a incrementar la fotosíntesis, ya que las oligosacarinas como el QuitoMax® intervienen en el incremento en masa seca de las plantas.

Teniendo en cuenta lo anterior, se recomienda la inmersión de las raíces de las plántulas durante 15 minutos y la aspersión foliar posterior 15 días después de la plantación con QuitoMax® (1 mg/L) para la aclimatación de las plántulas de pimiento (*C. annuum* L.) cultivar 'YAMIL' *in vitro*.

Tabla 3. Supervivencia de las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL', a los 7; 14; 21 y 28 días durante la fase de aclimatización tras el tratamiento con QuitoMax®\*

Variantes de medios de cultivo	Contenido de clorofila (mg/g MS)		Feopigmentos
	a	b	
Control (sin I + A)	1.976 e	0.238 d	0.338 c
I + A con AIA (2 mg/L)	2.678 d	0.254 d	0.331 c
I + A con QuitoMax® (1 mg/L)	3.895 a	0.486 a	1.005 a
I + A con QuitoMax® (5 mg/L)	3.472 b	0.347 b	0.626 b
I + A con QuitoMax® (10 mg/L)	3.091 c	0.311 c	0.600 b
EEx	0.82***	0.90***	0.75**
DE	0.38	0.41	0.25

\* I: Inmersión de las raíces de las plántulas 15 minutos. A: Aspersión foliar de las plántulas 15 días después de la plantación. AIA: ácido indolacético. n: total de 60 plántulas del experimento en las dos repeticiones. Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## Conclusiones

La suplementación del medio de cultivo basal MS con biorreguladores del crecimiento vegetal de producción nacional, como el QuitoMax®, favoreció la propagación *in vitro* de los explantes de pimiento (*C. annuum* L.) cultivar 'YAMIL'. Asimismo, este producto se puede emplear como sustituto del 6-BAP en los medios de cultivo, ya que es inocuo, no interacciona de forma negativa los demás componentes del medio de cultivo y son de más fácil adquisición. Por otra parte, esta sustancia favoreció el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las plántulas, así como el contenido de clorofilas a, b y feopigmentos durante la fase de aclimatización. Esto permite que se pueda suministrar material de siembra de elevada calidad fitosanitaria y de mejor calidad a los productores.

## Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran la ausencia de conflictos de interés.

27. Erazo JD. Evaluación del efecto de los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos sobre la morfogénesis de plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* (Tesis de Diploma). Quito: Universidad de las Américas. 2016.

28. Méndez MO. Efectos de cinco dosis de quitosano para el establecimiento *in vitro* del plátano dominico hartón (*Musa AAB* Simmonds) en la zona de Daule (Tesis de Diploma). Santiago de Guayaquil, Ecuador: Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil. 2014.

29. Ospina J, Rubiano J. Evaluación de bioestimulantes en la propagación intensiva de semilla plátano Dominico Hartón en almácigo bajo cubierta plástica (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD, Dosquebradas Risaralda, Colombia. 2019. 48 p.

30. Subbarao S, Hussain P, Ganesh P. Bio-stimulant activity of protein hydrolysate, influence on plant growth and yield. J Plant Sci Res. 2015;2(2):1-6.

31. Orlinska M, Nowaczyk P. *In vitro* plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types. Turkish J Biol. 2015;39(1):60-8.

32. Robledo A, Carrillo G. Regeneración *in vitro* de plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocótilos. Rev Fitotecnia Mexicana. 2004; 27(2):121-6.

33. Izquierdo H, Núñez M, González MC, Proenza R, Cabrera JC. Influencia de un oligogalacturonido en la aclimatización de vitropiantas de banano (*Musa* spp.) del clon 'FHIA-18' (AAAB). Cult Trop. 2009; 30(1):37-42.

34. Morales D, Dell Amico J, Jerez E, Díaz Y, Martín R. Efecto del Quitomax® en el crecimiento y rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Cult Trop. 2016;37(1):142-7.

35. Morales D, Dell'Amico J, Jerez E, Rodríguez P, Álvarez I, Díaz Y, et al. Efecto del Quitomax® en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) sometidas a dos regímenes de riego. I. crecimiento y rendimiento. Cult Trop. 2017;38(2):119-28.

36. Morales D, Torres L, Jerez E, Falcón A, Dell Amico J. Efecto del Quitomax® en el crecimiento y rendimiento del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Cult Trop. 2015;36(3):133-43.

37. Terry E, Falcón A, Ruiz J, Carrillo Y, Morales H. Respuesta agronómica del cultivo de tomate al bioproducto QuitoMax®. Cult Trop. 2017;38(1):147-54.

Recibido en mayo de 2021.

Aprobado en octubre de 2021.