

Comunicación corta

Desinfección de semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar ‘YAMIL’ para su implantación *in vitro*

Víctor M. Calaña-Janeiro¹

Humberto Izquierdo-Oviedo^{2*}

María C. González-Cepero²

Yaritzza Rodríguez-Llanes³

Marian Rodríguez-Hernández¹

Dayne Horta-Fernández²

¹Universidad Agraria de La Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez”, carretera a Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba ²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

³Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. Mérida. México

*Autor para correspondencia. hoviedo1966@gmail.com; hioviedo@inca.edu.cu

RESUMEN

En el Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, se llevó a cabo un experimento con semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar ‘YAMIL’, en el cual se compararon diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) [1,25; 2,5 y 5 %] y tiempos de desinfección (uno, tres y cinco minutos) de las semillas de pimiento cultivar ‘YAMIL’ para su posterior implantación *in vitro*, en dos medios de cultivo, que contenían las sales del medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS), suplementado con sacarosa (15 y 30 g L⁻¹), con el objetivo de determinar el mejor tratamiento y tiempo de desinfección de las semillas de este cultivar de pimiento. Los resultados obtenidos en este trabajo, indicaron que el 100 % de las semillas se desinfectaron con el NaOCl al 2,5% por tres minutos o al 5 % durante tres minutos. El 100 % de las semillas germinaron y la mayor altura de las plántulas (5,84 cm), así como el número

de raíces por plántula (5,15) y el vigor de las mismas, mostraron los mejores resultados con la utilización del NaOCl (5 %) durante un minuto y el empleo del medio de cultivo MS suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹) que fueron estadísticamente superiores a los tratamientos controles. A partir de los resultados obtenidos se obtiene una metodología de desinfección para la implantación *in vitro* del pimiento cultivar ‘YAMIL’.

Palabras clave: contaminación, germinación, hortaliza, hipoclorito de sodio, sacarosa

Recibido: 06/12/2018

Aceptado: 05/07/2019

INTRODUCCIÓN

El pimiento es una de las especies hortícolas más importante para Cuba y el mundo, pertenece al género *Capsicum*, familia *Solanaceae*. El género *Capsicum* contiene alrededor de 25 especies silvestres y cinco cultivadas, que son: *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum baccatum* L. y *Capsicum pubescens* R y P ⁽¹⁾. Se desarrolla desde cerca del nivel del mar hasta los 2500 m s.n.m, abarcando diferentes regiones de México y otros lugares del mundo, razón por la cual se pudiera encontrar este cultivo en el mercado todo el año, por lo que su consumo es muy generalizado en fresco e industrializado en diversas modalidades ^(2,3).

De las especies cultivadas *Capsicum annuum* L. es la de mayor importancia económica, ya que es ampliamente consumida por la población mundial como condimento; además, sus frutos tienen propiedades medicinales, debido a que contienen aceites volátiles, capsaisicinoides, carotenoides, vitaminas, proteínas, fibras, antioxidantes y elementos minerales ⁽⁴⁻⁶⁾. Existen cultivares que se diferencian en forma, tamaño, color, sabor y usos culinarios ⁽⁷⁾.

Por otra parte, se ha visto que el uso de explantes para la regeneración de meristemos apicales ⁽⁸⁾, hojas, hipocotilos, cotiledones, raíces y embriones inducen la embriogénesis somática ⁽⁹⁻¹¹⁾. Sin embargo, no todos los cultivares responden de igual manera a estas técnicas ni a la desinfección previa de los explantes, por lo que se necesitan ajustes y conocimientos básicos de los mecanismos fisiológicos que intervienen en las diferentes etapas de la micropropagación de un cultivo ⁽¹²⁾.

‘YAMIL’, es un cultivar de polinización abierta, de un ciclo de 130 días, presenta buena adaptación climática, se recomienda para época de invierno (15 de septiembre hasta 15 de febrero); posee buena cobertura de follaje que permite proteger a los frutos de los golpes de sol y de los depredadores; comienza a florecer a los 29 días después del trasplante (ddt), su floración masiva ocurre a los 34 ddt; los frutos son verde que pasan a rojo en su madurez fisiológica; tiene 9,94 cm de largo y 9,35 cm de ancho, así como un grosor de 6,62 mm, la masa media del fruto oscila entre 200-230 g y tiene entre seis a siete frutos por planta; el rendimiento es de 30 tha^{-1} ; la acidez (0,16 %), °Brix (4,5), pH (5,5-5,6) y entre 170-175 mg en 100g de contenido de vitamina C; es resistente a Potuvirus; este genotipo está inscrito en el registro oficial de variedades del Ministerio de la Agricultura de Cuba ⁽¹³⁾.

En la actualidad se trabaja en el mejoramiento genético del cultivar ‘YAMIL’ para las altas temperaturas; por una parte, ya que es un genotipo para campo abierto y para mejorar la calidad de los frutos; por otra parte, en cuanto al contenido de licopeno. Por lo que obtener plántulas de este cultivar en un menor tiempo resulta imprescindible y se debe acudir a las técnicas biotecnológicas, por lo que se deben iniciar las investigaciones por la desinfección de las semillas para su implantación *in vitro* y disminuir el tiempo de mejoramiento con respecto a los métodos tradicionales.

Existe una amplia gama de agentes químicos que se emplean en la desinfección de los explantes antes de su inoculación *in vitro*, por lo que es imprescindible establecer el tipo de desinfectante a utilizar, el tiempo de los tratamientos y las concentraciones, ya que de la misma forma que estos actúan sobre los microorganismos, lo hacen sobre el material tratado y pueden ocasionarle daños irreparables ⁽¹⁴⁾.

La desinfección de las semillas de diferentes genotipos de *Capsicum* spp. se realizó con hipoclorito de sodio al 5 % durante 10 minutos ⁽¹⁵⁾. Por otra parte, Matos *et al.* ⁽¹⁶⁾, informaron que la desinfección adecuada de los explantes (estructuras embrión-endospermo) de semillas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.), se realizó con hipoclorito de sodio 1 % (v:v) en agitación durante siete minutos. También se utiliza el hipoclorito de calcio a concentraciones y tiempos de desinfección diferentes, en dependencia de la especie y el cultivar. Asimismo, se emplea también el cloruro de mercurio II (HgCl_2) en la desinfección de los explantes para iniciar el cultivo *in vitro* en diferentes especies de plantas, pero este agente desinfectante es muy tóxico, por lo que se debe emplear con mucha precaución.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, este trabajo se realizó con el objetivo de determinar el mejor tratamiento de hipoclorito de sodio y tiempo de desinfección de las semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar ‘YAMIL’ para su implantación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba.

Material vegetal

Se emplearon semillas certificadas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) del cultivar ‘YAMIL’ de la campaña 2016-2017.

Medio de cultivo

Se empleó como medio de cultivo basal las sales de Murashige y Skoog ⁽¹⁷⁾ [MS]. Las combinaciones de medios de cultivo fueron las siguientes:

- MS + 15 g L⁻¹ de sacarosa
- MS + 30 g L⁻¹ de sacarosa

El pH se ajustó a 5,8±0, 2 antes de realizar la esterilización del mismo en autoclave a 1,5 atmósferas de presión y 121 °C de temperatura durante 20 minutos.

En todos los casos se emplearán 10 mL de medio de cultivo por frasco.

Condiciones de cultivo

Todos los frascos con los explantes se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 24±2 °C, a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos entre 220-250 μmolm⁻²s⁻¹, con un foto período de 16 horas luz y ocho de oscuridad y humedad relativa entre 70-75 %.

Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L⁻¹) - Control.
2. Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L⁻¹) - Control.
3. Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (1,25 %) - 5 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L⁻¹).

4. Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (1,25 %) - 5 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L⁻¹).
5. Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (2,5 %) - 3 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L⁻¹).
6. Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (2,5 %) - 3 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L⁻¹).
7. Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (5 %) - 1 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L⁻¹).
8. Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución)+hipoclorito de sodio (5 %) - 1 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L⁻¹).

Evaluaciones

Se realizaron a los 7, 14 y 21 días, pero en el trabajo se presentarán los resultados de la última evaluación. Las variables evaluadas fueron las siguientes:

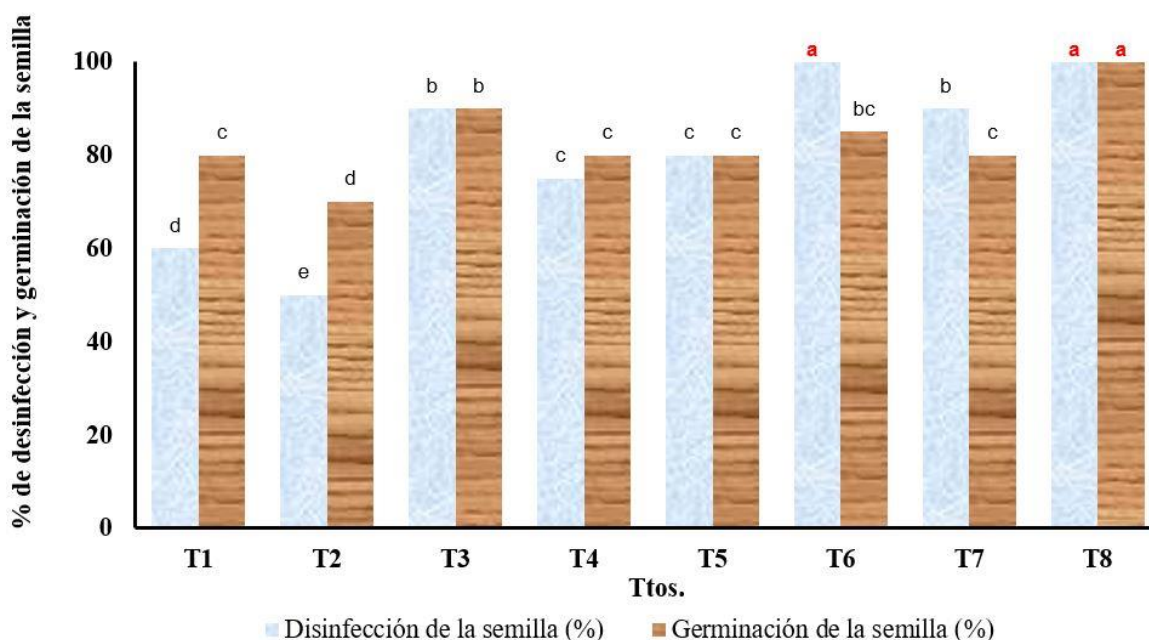
- Porcentaje de desinfección de las semillas [explantes]: se determinó el total de semillas que se desinfectaron, con respecto al total, que fueron inoculadas en el medio de cultivo. Posteriormente se determinó el porcentaje.
- Porcentaje de germinación de las semillas [explantes]: se determinó el total de semillas que germinaron con respecto al total que fueron inoculadas en el medio de cultivo. Posteriormente se determinó el porcentaje.
- Altura de las plántulas *in vitro* (cm): se midió con un papel milimetrado estéril que se encontraba en una placa de Petri®.
- Número de raíces por plántulas *in vitro*: se contó el total de raíces de cada plántula por tratamiento y posteriormente se obtuvo la media.
- Longitud de las raíces por plántulas *in vitro* (cm): se siguió el mismo procedimiento para medir la altura de las plántulas.
- Vigor de las plántulas *in vitro*: Se determinó según la escala propuesta por Izquierdo *et al* ⁽¹⁸⁾, donde: 1.- Poco vigoroso; 2.- Vigoroso; 3.- Muy vigoroso. Esta evaluación se realizó por apreciación visual.

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 dos veces en el tiempo. Los datos se procesaron mediante Análisis de Varianza de Clasificación Simple (ANOVA), con el programa SPSS 11,5 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL) y la comparación entre las medias se realizó de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados relacionados con el porcentaje de desinfección y germinación de las semillas (explantes) de pimiento se reflejan en la Figura 1. Como se puede observar hubo diferencias significativas en cuanto al porcentaje de desinfección de las semillas; el 100 % de las semillas de los tratamientos 6 y 8 se desinfectaron y no hubo diferencias entre las semillas de estos tratamientos, pero si se diferenciaron de las de los tratamientos 1 y 2. Es importante aclarar, que la contaminación de las semillas (explantes) en los diferentes tratamientos fue fundamentalmente con bacterias. Con respecto al porcentaje de germinación de las semillas, solo las del tratamiento 8 alcanzaron el 100 % de germinación y se diferenciaron estadísticamente del resto de los tratamientos.



- T1.- Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L⁻¹).- Control
- T2.- Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L⁻¹).- Control
- T3.- Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (1,25 %) - 5 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L⁻¹)
- T4.- Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (1,25 %) - 5 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L⁻¹)
- T5.- Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (2,5 %) - 3 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L⁻¹)
- T6.- Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (2,5 %) - 3 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L⁻¹)
- T7.- Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (5 %) - 1 minuto + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L⁻¹)
- T8.- Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (5 %) - 1 minuto + inoculación en el medio basal MS + sacarosa (30 g L⁻¹)

n.- total de semillas (explantes) del experimento en las dos repeticiones Ttos.- tratamientos

EEX.- error estándar de la media D.E.- desviación estándar

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos para la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)

Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) (** significativo para $p < 0,001$)

Figura 1. Porcentaje de desinfección (EEx = 3,25***; D.E = 4,10) y germinación (EEx = 2,90***; D.E = 3,00) de las semillas (explantes) de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL' en medios de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa, a los 21 días de inoculadas *in vitro*. n=60

El 100 % de las semillas de pimiento del cultivar 'Jalapeño M', se desinfectaron con 100 y 50 % de Clorox; sin embargo, el porcentaje de germinación fue superior con la concentración más elevada (92,6 %) y la más baja afectó la misma (64,2 %) ⁽¹⁹⁾.

Explantos obtenidos a partir de semillas de diferentes genotipos de *Capsicum* spp., se desinfectaron con agua que contenía Tween 20, etanol al 70 % y NaOCl al 5 % durante 10 minutos y obtuvieron un elevado porcentaje de germinación de las semillas ⁽¹⁵⁾. Por otra parte, Stanislava y Velichka ⁽²⁰⁾ también obtuvieron buenos resultados con respecto a la germinación de las semillas de los cultivares de pimiento 'Yasen F₁' y 'Kurtovskakapia 1619', cuando las mismas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de calcio al 5 % durante una hora.

Si bien el hipoclorito de calcio, es un buen agente desinfectante, es posible que en los resultados anteriores, se haya afectado un poco el porcentaje de germinación de las semillas en ambos cultivares de pimiento, ya que estas semillas estuvieron expuestas mucho tiempo al agente químico.

En otros cultivos como *Aloe vera* (L.) Burm. f., Lavanya y Thayamini ⁽²¹⁾, se informó que los brotes que extrajeron de la planta madre se lavaron con agua del grifo durante aproximadamente 40 minutos y después se desinfectaron con etanol al 70 % durante 30 segundos y posteriormente estos explantes se colocaron en Clorox al 20 % (5,25 % de NaOCl) con dos gotas de Tween 20 durante 30 minutos. Según otros autores ⁽²²⁾, cuando se realizó la desinfección durante un minuto en alcohol 96° y 20 minutos en NaOCl al 2 % (5,6 gL⁻¹ de cloro activo), con dos gotas de Tween 20, el porcentaje de contaminación *in vitro* de semillas de *Schinus fasciculata* (Griseb) J.M. Johnston. fasciculata (molle), implantada en agar, -agua fue de 16 %. Estos autores, informaron además, que el porcentaje de germinación fisiológica a los tres días de la inoculación en el medio de cultivo fue de 40 % y a los siete días alcanzaron el 84 %.

Otros autores desinfectaron semillas albahaca (*Ocimum basilicum* L.) con NaOCl al 10 % durante cinco minutos y etanol al 70 % durante 20 segundos ⁽²³⁾. En otras investigaciones se emplearon tres métodos para la desinfección de las semillas de *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz ⁽²⁴⁾, la primera desinfección la realizaron en una solución que contenía Mancozeb Benomilo (2 gL⁻¹ de Mancozeb; 0,6 gL⁻¹ de Benomil, más unas gotas de Tween 20) por 20 minutos y se colocaron en un agitador magnético; la segunda desinfección fue con una

solución de alcohol 75° por cinco segundos y, por último, las semillas se sumergieron en NaOCl al 1 % por 10 minutos.

Los fertilizantes químicos, como el Benomilo y el Mancozeb, son muy agresivos para emplearlos en la desinfección de explantes *in vitro*, con independencia de los resultados que se obtengan, ya que pueden ser tóxicos y de difícil remoción del explante *in vitro*, que posteriormente se convertirá en una planta, que consumen las personas y los animales y, además, afectan el medio ambiente.

La desinfección de los cultivares de berenjena (*Solanum melongena* L.) 'Mattu Gulla' y 'Perampalli Gulla', la realizaron introduciendo sus semillas en una solución jabonosa (dos o tres gotas de Tween 20) durante cinco minutos, seguido de un tratamiento con etanol al 70 % durante un minuto y posteriormente colocaron las semillas en cloruro de mercurio (II) (HgCl_2) 0,1 % (w/v) durante cinco minutos ⁽²⁵⁾. La germinación de las semillas de *Stenocereus queretaroensis* (F. A. C. Weber) F. Buxb. (una cactácea arborescente, endémica de México), tratadas con hipoclorito de sodio al 10 % durante cinco minutos, fue superior a las que no se trataron ⁽²⁶⁾.

El hipoclorito de sodio y calcio, así como el cloruro de mercurio (II) causan la muerte de los microorganismos infecciosos como bacterias y hongos exógenos, que permiten que haya un mayor índice de establecimiento en el material vegetal. Sin embargo, los dos primeros deben usarse a ciertas concentraciones y tiempos de desinfección, ya que son muy potentes y en el último caso, no debe emplearse en la desinfección de los explantes, ya que es muy tóxico para los mismos cuando se cultivan *in vitro* y muy difícil de remover de los mismos.

En la Tabla 1, se muestra la altura de las plántulas, el número y la longitud de las raíces, así como el vigor de las plántulas y hubo diferencias significativas entre los tratamientos en todas las variables que se evaluaron. Con respecto a la altura de las plántulas, el mejor tratamiento fue en el que se colocaron las semilla en NaOCl 5 % durante un minuto y las mismas se implantaron en el medio de cultivo MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, con 5,84 cm de altura de la plántula, que se diferenció estadísticamente de los tratamientos controles 1 (medio de cultivo MS suplementado con 15 g L⁻¹ sacarosa) y 2 (medio de cultivo MS suplementado con 30 g L⁻¹ sacarosa), que las plántulas alcanzaron 4,61 y 4,94 cm, respectivamente. Las plántulas del tratamiento 8, también se diferenciaron estadísticamente de las del resto de los tratamientos.

Tabla 1. Altura (cm), número y longitud (cm) de las raíces, así como el vigor de las plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL' en medios de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa, a los 21 días de inoculadas *in vitro*

No.	Tratamientos	Altura de la plántula (cm)	Número de raíces por plántula	Longitud de las raíces (cm)	Vigor de las plántulas
1	Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L ⁻¹).- Control	4,61 f	3,75 c	3,04 d	2 b
2	Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L ⁻¹).- Control	4,94 de	4,20 b	3,48 c	2 b
3	Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (1,25 %) - 5 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L ⁻¹)	4,89 e	4,35 b	4,08 a	2 b
4	Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (1,25 %) - 5 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L ⁻¹)	5,00 d	4,25 b	3,09 d	2 b
5	Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (2,5 %) - 3 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L ⁻¹)	5,23 c	4,35 b	3,16 d	2 b
6	Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (2,5 %) - 3 minutos + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L ⁻¹)	5,38 b	4,30 b	3,94 a	2 b
7	Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (5 %) - 1 minuto + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (15 g L ⁻¹)	5,25 c	4,60 b	3,45 c	2 b
8	Agua corriente + detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución) + hipoclorito de sodio (5 %) - 1 minuto + inoculación en el medio de cultivo basal MS + sacarosa (30 g L ⁻¹)	5,84 a	5,15 a	3,76 b	3 a
E.Ex(±)		0,02***	0,10***	0,04***	0,00***
D.E		0,36	0,57	0,41	0,33

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas entre tratamientos para la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). n=60

n.- total de plántulas (explantos) del experimento en las dos repeticiones EEx.- error estándar de la media

D.E.- desviación estándar

En relación con el número de raíces, las plántulas del tratamiento 8, fueron estadísticamente superiores a las del resto de los tratamientos, incluyendo a las de los tratamientos controles (1 y 2). Sin embargo, con respecto a la longitud de las raíces, las plántulas de los tratamientos 3 y 6, con 4,08 y 3,94 cm, respectivamente alcanzaron los mejores resultados (Tabla 1).

Finalmente, las plántulas más vigorosas fueron las del tratamiento 8, que alcanzaron un vigor de 3 y superaron a las de los tratamientos controles 1 y 2, con un vigor de 2 en ambos casos (Tabla 1).

Las plántulas del cultivar 'Jalapeño M', con aplicaciones de Clorox 50 % alcanzaron mayor altura y longitud de las hojas cotiledonares a diferencia de las plántulas en las que se empleó Clorox al 100 %. Sin embargo, no informaron diferencias significativas estadísticas con respecto al ancho de las hojas cotiledonares ni en la longitud de las raíces ⁽¹⁹⁾.

Otros autores ⁽²⁷⁾ en estudios realizados con *Escobaria cubensis* (Britton y Rose) Hunts, comúnmente denominado “cactus enano de Holguín”, informaron que el tratamiento de las semillas con 2 % de NaOCl y doble desinfección, fueron las que tuvieron mayores niveles de supervivencia de las plántulas; las mamilas respondieron mejor en cuanto a la supervivencia a las combinaciones mayores de concentración de NaOCl y el tipo de desinfección.

La obtención de diferentes tipos de explantes primarios de tres cultivares de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.: yemas de la corona y el meristemo de los hijuelos, a partir de tallos, que se lavaron previamente con detergente y, posteriormente, se transfirieron a una solución diluida de cloro comercial al 20 % (v/v) durante 10 minutos, observaron que a las cuatro semanas de cultivo, hubo brote de una yema apical en todos los cultivares, con una longitud de 3 a 4 mm, aproximadamente; después de cuatro semanas adicionales en el mismo medio de cultivo, hubo alargamiento de las hojas y del vástago (1 a 3 cm) y el alargamiento se incrementó con el tiempo, sin que se observara brotación lateral ⁽²⁸⁾. En sentido general, en este trabajo, las plántulas del tratamiento 8 (NaOCl al 5 % durante un minuto e inoculación de las semillas en el medio de cultivo basal MS suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), mostraron un desarrollo homogéneo, dada la alta sincronización que se observó en la germinación de las mismas. Además, este material constituyó una fuente adecuada de explantes de calidad para los experimentos posteriores.

A partir de estos resultado se propone una metodología de desinfección de las semillas de pimiento, cultivar 'YAMIL' para su implantación *in vitro*.

Pasos de la metodología:

1. Seleccionar semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL' que estén certificadas y síntomas aparentes de enfermedades fungosas o bacterianas.
2. Colocar las semillas en un beaker de 250 mL de capacidad y enjuagarlas con abundante agua del grifo y detergente comercial (0,5 g en 100 mL de solución).
3. Enjuagar las semillas con agua del grifo hasta eliminar toda la espuma proveniente del detergente.
4. En la cabina de flujo laminar, las semillas se colocan en hipoclorito de sodio (5 %) durante un minuto y se le agregan dos gotas de Tween 80 por cada 100 mL de solución y se agitaron.
5. Decantar la solución y enjuagar las semillas cuatro veces con agua destilada estéril.
6. Colocar las semillas en una placa de Petri® que contenga papel de filtro estéril, para eliminar la humedad en las mismas.
7. Inocular dos semillas por frasco, que contenga 10 mL de medio de cultivo MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa.

CONCLUSIONES

- Se estableció una metodología de desinfección adecuada para la implantación *in vitro* de las semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL', que garantiza la germinación de las semillas (explantos), así como la supervivencia y el crecimiento adecuados de las plántulas.
- La inoculación de las semillas se debe realizar en un frasco de cristal, que contenga 10 mL del medio de cultivo basal MS suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹).

BIBLIOGRAFÍA

1. Resources IB for PG. Genetic resources of capsicum: a global plan of action. IBPGR Secretariat; 1983.
2. Latournerie ML, Aguilar RVH, López LP, Ramírez MS, Corona TT, López ST, et al. Los recursos genéticos del chile *Capsicum* spp. México: estudio, conservación y utilización. Resúmenes Ejecutivos Ejercicio. 2010;157–9.
3. Palma J, Corpas FJ, Ruíz C, Molina T, Campos-Ramos MJ, Juanena A, et al. Los pimientos de las variedades Padrón, Piquillo, y Alegría riojana son una buena fuente de macro y microelementos para nuestra dieta [Internet]. Interempresas. 2016 [cited 2019

- Nov 21]. Available from: <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/154064-pimientos-variedades-Padron-Piquillo-Alegria-riojana-son-buena-fuente-macro.html>
4. Bosland PW, Votava EJ, International CAB. Peppers : vegetable and spice capsicums [Internet]. Wallingford, Oxon, UK ; New York : Cabi; 2000 [cited 2019 Nov 21]. Available from: <https://trove.nla.gov.au/version/46243014>
 5. Srinivasan K. Antioxidant potential of spices and their active constituents. Critical reviews in food science and nutrition. 2014;54(3):352–72.
 6. Palma JM, Sevilla F, Jiménez A, del Río LA, Corpas FJ, Álvarez de Morales P, et al. Physiology of pepper fruit and the metabolism of antioxidants: chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. Annals of botany. 2015;116(4):627–36.
 7. Rodríguez Ruiz M. Dinámica de los antioxidantes en la maduración y post-cosecha de pimiento *capsicum annum* l.) [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad de Granada; 2017 [cited 2019 Nov 21]. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=110114>
 8. Christopher T, Rajam MV. Effect of genotype, explant and medium on in vitro regeneration of red pepper. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1996;46(3):245–50.
 9. Agrawal S, Chandra N, Kothari SL. Plant regeneration in tissue cultures of pepper *Capsicum annum* L. cv. Mathania). Plant cell, tissue and organ culture. 1989;16(1):47–55.
 10. Kintzios S, Drossopoulos JB, Lympieropoulos C. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of rose. Journal of plant nutrition. 2000;23(10):1407–20.
 11. Savita, Pati PK, Virk GS, Nagpal AK. An Efficient Somatic Embryogenesis Protocol for *Citrus jambhiri* and Assessment of Clonal Fidelity of Plantlets Using RAPD Markers. Journal of Plant Growth Regulation. 2014;34:309–19. doi:10.1007/s00344-014-9465-6
 12. Pishbin N, Mousavi A, Kalatejari S, Shariatpanahi M, Jahromi BB. The effect of plant growth regulators and different types of explants on in vitro regeneration of sweet pepper *Capsicum annum* L.). International Journal of Biosciences (IJB). 2014;5(5):139–46.
 13. Rodríguez Y, Depestre T, Rodríguez SR, Camejo SM, Salgado JM, Hernández A, et al. Nuevas variedades de pimiento para campo abierto con buena calidad del fruto, resistentes a *Potyvirus*. Revista Agrotecnia, Cuba. 2015;39(2).
 14. Aniel Kumar O, Rupavathi T, Subba Tata S. Adventitious shoot bud induction in chili pepper *Capsicum annum* L. cv. X-235). International Journal of Science and Nature. 2012;3(1):192–6.

15. Orlinska M, Nowaczyk P. In vitro plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology*. 2015;39(1):60–8.
16. Matos Ruiz A, Capote Betancourt I, Pérez Martínez A, Lezcano Más Y, Aragón Abreu CE, Pina Morgado D, et al. Propagación in vitro de cultivares de *Moringa oleifera* Lam. *Cultivos Tropicales*. 2016;37:49–56.
17. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962;15(3):473–97.
18. Izquierdo Oviedo H, Alcaraz Meléndez L, Rodríguez-Álvarez M. Micropropagación de chiltepín *Capsicum annuum* L. cv. 'glabriusculum') mediante el empleo de una oligosacarina de origen péctico. *Acta universitaria*. 2017;27(5):34–43.
19. Calderón Aguirre C. Evaluación *in vitro* del brasinoesteroide BB-6 y del oligosacárido Pectimorf en *Capsicum annuum* L. variedad jalapeño M. [Internet] [Maestría]. [Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias]; 2013 [cited 2019 Nov 21]. 99 p. Available from: <https://cdigital.uv.mx/>
20. Grozeva S, Todorova V. *In vitro* regeneration in pepper *Capsicum annuum* L.) and characterization of plant–regenerants. *Electronic Journal of Biology*. 2015;11(1):17–22.
21. Lavakumaran L, Seran TH. Effect of 6-benzyl-aminopurine and thidiazuron on *in vitro* shoot organogenesis of *Aloe vera* (L.) Burm. f. *Chilean journal of agricultural research*. 2014;74(4):497–501.
22. Freire R, Carnevale NJ, Alzugaray C, Bueno MS. *Cultivo in vitro de Schinus fasciculata* (Griseb) JM Johnst var. *fasciculata* (molle). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2014;16(2):169–73.
23. Guerra-Cantú JA, Moreno-Limón S, Cárdenas-Ávila ML, González-Luna AR, Salcedo-Martínez SM, Sánchez-Sánchez AA. Efecto del estrés osmótico sobre el desarrollo in vitro de plántulas de albahaca *Ocimum basilicum* L. *Universidad Autónoma de Nuevo León*. 2016;1(1):207–13.
24. Rodríguez Beraud M, Tampe Pérez J, Hormazábal Vásquez N, Araneda Durán X, Tighe Neira R, Cárcamo-Fincheira P. Efecto de la escarificación y estratificación sobre la germinación *in vitro* de *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz. *Gayana. Botánica*. 2017;74(2):282–7.
25. Muthusamy A, Vidya KS, Pratibha PK, Rao MR, Vidhu SB, Guruprasad KP, et al. Establishment of an in vitro plantlet regeneration protocol for unique varieties of brinjal *Solanum melongena* L.) var. Mattu Gulla and Perampalli Gulla. 2014;
26. Solís-Márquez O, Plascencia-Escalante FO, Romero-Manzanares A, Cruz-Rodríguez JA, Ángeles-Pérez G, López-Acosta JC, et al. Potencial reproductivo de *Stenocercus queretaroensis* *Cactaceae* de San José de Cosalima, Zacatecas. *Revista mexicana de biodiversidad*. 2018;89(2):553–62.

27. Rodríguez de Francisco LE, Daquinta MA, Fornet Hernández E, Cantillo Ardeból R, Vásquez J. Propagación *in vitro* de escobaria cubensis (Britton Rose) Hunts. Ciencia y sociedad. 2013;38(2):345–75.
28. Rivas MAM, Mosquera HRM, Medina CLA. Micropropagación clonal y enraizamiento *ex vitro* de tres cultivares de piña *Ananas comosus* (L. Merr.) del Chocó, Colombia. Revista Biodiversidad Neotropical. 2014;4(2):133–40.