

## MICROPROPAGACIÓN DE *Capsicum annuum* (JALAPEÑO) CON APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

## MICROPROPAGATION OF *Capsicum annuum* (JALAPEÑO) WITH APPLICATION OF SILVER NANOPARTICLES

Aguilar Jiménez D.<sup>1\*</sup>, Herrera López H.<sup>1</sup>, Piña Guillén J.<sup>1</sup>, Salgado Bravo R.<sup>1</sup>, Pestryakov Alexey<sup>2</sup>, B. N.<sup>3\*\*</sup>

<sup>1</sup>Programa Educativo de Agrobiotecnología, Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros, Prolongación Reforma, Barrio de Santiago Mihuacán, Izúcar de Matamoros, Puebla. C.P. 74420.

<sup>2</sup>Research School of Chemical and Biomedical Technologies, Tomsk Polytechnic University, Lenin Avenue 30, Tomsk 634050, Russia.

<sup>3</sup>Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Tijuana-Ensenada Km 107, Ensenada 22860, México.

Autores para correspondencia: \*yolot777@hotmail.com, \*\* nina@cnyunam.mx

### RESUMEN

Se desarrolló un procedimiento para la micropropagación de *Capsicum annuum* (Jalapeño). Esta especie tiene mucho valor comercial en el mundo por tener varios usos. Sin embargo, el género *Capsicum* tiene problemas para propagarse exitosamente bajo condiciones *in vitro* por ser una especie recalcitrante y productora de etileno, además, el genotipo de la especie puede influir en la obtención de respuestas morfogénicas. La Empresa San Marcos, necesita plantas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) que mantengan su información genética y libres de microorganismos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue obtener plantas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) a partir de semillas establecidas *in vitro* con nanopartículas de plata (AgNPs) y reguladores de crecimiento para inducir su propagación mediante organogénesis directa. Para ello, se elaboraron tratamientos con las sales inorgánicas de Murashie y Skoog (1962), con y sin AgNPs. Además, diferentes reguladores de crecimiento (AIA 0.3 mg·L<sup>-1</sup> + KIN/BAP en 1, 3 y 5 mg·L<sup>-1</sup>) fueron adicionados para seleccionar el mejor tratamiento en la propagación de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro*, adicionando AgNPs a ese tratamiento y

determinando si ellos influyen o no en la micropropagación de la especie vegetal. Los datos de respuesta se analizaron mediante un análisis de varianza y la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ) con el paquete estadístico Minitab 17. La mejor respuesta para el establecimiento y germinación de semillas fue adicionando AgNPs, el mayor número de brotes (segmentos nodales) fue con AIA  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + KIN  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  más AgNPs mediante organogénesis directa.

**Palabras clave:** Micropropagación, hormesis, *Capsicum annum* (Jalapeño), AgNPs.

### **ABSTRACT**

A procedure for the micropropagation of *Capsicum annum* (Jalapeño) was developed. This species has a lot of commercial value in the world for having several uses. However, the genus *Capsicum* has trouble propagating successfully under *in vitro* conditions because it is a recalcitrant and ethylene-producing species, in addition, the genotype of the species can influence the obtaining of morphogenic responses. The San Marcos Company needs *Capsicum annum* (Jalapeño) plants that keep their genetic information and free of microorganisms. Therefore, the objective of this work was to obtain *Capsicum annum* (Jalapeño) plants from seeds established *in vitro* with silver nanoparticles (AgNPs) and growth regulators to induce their propagation by direct organogenesis. For this, treatments were developed with the inorganic salts of Murashie and Skoog (1962), with and without AgNPs. In addition, different growth regulators (AIA  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + KIN / BAP at 1, 3 and  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added to select the best treatment in the propagation of *Capsicum annum* (Jalapeño) *in vitro*, adding AgNPs to that treatment and determining whether or not they influence the micropropagation of the plant species. The response data were analyzed using an analysis of variance and the Tukey test ( $p = 0.05$ ) with the statistical package Minitab 17. The best response for the establishment and germination

of seeds was adding AgNPs, the highest number of outbreaks (nodal segments) was with AIA 0.3 mg·L<sup>-1</sup> + KIN 3 mg·L<sup>-1</sup> plus AgNPs by direct organogenesis.

**Keywords:** Micropropagation, hormesis, *Capsicum annum* (Jalapeño), AgNPs.

## **INTRODUCCIÓN**

El cultivo de chile es uno de los cultivos agrícolas más importantes en el mundo. Las plantas de este cultivo son valiosas por sus frutos, las cuales, pertenecen al género *Capsicum* y a la familia *Solanaceae* (Sanatombi y Sharma, 2007). Los frutos de chile se emplean para preparar diferentes comidas en el mundo, es utilizado para elaborar diversos productos farmacéuticos, cosméticos y en la industria. Los países que más producen chile son China, México, Turquía y Estados Unidos (Valadez-Bustos et al., 2009). El género *Capsicum* tiene entre 25 especies silvestres y 5 especies domesticadas (Sanatombi y Sharma, 2007). Sin embargo, algunos inconvenientes que se pueden presentar en el manejo agronómico del cultivo de chile son: poca viabilidad, bajo porcentaje de germinación y alta probabilidad de sufrir daños por ataque de plagas y enfermedades (Nuez et al. 1996; Otrushy et al., 2011). A pesar de ello, *Capsicum annum* L., es la especie más importante desde el punto de vista económico, con frutos de textura suave y diferente pungencia. Su propagación es comúnmente por semilla, sin embargo, al ser plantas de polinización cruzada, muestran una alta heterogeneidad en la población de semillas obtenidas, lo cual, eleva los costos de producción ya que es necesario emplear grandes cantidades de semilla comercial y garantizar los rasgos agronómicos deseados (Sanatombi y Sharma, 2006). Por ello, Ochoa-Alejo and Ramírez-Malangón (2001) y Santana-Buzzy et al. (2012), sugieren que la Biotecnología vegetal, específicamente el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, puede beneficiar al género *Capsicum* al obtener plantas de calidad genética y varietal, referente a ello, ya se cuenta con algunos protocolos de cultivo *in vitro* como lo publicado por Sanatombi y Sharma (2008) para la propagación

*in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq., Valera-Montero y Phillips (2005) mediante la formación de callo organogénico en *Capsicum baccatum*; López-Puc et al. (2006) mediante embriogénesis somática en *Capsicum chinense* Jacq., Joshi and Kothari (2007) mediante altos contenidos de cobre en el medio de cultivo que mejoran la diferenciación y alargamiento de brotes de *Capsicum annuum* a partir de cotiledones; Bello-Bello et al. (2010) reportan la proliferación y elongación de brotes *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq empleando biorreactores de inmersión temporal; Peddaboina et al. (2006) menciona la regeneración de plantas y multiplicación de brotes *in vitro* de cuatro especies de *Capsicum* usando thidiazuron (TDZ); Gogoi et al. (2014), también proponen un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq; Orlinska y Nowaczyk (2015), mencionan la regeneración *in vitro* de cuatro genotipos de *Capsicum* mediante diferentes explantes; Fidemann et al. (2016) reportan la obtención de plantas de *Capsicum baccatum* mediante la germinación de semillas *in vitro* en un medio de cultivo con ácido giberélico; Barroso et al. (2017), reportan efectos genéticos en la germinación *in vitro* y el desarrollo de plántulas de pimiento picante en un medio de cultivo únicamente con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962). Sin embargo, de toda la familia *Solanacea*, *Capsicum* es el género que presenta problemas para trabajarse *in vitro* ya que es una especie recalcitrante, posiblemente por la producción de etileno, regulador de crecimiento que afecta las respuestas morfológicas (Kumar et al., 1998; Santana-Buzzy et al., 2005, 2006), y además, su producción también está directamente relacionada con la concentración de auxinas afectando el metabolismo y transporte de la misma (Kende, 1993). También se ha demostrado en mutantes de *Arabidopsis* que el etileno actúa a nivel de receptores (etr1 y eti5) en las membranas celulares y que puede ser inhibida su biosíntesis o su efecto mediante el empleo de varias sustancias (Taiz, L. y Zeiger, 2006) una de ellas son las nanopartículas de plata (AgNPs), que también tienen efecto

microbicida (Spinoso-Castillo, et al., 2017). Por lo tanto, el éxito en la regeneración *in vitro* de plantas de *Capsicum* bajo esas condiciones se ve muy limitado (Liu et al., 1990; Ochoa-Alejo and Ramírez-Malangón, 2001; Santana-Buzzy et al., 2012). Con base al presente contexto, es fundamental generar protocolos para la micropropagación de plantas de *Capsicum annuum* L. var. Jalapeño, que permitan un escalamiento a nivel comercial y poder realizar transferencia agrobiotecnológica al sector productivo. En este contexto, el objetivo del presente proyecto fue evaluar el efecto de nanopartículas de plata en la obtención y micropropagación de plantas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) a partir de semillas establecidas *in vitro*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar del experimento**

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* de la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros, ubicada en Prolongación Reforma, Barrio de Santiago Mihuacán, Izúcar de Matamoros, Puebla. C.P. 74420.

### **Material vegetal**

Se emplearon como explantes, semillas cigóticas de *Capsicum annuum* (Jalapeño), las cuales, fueron proporcionadas por la empresa “San Marcos” en el mes de septiembre del presente año.

### **Efecto de nanopartículas de plata durante el establecimiento y germinación de semillas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro***

Para evaluar el efecto microbicida de las nano-partículas de plata AgROVIT-CP (Bionag S.A.P.I. de C.V.) y lograr el establecimiento *in vitro* de las semillas, se prepararon 200 mL de medio de cultivo con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MS) (1962) al 100 % de su concentración suplementado con tiamina  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , myo-inositol  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

<sup>1</sup>, sacarosa 30 g·L<sup>-1</sup>, agar 7 g·L<sup>-1</sup>. Antes de agregar el agar, el volumen final se dividió en dos partes iguales y a una de ellas se le colocaron nano-partículas de plata de acuerdo a la metodología reportada por Spinoso-Castillo, et al. (2017), se les ajustó pH a 5.7 ± 0.01, se vertieron 10 mL de medio de cultivo por tubo de ensayo y se taparon con tapas de aluminio para meterse en una autoclave horizontal a 1.5 Kg·cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos. Las semillas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) fueron colocadas en una solución de agua más detergente líquido para agitarse vigorosamente, posteriormente se colocaron en etanol al 70 % (v/v) por 3 minutos, pasado ese tiempo, se enjuagaron con agua esterilizada y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (cloralex®) al 10 % (v/v) durante 10 a 15 minutos, transcurrido el tiempo, se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada en una campana de flujo laminar y se colocó una semilla en cada tubo de ensayo con ayuda de pinzas de disección esterilizadas. Finalmente, se sellaron los tubos de ensayo con película plástica, se etiquetaron y se mantuvieron en condiciones del área de incubación durante dos meses con lámparas fluorescentes de luz blanca.

#### **Obtención de plántulas y multiplicación de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro***

Se buscó inducir nuevos brotes a partir de plántulas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, para ello, se elaboraron siete tratamientos con el medio de cultivo MS básico antes descrito, se separó en siete partes iguales y se adicionó ácido indol-3-acético (AIA) 0.3 mg·L<sup>-1</sup> a seis de los tratamientos, después, se adicionaron por separado las citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) y kinetina (Kin) en 1, 3 y 5 mg·L<sup>-1</sup> cada una de ellas, sólo a una de las siete partes del medio de cultivo MS básico no se le agregaron reguladores de crecimiento y éste fue considerado nuestro tratamiento control. Antes de agregar agar-agar 7 g·L<sup>-1</sup>, se ajustó pH en un rango de 5.8 a 5.85 y todos los tratamientos se vertieron en tubos de ensayo (10 mL/tubo) obteniendo 10 repeticiones por tratamiento. Los tubos de ensayo se taparon con tapas de aluminio

para meterse en una autoclave horizontal a  $1.5 \text{ Kg}\cdot\text{cm}^2$  de presión durante 15 minutos. Posterior a la polimerización de los medios de cultivo, se colocó una semilla en cada tubo de ensayo con ayuda de pinzas de disección esterilizadas, los tubos fueron sellados con película plástica, se etiquetaron y se mantuvieron en condiciones del área de incubación durante dos meses con lámparas fluorescentes de luz blanca. Después de obtener plántulas por tratamiento (a las cuatro semanas), se seccionó la parte apical de cada una de ellas por tratamiento (2 cm aproximadamente) y se colocaron nuevamente, una sección apical, por cada tubo de ensayo según el tratamiento correspondiente, los tubos fueron sellados con película plástica, se etiquetaron y se mantuvieron en condiciones del área de incubación para evaluar la multiplicación *in vitro*. Cada tubo de ensayo, con una semilla o sección apical, se consideró como unidad experimental.

#### **Efecto de las nanopartículas de plata en la multiplicación de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro***

A partir del caso anterior, el tratamiento que favorezca la mayor proliferación de nuevos brotes o material vegetal (segmentos nodales) *in vitro* para llevar a cabo la micropropagación de *Capsicum annuum* (Jalapeño), será el medio de cultivo que se usará para ser dividido en dos partes iguales, a una de ellas, se le agregaran nano-partículas de plata (Spinoso-Castillo, et al., 2017) para determinar si su presencia *in vitro* influye en alguna respuesta organogénica diferente durante la fase de multiplicación. Se verterán 10 mL de medio de cultivo en cada tubo de ensayo y se colocará un segmento nodal por recipiente, considerándose a cada tubo de ensayo como la unidad experimental, teniendo así, 10 repeticiones por tratamiento. Posteriormente a la siembra, se mantendrán los recipientes en el área de incubación bajo luz fluorescente color blanco durante cuatro semanas.

#### **Análisis de datos**

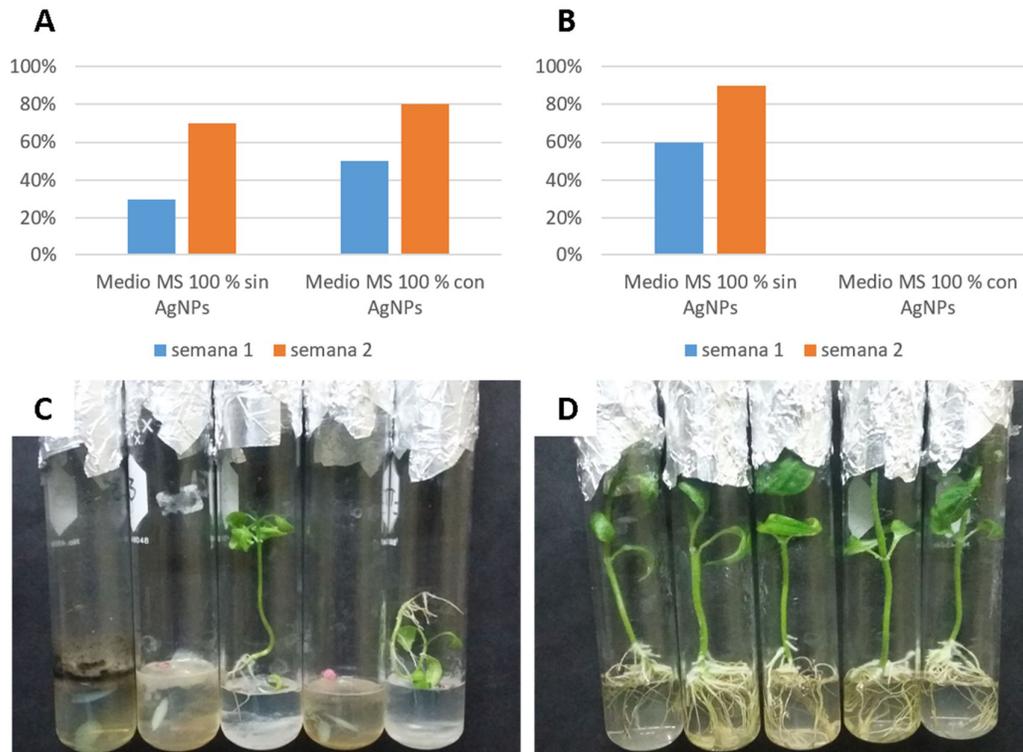
Para la obtención de datos de respuesta *in vitro* se van a considerar 10 repeticiones por tratamiento tomando un tubo de ensaye como unidad experimental con un explante cada uno y registrando las observaciones cada semana durante 8 semanas. Los datos se someterán a análisis de varianza y se aplicará la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ) para definir la diferencia entre los efectos medios de los tratamientos. El paquete estadístico empleado será Minitab 17.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Efecto de nano-partículas de plata durante el establecimiento y germinación de semillas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro***

Las respuestas obtenidas indican que esta variedad de *Capsicum annuum* posiblemente no presenta problemas serios por efecto de la triple respuesta al etileno bajo condiciones *in vitro* a partir de semilla ya que hubo un buen porcentaje de germinación en ausencia de AgNPs, sin embargo, el porcentaje de germinación fue mejor con AgNPs (Figura 1A), respuesta que coincide con lo publicado por Shah y Belozerova (2009) en semillas de lechuga y cuyo efecto puede ser porque las AgNPs mejoran la eficiencia del uso de nutrientes (Jhazab et al., 2015). No obstante, las plántulas obtenidas en ausencia de AgNPs presentaron caída prematura de hojas (Santana-Buzzy et al., 2005, 2006) y gravitropismo negativo (Figura 1C). Sin embargo, la presencia de AgNPs en el medio de cultivo resulta vital para evitar la presencia de microorganismos contaminantes, principalmente bacterias, las cuales, crecieron dentro y sobre el medio de cultivo en un 90 % aún después de someter el medio de cultivo a esterilización por vapor de agua mediante una autoclave tipo horizontal a 121 °C por 25 minutos (Figura 1C y D), coincidiendo los resultados con lo que reporta Spinoso-Castillo, et al. (2017) y Cardoso (2016) sobre el efecto microbicida de las AgNPs (Figura 1B).

También, las plántulas obtenidas en medio de cultivo con AgNPs, muestran mejor estructura y vigor con un color verde intenso y abundantes raíces con pelos absorbentes, posiblemente por la ausencia de contaminantes que compiten y afectan a las plántulas o por un efecto de hormesis al adicionar AgNPs como lo reporta Bello-Bello et al. (2017).



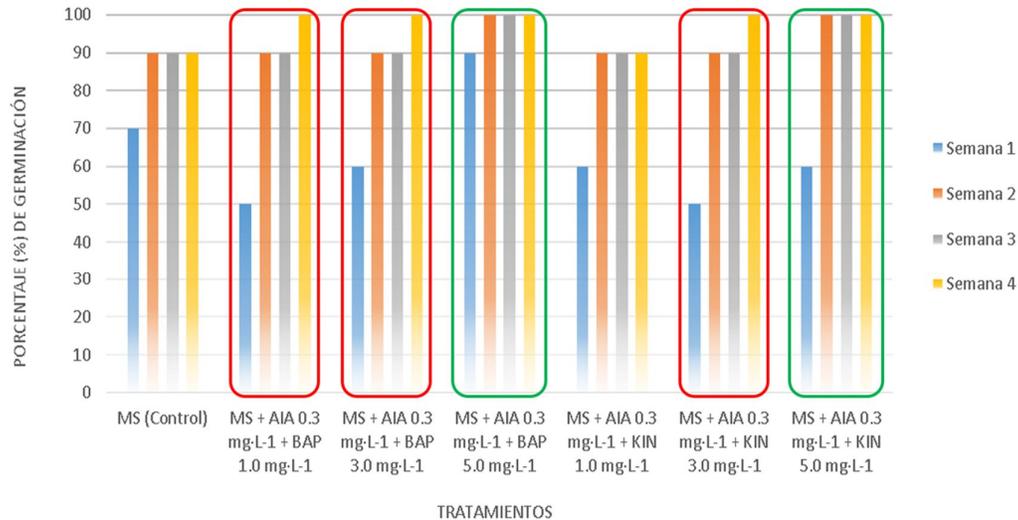
**Figura 1.** Porcentaje de germinación y contaminación durante el establecimiento *in vitro* de semillas de *Capsicum annuum* (Jalapeño). A) Germinación de semillas *in vitro* sin y con AgNPs B) Presencia de bacterias en el medio de cultivo sin y con AgNPs C) Plántulas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) a seis semanas de cultivo sin AgNPs D) Plántulas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) a seis semanas de cultivo con AgNPs.

### **Obtención de plántulas y multiplicación de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro***

Las respuestas obtenidas indican que la germinación de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro* no depende de la presencia de reguladores de crecimiento vegetal, sin embargo, al parecer las concentraciones más altas de ambas citocinictas con auxina (BAP y KIN 5 mg·L<sup>-1</sup> + AIA 0.3 mg·L<sup>-1</sup>) favorecen el 100 % de germinación a partir de la segunda semana de realizar el establecimiento *in vitro* (Figura 2) con respecto a los demás

tratamientos, en los tratamientos 2, 3 y 6 (AIA  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + BAP  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , AIA  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + BAP  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y AIA  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + KIN  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), respectivamente, también se obtuvo el 100 % de germinación observándose hasta la cuarta semana de realizar el establecimiento. Por otra parte, en el tratamiento 5 (AIA  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + KIN  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), a pesar de tener reguladores de crecimiento, la respuesta a la germinación fue similar al tratamiento control, esto indica posiblemente que la semilla de esta especie vegetal tiene problemas de germinación por otros factores (pueden ser genéticos) y no precisamente por el efecto de etileno como indica Barroso et al. (2017) en semillas de pimiento picante cultivadas únicamente en el medio MS (1962).

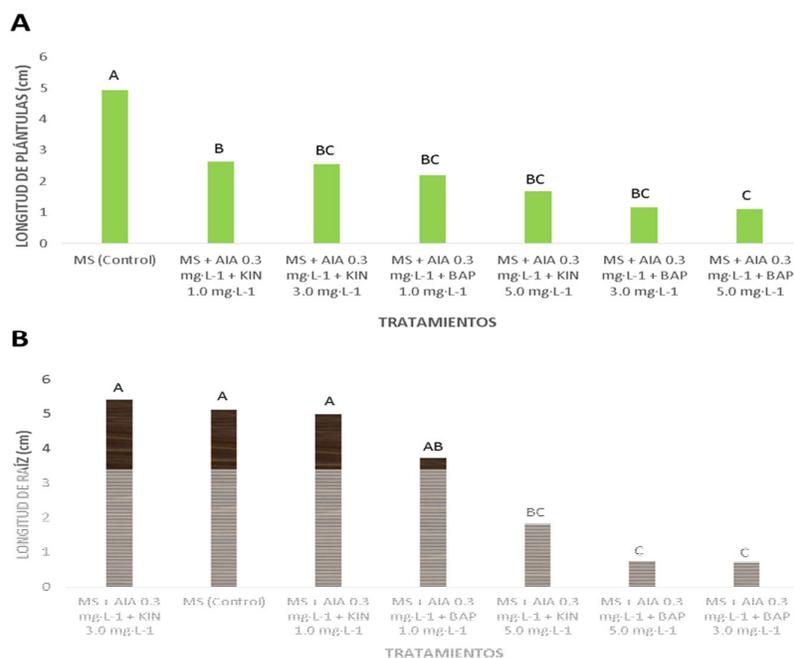
En otro caso, Fidemann et al. (2016) reportan la obtención de plantas a partir de semillas de *Capsicum baccatum in vitro* de forma similar al presente estudio, pero empleando ácido giberélico, fitohormona reportada ampliamente para favorecer la germinación de semillas al activar enzimas tipo alfa amilasas que degradan el almidón del endospermo en azúcares más simples para ser llevados vía escutelo hasta el embrión. No obstante, el porcentaje de germinación de semillas en *Capsicum annuum* (Jalapeño), con o sin fitohormonas, es aceptable ya que el porcentaje más bajo de germinación fue del 90 %. Sin embargo, parece ser que la concentración de determinadas fitohormonas puede acelerar dicho proceso y obtener resultados en dos semanas (Figura 2), por ello, es conveniente establecer otro diseño de tratamientos más amplio y poder corroborar si vale la pena el empleo de fitohormonas para la obtención de plantas *in vitro* a partir de semilla en menos tiempo.



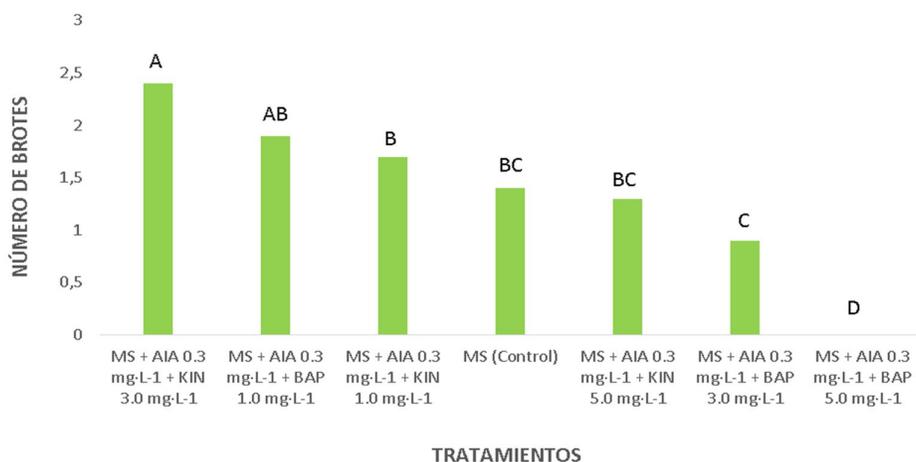
**Figura 2.** Efecto de reguladores de crecimiento en la germinación de semillas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) para obtener plántulas *in vitro*.

Para inducir la formación de brotes de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro*, se observó que los segmentos nodales no presentaron la neoformación de brotes y en los tratamientos con fitohormonas se obtuvieron plantas de menor tamaño con respecto al tratamiento control (Figura 3A) pero más compactas, es decir, menor distancia de entrenudos, esto puede ser favorable ya que a mayor número de entrenudos se pueden obtener mayor número de segmentos nodales para multiplicación como ocurrió en el tratamiento con AIA 0.3 mg·L<sup>-1</sup> + KIN 3 mg·L<sup>-1</sup> (Figura 4), el cual no presenta callo y favorece la formación de raíces (Figura 3B), estas respuestas pueden favorecer la multiplicación de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro* y su posterior aclimatación, resultados superiores (2.4 brotes) a lo reportado por Sanatombi y Sharma (2008) (1.3 y 2.3 brotes) mediante el empleo de KIN y BAP, respectivamente, en 5 mg·L<sup>-1</sup>. No obstante, reportan mayor número de brotes (3.7 brotes) cuando combinan BAP 10 mg·L<sup>-1</sup> más AIA 1 mg·L<sup>-1</sup>, y cuando emplean BAP 15 mg·L<sup>-1</sup> (3.8 brotes), concentraciones de fitoreguladores hasta 80 % más con respecto a las utilizadas para *Capsicum annuum* (Jalapeño). Por otra parte, en *Capsicum annuum* (Jalapeño), los tratamientos con BAP presentaron inhibición total de

raíz (Figura 3B) y favorecen la formación de callo en la base de los segmentos nodales, incrementándose al aumentar la concentración de BAP. KIN también inhibió en menor cantidad la formación de raíz sólo en la concentración más elevada y sin indicios de callo (Figura 3B). Resultados diferentes y superados 83.56 % más por Valadez-Bustos et al. (2008) en *Capsicum chinense* mediante el cultivo de hipocotilos con AIA 0.3 mg·L<sup>-1</sup> y BAP 5 mg·L<sup>-1</sup> (14.6 brotes); en *Capsicum annuum* (Jalapeño) obtuvieron 7.1 brotes también a partir de hipocotilos adicionando al medio de cultivo AIA 0.3 mg·L<sup>-1</sup> y BAP 4 mg·L<sup>-1</sup>. Esto significa que deben de estudiare otros tipos de explantes en *Capsicum annuum* (Jalapeño) y posiblemente más concentraciones y combinaciones de fitohormonas. Finalmente, en el tratamiento con AIA 0.3 mg·L<sup>-1</sup> y BAP 5 mg·L<sup>-1</sup>, la respuesta no se pudo observar ya que, al realizar el cultivo de segmentos nodales, estos se contaminaron en su totalidad.



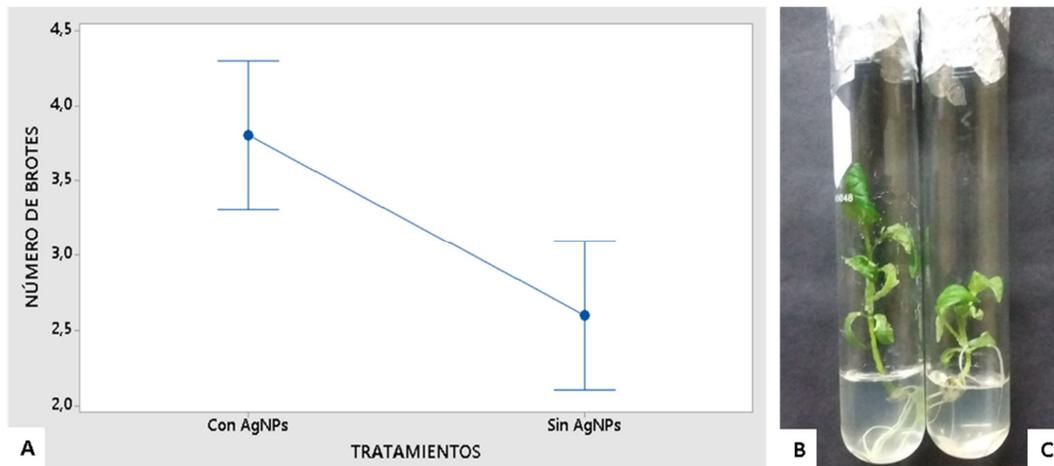
**Figura 3.** Longitud de plántula y raíz de *Capsicum annuum* (Jalapeño) a las tres semanas *in vitro*. Los tratamientos que presentan la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p = 0,05$ ).



**Figura 4.** Efecto de reguladores de crecimiento en la multiplicación de brotes (segmentos nodales) de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro*. Tratamientos que no tienen la misma letra son significativamente diferentes (Tukey,  $p=0,05$ ).

#### Efecto de las nanopartículas de plata en la multiplicación de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro*

Hasta el momento, no se reportan a las AgNPs como “regulador de crecimiento vegetal o fitohormona”, sin embargo, su presencia en los medios de cultivo favorece la obtención de mejores respuestas morfogénicas, efecto que se le ha denominado hormesis (fenómeno que depende de la concentración caracterizado por estimular el crecimiento a dosis bajas e inhibirlo a dosis altas) (Calabrese, 2003; Iavicoli et al. 2010 y Calabrese, 2016) y los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con lo reportado por Bello-Bello et al. (2017) en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum spp.* Cv. Mex 69-290) mediante un sistema de biorreactores de inmersión temporal y por (Spinoso-Castillo, et al., 2017) en la regeneración *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) también mediante biorreactores de inmersión temporal. El presente análisis indica que la respuesta de hormesis puede suceder en diferentes plantas por acción de AgNPs, ya que su presencia puede provocar un estrés leve induciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) para activar defensas antioxidantes, señalización de fitohormonas ante el estrés o favoreciendo respuestas adaptativas de crecimiento (Poschenrieder et al., 2013).



**Figura 5.** Efecto de AgNPs adicionadas al mejor tratamiento con reguladores de crecimiento para multiplicación de brotes (segmentos nodales) de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro*. A) Número de segmentos nodales con y sin AgNPs. B) Planta cultivada con AgNPs. C) Planta cultivada sin AgNPs. Se muestra diferencia significativa ( $3.8 \pm 0.789$  y  $2.6 \pm 0.699$ , respectivamente) según Tukey,  $p=0,05$ .

## CONCLUSIONES

La presencia de AgNPs en el medio de cultivo favoreció el establecimiento de semillas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro* al evitar el crecimiento de bacterias y hongos en los medios de cultivo (tratamientos).

La concentración más elevada de citocinas con auxina (BAP y KIN  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + AIA  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), favorecieron el tiempo y porcentaje de la germinación de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro*. Con respecto a la micropropagación de *Capsicum annuum* (Jalapeño) mediante organogénesis directa, la mejor respuesta estuvo determinada por AIA  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + KIN  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  siendo significativamente mejor para obtener plantas con mayor número de segmentos nodales (2.4 brotes) (Tukey,  $p=0,05$ ). Sin embargo, la presencia de AgNPs en dicho tratamiento, potenció su efecto al favorecer plantas con más entrenudos o segmentos nodales de manera significativa al aumentar de  $2.6 \pm 0.699$  hasta  $3.8 \pm 0.789$  (Tukey,  $p=0,05$ ).

El empleo de semillas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) con AgNPs de plata permitió obtener y multiplicar plantas de *Capsicum annuum* (Jalapeño) *in vitro* sin problemas por

microorganismos contaminantes y sin síntomas de presencia de etileno y además, el mayor número de brotes mediante segmentos nodales no estuvo determinado exclusivamente por la presencia de fitohormonas en los diferentes tratamientos, sino por un efecto de hormesis derivado de la presencia de AgNPs, lo que ayuda a potenciar dicha respuesta.

### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a las estudiantes: Fortino Saavedra Karen Stefany, Lezama Guzmán Valeria, Vara Bazán Ashleyn y Vergara Carrera Ana Yesenia, del P. E. de Agrobiotecnología de UTIM, por su participación activa y directa en el desarrollo experimental del presente trabajo y cursar la asignatura “Integradora I”.

### **REFERENCIAS**

1. Barroso, P. A., Rêgo, M. M., Rêgo, E. R., and Ferreira, K. T. C. 2017. Genetic effects of *in vitro* germination and plantlet development in chilli pepper. *Genetics and Molecular Research* 16 (3): gmr16038869.
2. Bello-Bello, J. J., Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Gómez-Uc, E., & Robert, M. L. (2010). Improvement of In Vitro Proliferation and Elongation of Habanero Pepper Shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion, 45(C), 1093–1098.
3. Bello-Bello, J. J., Chavez-Santoscoy, R. A., Lecona-Guzmán, C. A., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruíz, J., Gómez-Merino, F. C. and Pestryakov A. 2017. Hormetic Response by Silver Nanoparticles on *In Vitro* Multiplication of Sugarcane (*Saccharum spp.* Cv. Mex 69-290) Using a Temporary Immersion System. *Dose-Response: An International Journal*. 1-9. DOI: 10.1177/1559325817744945.

4. Cardoso, C. P. 2016. Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)* 58(260):19-28.
5. Calabrese, E. J. 2003. The maturing of hormesis a sacredible dose-response model. *Nonlinearity Biol Toxicol Med.* 1(3):319-343.
6. Calabrese, E. J. 2016. Preconditioning is hormesis part II:how the conditioning dose mediates protection: dose optimization within temporal and mechanistic frameworks. *Pharmacol Res.* 110:265-275.
7. Fidemann, T., Nascimento, L.B., Moraes, M. C., Bertão, M. R., Fernández-Núñez, E. G. 2016. Optimizing *in vitro* germination of *Capsicum baccatum* L. seeds through a multifactorial experimental design. *American International Journal of Biology* 4(2): 1-22. DOI: 10.15640/aijb.v4n2a1.
8. Gogoi, S., Acharjee, S., & Devi, J. (2014). *In vitro* plantlet regeneration of *Capsicum chinense* Jacq. cv. “Bhut jalakia”: hottest chili of northeastern India. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 50(2), 235–241. <http://doi.org/10.1007/s11627-013-9569-x>.
9. Iavicoli, I., Calabrese, E. J., Nascarella, M. A. 2010. Exposure to nanoparticles and hormesis. *Dose Response.* 8(4):501-517.
10. Jhanzab, H. M., Razzaq, A., Jilani, G., Rehman, A., Hafeez, A., Yasmeen, F. 2015. Silver nano-particles enhance the growth, yield and nutrient use efficiency of wheat. *Int J Agron Agri Res.* 7(1):15-22.
11. Joshi A.; Kothari S.-L High copper levels in the medium improves shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 88: 127–133; 2007. doi:10.1007/s11240-006-9171-6.

12. Kende H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 283-307.
13. Kumar, P.P., P. Lakshmanan, and T.A. Thorpe. 1998. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34:94–103.
14. Liu, W., Parrott, W.A., Hildebrand, D.F., Collins, G.B. and Williams, E.G. 1990. *Agrobacterium*-induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L) and formation of shoot like structures expressing induced genes. *Plant Cell Rep.* 9:360-364.
15. López-Puc G.; Canto-Flick A.; Barredo-Pool F.; Zapata-Castillo P.; Montalvo-Peniche M.-C.; Barahona-Pérez F.; Santana-Buzzy N Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* jacq.). *Hort. Sci.* 41: 1645–1650; 2006.
16. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
17. Nuez F.; Gil-Ortega R.; Costa J. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundi-Prensa, México D.F.1996.
18. Ochoa-Alejo N and Ramirez-Malagon R (2001). *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 701-729.
19. Orlinska, M., & Nowaczyk, P. (2015). *In vitro* plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. Genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 60–68. <http://doi.org/10.3906/biy-1403-89>.
20. Otrshy, M., Moradi, K., Khayam Nekouei, M. 2011. The effect of different cytokenins in propagation of *Capsicum annuum* l. By *in vitro* nodal cutting. *Trakia Journal of Sciences*, 9 (3): 21-30.

21. Peddaboina, V. Christopher, and Karampuri S. 2006. *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration in four *Capsicum* species using thidiazuron, *Sci. Hort.* 107: 117–122.
22. Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B., Barcelo', J. 2013. Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Sci.* 212:15-25.
23. Sanatombi, K. and Sharma, G.J., 2007. Micropropagation of *Capsicum annum* L. using axillary shoot explants, *Sci. Hort.* 113: 96-99.
24. Sanatombi, K., and Sharma, G. J. 2008. *In vitro* propagation of *Capsicum chinense* Jacq. *Biologia plantarum* 52 (3): 517-520.
25. Sanatombi, K., Sharma, G.J. 2006. *In vitro* regeneration and mass multiplication of *Capsicum annum* L. - *J. Food Agr. Environ.* 4: 205-208.
26. Santana-Buzzy, N., A. Canto-Flick, F. BarahonaPe´rez, M.C. Montalvo-Peniche, P.Y. ZapataCastillo, A. Soli´s-Ruiz, A. Zaldi´var-Colli´, O. Gutie´rrez-Alonso, and M.L. Miranda-Ham. 2005. Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience* 40:829–831.
27. Santana-Buzzy, N., A. Canto-Flick, L.G. IglesiasAndreu, M.C. Montalvo-Peniche, G. Lo´pezPuc, and F. Barahona-Pe´rez. 2006. Improvement of *in vitro* culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience* 41:405–409.
28. Santana-Buzzy, N., Bello-Bello, J. J., Iglesias-Andreu, L., Zúñiga-Aguilar, J.J., Canto-Flick, A., Avilés-Viñas, S. A., Lecona-Guzmán, C. A., Solís-Marroquín, D., Gómez-Uc, E., Balam-Uc, E., Arcos-Ortega, G. F., and Mijangos-Cortés, J. O. 2012. Tissue Culture of *Capsicum* Species. *Peppers: Botany, Production and Uses* (ed. V.M. Russo).

29. Shah V, Belozerova I. 2009. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Pollut.* 197(1-4):143-148.
30. Spinoso-Castillo JL, Chavez-Santoscoy RA, Bogdanchikova N, P´erez-Sato JA, Morales-Ramos V, Bello-Bello JJ. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2017; 129(2):195-207.
31. Taiz, L., and Zeiger, E. 2006. *Fisiología Vegetal*. Publicacions de la Universitat I de Catellón. Vol II. Traducido de la 3ra edición. 1338 p.
32. Valadez-Bustos, M. G., Aguado-Santacruz, G. A., Carrillo-Castañeda, G., AguilarRincón, V. H., Espitia-Rangel, E., Montes-Hernández, S., & Robledo-Paz, A. (2009). *In vitro* propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper (*Capsicum spp.*) plants from commercially important genotypes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45(6), 650–658. <http://doi.org/10.1007/s11627-009-9193-y>.
33. Valera-Montero L.; Phillips G.-C Long-lasting *Capsicum baccatum* ‘organogenic callus’ formation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 41: 470–476; 2005. doi: 10.1079/IVP2005648.