

**PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADO**

**Micropropagación de chile dulce (*Capsicum annuum* L. var. Najera.) y chile
habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con miras al mejoramiento genético del
cultivo.**

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el
Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
como requisito para optar por el grado de:

Magister Scientiae

Agricultura Ecológica

Por

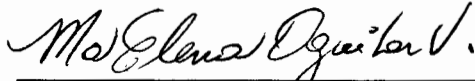
Jorge Cetz luit

Turrialba, Costa Rica, 2005

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

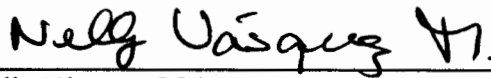
FIRMANTES:



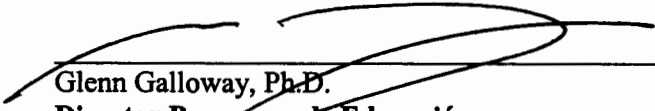
María Elena Aguilar, Ph.D.
Consejero Principal.



Juan Luis Ortíz, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Nelly Vázquez, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
**Director Programa de Educación y
Decano de la Escuela de Posgrado**



Jorge Cetz Iuit
Candidato

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de concluir con una meta más que tenía trazada en mi vida, y por darme la oportunidad de conocer este maravilloso País que me ha enseñado mucho de la vida.

A mis padres José Cetz y Juanita Iuit, por toda su comprensión y apoyo brindado para seguir adelante en este difícil camino de la vida.

A mis hermanos (Joaquín y Porfirio) y hermanas (Jacinta, Carmita, Dora, Paula y Candelaria) por sus palabras de aliento y motivación cuando más los necesitaba y por estar siempre al cuidado de mis padres durante mi ausencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a la Dra. Maria Elena Aguilar, profesora consejera y jefa del laboratorio de cultivo de tejidos, por toda su paciencia brindada para la revisión final de este trabajo ya que sin su amistad y confianza en mi persona no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A los miembros del comité M. Sc. Nelly Vásquez y M. Sc. Juan Luis Ortiz por su constante sugerencia y asesoramiento brindado para esta investigación. Así también por su interés de formar parte del comité asesor.

A todo el personal del laboratorio de cultivo de tejidos Alexis, Edgar, Karol y William por compartir sus conocimientos, experiencias y muestras de amistad. “TODO TUANIS” muchachos.

A todos mis compañeros de la maestría, por los momentos agradables que pasamos los cuales hicieron más fácil mi estancia en este hermoso País.

De manera especial a mis compañeros anexarios: Andres, Adriana, Salvador y Eduardo, por su apoyo moral y sus palabras de aliento cuando más los requería.

Agradezco a la fundación FORD por haberme otorgado el financiamiento y así concluir uno más de mis sueños.

Finalmente a este hermoso país Costa Rica y a su gente por ser como son “PURA VIDA”.

INDICE

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Caracterización.....	1
1.2. Justificación	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Hipótesis	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. Generalidades del cultivo	6
2.1.1. Origen y domesticación	6
2.1.2. Composición química de los frutos de chile.....	7
2.2. Biología del cultivo.....	9
2.2.1. Taxonomía.....	9
2.2.2. Morfología de la planta	9
2.2.3. Factores bióticos y abióticos que afectan al cultivo.....	10
2.3. Técnicas tradicionales de propagación de chile	12
2.3.1. Semillero.....	12
2.3.2. Producción de plántulas con cepellón	12
2.3.3. Producción de semillas	13
2.4. Mejoramiento genético de <i>Capsicum</i>	13

2.4.1. Injertación	14
2.4.2. Producción de híbridos	14
2.5. Biotecnología del chile.....	15
2.5.1. Avances en el cultivo in vitro de chile	15
2.5.2. Cultivo de meristemos	16
2.5.3. Organogénesis en chile	16
2.5.4. Embriogénesis somática.....	18
2.5.5. Cultivo de anteras.....	20
2.5.6. Aclimatación	21
3. MATERIALES Y METODOS	22
3.1. Localización del estudio.....	22
3.2. Material vegetal	22
3.2.1. Germinación de semillas y establecimiento de almácigos.....	22
3.2.2. Desinfección de explantes	23
3.3. Embriogénesis somática.....	23
3.3.1. Inducción de callo embriogénico a partir de segmentos de hoja	23
3.3.2. Multiplicación del callo en medio líquido.....	25
3.3.3. Histología.....	25
3.3.4. Variables evaluadas	26
3.4. Cultivo de ápices	26
3.4.1. Fase de iniciación	26
3.4.2. Fase de multiplicación	27
3.4.3. Fase de desarrollo	27
3.4.4. Fase de aclimatación.....	28
3.4.5. Variables evaluadas.....	28
3.4.6. Análisis estadístico	28

4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
4.1. Germinación de semillas y establecimiento de almácigos	29
4.2. Inducción de la embriogénesis somática.....	30
4.2.1. Establecimiento de cultivos asépticos	30
4.2.2. Obtención del callo primario	31
4.2.3. Color del callo y consistencia.....	42
4.2.4. Multiplicación del callo en medio líquido.....	44
4.2.5. Histología de callos.....	45
4.3. Cultivo de ápices	47
4.3.1. Fase de iniciación	47
4.3.2. Fase de multiplicación	50
4.3.3. Fase de desarrollo	52
4.3.4. Fase de aclimatación.....	53
5. CONCLUSIONES.....	55
6. RECOMENDACIONES.....	56
7. LITERATURA CITADA.....	57
ANEXOS.....	65

Cetz, J. 2005. Micropropagación de chile dulce (*Capsicum annuum* var. Najera) y chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq) con miras al mejoramiento genético del cultivo. Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Palabras claves: *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, explante, callo embriogénico, cultivo de ápices, sacarosa, carbón activado, gelificante.

RESUMEN

La investigación se realizó en los Laboratorios de Biotecnología y en el invernadero de aclimatación del CATIE, Turrialba, Costa Rica, en el período comprendido entre diciembre del 2004 a octubre del 2005. El principal objetivo fue establecer un protocolo eficiente para la micropropagación de dos especies de *Capsicum* de interés comercial.

Existen muy pocos estudios realizados en el cultivo *in vitro* del género *Capsicum*, por lo que se carece de protocolos eficientes de propagación. Por tal motivo este trabajo pretende contribuir al desarrollo de metodologías repetibles que permitan la propagación de especies de interés comercial con miras al mejoramiento genético del cultivo. Para este estudio se utilizó como base metodologías ya establecidas, haciendo modificaciones con el afán de encontrar las condiciones químicas y físicas que favorecieran el establecimiento de las variedades de interés. Fue así que se utilizaron explantes de hoja de 1 cm² de plantas con 35 días de edad, con el objetivo de desarrollar callo embriogénico en ambas especies. El medio MS completo con sus vitaminas más la adición de 1.5 mg/l de BAP, 4 mg/l de 2,4-D, 8% de sacarosa y tres semanas de cultivo en la oscuridad favoreció el desarrollo de callo friable con características embriogénicas. En *C. annuum* este medio permitió el desarrollo de pequeñas estructuras semejantes a un embrión somático. El análisis histológico de este callo muestra células en constante división con núcleos y nucleolos prominentes, además de la formación de pequeñas agrupaciones de almidón las cuales son típicas de proembriones; sin embargo estas estructuras no lograron desarrollarse probablemente porque el medio de regeneración no fue el adecuado.

Además se realizó el cultivo de ápices tomados de plantas de 40 días de edad, los cuales fueron cultivados en un medio MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP y sacarosa. En la fase inicial de cultivo concentraciones de 1.0 y 1.5 mg/l de BAP con 3% de sacarosa favorecieron el desarrollo de los ápices en *C. chinense*; mientras que en *C. annuum* todos los brotes se cubrieron de un callo compacto el cual no permitió pasar a la fase de multiplicación. Asimismo concentraciones de 0.25 y 1.0 mg/l de BAP, TDZ y Kinetina favorecieron el desarrollo de brotes en la fase de multiplicación para la especie *C. chinense*. Sin embargo, la mejor concentración fue de 0.25 mg/l de BAP ya que los brotes mostraron un rápido desarrollo del tallo y hojas más vigorosas. Al emplear un MS al 100% en combinación de 1 g de carbón activado favoreció el desarrollo de mayor número de folíolos, lo cual facilitó la transferencia de las vitroplantas a la fase de aclimatación. El 73.33% de las plantas que lograron sobrevivir a la fase de aclimatación tuvieron un desarrollo vegetativo normal.

Cetz, J. 2005. Micropropagation of sweet pepper (*Capsicum annuum* var. Najera) and habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq) with the aim to genetic improvement of the culture. Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Key words: *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, explant, embryogenic callus, apexes culture, sucrose, activated charcoal, gelling agent.

ABSTRACT

This research was completed in the Tissue Culture Laboratory and in the greenhouse of the CATIE Biotechnology Unit, at CATIE Turrialba, Costa Rican, from December 2004 to October 2005. The main objective was to establish an efficient method to micropropagate two commercial species of *Campsicum*.

Few studios have been done on *in vitro* culture of the genus *Capsicum*. So, efficient methods of propagation are lacking. In this way, the work attempted to help with the development of repeatable methodologies that permit to propagate commercial species with the aim to genetic improvement of the culture. Established methodologies were used as the base in this research. These methodologies were modified in order to find the chemical and physical conditions to establish successfully our varieties. In both species, 1 cm² foliar explants were taken from 35 day old plants to develop embryogenic callus. The MS medium with its vitamins plus BAP at 1.5 mg/l, 2,4-D at 4 mg/l, and sucrose at 8% and three weeks of culture in the dark favored the development of a friable callus with embryogenic characteristics. In *C. annuum* this medium permitted the development of small structures similar to somatic embryos. The histological analysis of this callus showed cells in constant division with prominent nuclei and nucleoli, as well as the formation of small groupings of starch, which are typical of proembryos. However, these structures failed to develop by themselves probably due to an inadequate regeneration medium.

Also, apex culture was done. Apexes were taken from 40 day old plants, and then they were sown in MS medium added with different levels of BAP and sucrose. In the initial phase, BAP at 1.0 y 1.5 mg/l combined with sucrose at 3% was the best to develop the *C. chinense* apex; in *C. annuum* all of the shoots were covered with a compact callus which avoided to pass to the multiplication phase. In the multiplication phase, BAP, TDZ, and Kinetin at 0.25 and 1.0 mg/l favored shoot development in *C. chinense*. The best treatment was BAP at 0.25 mg/l since shoots showed a faster development and more vigorous leaves. In the MS medium added with activated charcoal at 1 g/l the greatest number of leaflets was produced, which facilitated to transfer the vitroplants to the acclimatization phase. In this last phase, 73.33% of plants survived with a normal vegetative development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Escala de medición utilizada para medir el desarrollo de callo	26
Figura 2	Elaboración de semilleros en especies de <i>Capsicum</i> . A. <i>C. annuum</i> L var. Najera, muestra mayor germinación. B. <i>C. chinense</i> Jacq., muestra mayor número de celdas vacía debido a la menor germinación	29
Figura 3	Porcentaje de asepsia en explantes foliares de <i>C. annuum</i> y <i>C. chinense</i> ...	31
Figura 4	Desarrollo del callo primario en segmentos de hoja de <i>C. chinense</i> (Ch) y <i>C.annuum</i> (A). D0= ausencia, D1= 25%, D2= 50%, D4= 75% y D5= 100% de callo en la superficie del explante.....	32
Figura 5	Medias para el desarrollo de callo primario expresado en porcentajes para los cuatro medios de cultivo probados en las dos especies de <i>Capsicum</i>	34
Figura 6	Diferentes efectos sobre el desarrollo de callo primario. A. Respuesta de las dos especies de <i>Capsicum</i> al desarrollo de callo primario. B. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el desarrollo de callo primario.....	36
Figura 7	Efecto del tiempo de cultivo en la oscuridad sobre el desarrollo de callo.....	37
Figura 8	Grupos de tratamientos con la combinación de cuatro factores especie (<i>C. annuum</i> y <i>C. chinense</i>), medios (1 y 2), sacarosa (4, 6 y 8%) y semanas del cultivo en la oscuridad (3, 4, 5 y 6 semanas) definidos por el análisis de conglomerados.....	38
Figura 9	Efecto de los reguladores de crecimiento BAP y 2,4-D sobre el desarrollo de los callos en las dos especies de <i>Capsicum</i> . A. Concentraciones de BAP (mg/l). B. Concentraciones de 2,4-D (mg/l).....	40
Figura 10	Grupos de tratamientos sobresalientes para el desarrollo de callo; tomando en cuenta la combinación de tres factores: especie (<i>C. annuum</i> y <i>C. chinense</i>), BAP (0.0, 1.0 ,1.5 y 3.0 mg/l) y 2,4-D (0.0, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/l).....	41
Figura 11	Tipos de callo primario caracterizados por su color y consistencia, en ambas especies de <i>Capsicum</i> . A. Cristalino blanco (cb); B. Cristalino blanco formando agrupaciones (cba); C. cristalino verde (cv); D. café translucido (ct).....	43
Figura 12	Suspensiones celulares de <i>C. annuum</i> (A) y <i>C. chinense</i> (B). ac : Agregados celulares. cc : células con contenido celular. dc : Células en división.....	44
Figura 13	Suspensiones celulares de <i>C. annuum</i> mostrando cierta organización. A. Estructuras redondas y alargadas que asemejan a un embrión. B. Estructuras en el medio de maduración que comienzan a necrosarse. C. Callos organizados en pequeñas agrupaciones redondas.....	45

Figura 14	Cortes histológicos de callos con características embriogénicas, A, B y C corresponden a <i>C. annuum</i> y D corresponde a <i>C. chinense</i> . A. Posibles células embriogénicas (ce), núcleo con nucleolo (n). B. Posibles proembriones (pe), con paredes gruesas bien definidas (p). C. Gránulos de almidón (a) y citoplasma muy denso (c). D. Posibles células embriogénicas con presencia de fenoles (pf) visto a 20X.....	46
Figura 15	Desarrollo y respuesta morfogénica de ápices de <i>C. annuum</i> (A) y <i>C. chinense</i> (B y C) evaluados a los 22 días de cultivo. A. Callo muy compacto cubriendo la parte apical del explante. B. callo formado en la base del corte, C. Ápice mostrando la formación de raíces a partir de callo.....	49
Figura 16	Brotos de <i>C. chinense</i> en fase de multiplicación en presencia de diferentes fuentes de citocinina. A. Cultivo de brotes en presencia de 0.25 mg/l de BAP, Kinetina y TDZ. B. Cultivo de brotes en presencia de 0.5 mg/l de BAP, Kinetina y TDZ.....	51
Figura 17	Vitroplantas de 6 semanas de edad de <i>C. chinense</i> en fase de desarrollo. A. Vitroplanta proveniente del medio MS al 100% mostrando un buen desarrollo del vástago con varios nudos y entrenudos. B. Vitroplanta proveniente del medio MS al 50% en la cual se observa un solo entrenudo muy desarrollado.....	52
Figura 18	Desarrollo de brotes de <i>C. chinense</i> a la 6 semana de cultivo en presencia de 1 g/l de carbón activado en el Medio MS. A. Brotes procedentes de 0.25 mg/l de Kinetica, TDZ y BAP. B. Brotes procedentes de 0.5 mg/l de Kinetina, TDZ y BAP.....	53
Figura 19	Aclimatación de plantas de <i>C. chinense</i> . A. Planta con cinco folíolos y buen desarrollo de raíces. B. Desarrollo de folíolos C. Planta morfológicamente bien desarrollada y en etapa de floración. D. Planta con el primer fruto formado al tercer mes de cultivo en el invernadero.....	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Medios de cultivo utilizados para la inducción de la embriogénesis somática de chile dulce (<i>C. annuum</i> var. Najera) y chile habanero (<i>C. chinense</i>). El M1 corresponde al testigo recomendado por Kintzios <i>et al.</i> (2000).....	24
Cuadro 2	Efecto de las concentraciones de BAP y 2,4-D, solos o en combinación sobre la inducción de callo embriogénico de <i>C. annuum</i> y <i>C. chinense</i>	24
Cuadro 3	Concentraciones de sacarosa y BAP utilizados para el cultivo de ápices y yemas axilares de <i>C. Annuum</i> var. Najera y <i>C. chinense</i>	27
Cuadro 4	Prueba de medias y análisis de varianza para las principales variables evaluadas en las dos especies de <i>Capsicum</i> cultivadas en los medios M1 y M2 en condiciones de oscuridad.....	34
Cuadro 5	Prueba de medias y análisis de varianza para las principales variables evaluadas en las dos especies de <i>Capsicum</i> cultivadas en los medios M1 y M2, en condiciones de luz.....	35
Cuadro 6	Grupo V con las combinaciones de tratamientos que favorecen el desarrollo de callo en las dos especies de <i>Capsicum</i>	39
Cuadro 7	Mejores combinaciones de tratamientos para el desarrollo de callo friable en las dos especies de <i>Capsicum</i>	42
Cuadro 8	Comparación de medias de Duncan para la variable número de hojas y número de nudos en el cultivo de ápices de en <i>C. annuum</i> y <i>C. chinense</i> cultivados en diferentes concentraciones de sacarosa y BAP. La evaluación se hizo a los 22 días de cultivo.....	48
Cuadro 9	Comparación de medias de Duncan para el efecto Kinetina, TDZ y BAP sobre el desarrollo de brotes en <i>Capsicum</i> a la tercera semana de cultivo..	51

ANEXO

Anexo 1	Cuadro 1. Composición química de sales minerales MS.....	66
Anexo 2	Medio de suspensión celular fase de multiplicación (Buyukalaca y Mavituna,1996).....	67
Anexo 2	Medio de regeneración (Buyukalaca y Mavituna, 1996).....	67
Anexo2	Medio de suspensión celular fase de multiplicación Ma2.....	67
Anexo 2	Cuadro 2. Medio de regeneración Ma3.....	67
Anexo 3	Cuadro 1. Análisis de la varianza para el desarrollo de callo en condiciones de oscuridad. Es posible ver el nivel de interacción entre el medio (M1, M2, M3 y M4) con la especie.....	68
Anexo 3	Cuadro 2. Análisis de la varianza para el desarrollo de callo en condiciones de luz. Es posible ver el nivel de interacción entre el medio (M1, M2, M3 y M4) con la especie.....	68
Anexo 4	Cuadro 3. Análisis de la varianza para el desarrollo del callo evaluados a la (3, 4, 5 y 6 semanas de oscuridad), donde es posible observar el nivel de interacción entre los factores en estudio: medio, especie, sacarosa y semanas de oscuridad (SemOsc).....	69
Anexo 5	Figura 1. Dendograma en la cual se aprecia los mejores grupos de tratamientos en las dos especies de <i>Capsicum</i> . En la primera fila corresponde a especies (<i>C. annum</i> y <i>C. Chinenses</i>), en la segunda fila corresponde al medio (1 y 2), tercer fila concentraciones de sacarosa (4, 6 y 8%)y la cuarta fila semanas de oscuridad (3, 4, 5 y 6 semanas).....	70
Anexo 6	Cuadro 4. Análisis de la varianza para el desarrollo del callo evaluados para las dos especies de <i>Capsicum</i> en combinación con BAP (0, 1.0, 1.5 y 3 mg/l) y 2,4-D (0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l) en un medio MS.....	71
Anexo 7	Figura 2. Dendograma en la cual se aprecia los mejores grupos de tratamientos en las dos especies de <i>Capsicum</i> . En la primera fila corresponde a especies (<i>C.annuum</i> y <i>C. chinenses</i>), en la segunda fila corresponde a concentraciones de BAP (0, 1, 1.5 y 3 mg/l) y la tercer fila corresponde a concentraciones 2,4-D (0, 1,2 y 3 mg/l).....	72
Anexo 8	Análisis de frecuencia para el color de callo primario en las dos especies de <i>Capsicum</i>	73

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Caracterización

La horticultura es una actividad agrícola de gran importancia tanto en la agricultura nacional como mundial. Particularmente, el cultivo de chile (*Capsicum spp.*) representa una actividad importante en el ámbito mundial, cultivándose en años recientes 25,149,997 toneladas según datos de la FAO (2004). China y México son los principales productores con rendimientos de 11,534,871 y 1,853,619 toneladas respectivamente, seguidos por Turquía (1,790,000 ton), España (1,006,000 ton), Estados Unidos (977,760 ton), Nigeria (720,000 ton), Indonesia (620,076 ton), Egipto (390,000) y otros (6,257,671 ton).

Esta relevancia se debe a que el chile forma un importante elemento en la dieta de los seres humanos alrededor del mundo, siendo América Latina el principal consumidor (FAO 1998). Particularmente en México el chile es una pieza importante para la elaboración de varios platillos típicos, en los cuales es empleado como condimento y saborizante. Además, existe una gran gama de productos transformados como curtidos, enlatados, pastas y salsas que son elaborados a base de chile (McNeish, 1964; Guzman y Paredes, 1998).

El interés en este cultivo no se encuentra únicamente en su importancia económica, estudios anteriores han demostrado que el chile es una fuente excelente de colorantes naturales por lo que el uso más importante es la extracción de la capsaicina, de la cual se elaboran pinturas y cosméticos. El chile es rico en vitaminas A, B y C, además el interés por esta planta se ha incrementado por la presencia de otros compuestos, conocidos como fitoquímicos, que tienen un efecto benéfico sobre la salud humana (Guzmán y Paredes, 1998). Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los ácidos fenólicos, de los cuales se sabe que reducen el riesgo de contraer cáncer, problemas cardiovasculares y otras enfermedades crónicas degenerativas. Los frutos de chile poseen un bajo contenido en calorías por lo que se emplean como tratamientos para bajar de peso (Dallard y German, 2000).

También es usado en el sector salud para la elaboración de algunos medicamentos como cremas y pastas que son utilizados para aliviar algunos dolores musculares causados por la artritis, además se elaboran shampoo y píldoras a partir de la capsaicina. Es el ingrediente principal de las bombas lacrimógenas que son empleadas por la policía en varios países (Maga, 1975; Baum, 1981).

En América Latina; México se destaca como el principal productor de hortalizas, con más de 30 especies, distribuidas en una superficie de 1,000,750 hectáreas, entre las cuales destaca principalmente el tomate, chile, melón, papa, calabaza, sandía, brócoli y lechuga. El chile representa uno de los principales cultivos hortícolas que más se producen, ocupando el segundo lugar en importancia después del tomate (Rosado, 2002).

El chile es una hortaliza de relevancia económica y social, debido a que es una importante fuente de empleo en el medio rural, ocupa entre 120 a 150 jornales por hectárea, y se caracteriza por ocupar mano de obra familiar para realizar prácticamente todas las actividades de producción (Romero *et al.*, 1995). Es un cultivo de reducido ciclo vegetativo (4 a 6 meses), lo cual permite tener en un tiempo relativamente corto, una buena utilidad por área sembrada (Véliz y Montás, 1981).

Los chiles pertenecen al género *Capsicum* y la familia Solanaceae. A nivel mundial son cinco las especies más cultivadas, *Capsicum baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annuum*, de las cuales esta última es la más importante ya que agrupa la mayor diversidad de chiles cultivados o silvestres. El cultivo de *Capsicum* destaca por su facilidad de adaptarse a diversos climas, así como a la pequeña y mediana producción ya que no requiere de técnicas muy avanzadas para su cultivo, aunque es recomendable el uso de tecnología para obtener mejores rendimientos (Hernández, 1982; Alfonso, 1993).

México es el primer productor en América y Estados Unidos el segundo; sin embargo, México tiene rendimientos por parcela inferiores a los Estados Unidos. Esto se debe principalmente al bajo nivel tecnológico y al empleo de material criollo que generalmente es muy susceptible a plagas y enfermedades (Gómez y Schwentesius, 1991). El agricultor utiliza estas variedades criollas sin un proceso preciso de selección de la semilla para la siembra, resultando plantas ineficientes en el aprovechamiento de los recursos, debido

principalmente a su porte alto, cortes muy espaciados, y bajo potencial de rendimiento (Ramírez, 2002).

La dificultad de obtener buenos rendimientos comienza con la producción de las plántulas en el almacigo, actividad que se ve amenazada por varios factores bióticos y abióticos que anualmente disminuyen los rendimientos. Entre los factores bióticos de mayor importancia destacan la presencia de enfermedades virales que disminuyen considerablemente los rendimientos antes obtenidos ocasionando pérdidas hasta de un 100%. El Damping-off es una enfermedad causada por un complejo de hongos (*Pythium spp*, *Rhizoctonia spp* y *Fusarium*) que desde muy temprana edad afecta a las plántulas. Además en el momento de la producción el cultivo es afectado por el insecto llamado picudo del chile (*Anthonomus eugenii* C.) el cual daña los frutos y produce su caída. Asimismo, este cultivo carece de cultivares adaptables y homogéneos en cuanto a rendimiento y calidad (Uvalle 1985; DeWitt y Bosland 1993).

Otro de los grandes problemas que afecta la producción del chile es la baja disponibilidad de semilla de calidad a bajo costo, lo cual incrementa los costos de producción y obliga a los productores a utilizar semilla de cultivos anteriores. Normalmente estas semillas han perdido su potencial de producción debido a que son el resultado de polinización cruzada ocasionando una elevada heterosis en la descendencia. Esto incrementa el riesgo de obtener bajos rendimientos y mayor pérdida por patógenos. Aunado a esto el productor carece de tecnología apropiada, por ejemplo, en la etapa de almácigo se necesita de un ambiente protegido o invernadero para evitar el ataque de plagas y enfermedades, lo cual para el pequeño productor resulta casi imposible por el alto costo que esto genera (Uvalle, 1985; INEGI, 1998; Michaelangeli *et al.* 2003; Wall, 1994).

1.2. Justificación

En la actualidad se están empleando las técnicas de micropropagación para producir semilla vegetativa de plantas con un alto nivel productivo y libre de enfermedades al momento de salir del laboratorio (Montoya, 1991).

El uso de plantas élite, con resistencia a plagas y enfermedades, conjugadas con las técnicas de cultivo *in vitro*, constituyen una opción interesante para solucionar algunos de los

problemas agrícolas que afectan a los cultivos. Las técnicas de cultivo *in vitro* ofrecen ventajas en propagación clonal, germinación de semillas, multiplicación, regeneración, conservación e intercambio del germoplasma (Montoya, 1991; Pérez, 1998).

El cultivo de tejidos es una herramienta que nos permite reducir los problemas ocasionados por las distintas enfermedades que se presentan en las diferentes etapas del cultivo. Por consiguiente, consideramos que el desarrollo de protocolos de propagación en el cultivo de chile constituye una base muy importante para el uso de técnicas modernas de mejoramiento genético y la multiplicación clonal de plantas élite en el futuro. La conjugación de estas metodologías permitirá desarrollar plantas con resistencia a agentes bióticos y abióticos; así como favorecer algunas características hortícolas del cultivo.

El chile es uno de los cultivos de mayor importancia económica en México y en el Mundo, sin embargo, son muy pocos los estudios realizados para su cultivo *in vitro*. A pesar de que los primeros estudios en cultivo *in vitro* fueron desarrollados en especies de la familia *Solanaceae*, de las cuales podemos mencionar el tabaco, el tomate y la papa. Esos cultivos generalmente son utilizados como modelos, debido a su gran capacidad de regeneración. Son escasos los informes sobre la regeneración de chile, a partir de callos en suspensión y cultivo de protoplastos. Esto se debe a problemas morfogénéticos severos que existe con este género al momento de la regeneración (Ochoa-Alejo y Malagon, 2001). Es por esta razón que consideramos necesario seguir realizando trabajos en la biotecnología del chile.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Establecer un protocolo eficiente para la micropropagación de dos especies de chile de interés comercial; el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) y el chile dulce (*Capsicum annuum* var. Najera).

1.3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta de ápices vegetativos de *C. chinense* y *C. annuum* durante la micropropagación.
2. Determinar el potencial de fragmentos de hoja para la inducción de la embriogénesis somática en ambas especies.
3. Estudiar el efecto de diferentes condiciones de cultivo, químicas (reguladores de crecimiento, concentraciones de azúcar y otras sustancias) y físicas (luz y oscuridad) sobre la respuesta de las dos especies al cultivo *in vitro*.

1.4. Hipótesis

1. Explantes apicales responden adecuadamente al establecimiento aséptico y a la micropropagación.
2. La embriogénesis somática en *C. chinense* y *C. annuum* dulce puede ser inducida a partir de explantes de hoja.
3. Las dos especies de *Capsicum* responden favorablemente a determinadas condiciones químicas y físicas del cultivo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cultivo

Junto con la calabaza, el maíz y el frijol, el chile (*Capsicum spp*) fue la base de la alimentación de las culturas de Mesoamérica. El chile es originario de América tropical y fue introducido a Europa por Cristóbal Colón entre los años 5200 y 3400 A.C Heirser (1976). Los nativos americanos cultivaron especies de *Capsicum*; este hecho coloca a los chiles entre los cultivos más antiguos de América.

El fruto de *Capsicum* se conoce de varias maneras en Iberoamérica, dependiendo del país y del lenguaje que se hable dentro de una región particular. Así tenemos que en México existen varios nombres como 'Itz' en Huasteco, 'Chac-ic' ó 'Max-ic' en Maya, 'Chilli' en Nahuatl, 'Ng-i' en Otomi. En Bolivia y en Perú se le conoce como 'Huayco' en Ayamara y 'Uchu' en Quechua. Otros nombres utilizados son 'Morrón' para los frutos de chile dulce y 'Pepper' en países de habla inglesa (Dewitt y Bosland, 1993).

La palabra chile es una variación del vocablo chil, derivado del dialecto Náhuatl (Azteca), mientras que ají, es una variación de 'axi' del extinto dialecto Arahua del Caribe. La palabra española chile, usada por los mexicanos en la época de la conquista, sigue siendo usada en México y América Central. Los españoles adoptaron la palabra ají cuando pasaron por el Caribe y lo implementaron en la Nueva España y América del Sur (Long-Solis, 1986).

2.1.1. Origen y domesticación

Diversos estudios han definido como el principal centro de origen del género *Capsicum* una gran área ubicada entre el Sur de Brasil y el Este de Bolivia, Oeste de Paraguay y Norte de Argentina, pues en esta región ha sido observada la mayor distribución de especies silvestres del mundo (Dewitt y Bosland, 1993). Posteriormente fue distribuida por toda América desde el Sur de los Estados Unidos hasta Argentina. Las cinco especies más cultivadas son derivadas de diferentes ancestros localizados en tres distintos centros de origen. México es el principal centro de origen para *C. annum* junto con Guatemala; *C.*

frutescens y *C. chinense* se encuentran en la Amazonía y el Perú; y *C. baccatum* y *C. pubescens* son originarios de Bolivia. No obstante, la especie de mayor distribución geográfica es *C. frutescens*, la cual se encuentra en México, Centroamérica y el Caribe. Desde el punto de vista económico *C. annuum* es la especie más cultivada en América Latina y en todo el mundo, seguida de *C. chinense*. Esto se debe a que *C. annuum* es fácilmente adaptable a altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2,500 msnm (Pozos, 1981; González, 1998).

El chile es una de las primeras plantas domesticadas en Mesoamérica. Este proceso condujo a modificar la planta, especialmente los frutos. El hombre seleccionó y conservó una amplia diversidad de tipos de chile por el color, tamaño, forma e intensidad del sabor picante. Se observa una variación paralela en las diversas especies domesticadas existiendo series homólogas de variación respecto al sabor del fruto “dulce o picante”, coloración antes de la madurez de “blanco marfil a verde intenso”, coloración en la madurez de “amarillo a rojo oscuro”, variación en la forma de “larga y estrecha a corta y redonda”, y en el porte del fruto de “erecto a pendiente” (Pozos *et al.* 1992).

2.1.2. Composición química de los frutos de chile

Los principales componentes químicos presentes en los frutos de especies de *Capsicum* son carbohidratos, proteínas, grasa y fibras. Entre los azúcares se han encontrado fructosa, glucosa, galactosa y sacarosa, siendo la fructosa la más abundante, con un 70% de los azúcares reductores. También contienen ácido cítrico, succínico, fumárico y málico, entre los cuales el ácido cítrico es el más abundante (Purseglove *et al.* 1981).

El cultivo de chile tiene marcada importancia en la industria alimentaría, donde se le usa como especia por su color y pungencia, dada por los carotenoides y capsaicinoides presentes en los frutos, y también por el suave aroma que le confieren los aceites esenciales perceptibles en la paprika y en los frutos secos. Desde el punto de vista nutricional, posee un elevado contenido de vitamina C, la cual fue aislada de la paprika por Szent Gyorgy, con lo cual le fue otorgado el premio Nobel de medicina en 1937. La vitamina C es un factor a considerar para la selección de variedades. También el contenido de vitamina C va de 70 a 300 mg/100 g de peso fresco, aunque hay grandes diferencias entre variedades; por ejemplo

la variedad de color verde contiene más vitamina C que la de color amarillo. Se ha demostrado que los chiles son una buena fuente de vitamina A y de vitaminas del complejo B; se estima que con 3 a 4 g de chile rojo se cubren los requerimientos diarios de vitamina A de una persona adulta (Maga, 1975; Loayza, 2001).

Desde hace siglos, la capsaicina ha sido utilizada como un remedio para aliviar dolores. Evidencias recientes indican que la misma actúa selectivamente sobre una subpoblación de neuronas sensoriales primarias con una función nociceptora. Estas neuronas además de generar sensaciones dolorosas, participan, en la activación de enrojecimiento local y en un proceso conocido como inflamación neurogénica. Así, la capsaicina, además de producir sensación de dolor y calor, también produce, paradójicamente, un efecto analgésico y desinflamatorio; lo cual se sabe a que al irritar una parte del cuerpo desactiva las neuronas sensoriales produciendo alivio del dolor (Liu y Simon 1996).

Estudios realizados por Kawada *et al.* (1986) mencionan que la capsaicina incluida en la dieta aumenta la actividad de las enzimas hepáticas, estimulando la eliminación de las grasas y triglicéridos a través del hígado, disminuyendo su acumulación.

Un grupo de investigadores de la Escuela de Medicina de la Universidad de Yale en Estados Unidos, determinó que un dulce elaborado de chile alivia el dolor en la boca de pacientes con cáncer. La capsaicina contenida en el dulce, es la que permite controlar el dolor después de aplicaciones repetidas. Aparentemente el azúcar en el dulce inhibe la sensación de calor causado por la capsaicina, a la vez que mantiene su estímulo sensorial perfecto y efectivo en la boca del paciente (OnkoLine, 1994).

Las oleorresinas son talvez los principales compuestos que se obtienen de la capsaicina. Son de apariencia normalmente líquida, viscosa y coloreada. Estas sustancias se emplean como saborizantes, aromatizantes y colorantes artificiales aprovechando para ello el alto contenido de compuestos carotenoides los cuales se usan para la fabricación de pinturas y cosméticos (Maga, 1975; Baum, 1981).

2.2. Biología del cultivo

2.2.1. Taxonomía

Todas las formas de los chiles, pimientos o 'ajís' utilizadas por el hombre pertenecen al género *Capsicum*. Este nombre deriva del griego *Kapso* (picar) haciendo mención a la pungencia del fruto. Según otros autores este nombre proviene del latín *Capsicon* (Cápsula o caja) debido a la forma del fruto. Este género se incluye en la extensa familia de las Solanáceas (Pozo *et al.* 1991; Nuez *et al.* 1996).

Actualmente se considera que esta familia está formada por 90 géneros, los cuales se encuentran divididos en 2 subfamilias: *Solanoideae* y *Cestroideae*. La diferencia entre estas dos subfamilias se basa en la presencia de diferentes modelos del desarrollo embrionario. En *Solanoideae* el embrión está enrollado y es de un diámetro más o menos uniforme. Mientras que en *Centroideae* el embrión es típicamente recto o ligeramente curvo. Además, un gran número de diferencias morfológicas, químicas y citogenéticas acompañan esta división básica. *Capsicum* pertenece a la tribu *Solaneae* la más grande de la familia *Solanaceae*. En esta tribu se encuentran alrededor de 1,250 especie ubicadas en 18 géneros; entre ellos *Solanum*, *Lycopersicum*, *Cyphomandra*, *Physalis*, etc. La gran mayoría de estos representan cultivos de gran importancia económica debido a las ganancias que le generan al productor (Hunziker, 1979; Badr, 1997).

Los estudios taxonómicos indican que las especies que más se cultivan son *C.baccatum*, *C. pubescens*, *C. frutescens*, *C. chinenses* y *C. annum*, de las cuales, las dos últimas son las más importantes porque agrupan la mayor diversidad de chiles silvestres y domesticados. Estas especies se caracterizan por su fácil adaptabilidad a casi todos los climas, su cultivo va desde el nivel del mar, hasta los 2,500 de altitud, abarcando casi todas las regiones, razón por la cual se encuentra en casi todo el mundo (Pickersgill, 1971; Pozo *et al.* 1991).

2.2.2. Morfología de la planta

Los chiles constan de una raíz axonomorfa de la cual se ramifica un conjunto de raíces laterales. La raíz profundiza el suelo hasta unos 30-50 cm y se extiende lateralmente,

hasta 120 cm de diámetro alrededor de la planta. El tallo puede ser cilíndrico o prismático, su parte inferior es leñosa y en algunas especies ramifica determinando la forma de la planta. El tallo puede crecer hasta una altura de 30 a 120 cm, según la especie (Piña, 1984; Pérez *et al.* 1997).

En la gran mayoría de las especies de *Capsicum* las flores son hermafroditas, esto significa que en la misma flor se encuentran los gametos masculinos y femeninos (Nuez *et al.* 1996). El cáliz es campanulado y persistente, de poco crecimiento a través del desarrollo del fruto, el margen del cáliz puede ser liso intermedio o dentado en 4 o 6 segmentos o más ocasionalmente. La base de la flor es un tubo cilíndrico corto del que emergen de 4 a 7 lóbulos acumulados o terminados en punta (Pérez *et al.* 1998).

Los granos de polen son elipsoidales con una hendidura longitudinal a lo largo de la mitad del grano. El ovario en plantas silvestres tiene dos capas de lóbulos, pero en especies domesticadas el número de lóbulos o celdillas puede variar de dos a cuatro y ocasionalmente hasta cinco. El número de lóbulos no influye en la producción de frutos (Pérez *et al.* 1997).

Después de la polinización, el establecimiento de los frutos depende principalmente de la temperatura nocturna, siendo la óptima entre 18 y 27°C, arriba de 30°C no hay establecimiento de frutos. El tiempo requerido para la maduración de los frutos depende del modo de cultivar y está dentro de un rango de 60 a 75 días después de la antésis. Los frutos son la parte de mayor importancia económica; no obstante, las características de forma, tamaño y color no son utilizados para su clasificación ya que estas características pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales y de los diferentes estados fisiológicos de maduración (Contreras, 1982).

2.2.3. Factores bióticos y abióticos que afectan al cultivo

La gran mayoría de las especies de chile son susceptibles al ataque de plagas y enfermedades, ocasionando fuertes pérdidas económicas a los productores, las cuales son variables año con año, y siempre han estado en función de las condiciones climáticas, manejo del cultivo, control químico y cultural de los insectos y malezas llegando a alcanzar valores hasta de un 100% (Vidales y Alcanzar, 1989).

Los insectos de mayor importancia económica para el cultivo de chile son el barrenillo del chile (*Anthonomus eugenii* C.) el cual barrena los frutos causando grandes pérdidas por atacar directamente el producto final; la pulga saltona (*Epitrix cucumeris* H) que se alimenta del follaje de las plantas jóvenes; los trips *Frankliniella occidentales* y *Trips tabaci* L. que barrenan el follaje y succionan los jugos celulares causando defoliación en las plantas. Otras plagas como el pulgón (*Myzus persicae* S) y la mosca blanca (*Bemisia tabaci* G. y *Trialeurodes vaporariorum* W) se alimentan succionando la savia de las plantas hospederas causando un daño directo. No obstante, también son portadores de diferentes virus como son el virus del mosaico del tabaco, virus Y de la papa, virus moteado del chile y virus huasteco del chile, entre otros, causando un daño indirecto (Uvalle, 1985; Greenleaf, 1986; Nuez *et al.* 1996).

Por otro lado, se encuentran las enfermedades conocidas como marchitez del chile causada por el hongo *Phytophthora capsici* L, el Damping-off causada por un complejo de hongos constituido por *Pythium* spp, *Rhizoctonia* spp y *Fusarium*. Estos hongos atacan los cultivos principalmente en la etapa de semillero, causando la muerte de las plántulas si no se combaten a tiempo. Ellos se encuentran en el suelo o las semillas y su actividad se ve favorecida por la presencia de materia orgánica no descompuesta y altas humedades y además, atacan a las plantas poco lignificadas (DeWitt y Bosland, 1993; Ochoa-Alejo y Ramírez, 2001).

Las bacterias *Xanthomona campestris*, *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas solanacearum*, causan marchitez prematura de las plántulas recién trasplantadas en el campo. También llegan a dañar los frutos causando severas pudriciones y manchas; a causa de esto, algunos frutos son rechazados en el mercado, años tras año provocando grandes pérdidas al productor que van desde un 30 al 40% de la cosecha y en algunos años la pérdida pueda ser total (Nuez *et al.* 1996; Ochoa-Alejo y Ramírez, 2001).

Entre los agentes abióticos se encuentran las elevadas densidades de siembra que se requieren en el campo, temperaturas extremas, niveles de pH elevados, contaminación del aire y el abuso de pesticidas, todos estos causan bajos rendimientos de la producción (DeWitt y Bosland, 1993, Ochoa-Alejo y Ramírez, 2001).

2.3. Técnicas tradicionales de propagación de chile

2.3.1. Semillero

En el cultivo intensivo de chile, es importante la realización de semilleros con el objeto de obtener plántulas en condiciones adecuadas para el transplante, es uno de los aspectos a los que más atención se debe prestar para conseguir plantas sanas y vigorosas, y de esta forma asegurar resultados económicos satisfactorios (Loayza, 2001).

Al inicio del cultivo de chile en invernadero, los semilleros los hacía el propio agricultor, con tecnología idéntica a la utilizada en los semilleros tradicionales destinados al cultivo intensivo. En este sistema se utilizan pequeños túneles cubiertos de plástico, en el interior de los cuales se siembran las semillas al voleo o en filas sobre el terreno, con la finalidad de obtener plantas con raíz desnuda para el transplante. El resultado, en muchas ocasiones, con este tipo de semillero, era la obtención de plantas heterogéneas, débiles, deshojadas, y muy endurecidas o excesivamente tiernas. Este estrés vegetativo sufrido por la planta es ocasionado por el cambio de temperatura que se presenta en el suelo. Lo anterior, junto con el hecho de que el precio de la semilla híbrida comercial es elevado, es aconsejable que el productor obtenga sus plántulas de semilleros especializados en la producción de almácigos, con la finalidad de utilizar plantas saludables para su transplante directo al suelo (Nuez *et al.* 1996).

2.3.2. Producción de plántulas con cepellón

Otra técnica empleada es el cultivo de plantas con cepellón, la cual consiste en depositar las semillas en unas celdas de cartón o de plástico (bandeja), las cuales se rellenan con un sustrato comercial que cumpla con las siguientes características: buena aereación, una buena capacidad retentiva para el almacenamiento de agua, tener un pH neutro o ligeramente ácido y no poseer nutrientes en cantidades excesivas. Esta técnica tiene la ventaja de que las raíces no se rompen durante el transplante ya que se encuentran protegidas por el cepellón. Además las plantas experimentan mayor crecimiento y es posible lograr una mayor precocidad en la producción ya que el productor puede manejar con mayor flexibilidad su fecha de plantación (Nuez *et al.* 1996).

Una vez realizada la siembra, las bandejas se pasan a la cámara de germinación, en donde se deberán mantener entre 48 y 72 horas a una temperatura de 22 a 25°C. De ahí se trasladan al semillero, donde se desarrollaran las plantas hasta el trasplante. El tiempo de germinación oscila entre los 45 y 60 días (Rodríguez *et al.* 1989).

2.3.3. Producción de semillas

Se ha determinado que a nivel de campo puede ocurrir cruzamientos naturales que van de 7 a 32% según Oldand citado por Leslie y Pollard (1954). Durante la producción de semilla se debe aislar los cultivares por lo menos unos 400 m de distancia entre ellos para evitar el cruzamiento. La cosecha debe hacerse cuando los frutos están bien maduros para poder extraerles la semilla. El rendimiento de semillas es de aproximadamente 39 a 56 kg/ha dependiendo de la especie.

2.4. Mejoramiento genético de *Capsicum*

De acuerdo con Wall (1994) el éxito en el cultivo de chile de alta calidad aumenta con la selección de variedades apropiadas y el uso de semilla certificada; así mismo se requiere de un buen manejo de cultivo. Por su parte Mendoza (1991) indica que es importante la combinación de genotipos de alto rendimiento con prácticas agrícolas que favorezcan desde el punto de vista económico, social o ambiental la expresión fenotípica de tales genotipos.

En *Capsicum* se han encontrado accesiones tolerantes al ataque de *F. occidentales*. No obstante, esta tolerancia no está basada en mecanismos de rechazo del vector hacia la planta o de antibiosis por parte de la planta (Fery y Schalk, 1991), por lo tanto el chile puede resultar interesante para contrarrestar los ataques de Trips, y para la lucha contra la propagación del virus del bronceado del tomate (TSWV) transmitidos por este mismo insecto.

Boiteux *et al.* (1993) han encontrado resistencia en campo del virus TSWV en dos líneas de *C. baccatum* var. Pendulum y afirman que esta resistencia está basada en un mecanismo de no preferencia del vector por la planta, ya que esta misma línea cuando se inocula artificialmente es muy susceptible al virus por lo que resultaría interesante asociarla con las otras resistencias encontradas.

Mediante ingeniería genética se ha conseguido obtener plantas transgénicas de tabaco que codifican elevadas cantidades de la proteína de nucleocápsida (N) del virus TSWV, de modo que cuando estas plantas son infectadas por ciertos aislados del virus se produce un aborto de la infección. El mecanismo por el cual se produce este aborto no es bien conocido, aunque se piensa que puede deberse a que el proceso de transcripción viral queda bloqueado. Debido a la elevada cantidad de proteína (N) en el citoplasma celular provocaría el paso de la polimerasa viral del modo de actuación transcritiva al replicativo (Pang *et al.*, 1993). No obstante no parece fácil incorporar este tipo de resistencia en *Capsicum*; porque es muy difícil regenerar plantas enteras a partir de cultivos celulares (Roselló *et al.*, 1994).

2.4.1. Injertación

Mediante la técnica de injertación es posible construir plantas artificiales, con el pie o portainjertos de una variedad ó especie y la parte aérea fructífera de otra. Esta técnica ofrece entre otras aplicaciones, la posibilidad de combatir la enfermedad conocida como tristeza o secado del chile producido por *Phytophthora capsici* si se injerta la variedad susceptible sobre pies resistentes al hongo. Sin embargo, esta técnica no es muy utilizada, por su poca rentabilidad (Gil-Ortega, 1973).

2.4.2. Producción de híbridos

El mejoramiento genético del chile juega un papel importante; al conjugar por la vía sexual el patrimonio genómico de dos o más padres. Esto es posible mediante cruzamientos, con el propósito de combinar en la progenie los alelos no comunes en los progenitores, ampliar la variabilidad y mejorar la posibilidad de seleccionar plantas sobresalientes durante el proceso de endocría y selección (Pozo y Ramírez, 1994).

El mejoramiento genético de chile consiste, tradicionalmente, en hacer cruzas entre líneas élite o variedades comerciales, siguiendo el esquema de hibridación endocrina y selección (Pozo y Ramírez, 1994), conocido como selección genealógica o métodos de pedigrí (Márquez, 1991).

El chile es una especie autógama, monoica, de flores completas y perfectas cuya estructura floral facilita el trabajo básico de emasculación y polinización en un programa de mejoramiento genético. Sin embargo, es común una baja eficiencia en el proceso de cruzamiento, debido a la corta vida del polen, vulnerabilidad del estigma y estilo al manejo durante la polinización entre otros factores (Nuez *et al.*, 1996). El porcentaje de obtención de los frutos varía según la técnica utilizada. Por ejemplo Ramiro (1968) obtuvo de 32 a 54.6% de frutos con emasculación, de 10.5 a 15% con emasculación y sin polinización artificial de 10.5 a 15%; y con emasculación y polinización artificial obtuvo de 23 a 55.6% de frutos.

El polen germina tres horas después de la polinización, y requiere de 8 a 10 horas para alcanzar el saco embrionario. Se puede preservar de 8 a 10 días a temperaturas de 20 a 22°C y HR de 50 a 55%, aunque su calidad baja cuando se almacena por más de 8 días. Los mejores resultados para la fertilización se obtienen cuando el polen se colecta el mismo día que abre la flor y cuando la polinización se realiza antes de la antésis (Veliz y Montás, 1981; Nuez *et al.* 1996).

2.5. Biotecnología del chile

2.5.1. Avances en el cultivo *in vitro* de chile

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas, y constituyen dentro de la biotecnología, la técnica que mayor aporte práctico han brindado. Sus aplicaciones son varias: regeneración de plantas, obtención de plantas libres de patógenos (Morel y Martin, 1995), conservación de germoplasma (Withers, 1985), producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1994), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* (Perez *et al.* 1998).

Aunque en las dos últimas décadas se han generado procesos excelentes para la propagación de plantas y el mejoramiento genético de muchas especies de la familia Solanaceae; el chile (*Capsicum* spp) se ha quedado atrás, probablemente, debido a la falta de un eficiente protocolo de regeneración (Lui y Simon, 1996; Ebida y Hu, 1993). La regeneración a partir de células y tejidos es un proceso fundamental para la aplicación de técnicas de transformación genética de las plantas. En *Capsicum* se han demostrado serias

dificultades en la regeneración de plantas completas, lo cual puede ser un claro indicador de la presencia de problemas morfogénéticos en estas especies (Ochoa-Alejo y Ramirez, 2001).

Smith y Heiser (1957), fueron los primeros en publicar trabajos en cultivo *in vitro* de chile. Plantas F1 fueron obtenidas de embriones sexuales parcialmente desarrollados de la cruce de *Capsicum pendulum* con *Capsicum annum*. Asimismo, embriones sin endospermo fueron originados del cruce de *Capsicum chinense* con *Capsicum pubescens*, los cuales se desarrollaron bien solo después de ser germinados en un medio de cultivo.

2.5.2. Cultivo de meristemos

El cultivo de meristemos ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa *in vitro* y dentro de esta se puede diferenciar dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias. El cultivo de meristemos se basa en la formación de brotes a partir de yemas ubicadas en las axilas de primordios foliares, los cuales son divididos y subdivididos repetidas veces (Hu y Wang, 1983). Este método a pesar de no ser el más rápido, ha sido el más utilizado para la propagación comercial, debido a la gran facilidad con que es establecido en la gran mayoría de las especies y a la estabilidad genética de las plantas regeneradas (Perez *et al.*, 1998).

Canul (1996), reporta hasta un 100% de asepsia en el cultivo de meristemos de chile habanero. Recomienda como mejor tratamiento de desinfección el hipoclorito de sodio (NaClO) al 15% (v/v). Además menciona que los mejores resultados para la obtención de brotes en este cultivo se lograron utilizando el medio MS semisólido de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 1.5 y 0.5 mg/l de Bencil aminopurina (BAP). Aunque se formó un bajo porcentaje de prendimiento (33.3%), fue en este tratamiento donde se logró la formación de plantas completas, a los 30 días de la siembra del meristemo. Menciona también la importancia de tomar en cuenta el tamaño del explante, ya que es necesario cultivar el meristemo con dos primordios foliares para lograr un establecimiento exitoso.

2.5.3. Organogénesis en chile

Esta técnica consiste en formar brotes a partir de órganos de plantas con potencial para la formación de vástagos. Existen dos tipos de organogénesis, la directa y la indirecta;

la directa consiste en la formación de brotes directamente de explantes tomados en cualquier parte de la planta sin pasar a formar callo, los explantes más utilizados en esta técnica son pecíolos y bases foliares. Mientras que en la indirecta hay formación de callos de los cuales se desarrollan brotes y raíces. Estos brotes pueden removerse para desarrollar plantas enteras y posteriormente multiplicarse (Usui *et al.*, 1996).

Gunay y Rao (1978), demostraron la inducción directa de meristemas adventicios a partir de cotiledones e hipocótilos de chile. Mientras que Fari y Czako (1981) repitieron estos experimentos y afirmaron que los meristemas adventicios de chile pueden ser inducidos en porciones superiores del hipocótilo, pero no en partes mas bajas. Sin embargo, ellos reportan que pocas plantas fueron obtenidas mediante esta técnica de cultivo de tejidos.

Ochoa-Alejo y García-Bautista (1990), afirman que explantes provenientes del hipocótilo de *Capsicum annuum* var. Esmeralda fueron capaces de formar vástagos y raíces adventicias, así también, la formación de callos, dependiendo de las concentraciones de reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo.

Heridas realizadas en la parte apical del hipocótilo promueven la formación de pequeños callos blancos y promueven la formación de brotes en *Capsicum annuum* spp. La respuesta a la formación de brotes depende de la especie en la cual se trabaje, en esta investigación la variedad de chile dulce que mejor respondió a la brotación fue la variedad Piquillo con un 95.1% de plántulas formadas (Dabauza y Peña, 1999)

Santana *et al.* (2005) lograron la regeneración de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) mediante organogénesis, a partir del cultivo de nudos y segmentos de tallo. Los explantes fueron cultivados en un MS suplementado con varias concentraciones de kinetina, thidiazuron (TDZ) y BAP. El TDZ fue clave en el proceso regulatorio para la formación de vástagos, una concentración de 3.4 μM indujo la regeneración de siete a ocho vástagos los cuales desarrollaron en plantas saludables. También se evaluó el efecto de la edad de los explantes sobre la formación de vástagos y el desarrollo de la planta.

2.5.4. Embriogénesis somática

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales. Este método es considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*. Debido a la naturaleza del embrión y la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, su uso como método de regeneración durante la transformación genética y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales, son solamente algunas de las ventajas de la embriogénesis somática (Street y Withers, 1974; Haccius, 1978; Tisserat *et al.*, 1979).

Algunas de las principales características de la embriogénesis somática según Sannasgala (1989) es la autonomía del embrión frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen por lo que puede ser separado fácilmente de éste; los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta que le dio origen y poseen una estructura bipolar con ápice y radícula.

Un embrión somático es muy similar a un embrión cigótico, sobre todo en su desarrollo desde el proembrión, pasando por las fases globular, corazón, torpedo y cotiledonar o embrión maduro, las cuales están bien definidas en especies de plantas dicotiledóneas. La embriogénesis somática se ve afectada por el genotipo de la planta donante, el tipo y estado fisiológico del explante, los reguladores de crecimiento y las condiciones de cultivo (Parrott, 1993).

Binzel *et al.* (1996) reportaron la inducción de la embriogénesis somática directa y la regeneración de plantas de chile (*Capsicum annuum* L). Las plantas fueron regeneradas a partir de embriones cigóticos inmaduros vía embriogénesis somática directa, sin pasar por la formación de callos. Como explantes se utilizaron los ápices de embriones cigóticos, ejes embrionarios y cotiledones los cuales crecieron en el medio MS conteniendo de 4 a 18 μM de 2,4-D, 10 μM de TDZ y altas concentraciones de sacarosa de 6 a 10%. Sin embargo, los mejores resultados fueron observados en el medio MS con concentraciones de 9 μM de 2,4-

D, 10% de agua de coco y 8% de azúcar. El proceso completo de inducción y maduración de los embriones fue hecho en el mismo medio. Más de un 70% de los embriones somáticos germinaron y posteriormente fueron transferidos a un medio MS que contenía ácido giberélico (AG₃) y TDZ, solos y en combinación, los embriones finalmente fueron transferidos en macetas para el crecimiento normal de la planta.

Buyukalaca y Mavituna (1996), lograron la regeneración de chile (*Capsicum annuum* var. Acre) a través de la embriogénesis somática en medio líquido. Para la formación de callos embriogénico se utilizaron explantes de embriones cigóticos maduros los cuales fueron plantados en el medio líquido MS con 9.05 µM de 2,4-D y 3% de azúcar. Los callos embrionarios fueron transferidos al mismo medio con la concentración de 2,4-D reducida a la mitad para incrementar la masa celular. Los cultivos embrionarios fueron pretratados por tres semanas con un medio MS líquido que contenía nitrato de potasio (KNO₃) y posteriormente fueron transferidos a un medio de iniciación embrionaria con 6 g/l de L-proline. Estos embriones fueron madurados en el medio MS al 50% suplementado con 1.89 µM de ácido abscísico (ABA). La conversión en plantas fue de un 97%.

Por su parte Kintzios *et al.* (2000) reportaron la inducción de la embriogénesis somática a partir de hojas jóvenes de chile dulce (*Capsicum annuum* L). Explantes de hoja de 1 cm fueron cultivados en un medio MS suplementado con 12.9 µM de BA, 9 µM de 2,4-D y 8% de azúcar, los cultivos fueron incubados en la oscuridad. La formación de un callo embriogénico fue observado en el 100% de los explantes a partir de la tercera semana en la oscuridad. El mayor número de embriones se observó en las hojas que fueron tomadas a partir del primer y segundo nudo en forma descendente, contados a partir del ápice. Estos explantes recibieron un pretratamiento por 24 h en un medio líquido MS conteniendo 129 µM de BA y luego fueron transferidos en el medio sólido. Los embriones somáticos en estado globular fueron subcultivados en un medio MS con un 3% de azúcar en el cual se desarrollaron hasta el estado de corazón y torpedo.

Kintzios *et al.* (2001) investigaron el efecto de las vitaminas y micronutrientes inorgánicos sobre el crecimiento de los callos y la proliferación de embriones somáticos. Estos autores encontraron que la adición de diferentes vitaminas al medio MS, ayuda al desarrollo de los callos embriogénicos. La adición de Piridoxina o Mio-inositol en el medio basal MS produjo mayor número de callos que el control, el cual contenía solamente

Tiamina. Sin embargo, significativamente el mayor número de embriones globulares fueron inducidos en un medio que contenía Ácido Nicotínico.

2.5.5. Cultivo de anteras

El cultivo *in vitro* de anteras o polen, es una técnica que puede combinarse con el mejoramiento tradicional para incrementar la eficiencia de la generación de variedades superiores, puesto que, con este sistema se pueden obtener líneas homocigóticas a partir de padres heterocigóticos en una sola generación. Como resultado de la homocigosis se consiguen líneas puras que, posteriormente hacen posible la producción de híbridos F1; y poseen una gran ventaja para el mejoramiento genético del cultivo (Croughan, 1995; Jain *et al.* 1996).

De acuerdo a Poschard y Dumas de Valux (1979), los primeros reportes de obtención de plantas haploides en *Capsicum* son de investigadores hindúes y chinos en 1973. Al año siguiente los franceses lograron regenerar los primeros haploides por androgénesis en Chile (Ramage y David, 1996). Estos autores presentaron los resultados de estudios efectuados por los principales países productores de hortalizas, especificando que los haploides de diferentes cultivares de *C. annuum* L. fueron obtenidos, con sensibles diferencias genotípicas. Dichos estudios toman en cuenta diferentes parámetros como son el crecimiento de las plantas donantes, las aplicaciones de pretratamientos térmicos y condiciones ambientales de cultivo que incluyen iluminación, temperatura y medios de cultivo con diferentes dosis de sales y reguladores de crecimiento.

Ferrie *et al.* (1998) y Ferrie y Kéller (1995) mencionan que el éxito en la inducción de la embriogénesis somática en el cultivo de anteras está influenciado por las condiciones de crecimiento de las plantas donantes (Fotoperíodo, intensidad lumínica y temperatura día/noche); los pretratamientos aplicados previos al inicio de la incubación; el estado de desarrollo de las células gametofíticas; el genotipo de la planta donante y la composición del medio de cultivo.

Kristiansen y Andersen (Citados por Ferrie 1986), encontraron que la formación de embriones somáticos a partir del cultivo de anteras fue óptima cuando las plantas donantes se cultivaron a una temperatura ambiental de 26°C. Las experiencias de Ramage y David

(1996) quienes trabajaron con plantas donantes cultivadas en invernaderos y con temperaturas controladas confirman este aspecto; además afirman que fuera de los invernaderos existe una influencia determinada por las estaciones del año. Matsubara *et al.* (1998) confirmaron estas observaciones al trabajar en el cultivo *in vitro* de anteras de diferentes especies de *Capsicum* colectados en diferentes épocas de año.

Cardeña (2000), observó que el establecimiento del cultivo *in vitro* de anteras de *Capsicum annuum*, variedad Xcat' ic. Está dada por la combinación de sales minerales MS al 50%, las vitaminas de Morel y Wetmore (1951), Mio-inositol (100 mg/l), adenina (50 mg/l) y sacarosa al 3%. Además, de aplicar choques térmicos de 4°C por 24 h, un régimen lumínico con fotoperíodos de 16:8 h y temperatura de incubación de 27±2°C, las condiciones adecuadas para inducir y desarrollar los callos.

2.5.6. Aclimatación

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente controlado con alta humedad relativa, baja intensidad lumínica, temperaturas constantes, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y fisiología de las plantas, que las hacen diferentes de las cultivadas en campo. Todos estos cambios provocan que una gran mayoría de las plantas micropropagadas no sobrevivan al trasplante por las condiciones ambientales que se presentan en el campo. Por lo tanto, se hace necesario aplicar técnicas de aclimatación *in vitro* o *ex vitro*, que garanticen un retorno gradual de estas características morfológicas a la planta (Donnelly *et al.*, 1985).

Vitroplantas de *Capsicum annuum* obtenidas por organogénesis fueron cultivadas en macetas y transferidas al invernadero de aclimatación, obteniendo un alto porcentaje de sobrevivencia. Las plantas tuvieron un desarrollo normal y desarrollaron frutos que llegaron a la maduración (Dabauza y Peña, 2001).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del estudio

La presente investigación fue realizada en los Laboratorios de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica. El trabajo se desarrolló en el periodo que abarca de diciembre del 2004 a octubre del 2005.

Los trabajos fueron desarrollados en tres fases bien definidas: elaboración de los semilleros y desarrollo de plantas madres en invernadero; establecimiento del cultivo en el laboratorio; preparación de las muestras para el análisis histológico y aclimatación en el invernadero.

3.2. Material vegetal

Todos los experimentos fueron realizados con plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) accesión 5465 y chile dulce (*Capsicum annuum* var. Najera) accesión 20266, desarrolladas en el invernadero a partir de semillas obtenidas del Banco de Germoplasma del CATIE.

3.2.1. Germinación de semillas y establecimiento de almácigos

Las semillas fueron germinadas en el invernadero de los laboratorios de Biotecnología del CATIE. Se utilizó bandejas de plástico y el sustrato comercial Fafarg®. Veinticinco días después de la germinación las plantas se transplantaron en macetas que contenían una mezcla de 30% de fibra de coco y 70% de suelo. Esta mezcla fue desinfectada previamente con 3 ml/l de PCNB® cuyo ingrediente activo es clorfenil quintozeno. Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero con aplicaciones de 2 g/l de fungicida comercial Clortosip® cuyo ingrediente activo es clorotalonil. Las aplicaciones se realizaron con una semana de anticipación a la introducción *in vitro*.

3.2.2. Desinfección de explantes

Todos los explantes (hojas y ápices) utilizados en esta investigación fueron desinfectados utilizando el mismo tratamiento. Este consistió en el lavado de los explantes con agua corriente y posteriormente tratados con fungicida a razón de 1 g/l de Clortosip® durante 10 minutos. Seguidamente fueron llevados a la cámara de flujo laminar, donde se aplicó una doble desinfección con hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) a concentraciones de 10 y 8% durante 20 y 15 minutos respectivamente. Finalmente se realizó 3 enjuagues con agua bidestilada estéril.

3.3. Embriogénesis somática

3.3.1. Inducción de callo embriogénico a partir de segmentos de hoja

Como fuente de explantes se utilizó hojas de plantas de 35 días de edad colectadas antes de la floración. Las hojas se seleccionaron del meristemo apical hacia la raíz tomando la tercera hoja del tercer nudo. En el laboratorio las hojas fueron desinfectas según el procedimiento que se mencionó previamente.

Posteriormente las hojas fueron cortadas en secciones de 1 cm^2 aproximadamente, cuidando eliminar el borde y la vena central para luego colocarlas en el cultivo con la superficie abaxial hacia el medio.

Los explantes fueron introducidos en tubos viales de 2 X 10 cm. Estos tubos contenían 10 ml de medio de cultivo constituido de las sales minerales MS (Anexo 1) reguladores de crecimiento, vitaminas y sacarosa al 8% de acuerdo a lo recomendado por Kintzios *et al.*, (2001), con algunas variantes (Cuadro 1). Se utilizó agar al 0.8% como gelificante y el pH se ajustó a 5.7. Los cultivos fueron incubados en la oscuridad por 3 semanas a una temperatura de 27 ± 2 °C. Posteriormente fueron transferidos a la luz bajo un fotoperíodo de 12 horas luz y una temperatura de 29 ± 2 °C.

Cuadro 1. Medios de cultivo utilizados para la inducción de la embriogénesis somática de chile dulce (*C. annuum* var. Najera) y chile habanero (*C. chinense*). El M1 corresponde al testigo recomendado por Kintzios *et al.* (2000).

M 1	M 2	M 3	M 4
MS Completo	MS Completo	MS Completo	MS Completo
0.5 mg/l Tiamina HCl 0.1 mg/l Ac. Nicotínico	Vitaminas MS	1 mg/l Tiamina HCl	1 mg/l Ac. Nicotínico
3 mg/l BAP	3 mg/l BAP	3 mg/l BAP	3 mg/l BAP
2 mg/l 2,4-D	2 mg/l 2,4-D	2 mg/l 2,4-D	2 mg/l 2,4-D
80 g sacarosa	80 g sacarosa	80 g sacarosa	80 g sacarosa

Los mejores medios (M1 y M2) del ensayo anterior, en cuanto al desarrollo del callo friable, fueron tomados como punto de partida para un nuevo ensayo. Este ensayo tuvo como objetivo evaluar la respuesta de diferentes concentraciones de sacarosa (8, 6 y 4%) y el tiempo de cultivo en la oscuridad (3, 4, 5 y 6 semanas) durante la inducción de callo embriogénico en las dos especies de *Capsicum*.

De igual manera se realizó un último ensayo utilizando el medio MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D, con la finalidad de evaluar la respuesta a la formación de callo embriogénico (Cuadro 2). Como testigo se utilizó el tratamiento 12 que corresponde al medio de Kintzios *et al.*, (2000).

Cuadro 2. Efecto de las concentraciones de BAP y 2,4-D, solos o en combinación sobre la inducción de callo embriogénico de *C. annuum* y *C. chinense*.

BAP mg/l 2,4-D mg/l	0	1.0	1.5	3.0
0	1	2	3	4
1.0	5	6	7	8
2.0	9	10	11	12
4.0	13	14	15	16

Los cultivos fueron incubados a la oscuridad durante 3 semanas a una temperatura de 27 ± 2 °C. En este ensayo se utilizó como unidad experimental platos petri que contenían 20 ml de medio de cultivo, y cuatro submuestras cada uno.

3.3.2. Multiplicación del callo en medio líquido

Los callos procedentes de ensayos anteriores e identificados con características interesantes fueron tomados para iniciar suspensiones celulares. El procedimiento utilizado consistió en adicionar una porción de callo en platos multi-hueco de seis pozos cada uno los cuales tienen un volumen de 10 ml. Se utilizaron los medios de cultivo para suspensiones celulares de *Capsicum* (Buyukalaca y Mavituna, 1996) y de *Musa* (Cotê *et al.* 1996) con el fin de analizar cualitativamente el comportamiento de los callos en medio líquido (Anexo 2). Además se hicieron plateos en los medios de regeneración correspondientes a estos autores para evaluar la calidad embrionaria de las suspensiones.

3.3.3. Histología

Con la finalidad de estudiar, si los callos que se formaron tenían características embriogénicas, se procedió a realizar el estudio histológico. Para esto se tomaron muestras de callos de diferentes tratamientos y con características morfogenéticas interesantes.

Los callos fueron colocados inicialmente en una solución de agar y agua a una concentración de 1% para formar bloques y evitar que las células se desintegren. Posteriormente se colocaron en un tubo vial con Formalina-Alcohol-Ácido Acético (FAA) durante 48 horas y seguidamente fueron deshidratadas en una serie ascendente de etanol (50-70-80-90-95-100 y 100 %) durante una hora en cada uno de ellos; después fueron infiltrados en resina Technovit® 7100. Luego se prepararon los bloques con 15 ml de solución de resina usada en la infiltración y se le adicionó 1 ml de la solución endurecedora Technovit 7100®. Posteriormente se realizaron cortes transversales de 3 a 4 micras de grosor con la ayuda de un micrótopo de resina y seguidamente se tiñeron en una batería de tinción con PAS (Periodic acid Schiff), para finalmente observarlos en el microscopio de luz.

3.3.4. Variables evaluadas

En estos ensayos se evaluaron las siguientes variables:

- Porcentaje de asepsia (%).
- Porcentaje para el desarrollo de callo. En la Figura 1 se muestra la escala de medición establecida para evaluar esta variable.

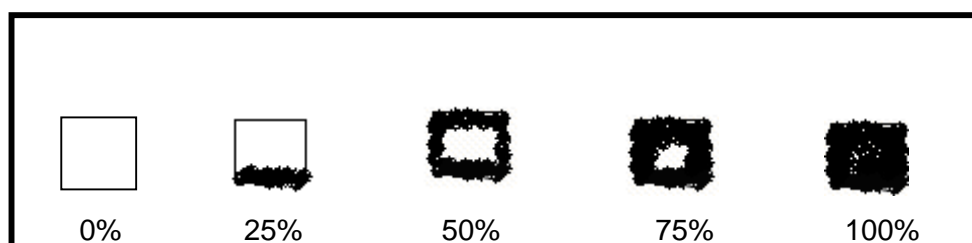


Figura 1. Escala de medición utilizada para evaluar el desarrollo de callo en las dos especies de Capsicum.

- Características del callo
 1. Naturaleza del callo (Compacto o friable)
 2. Color del callo
 3. Presencia de callo secundario

3.4. Cultivo de ápices

3.4.1. Fase de iniciación

Yemas apicales fueron tomadas de plantas de 40 días de edad antes de la floración, ubicadas en el invernadero. Estos materiales se desinfectaron utilizando el tratamiento de desinfección antes descrito en el apartado 3.2.2. Los ápices se retiraron cuidadosamente con la ayuda de un estereoscopio, para finalmente introducirlos en un medio basal MS siguiendo las indicaciones de Canul (1996). El Cuadro 3 muestra los tratamientos utilizados para evaluar el efecto de tres concentraciones de sacarosa en combinación con diferentes dosis de BAP. Como testigo se utilizó el tratamiento 4 sugerido por Canul (1996). Los cultivos permanecieron en este medio durante un mes, bajo un fotoperiodo de 12 horas y una temperatura de incubación de 29 ± 2 °C.

Cuadro 3. Concentraciones de sacarosa y BAP utilizados para el cultivo de ápices y yemas axilares de *C. Annuum* var. Najera y *C. chinense*.

BAP mg/l \ Sacarosa	0.25	0.5	1.0	1.5
3%	1	2	3	4
6%	5	6	7	8
8%	9	10	11	12

3.4.2. Fase de multiplicación

Esta etapa consistió en tomar los brotes que se lograron desarrollar en la fase de iniciación, para comenzar el proceso de multiplicación. Estos brotes fueron seccionados en explantes nodales y cultivados en frascos tipo gerber conteniendo un medio MS completo suplementado con tres citocininas, la BAP (0.25 y 0.5 mg/l), Kin (0.25 y 0.5 mg/l) y el TDZ (0.25 y 0.5 mg/l); como fuente de carbono se utilizó sacarosa al 3%. Estos cultivos se incubaron bajo un fotoperíodos de 12 horas y una temperatura de 29 ± 2 °C.

3.4.3. Fase de desarrollo

Parte de los brotes del primer ensayo de cultivo de ápices y con un mes de edad, fueron transferidos a un medio MS completo y a otro medio MS reducido a la mitad en su composición de sales, esto con el propósito de buscar la mejor concentración para el desarrollo de los brotes. Ambos medios contenían 1 g/l de carbón activado, 3% de sacarosa y 0.8% de agar como gelificante.

Asimismo, los brotes que fueron llevados a fase de multiplicación como explantes nodales posteriormente fueron transferidos en la fase de desarrollo utilizando un medio MS completo como ha sido indicado en el párrafo anterior. Todos los tratamientos fueron incubados bajo un fotoperíodo de 12 horas luz y una temperatura de 29 ± 2 °C y evaluados cada tres semanas.

3.4.4. Fase de aclimatación

La aclimatación consistió en seleccionar las vitroplantas con una altura promedio de 4.5 cm, con 2 a 8 folíolos y con raíces bien desarrolladas para transferirlas a condiciones de invernadero. Para tal efecto se utilizó recipientes de plástico (macetas), los cuales fueron cubiertos de un sustrato estéril compuesto de 50% de suelo y 50% de fibra de coco. Las vitroplantas fueron sacadas del frasco y lavadas sus raíces con abundante agua para ser plantadas en las macetas. Seguidamente los cultivos fueron colocados en el invernadero de aclimatación directamente bajo sombra de Saran[®]. Las plantas recibieron un solo riego diario por la mañana, manteniendo el sustrato totalmente húmedo durante dos semanas. En esta etapa se evaluó el porcentaje de sobrevivencia y el comportamiento morfológico de la plantas.

3.4.5. Variables evaluadas

Las variables evaluadas en el cultivo de ápices y explantes nodales fueron las siguientes:

- Porcentaje de asepsia (%)
- Número de hojas formadas
- Número de nudos y entrenudos formados
- Presencia de callo

3.4.6. Análisis estadístico

Para todos los experimentos se utilizó tres repeticiones y un Diseño Completamente al Azar (DCA) con o sin diseño factorial de los tratamientos. Estos fueron sometidos al análisis de la varianza (ANDEVA) para la comparación de medias, y en algunos casos se les aplicó la prueba de comparación múltiple de Duncan. Para formar grupos de tratamientos se aplicó el análisis de conglomerados. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS (1999). En los ensayos de suspensiones celulares y aclimatación no se aplicó ningún análisis estadístico por considerarse meramente exploratorios y preliminares.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Germinación de semillas y establecimiento de almácigos

Bajo condiciones de almacenaje las semillas de especies de *Capsicum* permanecen viables durante 5 a 8 años; aunque hay considerable variación entre cultivares y condiciones de almacenamiento. El contenido de humedad óptimo para la conservación de estas semillas está entre 4 y 5%, bajo temperaturas de -10 y -20° C, estas condiciones permiten mantener la viabilidad hasta en un 85% con periodos de germinación que van de 3 a 4 semanas después de la siembra, dependiendo de las condiciones de germinación y la variedad empleada (IBPGR, 1983). Las semillas utilizadas en este estudio procedentes del Banco de Germoplasma del CATIE, se comportaron de manera similar. En semillas de *C. annuum* se obtuvo un 95% de germinación después de 15 días de cultivo; mientras que en *C. chinense* sólo se obtuvo un 83% de germinación, después de 18 días de cultivo. Esta diferencia posiblemente se debe a las condiciones y tiempos de almacenamiento de las semillas y a la constante variación del estado del tiempo durante el periodo de germinación.

El desarrollo posterior de las plantas también fue variable entre ambas especies, en *C. annuum* se obtuvieron plantas sanas y vigorosas mientras que en *C. chinense* algunas plantas se mostraban enfermas y cloróticas lo cual redujo la disponibilidad de material para la introducción al laboratorio (Figura 2).

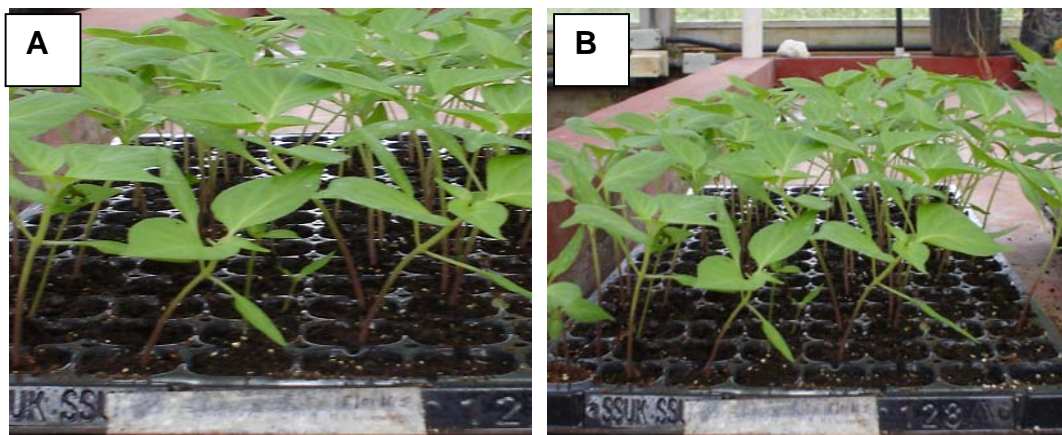


Figura 2. Elaboración de semilleros en especies de *Capsicum*. A. *C. annuum* L var. Najera, muestra mayor germinación. B. *C. chinense* Jacq., muestra mayor número de celdas vacía debido a la menor germinación.

4.2. Inducción de la embriogénesis somática

4.2.1. Establecimiento de cultivos asépticos

El éxito de los sistemas de micropropagación de plantas depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana, hoy en día la contaminación es uno de los principales problemas para los que trabajan en cultivo de tejidos de plantas (Perez *et al.* 1998). Es por esta razón, que se debe prestar total importancia a la procedencia de los explantes, ya que todo material que viene del campo y que se introduce al laboratorio siempre va acompañado de microorganismos presentes en el ambiente donde se desarrollan las plantas (George, 1993). Al respecto Mroginski y Roca (1991), mencionan que el procedimiento de desinfección debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes, por lo tanto no es factible recomendar un procedimiento general para este propósito, y se debe considerar la especie y el tipo de explante a utilizar. Para considerar el éxito de la desinfección es necesario evaluar el nivel de asepsia como el de sobrevivencia de los explantes.

Afortunadamente el establecimiento de cultivos asépticos de hoja se logró con éxito desde los primeros ensayos. La doble desinfección con hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), permitió el mejor resultado de asepsia en *C. chinense* con un 94.61%; mientras que en *C. annuum* se obtuvo un 92.87% (Fig. 3). En *C. chinense* se obtuvo mayor daño por bacterias (4%) y en *C. annuum* se observó mayor contaminación por hongos (6%). Además se observó un incremento en la contaminación conforme las plantas fueron alcanzando la madurez, lo cual posiblemente se debe a la presencia de hongos y bacterias endofíticos presentes en el material vegetal y que se expresan a cierta edad de las plantas.

A pesar del alto porcentaje de asepsia observado en las dos especies de *Capsicum*, también se apreció un número importante de explantes necrosados cuando se utilizaron tiempos de desinfección de 20 y 15 minutos en $\text{Ca}(\text{OCl})_2$; por tal motivo el tiempo de la doble desinfección se redujo a 15 y 10 minutos respectivamente en los ensayos posteriores.

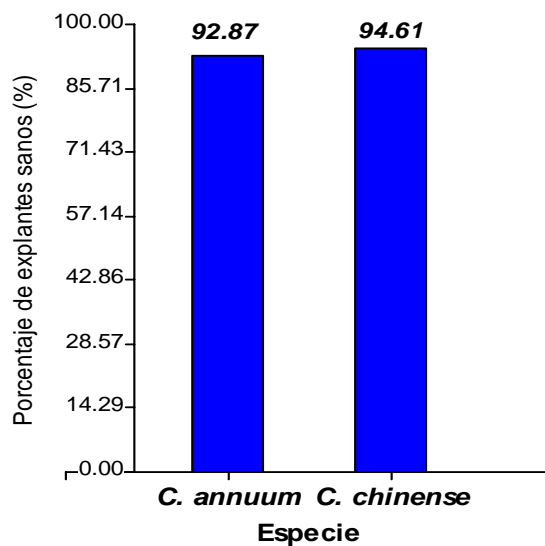


Figura 3. Porcentaje de asepsia en explantes foliares de *C. annuum* y *C. chinense*.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Kintzios *et al.* (2000), quienes reportan hasta un 100% de asepsia al trabajar con explantes de hoja de *C. annuum*, empleando una solución al 20% de NaOCl y 2% de Tween-80 por 10 minutos. Por consiguiente, el tratamiento de desinfección utilizados en este estudio logró cumplir los requerimientos de sanidad necesarios para el establecimiento *in vitro* de las dos especies de *Capsicum*.

4.2.2. Obtención del callo primario

Son pocos los trabajos desarrollados para la inducción de la embriogénesis somática en especies de *Capsicum* (Binzel *et al.* 1996; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Kintzios *et al.* 2000). En lo que respecta a la inducción de callo a partir de explantes de hoja, se tomó como modelo el protocolo establecido por Kintzios *et al.* (2000). Estos autores reportaron haber obtenido embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo a partir de explantes de hoja de *C. annuum* a la tercera semana de su cultivo en la oscuridad.

En este estudio se observó que a la primera semana de cultivo en la oscuridad los explantes cultivados en los cuatro medios de inducción de callo (M1, M2, M3 y M4)

mostraron la formación de un callo de cicatrización en el contorno del explante tanto en *C. annuum*, como en *C. chinense*. No obstante, la morfología del callo fue diferente en ambas especies. En *C. chinense* el callo fue cristalino, mientras que en *C. annuum* se observó un callo cremoso y denso. Al realizar las evaluaciones a la tercera semana de cultivo en la oscuridad los callos mostraban un aumento en tamaño y volumen con apariencia consistente en las dos especies.

La escala de medición establecida anteriormente (Fig. 1), para evaluar la callogénesis en el curso del cultivo permitió medir cualitativamente el incremento en el desarrollo del callo en el tiempo. La Figura 4 muestra el incremento en el desarrollo de callo expresado en porcentaje del área del explante cubierta por el callo.

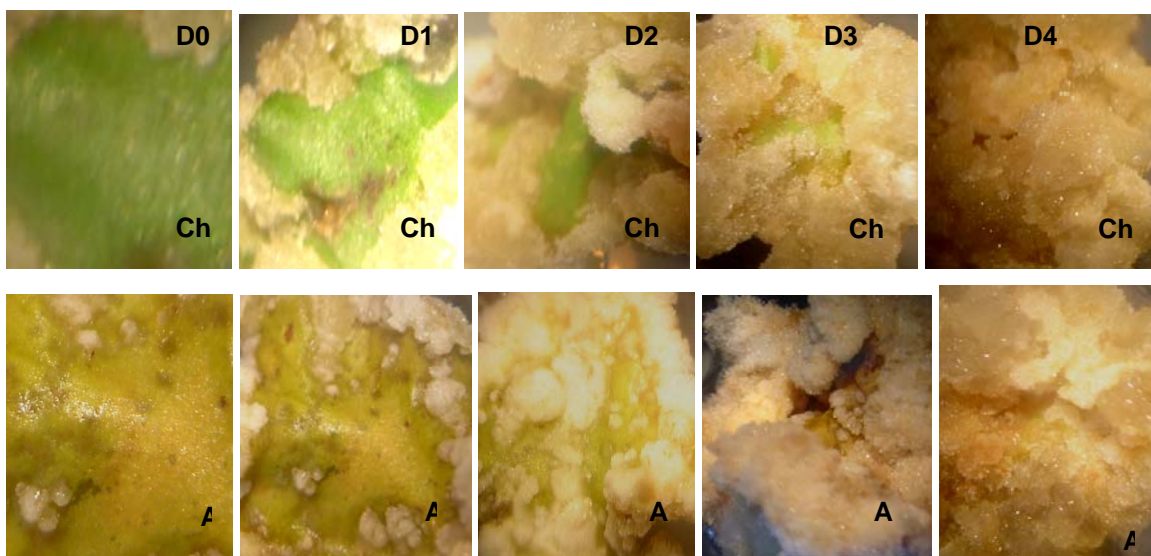


Figura 4. Desarrollo del callo primario en segmentos de hoja de *C. chinense* (Ch) y *C.annuum* (A). D0= ausencia, D1= 25%, D2= 50%, D4= 75% y D5= 100% de callo en la superficie del explante.

Las evaluaciones efectuadas después de la tercera semana de cultivo en la oscuridad, muestran diferentes respuestas en el desarrollo del callo dependiendo de la especie y de los medios de cultivo empleados. Aunque se pudo apreciar el desarrollo constante de callo en todos los medios, el análisis de la varianza (ANDEVA) indica

diferencias significativas con relación al medio (0.0014) y a la especie (0.0011); mientras que la interacción medio*especie (0.4848) no fue significativa, indicando que estos dos factores actúan de manera independiente (Cuadro 1, Anexo 3).

Según la prueba de comparación de medias de Duncan, se observan diferencias estadísticas altamente significativas para el desarrollo de callo en los diferentes medios de cultivo. Se destacaron como mejores tratamientos los medios M1 y M2 para ambas especies, el promedio más alto fue registrado en el medio M2 con una media de 71.54% de callo, sin encontrarse diferencias significativas con el tratamiento testigo M1 (71.04%). Sin embargo, estos medios fueron estadísticamente diferentes a los medios M3 y M4 en los cuales se obtuvo efectos mínimos, con medias de 62.56 y 54.99, respectivamente como se aprecia en la Figura 5. Estos medios tampoco presentaron diferencias significativas entre sí. La adición de vitaminas al medio MS como el ácido nicotínico más la combinación de piridoxina o mioinositol favorecen el desarrollo del callo según Kintzios *et al.* (2001). Asimismo, Vázquez *et al.* (2003), mencionan que el mejor tratamiento para el desarrollo de callo en hojas de *C. annuum* fue el uso de 20% de agua de coco más la adición de vitaminas. Esto coincide con nuestros resultados obtenidos en los medios M1 y M2 en los cuales se combinó dos o más vitaminas; mientras que en los medios M3 y M4 solamente se adicionó una vitamina (Tiamina ó Ac. Nicotínico) a lo cual se le atribuye las diferentes respuestas. En el medio M4 el cual contiene ácido nicotínico Kintzios *et al.* (2001), lograron la inducción de embriones somáticos; no obstante esta respuesta no fue observada en este estudio.

La respuesta a los medios M3 y M4 fue un lento desarrollo del callo y mayor número de explantes necrosados; sin embargo, tener una buena respuesta a la formación de callo no es sinónimo de obtener callos con características embriogénicas. En este sentido Chanatásig (2004), menciona en su estudio haber obtenido callos embriogénicos a partir de callos necrosados de pétalos de cacao, y a partir de ellos obtuvo embriones en diferentes estados de desarrollo. Sin embargo, este estudio no puede tomarse como punto de partida para seleccionar un callo embriogénico en Chile por tratarse de especies totalmente diferentes y trabajar con metodologías diferentes.

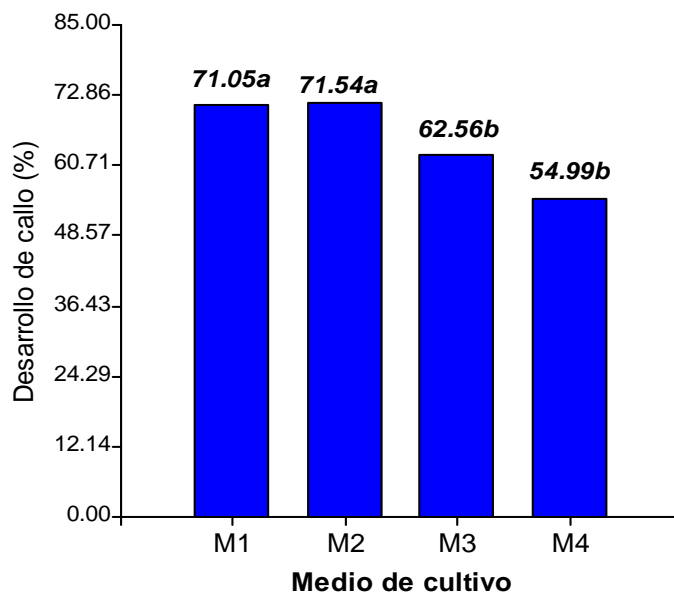


Figura 5. Medias para el desarrollo de callo primario expresado en porcentajes para los cuatro medios de cultivo probados en las dos especies de *Capsicum*.

En el Cuadro 5 se puede apreciar que la especie *C. chinense* respondió mejor al desarrollo de callo con una media de 70.34% con diferencias altamente significativas respecto a la especie *C. annuum* que mostró una media de 59.58%. Esto nos indica que la respuesta al desarrollo de callo depende en gran parte de la especie, así tenemos que *C. chinense* tiene una mayor capacidad para la formación de callo primario que la especie *C. annuum* en las condiciones planteadas.

Cuadro 4. Prueba de medias y análisis de varianza para las principales variables evaluadas en las dos especies de *Capsicum* cultivadas en los medios M1 y M2 en condiciones de oscuridad.

Especie	Medio de cultivo	Asepsia (%)	Explante necrosado (%)	Desarrollo callo primario (%)
<i>C. annuum</i>	M1 y M2	92.87	3.71	59.58b
<i>C. chinense</i>	M1 y M2	94.61	2.319	70.34a

Cuando el cultivo fue evaluado a la tercera semana en luz continua se observó diferencias estadísticas significativas entre el medio de cultivo (0.0019) y la especie (0.0009); contrariamente la interacción medio*especie (0.06023) no fue significativa (Cuadro 2, anexo 3). Los explantes mostraron un comportamiento similar con respecto a la tasa de crecimiento exponencial del callo cuando fueron incubados inicialmente en oscuridad y luego transferidos a la luz (Cuadro 6). Sin embargo, en explantes bajo condiciones de oscuridad se apreció un tipo de callo con características friables, mientras que en condiciones de luz se apreciaron células alargadas y muy hidratadas en gran número de callos. Al respecto, Kintzios *et al.* (2000), también mencionan haber obtenido mayor número de callos friables cuando los explantes se incubaron en condiciones de oscuridad.

Cuadro 5. Prueba de medias y análisis de varianza para las principales variables evaluadas en las dos especies de *Capsicum* cultivadas en los medios M1 y M2, en condiciones de luz.

Especie	Medio de cultivo	Asepcia (%)	Explante necrosado (%)	Desarrollo de callo primario (%)
<i>C. annuum</i>	1 y 2	88.87	3.71	59.58b
<i>C. chinense</i>	2 y 1	89.61	2.319	70.88a

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo anterior y destacando como mejor tratamiento los medios M1 y M2 para ambas especies se inició un segundo ensayo para evaluar concentraciones de sacarosa y tiempos de cultivo en la oscuridad. Al realizar la prueba de análisis de varianza se encontró diferencias significativas con relación a sacarosa (<0.0001) y el tiempo de cultivo en la oscuridad (<0.0001), para ambas especies. En lo referente a las interacciones éstas se presentaron en especie*medio (0.0173), especie*oscuridad (<0.0001), medio*oscuridad (0.0147), y especie*medio*oscuridad (0.0380). No se encontró interacción entre los cuatro factores (Anexo 4).

Las dos especies se comportaron de manera similar al ensayo anterior, lo cual confirma que *C. chinense* con una media de 67.88%, es más callogénico que *C. annuum* con una media de 60.95% (Fig. 6A). No se encontraron diferencias significativas para el desarrollo de callo en 8 y 6% de sacarosa con medias de 68.99 y 66.59% respectivamente,

pero si con respecto al 4% de sacarosa con una media de 57.65% (Fig. 6B). Esto significa que hay mayor desarrollo del callo a mayor concentración de sacarosa, pero no depende solamente de esta fuente sino que tiene una acción conjunta con los otros factores. Harini y Laskshmi Sita (1993), reportaron haber encontrado mayor desarrollo de callo al trabajar con concentraciones de 2 a 10% de sacarosa, pero el mayor número de embriones en estado globular y cotiledonar lo obtuvo al trabajar con 8 y 10% de sacarosa en explantes de embriones cigóticos de *C. annuum* var. California. Por otro lado, Binzel *et al.* (1996), lograron la formación de callo embriogénico en *C. annuum* en presencia de sacarosa al 8%.

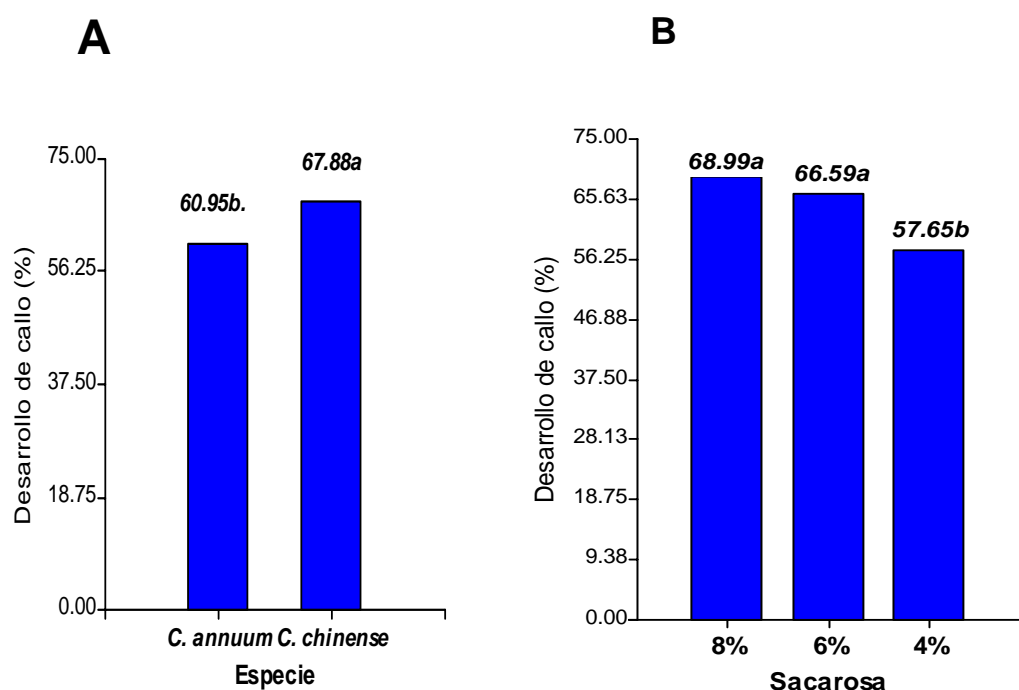


Figura 6. Diferentes efectos sobre el desarrollo de callo primario. A. Respuesta de las dos especies de *Capsicum* al desarrollo de callo primario. B. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el desarrollo de callo primario.

Según se muestra en la Figura 7 el tiempo de cultivo en la oscuridad tiene un efecto significativo sobre la calogénesis. Seis semanas de cultivo en la oscuridad significaron una media de 82.43% de desarrollo de callo; en tanto que tres semanas reflejaron una calogénesis de 54.12%. Sin embargo, cuando los explantes fueron transferidos a condiciones de luz en determinado momento alcanzaron un 100% de formación de callo.

Chee *et al.* (1982) citados por Villalobos y Thorper (1991), señalan que los factores físicos entre ellos la luz y la temperatura son considerados de los más importantes a controlar durante la microprogación.

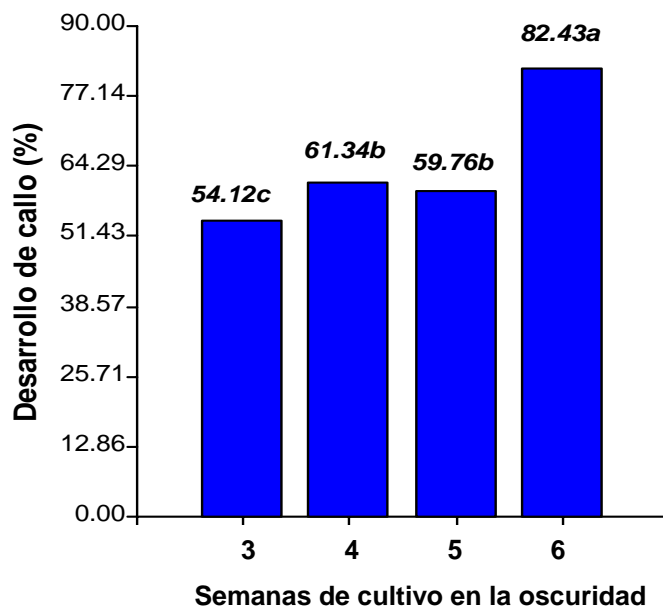


Figura 7. Efecto del tiempo de cultivo en la oscuridad sobre el desarrollo de callo.

Debido a la cantidad de tratamientos (48), se aplicó el análisis de conglomerados con el propósito de agrupar tratamientos y de esta forma seleccionar un grupo de ellos que fuera estadísticamente diferente del resto. (Fig. 8). Este análisis (Figura 1, Anexo 5), permitió seleccionar siete grupos, destacando el grupo **V** como el más callogénico con una media de 90.43% de desarrollo de callo, y por lo tanto significativamente diferente a los otros grupos formados. Mientras que en el grupo **VII** se apreciaron los más bajos rendimientos (34.23%).

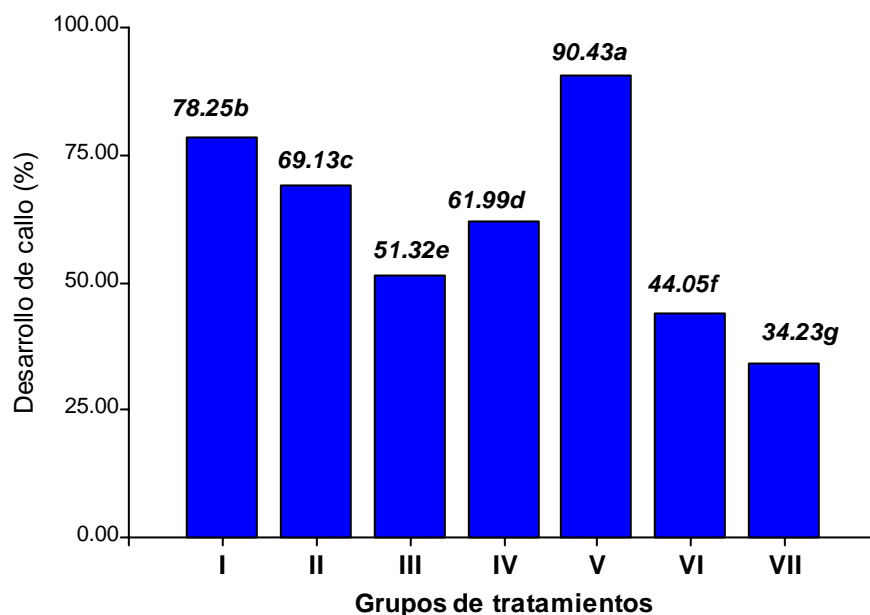


Figura 8. Grupos de tratamientos con la combinación de cuatro factores especie (*C. annuum* y *C. chinense*), medios (1 y 2), sacarosa (4, 6 y 8%) y semanas del cultivo en la oscuridad (3, 4, 5 y 6 semanas) definidos por el análisis de conglomerados.

En el Cuadro 6 se presenta un resumen de la combinación de tratamientos que favorecen la formación de callo en cada una de las especies. Así tenemos que para *C. annuum* estas combinaciones de tratamientos se encontraron en el grupo **V** en el medio M1 con 8% de sacarosa y seis semanas de cultivo en la oscuridad, superando al testigo con tres semanas de cultivo en la oscuridad. Cuando se utilizó el medio M2, las tres concentraciones de sacarosa y 6 semanas de cultivo en la oscuridad favorecieron el desarrollo de callo. Por lo tanto se puede recomendar el medio M2 con 4% de sacarosa ya que este tratamiento produce un comportamiento similar que al utilizar las concentraciones más altas. Asimismo para la especie *C. chinense* la combinación que mejor resultó fue el medio M1 con 6 y 8 % de sacarosa y 6 semanas de cultivo en la oscuridad o bien el medio M2 en presencia de 6% de sacarosa y 6 semanas de cultivo en la oscuridad.

Cuadro 6. Grupo V con las combinaciones de tratamientos que favorecen el desarrollo de callo en las dos especies de *Capsicum*.

Especie	Grupo	Medio de cultivo	Sacarosa (%)	Semana de cultivo a la oscuridad
<i>Capsicum annuum</i>	V	1	8	6a
		2	8	6a
		2	6	6a
		2	4	6a
<i>Capsicum chinense</i>	V	1	6	6a
		1	8	6a
		2	6	6a

Para el buen desarrollo de los explantes es necesario tomar en cuenta las interacciones entre la luz, la sacarosa y la fuente nitrogenada. La expresión del gen y la actividad enzimática de las proteínas dentro del medio son regulados por estímulos internos y ambientales en el que la luz, la fuente de carbono y la fuente nitrogenada juegan un papel muy importante en el desarrollo morfogénico de los explantes (Sivasankar y Oaks, 1996).

Nuestros resultados difieren con los obtenidos por Kintzios *et al.* (2000) y Binzel *et al.* (1996), quienes recomiendan utilizar 8% de sacarosa y 3 semanas de cultivo en la oscuridad para la expresión del callo embriogénico y posteriormente la formación de embriones somáticos en explantes de *C. annuum*. A pesar de que este tratamiento fue usado como testigo, se pudo apreciar que los callos que permanecieron mayor tiempo en la oscuridad mostraban un buen desarrollo con características morfogénicas como una mayor friabilidad y disgregación. De igual manera se apreció la diferenciación de algunos callos de coloración café translucido los cuales se agrupaban entre sí y presentaba una coloración café translucido, mientras que los callos que se transfirieron tempranamente a condiciones de luz presentaban células alargadas y muy hidratadas sin mostrar características morfogénicas interesantes.

El comportamiento de los explantes respecto al desarrollo del callo friable se evaluó en un último ensayo, empleando un medio MS suplementado con diferentes concentraciones de citocinina y auxina. Este ensayo permitió observar diferencias significativas entre los efectos principales de la BAP (<0.0001) y el 2,4-D (<0.0001) y la interacción de todos los factores, los cuales resultaron ser significativos indicando que la citocinina depende de la auxina para el desarrollo de callo (Anexo 6).

Por primera vez en esta investigación no se encontraron diferencias significativas para el desarrollo del callo en las dos especies de *Capsicum*. El desarrollo del callo es favorecido por las concentraciones de 1 y 1.5 mg/l de BAP con medias de 47.22 y 45.91%; respectivamente. Los porcentajes más bajos de desarrollo del callo se obtuvieron en 3 y 0 mg/l de BAP con medias de 36.58 y 27.92%, respectivamente (Fig. 9A). Concentraciones altas de 4 y 2 mg/l de 2,4-D favorecen el desarrollo de callo (54.05 y 49.31 %) encontrándose los más bajos rendimientos (36.02 y 18.35 %) al 1 y 0 mg/l de 2,4-D (Fig. 9 B). No obstante, hasta el momento ninguno de estos tratamientos ha favorecido la inducción de callo embriogénico.

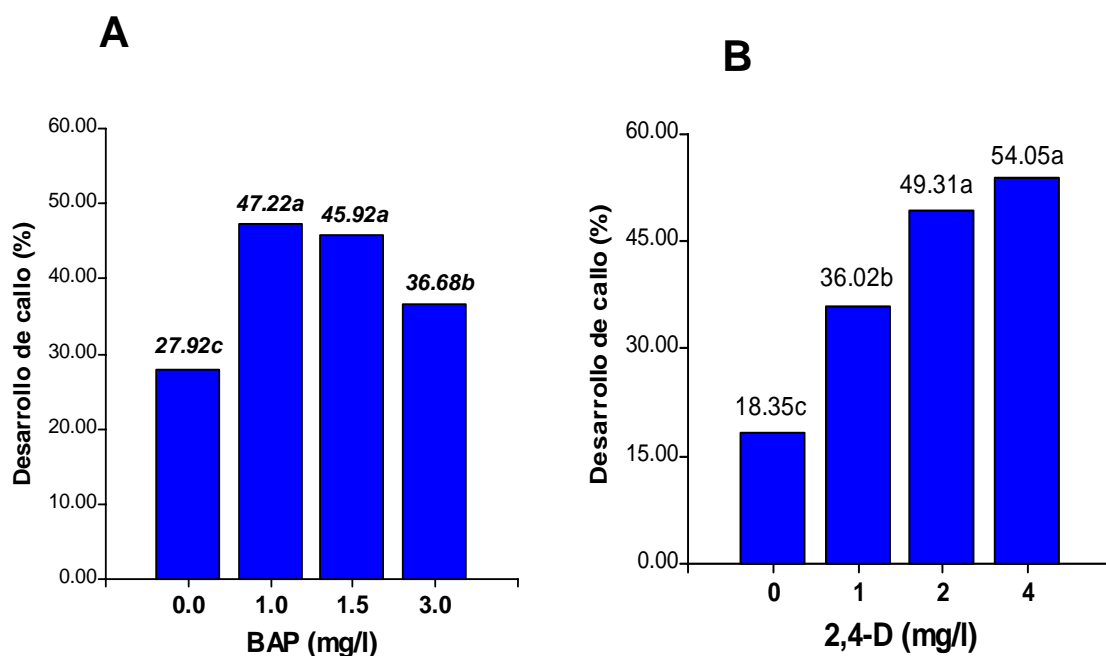


Figura 9. Efecto de los reguladores de crecimiento BAP y 2,4-D sobre el desarrollo de los callos en las dos especies de *Capsicum*. A. Concentraciones de BAP (mg/l). B. Concentraciones de 2,4-D (mg/l).

Se aplicó el análisis de conglomerados a los 32 tratamientos con el propósito de agruparlos y seleccionar un grupo de tratamientos que fuera estadísticamente diferente del resto. Al aplicar el análisis de conglomerados y de acuerdo al dendograma (Anexo 7) se seleccionaron los cinco grupos que mejor respondieron al desarrollo de callo. El grupo V fue el que presentó un mejor comportamiento para el desarrollo del callo (77.08%), encontrándose diferencias altamente significativas entre los grupos restantes (Figura 10). El grupo II contiene los tratamientos con nulo desarrollo en las dos especies.

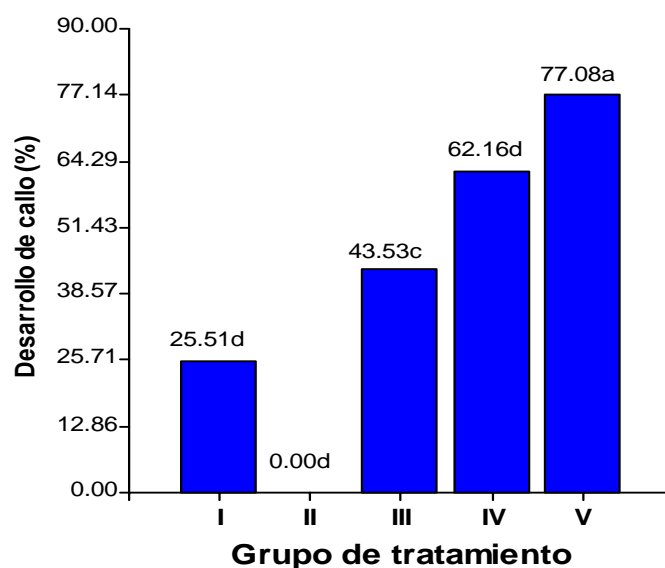


Figura 10. Grupos de tratamientos sobresalientes para el desarrollo de callo; tomando en cuenta la combinación de tres factores: especie (*C. annuum* y *C. chinense*), BAP (0.0, 1.0 ,1.5 y 3.0 mg/l) y 2,4-D (0.0, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/l).

En el Cuadro 7 se presenta un resumen de las combinaciones de los mejores tratamientos, para *C. annuum* fueron las concentraciones de BAP (1.0, 1.5 y 1.5 mg/l) en combinación de 2,4-D (2, 2 y 4 mg/l), mientras que en *C. chinense* solamente se encontró una combinación de BAP (1.5 mg/l) y 2,4-D (4 mg/l) que favorecieron el desarrollo de callo. Estos datos superan al testigo que fue de 3 mg/l de BAP en combinación de 2 mg/l de 2,4-D.

Cuadro 7. Mejores combinaciones de tratamientos para el desarrollo de callo friable en las dos especies de *Capsicum*.

Especie	Grupo	BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)
<i>Capsicum annuum</i>	V	1.0	2a
		1.5	2a
		1.5	4a
<i>Capsicum chinense</i>	V	1.5	4a
		1.0	2b

Buyukalaca y Mavituna (1996), encontraron que una efectiva inducción y desarrollo de callo friable depende directamente del 2,4-D, reportando un nivel óptimo de 2 mg/l para el desarrollo de embriones. Sin embargo, cuando se duplicó la concentración de 2,4-D se encontró una leve disminución en el porcentaje de embriones somáticos, aunque el porcentaje de callo embriogénico se mantuvo. También encontró que concentraciones de 0.5 y 1 mg/l de BAP favorecen el desarrollo de los embriones y la maduración de los mismos. Asimismo, Furelli y García (1986) encontraron que el 2,4-D es esencial para el desarrollo de callo embriogénico en explantes foliares de helecho (*P. cretica*). En este trabajo el mayor porcentaje de callo con características embriogénicas se presentó a concentraciones de 4 mg/l de 2,4-D en combinación de 1.5 mg/l de BAP en ambas especies; no obstante, la expresión de embriones somáticos aun no ha sido observada.

4.2.3. Color del callo y consistencia

En todos los ensayos y en ambas especies se apreció diferencias en el color y la morfología del callo por lo que se clasifican en cuatro tipos: cristalino blanco (cb) constituido de células alargadas muy hidratadas, disgregables al tacto (Fig. 11A); cristalino blanco y formando agrupaciones en todo el explante (cba), es un callo muy compacto no disgregable al tacto (Fig. 11B); cristalino verde (cv) es un callo constituido por agrupaciones celulares de consistencia gruesa y disgregable al tacto (Fig. 11C); el callo café translucido (ct), conformado por células redondas muy hidratadas y disgregables al tacto (Fig. 11D). Estos tipos de callos fueron muy similares a los descritos por Buyukalaca y Mavituna (1996), en explantes de embriones cigóticos de *C. annuum* var. Arce. Estos autores encontraron un callo café-amarillento con alta frecuencia embriogénica y a partir del cual obtuvieron embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo.

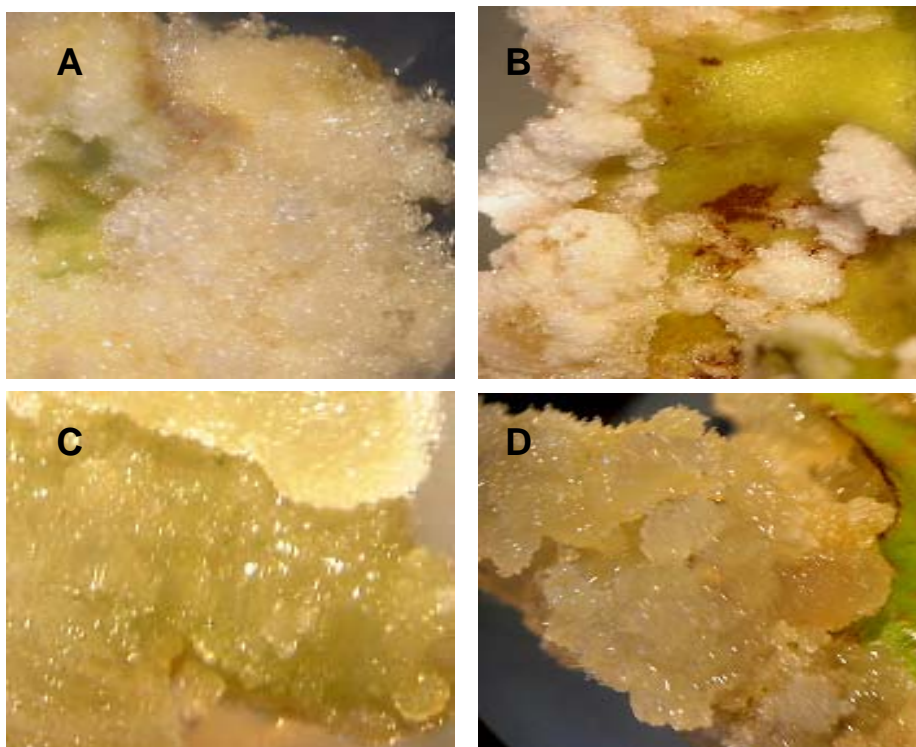


Figura 11. Tipos de callo primario caracterizados por su color y consistencia, en ambas especies de *Capsicum*. A. Cristalino blanco (cb); B. Cristalino blanco formando agrupaciones (cba); C. cristalino verde (cv); D. café translucido (ct).

De manera general se realizó un análisis de frecuencia y se sacaron los promedios del tipo de callo que predominó en cada una de las especies (Anexo 8). Así se tiene que para *C. annuum* el tipo de callo que predominó fue el cba en todos los medios, mientras que en *C. chinense* el callo predominante fue el ct. También se pudo apreciar que a concentraciones altas de sacarosa (6 y 8%) y a seis semanas de cultivo en la oscuridad se favoreció un callo tipo ct. Sin embargo, cuando estos callos fueron transferidos a condiciones de luz adquirieron características del callo tipo cv, mientras que a concentraciones altas de BAP (1.5 mg/l) y de 2,4-D (4 mg/l) se favoreció el callo tipo ct, en ambas especies. La presencia de pequeñas agrupaciones celulares en este callo nos llevó a suponer que el callo ct posiblemente tenía aptitudes embriogénicas; sin embargo no se pudo observar la formación de embriones somáticos.

Una vez que el callo primario dejó de crecer, se pudo observar un callo secundario creciendo sobre el mismo. Prácticamente, esto fue observado en todos los ensayos, pero su frecuencia fue mayor en presencia de 2,4-D conforme a lo esperado.

4.2.4. Multiplicación del callo en medio líquido.

El cultivo de células en suspensión consiste en aislar un conjunto de células ó agregados celulares con características embriogénicas y distribuirlo en un medio líquido en constante movimiento (Gómez, 1996). El éxito del establecimiento de suspensiones celulares a partir de fragmentos de callo depende en gran medida de la friabilidad del tejido calloso. Esta es la propiedad que tienen las células de separarse unas de otras con relativa facilidad después de una división celular (Evan *et al.* 1981).

Los callos tipo ct con aparentes características embriogénicas fueron introducidos en el medio de cultivo para suspensiones celulares propuesto para *Capsicum* por Buyukalaca y Mavituna (1996) y para musáceas por Cotê *et al.* (1996). En ambos medios se evidenció una temprana multiplicación celular tanto en *C. annuum* como en *C. chinense*. En la Figura 12 se aprecia las suspensiones celulares de *C. annuum* (A) y *C. chinense* (B) mostrando células redondas con contenido formando agregados celulares y células en multiplicación.

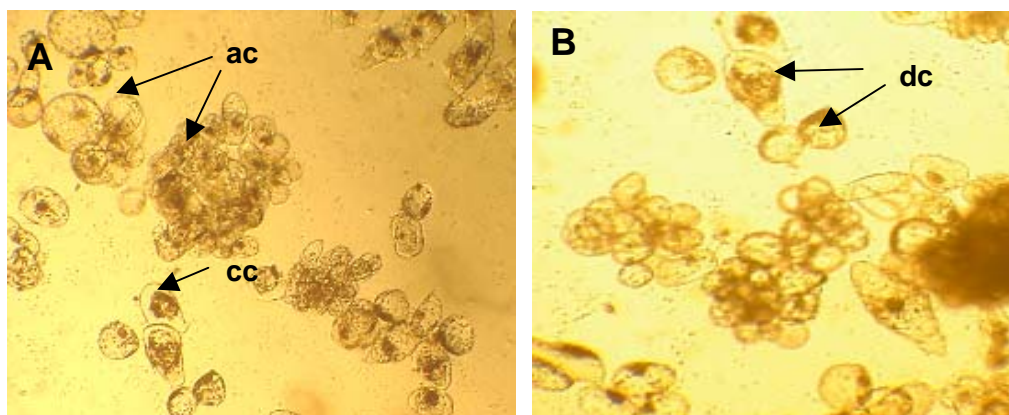


Figura 12. Suspensiones celulares de *C. annuum* (A) y *C. chinense* (B).

ac: Agregados celulares
cc: células con contenido celular
dc: Células en división

Cuando los callos de *C. annuum* tipo ct provenientes del tratamiento 1.5 mg/l de BAP, 4 mg/l de 2,4-D, 8% de sacarosa y tres semanas de cultivo en la oscuridad fueron transferidos al medio de regeneración propuesta por Buyukalaca y Mavituna (1996), se comenzó a observar pequeñas estructuras redondas en forma de embrión (Fig. 13A). Estas

estructuras fueron transferidas a un medio sólido de maduración recomendada por este mismo autor. Estas estructuras aumentaron de tamaño y posteriormente se fueron necrosando, lo cual indica que el medio de maduración no fue el adecuado para su desarrollo o las estructuras observadas no preservaron un adecuado estado de diferenciación embrionaria (Fig. 13B).

De igual manera se tomó agregados celulares para iniciar el proceso de regeneración sobre medios recomendados por los mismos autores. En los medios utilizados se observó el desarrollo de un callo compacto sin mostrar signo de regeneración, también se apreció algunos callos que comenzaban a organizarse y formar grupos compactos en ambas especies (Fig.13C). Esto nos indica que el callo tiene aptitudes morfogenéticas y que hay células que en algún momento comienzan a organizarse.



Figura 13. Suspensiones celulares de *C. annuum* mostrando cierta organización. A. Estructuras redondas y alargadas que asemejan a un embrión. B. Estructuras en el medio de maduración que comienzan a necrosarse. C. Callos organizados en pequeñas agrupaciones redondas.

4.2.5. Histología de callos

El estudio histológico permitió analizar la calidad de los callos que produjeron los explantes en las dos especies de *Capsicum* (Fig. 14). Ambas especies presentan callos con células grandes, diferenciadas y sin contenido, dando la apariencia de ser células ya envejecidas. Las muestras tomadas de las estructuras formadas en suspensión celular y los callos tipo ct de *C. annuum* mostraron una mayor cantidad de células en activa división celular. Se observan grupos de células con citoplasma muy denso, núcleos y nucleolos prominentes, típicos de células con gran actividad metabólica (Fig 14A). Algunos de estos grupos celulares se organizan en forma de proembriones, los cuales a su vez se recubren de

una gruesa pared (Fig. 14B). Es posible observar también pequeños granos de almidón que forman parte de su contenido celular, así como divisiones celulares en diferente plano (Fig.14C). Esta especie fue la que presentó una mayor formación de células con características embriogénicas o bien, mayor formación de proembriones. No se logró observar la formación de embriones bien desarrollados.

En callos de *C. chinense* (Fig. 14D) las características fueron muy similares a las descritas anteriormente, sin embargo, la calidad de las células fue menor que en el caso anterior. Aquí hubo mayor presencia de células muy diferenciadas que no presentaron características embriogénicas, las cuales lucen completamente vacías. Sin embargo es importante hacer notar que se encontraron pequeños grupos de células aún con características meristemáticas. Las células que al parecer en algún momento formaron proembriones, no lograron completar su desarrollo y posteriormente entraron en un proceso de deterioro celular, razón por la cual se aprecian grandes cantidades de fenoles en su interior. Hubo también pequeños grupos de células con un núcleo prominente y contenido de almidón, sin ser de relevancia en el proceso embriogénico.

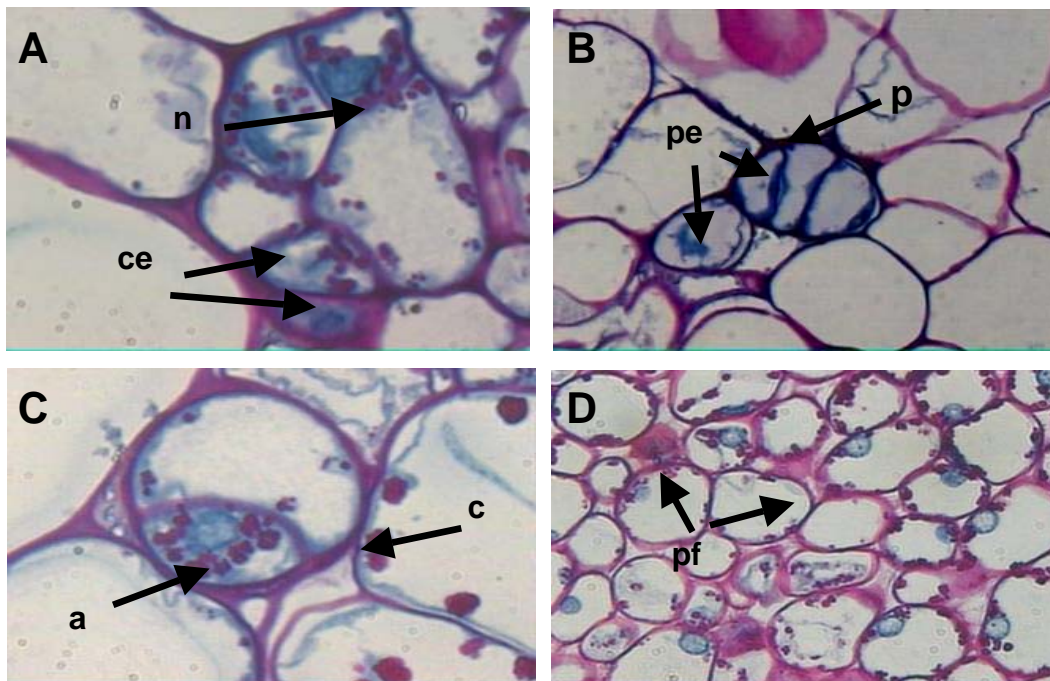


Figura 14. Cortes histológicos de callos con características embriogénicas, A, B y C corresponden a *C. annuum* y D corresponde a *C. chinense*. A. Posibles células embriogénicas (ce), núcleo con nucleolo (n). B. Posibles proembriones (pe), con paredes gruesas bien definidas (p). C. Gránulos de almidón (a) y citoplasma muy denso (c). D. Posibles células embriogénicas con presencia de fenoles (pf) visto a 20X.

Como se puede observar en la Figura 14, algunos de estos callos tienen características embriogénicas, sin embargo el desarrollo de embriones no seda, lo cual posiblemente se deba a que el medio de cultivo utilizado, no es el más indicado. Esto implica que a pesar de su potencial para formar proembriones, se requiere seguir optimizando aún más el medio de cultivo, de manera que se logre concluir con la formación de embriones bien desarrollados.

4.3. Cultivo de ápices

4.3.1. Fase de iniciación

Resulta importante señalar que debido a que los explantes fueron tomados de plantas cultivadas en condiciones de invernadero y al eficiente protocolo de desinfección utilizado, se logró hasta un 100% de asepsia en las dos especies de *Capsicum*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Canul (1996) quien reporta haber obtenido un 100% de asepsia en el establecimiento de meristemos de *C. chinense* provenientes de campo. Este autor utilizó un tratamiento de desinfección de hipoclorito con sodio (NaOCl) al 15% y un tiempo de remojo de 10 minutos. Santana *et al.* (2005), también reporta el uso de NaOCl al 30 % de su concentración con un tiempo de remojo de 15 minutos obteniendo resultados similares en explantes de yemas axilares de *C. chinense*.

El cultivo de ápices y yemas axilares durante 22 días en presencia de las diferentes concentraciones de BAP (0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l) y sacarosa (3, 6 y 8%) permitió observar tendencias diferentes entre las especies en cuanto al número de hojas y nudos formados (Cuadro 8). Para la especie *C. annuum* la media máxima (1.56) para el número de hojas fue registrado en sacarosa al 3% y 0.5 mg/l de BAP (T2), mientras que la mejor media (0.17) para la variable número de nudos se observó con sacarosa al 8% y 1.5 mg/l de BAP (T12).

Mientras que en la especie *C. chinense*, la media máxima (1.89) para el número de hojas y número de entrenudos (0.61) se presentó en sacarosa al 3% y 1.5 mg/l de BAP (T4). No obstante las diferencias entre estos tratamientos y el T3, T11 y T12 no son significativas estadísticamente (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de medias de Duncan para la variable número de hojas y número de nudos en el cultivo de ápices de en *C. annuum* y *C. chinense* cultivados en diferentes concentraciones de sacarosa y BAP. La evaluación se hizo a los 22 días de cultivo.

Tratamiento	BAP mg/l	Número promedio de Hojas	Número promedio de Nudos
<i>C. annuum</i>			
3% sacarosa			
T1	0.25	0.28f	0.0b
T2	0.5	1.56a	0.06ab
T3	1.0	1.28abcd	0.06ab
T4	1.5	1.22abcd	0.11ab
6% sacarosa			
T5	0.25	0.78e	0.0b
T6	0.5	0.89de	0.0b
T7	1.0	0.94dec	0.06ab
T8	1.5	1.00abcde	0.06ab
8% sacarosa			
T9	0.25	0.83e	0.0b
T10	0.5	1.33abc	0.0b
T11	1.0	1.28abcd	0.06ab
T12	1.5	1.39a	0.17a
<i>C. chinense</i>			
3% sacarosa			
T1	0.25	1.50abc	0.39abc
T2	0.5	1.41abc	0.50ab
T3	1.0	1.68ab	0.58a
T4	1.5	1.89a	0.61a
6% sacarosa			
T5	0.25	0.89d	0.0d
T6	0.5	1.28abc	0.06cd
T7	1.0	1.39abc	0.17bcd
T8	1.5	1.50abc	0.29abc
8% sacarosa			
T9	0.25	1.11dc	0.11cd
T10	0.5	1.61abc	0.33abc
T11	1.0	1.67ab	0.286abcd
T12	1.5	1.72ab	0.500ab

Valores seguidos por la misma letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes (Duncan $\alpha=0.05$).

En *C. chinense* se observaron resultados similares a los obtenidos por Canul (1996), quien menciona haber logrado plantas a los 30 días de cultivo de los explantes, en un medio MS suplementado con 1.5 mg/l de BAP. Menciona también que las concentraciones altas de citocinina y auxina inhiben el alargamiento e incentivan la producción de grandes masas de callo. Mientras que concentraciones bajas de BAP

inhiben el alargamiento de los brotes (Pierik, 1990). Este mismo efecto fue observado en este estudio al emplear bajas concentraciones de BAP, las cuales inhibieron el desarrollo de los brotes y posteriormente se necrosaron. También se observó que las altas concentraciones de sacarosa (6 y 8%) favorecen el desarrollo de callo e inhiben el crecimiento de los brotes.

En los tratamientos con sacarosa al 6 y al 8% se observaron efectos mínimos para ambas especies, sin embargo todos los explantes desarrollaron callo en la base del corte que posteriormente creció y los cubrió por completo. Dabauza y Peña (2001), Ochoa-Alejo y García-Bautista (1990) encontraron que las heridas realizadas en la parte apical del explante promueven la formación de pequeños callos blancos sobre el mismo. Efectos similares fueron observados en este estudio para ambas especies de *Capsicum* ya que en todos los tratamientos se desarrolló un callo blanco en la base del corte.

En *C. annuum* se observó en todos los tratamientos un callo de consistencia compacta que cubrió la parte apical del explante impidiendo el desarrollo de plantas completas (Fig. 15A). En tanto que en *C. chinense* se formó un callo de consistencia cremosa y menos compacta, el cual no impidió la formación de plantas completas (Fig. 15B). Este callo se fue necrosando para dar origen al desarrollo de raíces, lo cual permitió valores de 83.33 y 66.67% de plantas bien desarrolladas en término de 30 días en los tratamientos T3 y T4, respectivamente.

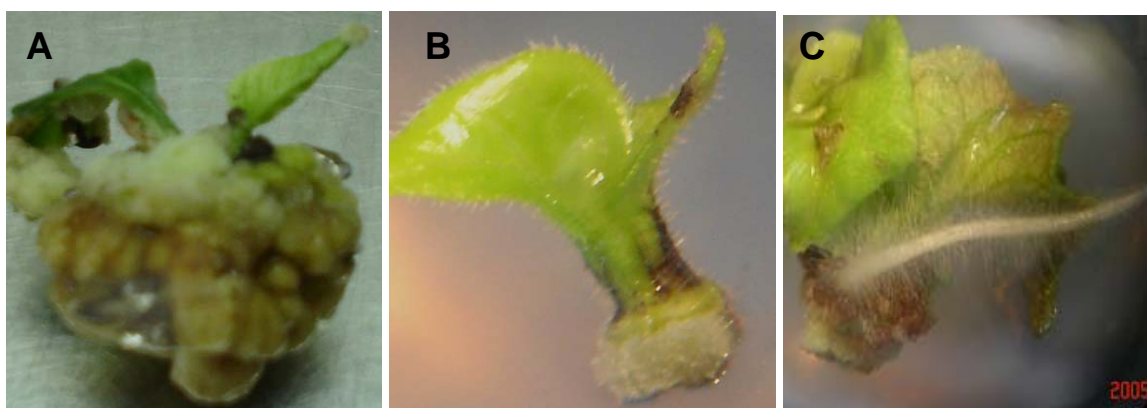


Figura 15. Desarrollo y respuesta morfogénica de ápices de *C. annuum* (A) y *C. chinense* (B y C) evaluados a los 22 días de cultivo. A. Callo muy compacto cubriendo la parte apical del explante. B. callo formado en la base del corte, C. Ápice mostrando la formación de raíces a partir de callo.

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan diferentes respuestas entre *C. annuum* y *C. chinense*; por ejemplo en *C. annuum* no se logró el alargamiento de los brotes y por lo tanto no se estableció la fase de multiplicación. Resultados similares son señalados por Dabauza y Peña (2001) quienes trabajaron con 21 variedades de *C. annuum*. Ellos observaron una baja respuesta a la brotación y formación de vástagos, y aseguran que las variables número de brotes y alargamiento del tallo dependen de la especie y la variedad con que se trabaje.

4.3.2. Fase de multiplicación

En esta fase se evaluó el efecto de la BAP, Kinetina y TDZ en concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/l, sobre la multiplicación de brotes (Cuadro 9). No obstante, el efecto de las concentraciones utilizadas no fue el esperado en el desarrollo de brotes múltiples más bien todos los tratamientos desarrollaron plantas completas. Además en el tratamiento con 0.25 mg/l de BAP; se observó plantas con tallos deformes. También se observó el desarrollo de un callo cristalino en los dos extremos de la microestaca (Fig. 16). Efectos similares fueron encontrados por Ochoa-Alejo y García-Bautista (1990) quienes mencionan haber obtenido un bajo porcentaje de vástagos deformes al utilizar solo BAP; sin embargo también mencionan que la BAP estimula el desarrollo de raíces en los brotes.

Es posible observar diferentes respuestas del explante a las tres citocininas empleadas. La mayor media (2.87) para el número de hojas se registró con 0.25 mg/l de Kinetina, la cual mostró diferencias significativas con los demás tratamientos. La media más baja (1.33) para el número de hojas se registró en 0.25 mg/l de TDZ. Estos resultados difieren totalmente con los encontrados por Santana *et al.* (2005) quienes mencionan que a concentraciones de 0.75 mg/l de TDZ se provoca la organogénesis en explantes nodales de *C. chinense*; sin embargo este fenómeno no se observó en este estudio lo cual pudo deberse a las bajas concentraciones de TDZ usadas en este estudio.

La mayor media (1.13) para el número de nudos fue registrada con 0.25 mg/l de Kinetina, encontrándose diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El peor resultado (0.20) para esta variable se registró en presencia de 0.25 mg/l de BAP (Cuadro 9).

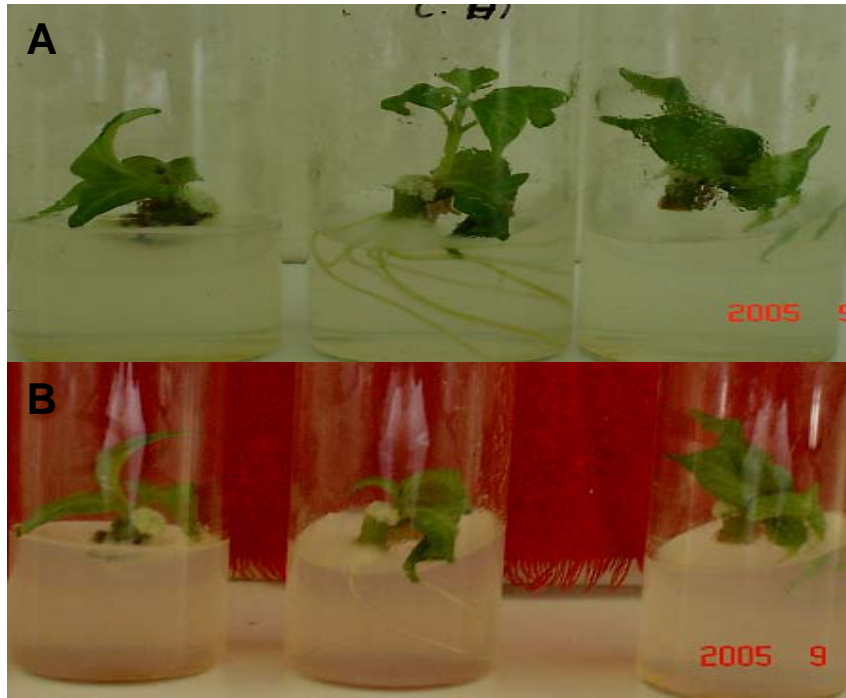


Figura 16. Brotes de *C. chinense* en fase de multiplicación en presencia de diferentes fuentes de citocinina. A. Cultivo de brotes en presencia de 0.25 mg/l de BAP, Kinetina y TDZ. B. Cultivo de brotes en presencia de 0.5 mg/l de BAP, Kinetina y TDZ.

Cuadro 9. Comparación de medias de Duncan para el efecto Kinetina, TDZ y BAP sobre el desarrollo de brotes en *Capsicum* a la tercera semana de cultivo.

Tratamiento	mg/l	Número promedio de hojas	Número promedio de nudos
BAP			
1	0.5	1.93b	0.53b
2	0.25	1.47b	0.20b
Kin			
3	0.5	1.87b	0.47b
4	0.25	2.87a	1.13a
TDZ			
5	0.5	1.40b	0.27b
6	0.25	1.33b	0.20b

Valores seguidos por la misma letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes (Duncan $\alpha=0.05$)

La Kinetina en concentraciones de 0.25 mg/l favoreció el desarrollo de brotes en plantas completas, en este tratamiento también fue observado mayor desarrollo de raíces aunque esta variable no fue evaluada. Estas observaciones son similares con lo descrito por Christopher y Rajam (1994), quienes obtuvieron mayor formación de raíces en vástagos de

C. annuum al utilizar 1 mg/l de Kinetina ó BA en el medio de desarrollo MS. Por otro lado Ochoa-Alejo y García-Bautista (1990), encontraron mayor número de vástagos formados en explantes de *C. annuum* al utilizar Kinetina en el medio.

4.3.3. Fase de desarrollo

Los brotes del primer ensayo (T3 y T4) de *C. chinense* que presentaban buena conformidad morfológica fueron transferidos a un medio MS al 100 y 50% de su concentración original, más 1 g/l de carbón activado para acelerar su desarrollo. Los dos tratamientos desarrollaron plantas completas al mes de cultivo; sin embargo en el medio MS al 50% se pudo apreciar un alargamiento acelerado de un solo entrenudo, mientras que en el medio MS al 100% se observó un lento desarrollo del vástago con mayor número de nudos y entrenudos lo cual permitió un mejor desarrollo morfológico del vástago (Fig. 17).

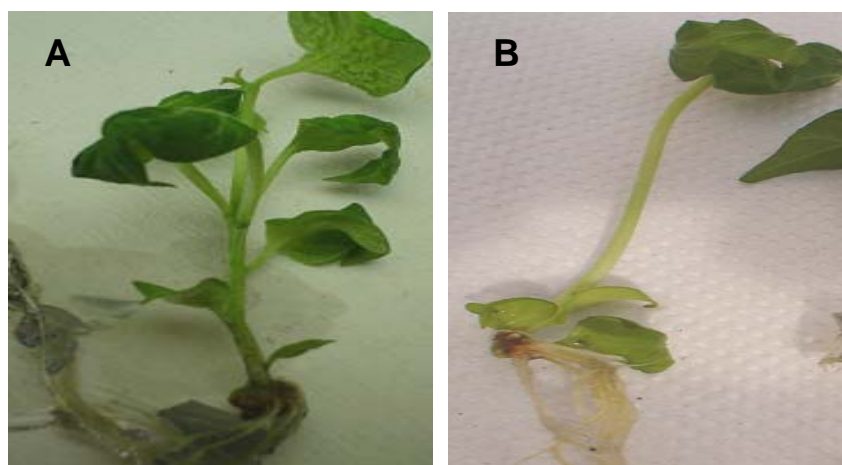


Figura 17. Vitroplantas de 6 semanas de edad de *C. chinense* en fase de desarrollo. A. Vitroplanta proveniente del medio MS al 100% mostrando un buen desarrollo del vástago con varios nudos y entrenudos. B. Vitroplanta proveniente del medio MS al 50% en la cual se observa un solo entrenudo muy desarrollado.

En el desarrollo de brotes de Gloxinia (*Sinningia speciosa*) la adición de 1.5 g/l de carbón activado en el medio MS, favoreció que los brotes enraizaran exitosamente en 4 semanas y desarrollaran mayor número de nudos y entrenudos adquiriendo mayor vigor en tallos y hojas (Aceves y Hernández, 1997). Efectos similares pudieron observarse en las vitroplantas de *C. chinense* al utilizar 1 g/l de carbón activado en el medio MS después de 6 semanas de cultivo (Fig. 18).

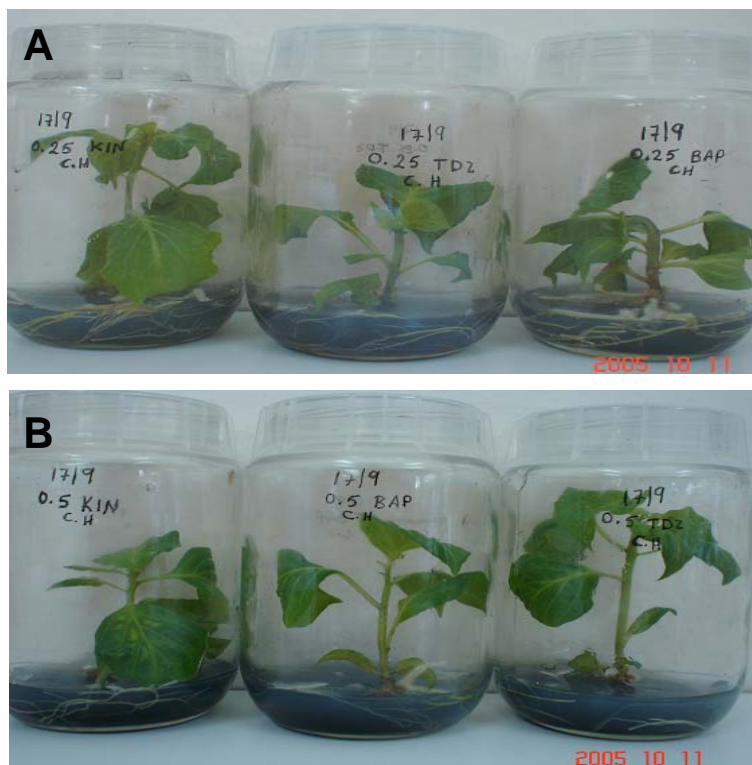


Figura 18. Desarrollo de brotes de *C. chinense* a la 6 semana de cultivo en presencia de 1 g/l de carbón activado en el Medio MS. A. Brotes procedentes de 0.25 mg/l de Kinetica, TDZ y BAP. B. Brotes procedentes de 0.5 mg/l de Kinetina, TDZ y BAP.

4.3.4. Fase de aclimatación

Del total de 30 vitroplantas de *C. chinense* que fueron transferidas al invernadero para la fase de aclimatación, se logró un 73.33% de sobrevivencia después de dos semanas en invernadero. Estos resultados son similares a los observados por Christopher y Rajam (1994), quienes lograron un 86% de sobrevivencia al trabajar con dos especies de *Capsicum*. Dabauza y Peña (2001); obtuvieron 90 y 95% de sobrevivencia en *C. annuum* L.

El 36.67% de mortalidad obtenido durante la aclimatación lo atribuimos a las plantas que fueron plantadas con menos de 4 folíolos, los cuales no resistieron el estrés causado por el cambio de temperatura y por consiguiente murieron; mientras que las plantas que fueron plantadas con 4 a 8 folíolos presentaron una alta sobrevivencia (Fig. 19A). Otro factor que influyó fue la presencia de hongos (Damping-off) en la etapa de transplante. También se requiere prestar atención al momento del transplante y cubrir solamente la base del tallo ya que si se cubre el primer entrenudo aumenta la mortalidad.

Las plantas que lograron sobrevivir presentaron un lento desarrollo en la primera semana de transplante; pero en el transcurso de la tercera semana se apreció el desarrollo de nuevos folios (Fig. 19B), y los 45 días se pudo observar la formación de yemas florales (Fig. 19C). El desarrollo de frutos se dio a los 60 días de cultivo en el invernadero, los cuales estaban listos para su cosecha al cabo de 98 días (Fig. 19D). El ciclo vegetativo de las plantas fueron muy similar a las plantas procedentes de semilla (Nuez *et al.* 1996).

Es importante señalar que todas las plantas fueron colocadas bajo sombra de Saran[®] en el invernadero y no en cámaras húmeda de aclimatación como se acostumbra hacer con la mayoría de las plantas que son aclimatadas en el invernadero. Esta información resulta importante ya que simplifica la manipulación de las vitroplantas durante la transferencia a invernadero, reduce el tiempo de cultivo en esta fase y facilita la transferencia de plantas a campo.

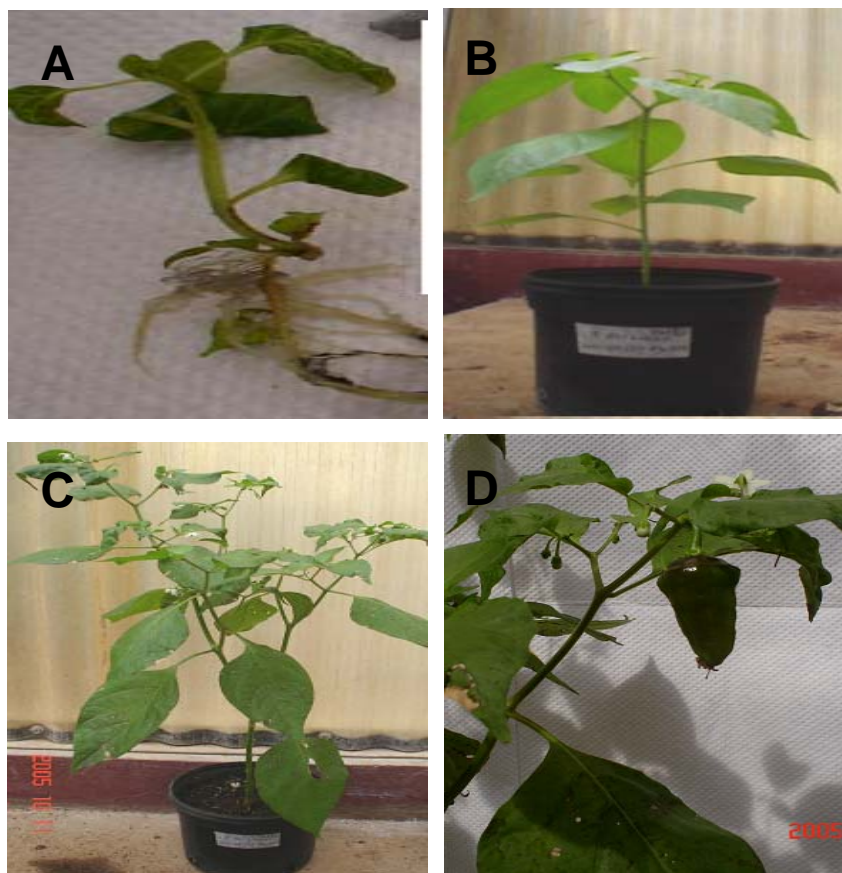


Figura 19. Aclimatación de plantas de *C. chinense*. A. Planta con cinco foliolos y buen desarrollo de raíces. B. Desarrollo de foliolos C. Planta morfológicamente bien desarrollada y en etapa de floración. D. Planta con el primer fruto formado al tercer mes de cultivo en el invernadero.

5. CONCLUSIONES

1. El tratamiento de desinfección utilizado permitió el establecimiento exitoso de explantes de hojas y meristemas en ambas especies de *Capsicum*. Mostrando los porcentajes mas altos en la especie *C. chinense*.
2. El protocolo de Kintzios et al. (2000), no fue el adecuado para embriogénesis somática del cultivo, sin embargo, este protocolo modificado con 1.5 mg/l de BAP, 4 mg/l de 2,4-D, 8% de sacarosa y tres semanas de cultivo en la oscuridad favorecieron la inducción de callo friable con características embriogénicas.
3. El medio para suspensiones celulares recomendados por Buyukalaca y Mavituna (1996), para *Capsicum*, favoreció en desarrollo de pequeñas estructuras semejantes a un embrión en *C. annuum*.
4. Se logró el establecimiento aséptico de las dos especie de *Capsicum*; sin embargo en *C. annuum* las plantas no llegaron a la fase de desarrollo debido a que se cubrieron de callo, mientras que *C. chinense* respondió favorablemente a las distintas fases de cultivo.
5. En la fase de iniciación el medio suplementado con 1,0 y 1,5 mg/l de BAP y 3% de sacarosa favoreció el crecimiento de los ápices en *C. chinense* y además permitió iniciar la fase de multiplicación.
6. En la fase de multiplicación todos los tratamientos permitieron el desarrollo de brotes; sin embargo, 0.25 mg/l de kinetina fue el mejor tratamiento.
7. El desarrollo de plantas completas, conformes morfológicamente se logró en el medio MS al 100% de sales minerales y 3% de sacarosa.
8. La aclimatación de las vitroplantas de *C. chinense* fue exitosa, las plantas en invernadero siguieron un desarrollo vegetativo normal.

6. RECOMENDACIONES

1. Con la finalidad de obtener un protocolo eficiente para la embriogénesis somática resulta importante darle seguimiento a las variables y tratamiento que mejor resultaron en este trabajo y evaluar otros factores que resulten importantes como lo son los reguladores de crecimiento y las vitaminas.
2. Reducir el numero de ensayos, y dedicarle mayor interés a los callos con características friables, de igual manera prestar más tiempo a evaluar diferentes medios que orienten la expresión de dicho callo.
3. Realizar análisis histológicos en todos los callos que tengan apariencia de friabilidad y así detectar el momento oportuno para la expresión embriogénica.
4. Para el cultivo de meristemas, consideramos importante evaluar en la fase de iniciación, los mismos tratamientos que se utilizaron en la fase de multiplicación. Esto resultaría interesantes sobre todo para la especie *C. annuum*.
5. Seguir evaluando las características morfológicas de las plantas que llegaron a la fase de aclimatación, y si es posible llevarlas a campo para seguir evaluando su comportamiento.

7. LITERATURA CITADA

- Aceves, JL; Hernández, J. 1997. Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. Ciencia administrativa. Vol. Nueva época. Disponible en línea. <http://www.uv.mx/iiesca/dinah/ACEVES.htm>. Fecha de consulta 22 de noviembre del 2005.
- Alfonso, J. 1993. Cultivo de chile tabasco. Guía sobre la producción de chile tabasco para exportación. Fundación Hondureña de investigaciones agrícolas, San Pedro Sula, Honduras, HN. p 9-15.
- Baum, S.J. 1981. Introducción a la química orgánica y biología. Compañía editorial continental, México, MX. p 286-288.
- Badr, A; Kalifa, F; Aboel- Atta A; Abou El Enain, M. 1997. Chromosomal criteria and taxonomic relationships in the Solanaceae. The Japan Mendel society. Cytología, 63: 103-113.
- Binzel, ML; Sankhla, N; Joshi, S; Sankhla, D. 1996. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. 15: 536-540.
- Boiteux, L; Nagata, T; Dutra, W; Fonseca, M. 1993. Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. Euphytica 67:89-94.
- Buyukalaca, S; Mavituna, F. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 46: 227-235.
- Canul, LG. 1996. Estudios sobre la primera fase de cultivo *in vitro* de meristemos de chile habanero (*Capsicum chinensis* L.). Tesis Ing. Agro. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2 Conkal, Yucatán , MX. 46 p.
- Cardeña, JA. 2000. Cultivo *in vitro* de anteras de chile Xcat' Ic, *Capsicum annuum* L. Tesis Mag Sc. Instituto Tecnológico Agropecuario No.2 Conkal, Yucatán, MX. p 50-81.
- Contreras, J. 1982. Manual de producción de chile jalapeño en los estados de Veracruz y Oaxaca. Editado por la SARCH, INIA y Centro de Investigación Agrícola del Golfo Centro. Cotaxtla, Veracruz, MX. 58 p.
- Collins, M., Wasmund, L., Bosland , P. 1995. Improved method for quantifying psaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. Hortscience. 30(1): 137-139.
- Cotê, FX; Domergue, R; Monmarson, S; Schwendiman, J. Teisson, C; Escalant JV. 1996. Embryogenic cell suspensions from male flower of Musa AAA cv. Grand Nain. Physiol. Plant.97: 285-290.

- Chanatásig, C. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. p 30-40.
- Chrystopher, T; Rajam. 1994. *In vitro* clonal propagation of Capsicum spp. Plant Cell Tiss Organ Cult 38:25-29.
- Croughan, T. 1995. Ather for doblehaploid production. In: Gamborg, O. And Phillips, G. (eds.). Plant cell, tissue and organ culture. Springer Varlg Germany. p 14-22.
- Dabauza, M; Peña, L. 2001. Hihg efficiency organogénesis in Sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) tissues from diferent seedling explants. Plant Growth Regulation 33:221-229.
- DeWitt, D; Bosland, P. 1993. The Pepper Grarden, From the Sweetest bell to the Hotest Habanero. Ten Speed Press, Berkeley California, US. p 23-220.
- Dillard, CJ; German, JB. 2000. Phytochemiclcs: nutraceuticals and human health. J Sci. Food Agric. 80:1744-1756.
- Donnelly, D; Vidaver, K; Lee, Y. 1985. The anatomy of tissue cultured red, raspberry prior to and after transfer to siol. Plant Cell Tissue Organ Culture 4:43-50.
- Ebida, A; Hu, C. 1993. *In vitro* morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L., var. Early California Wonder) seedling explants. Plant Cell Report.13:107-110.
- Evans, D; Sharp, W; Flick, C. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and arganogenesis. In Plan Tissue Culture: methods and applications in agriculture. By Thorper, T. New York, Academic Press. p 14-113.
- FAO. 2004. Base de datos agrícolas. FOASTAT. Distribución de la producción mundial de chile. Disponible en línea. <http://apps.fao.org/faostat>. Fecha de consulta 24 de septiembre del 2005.
- FAO. 1998. FAOSTAT Datebase result. Disponibel en línea. www.fao.org/faostat. Fecha de consulta el 7 de enero del 2005
- Fari, M; Czako, M. 1981. relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured in vitro. Scientia Horticulturae 15:207-213
- Ferrie, M. 1986. Pepper (*Capsicum annuum* L.). In Biotechnology in agriculture and forestry Vol.2: crops I. Bajaj,YP (Eds). Springer Verlang New York. p 57-59
- Ferrie, A; Kaller W. 1995. Microspora cultura for haploid plant production. In Gamborg O y Phillips (Eds.). Plan Cell, and organ culture, fundamental methods. Springer-Verlang Berlim Heidelberg. Germany. p 155-164.
- Fery, R; Schalk, J. 1991. Resistance in Pepper (*Capsicum annuum* L.) to Western flower trips (*Frankliniella occidentalis* P). Hort. Sciense 26 (8):1073-1074.

- Gómez, MA; Schwentesius, R. 1991). "El chile seco en Zacatecas y sus perspectivas ante el TLC" en M.A. Gómez Cruz, R. Schwentesius Rindermann, J. C. Ledesma Mares y C. Gallegos, (coeds). El TLC y sus repercusiones en el sector agropecuario del centro-norte de México. UACH, UAZ, México, 1995, pp.63-92.
- Gómez, RK, 1996. Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*Ustilago scitaminea* S.), de la caña de azúcar (*Saccharum* sp, híbrido). Tesis de doctorado. Instituto de biotecnología de plantas, Cuba, CU. p 98.
- González, M. 1998. Los chiles: Red colaboradora de investigación y desarrollo de la horticultura. Curso regional de producción integrada de hortalizas. Antigua Guatemala, GT. p 1-30.
- Guzmán, S y Paredes, O. 1998. Functional products of plant indigenous to Latin America: Amaranth, quinoa, common beans and botanicals. *In* Functional Foods- Biochemical & Processing Aspects. Mazza, G. (Eds.). Technomic. Publishing Co., Inc., Lancaster, PA. p 293-328.
- Greenleaf, WH. 1986. Pepper breeding. In: Bassett, M.J., Ed. Breeding vegetable crops. Westpot, CT: AVI Publishing. p 67-134.
- Gil-Ortega, R. 1974. La tristeza o secado del pimiento (*Phytophthora capsici* L) un nuevo método de lucha. ITEA 16:3-7.
- Gunay, A; Rao, P. 1978. *In vitro* plant regeneration from hypotyl and cotyledon explant of red pepper (*Capsicum*). Plant Sci. Lett. 11:365-372.
- Harini, I; Lakshmi Sita, G. 1993. Direct embryogenesis and plant regeneration from immature embryos fo chilli (*Capsicum annum* L.). Plant Sci. 89:107-112.
- Hernández, A. 1982. Influencia de la densidad de población sobre el rendimiento de la calidad del chile (*Capsicum annum* L). Tesis Ing. Agr. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, MX. 59p.
- Heiser, CB. 1976. Pepper *Capsicum* (*Solanaceae*). *In* Simmond (Eds.), The evolution of crop plants, Longman Press, London. p 265-268.
- Hu, C; Wang, J. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. En: Handbook of Plant Cell. Evans, DA.; Ammirato, PV.; Yameda, Y. (Eds). p 256-290.
- Huccius, B. 1978. Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus cultures. Phytomorphology. No.28. p. 74-81.
- Hurziker, AT. 1979. South America Solanaceae: a Synoptic survey. In: Hawkes, JG; Lester, RN; Skelding, AD. (Eds.). The biology and Taxonomy of the *Solanaceae*. Academic Press. London. p 49-85.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). 1983. Genetic Resources of *Capsicum*. Rome. p 49.

- Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática (INEGI). 1998. Datos estadísticos de Yucatán 18 (3): 30-55.
- Jain, A; Sarkar, A; Datta, R. 1996. Induction of haploid callus and embryogenesis *In vitro* cultured anthers of mulberry. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 44:143-147.
- Kawada, T.; Hagihara, K.; Iwai. 1986. Effects of capsaicina on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *J. Nutr.* p 8-9.
- Kintzios, S; Drossopoulos, J.B; Lymperopoulos, Ch. 2000. Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturae*. 85: 137-144.
- _____.; Drossopoulos, J.B; Lymperopoulos, Ch. 2001. Efectos of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of pepper. *Plant cell, tissue organ culture*. 67:55-62.
- Leslie, RH; Pillard HP. 1954. Vegetable and flower seed production. Blakiston, New York, US. p 463-477.
- Loayza, I. 2001. *Capsicum* y sus derivados en Iberoamerica: Aspectos agrícolas, científicos, tecnológicos y económicos. CYTED (Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo). Bolivia, BO. p 33-45.
- Liu, L; Simon, SA. 1996. Similarities and differences in currents activated by capsaicin, piperine, and zigerone in rat trigeminal ganglion cell. *J. Neurophysiol* . p 76-69.
- Long-Solís, J. 1986. *Capsicum* y cultura: La historia de chilli, Fondo de cultura económica (Eds), México, MX. s.p.
- León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica, CR. p 179-182.
- Maga, JA. 1975. *Capsicum*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 6:177-199 p.
- Martínez G, A. 1983. Diseño y Análisis de Experimentos de Cruzas Dialélicas. Colegio de postgraduados. 13 p.
- Márquez, SF. 1991. Genotecnía Vegetal. Métodos, Teoría, Resultados. AGT (Eds.), México, D. F., México. Tomo II. 458 p.
- Matsubara, S; Yamamoto, M; Hyunjo-Murakami, K. 1998. Embryoid and callus formation from microspore by anther culture from July and November in pepper (*Capsicum annuum* L.). *AgBiotech News and Information*, 10 (9):422.
- Mendoza, O. 1991. La enseñanza de la fisiotecnía vegetal en el colegio de postgraduados y en la Universidad Autónoma de Chapingo. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 14. No 2. 109-120.

- Michaelangeli, C; Artioli, P; Medina. A. 2003. Anatomía y ultra estructura de la embriogénesis somática en onoto (*Bixa orellana*). Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación (fonacit), y Centro de investigaciones en biotecnología agrícola (CIBA). Maracay, Venezuela. VE. *Agronomía Trop.* 53(1): 33-48.
- Misawa, M. 1994. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. *FAO agricultural services bulletin*, 108. 87p.
- Montoya, L.M. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Facultad de ciencias agropecuarias departamento de agronomía. Medellín, CO. 73 p.
- Morel, G y Wetmore, R. 1951. Tissue culture of monocotyledons. *Am. J. Bot.* 38:138-140.
- _____; Martín, C. 1995. Guérison de pomme de terre de maladie a virus. *C.R. Acad. Sci. Paris.* p 1315-1324.
- Murashige, T y Skoog, F; 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:53-58.
- Mroginski, L; Roca, W. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *In vitro*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W y Mroginski, L. (Eds). Cali, Colombia, CO. p 30-49.
- McNeish, R. 1964. Ancient Mesoamerican Civilization. *Science* 143:531-537.
- Nuez, F; Gil, R; Costa, J. 1996. El cultivo de pimientos chiles y Ajís. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, ES. 606 p.
- Ochoa-Alejo, V; Ramírez, R. 2001. Invited review: *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:701-729.
- _____; Garcia-Bautista, M. 1990. Morphogenetic responses *in vitro* of hypocotyl tissues of chili pepper (*Capsicum annum* L) to growth regulators. *Turrialba* 3:311-318.
- OnkoLine. 1994. Hot pepper candy found to help chemotherapy effects. Disponible en línea. http://www.oncolink.upenn.edu/cancer_news/1994/hot_candy.html. Fecha de consulta 15 de octubre del 2004.
- Parrott, W. 1993. Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP. San Jose. CR. Proceedings. Montpellier, FR. p 183-191.
- Pérez, M.; Márquez, F.; Peña, A. 1997. Mejoramiento genético de las hortalizas. Chapingo, Mexico. MX. 56 p.
- Pérez, J; Alvarado, Y; Gómez, R; Jiménez, E; Orellana, P. 1998. Propagación y mejoramiento genético de las plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. CU. p 57-79.

- Pelacho, A; Martín, L; Cuevas, R; Sanfelire, J; Badía, J; Alins, G. 2002. Cultivo *in vitro*. Escuela técnica superior de ingeniería agrícola de Lleida. H. Disponible en línea. http://www.etsea2.udl.es/in_vitro/luz. Fecha de consulta 17 de agosto del 2005.
- Piña-Razo, J.1984. Guía para la producción de chile habanero en suelos arables de Yucatán. Folleto técnico editado por SARH, INIAP y el centro de investigaciones agrícolas de la Península de Yucatán. Mérida, Yucatán, MX. 47 p.
- Pierik, RL. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Edic. Mundi-prensa. 343 p.
- Pickersgill, B. 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*. 25:683-691.
- Poschard, E. y Dumas de Valux, R. 1976. Haploid partenogénesis in *Capsicum annuum* L. In: Haukes, J; Lester, R; Skelding, A. (Eds.). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic press London. p 455-472.
- Pozo, O. 1981. Descripción de tipos y cultivares de chile (*Capsicum* spp) en México. Folleto técnico num. 77. INIA-SARH 40 p
- _____, E; Pilloix, A; Daubeze, AM. 1992. Le piment. En: Gallais, A.; Bannerot, H. (Eds.) *Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de selection*. INRA. Paris, FR. p 420-447.
- _____.; Montes, S.; Redondo, E. 1991. Chile (*Capsicum* spp.). Avance en el estudio de los recursos fitogenéticos de México. SOMEFI. México.
- _____., M. Ramírez M. 1994. Gigante Ébano y Paraíso. Nuevas variedades de chile serrano en México. Folleto Técnico No. 10. CESTAM-CIRNE-INIFAP. 30 p.
- Pung, S; Slightom, J; Gonsalves, D. 1993 Different mechanisms protect transgenic tobacco against tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot tospoviruses. *Bio. Technology*. Vol. 11 julio: 819-824.
- Purseglove, J.W; Broen, EG;Green, CL; Robbins, SRJ. 1981. Chillies *Capsicum* spp Tropical Agriculture Series. Longman group Limited, Londres. Vol 1. p 331-439.
- Ramiro, C. A. 1986. Cruzamiento Artificial en Chile (*Capsicum annum* L.). Tesis de Mag.Sc. Colegio de postgraduados, Montecillos, Mex. p 45-57.
- Ramage, C y David, W. 1996. Influence of BA and sucrose on the competence and determination of pepper (*Capsicum annum* L var. Sweet Banana) hypocotyl culture during shoot formation. *Plant Cell Rep* 15:974-979.
- Ramírez, J. 2002. Cultivo del chile. Disponible en línea. http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/chile.html. Fecha de consulta 18 de octubre del 2004

- Reynold, J.F. 1986. Regeneration in vegetales species. In: Cell culture and somatic cell genetics. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability academic press. New York. p 657.
- Rodríguez, A; Martínez, P; Jarillo, J; Guzman, J. 1989. Extracción de los macronutrientes principales que realiza el cultivo del pimiento en condiciones de cultivo en regadíos. Agricultura, Industrial y Comercial (Eds.). Fertilización de cultivos en Extremadura. Badajoz, ES. p 121-142.
- Romero, HI; Valera, L; Osna, P; Haro, JM. 1995. Obtención de plántulas de cultivo *in vitro* de anteras de chile (*Capsicum annuum* L.). VI Congreso nacional de investigación y desarrollo tecnológico agropecuario. Roque, Celaya, Mex., s.p.
- Rosado, G. 2002. Métodos alternativos de control para la mosca blanca (*Benisia tabaci* Genn) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis Mag. Sc. Instituto Tecnológico Agropecuario No.2, Conkal, Yucatán, MX.
- Roselló, S; Jordá, C; Nuez, F. 1994. El virus del bronceado del tomate (TSWV). II. Etiología y control. Phytoma España. 64:33-45.
- Sabi, M; Dumas de Valulx, R; Chambonnet, D. 1979. Obtention de plantes haploides par androgenese *in vitro* chez le piment (*Capsicum annum* L.) Anales l' Amelioration des Plantes 29:583-606.
- Santana, N; Canto, A; Barahona, F; Montalvo, M; Zapata, P; Solís, A; Zaldívar, A; Gutiérrez,O; Miranda, M. 2005. Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Vía organogénesis. HortScience. 40:6.
- Sannasgala, K. 1989. In Vitro somatic embryogenesis in Musa. PhD. Thesis. Leuven. Bélgica. Katholienke Universiteit Leuven. p 172.
- Seminario de hortalizas en el trópico. 1981. Producción de semillas en hortalizas. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Departamento de producción vegetal. Eds. Véliz, G y Montas, TA. 1981. Turrialba, CR. CATIE.
- Sivasankar, S; Oaks, A 1996. Nitrate assimilation in higher plants. The effect of metabolites and light. Plant Physiol. Biochem. 34:609-620.
- Smith, PG; Heiser, CB. 1957. Taxonomy of *Capsicum chinensis* Jac., and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* Species. Bull. Torrey Bot. Club 84 (6): 413-420.
- Street, H; Withrs, L. 1974. Thr anatomy of embryogenesis in culture. In Tissue Culture and Plan Science. Street, H. Academia Press, London. New York. p. 71.
- Tisserat, D; Esan, E; Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev. 1. p 1-78.

- Uvalle, GC. 1985. Técnicas de producción de cultivo de chile habanero en la zona henequenera. Tesina de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario (ITA) No.2 . Conkal, Yuc. MX.43 p.
- Usui, K; Okabe, K; Pernillo, R; Ramirez, A. 1996. Principios básicos de cultivo de tejidos vegetales, GT, ICTA, JOCV. 166 p.
- Vidales, F; Alcantar, R. 1989. Ataque de la virosis durante la floración y su efecto sobre la producción de melón (*Cucumis melo* L.). Memorias del XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Xalapa, Veracruz, MX. Resumen, p. 67.
- Vázquez, JE; Cárdenas, ML; Morales, ME. 2003. Callo *in vitro* de chile morron (*Capsicum annuum* L). Memoria del IV congreso regional de ciencias de los alimentos. Monterrey, Mex. 2002. Revista salud pública (RESPYN). Disponible en línea. <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/especiales/memorias-tam/14.htm>.
- Villalobos, V; Thorper, T.1991. Micropropagación: conceptos metodología y resultados. En Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones. Colombia, CO. p 128-141.
- Wall, M. 1994. Postharvest handling of fresh chiles. Coop. Extension Service. NMSU. Guide H-235.3p. In Acosta, G y Lujan, M. 2004. Selección de tipos de chile de árbol y caney en el estado de Chihuahua. Primer congreso mundial de Chile (2004, León, Guanajuato, MX). Memoria, México, MX.
- Winthers, L. 1985. Cryopreservation an storage of germoplasm. En: Plants cell culture: a practical approach. R.A. Dixon (ed). IRL Press, Oxford. p 169-191.
- Zorzoli, R; Cointry, E; Prado, E; Mroginski, L; Picardi, L. 1987. Regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) por cultivo *in vitro* de folíolos. Turrialba 4:332-336.

ANEXOS

Anexo 1

Cuadro 1. Composición química de sales minerales MS.

Sales orgánicas	MS mg/l concentración
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	900
Ca ₄ Cl ₂	-
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
Ca(NO ₃) ₂	-
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	-
MgSO ₄	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ . 7H ₂ O	37.3
Microelementos	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ . H ₂ O	-
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
Na ₂ MEDTA. 2H ₂ O	37.3

Anexo 2

Medio de suspensión celular fase de multiplicación (Buyukalaca y Mavituna, 1996)

Macro y microelementos de MS adicionado con 2ml/l de 2,4-D, 3% de sacarosa, el medio se ajusto a un pH:5.8

Medio de regeneración (Buyukalaca y Mavituna, 1996)

Macro y microelementos de MS al 50%, adicionado con 0.5 ml/l de BAP, 3% de sacarosa y 0.8 de agar, el medio se ajusto a un pH: 5.8

Medio de suspensión celular fase de multiplicación Ma2 (Cotê *et al.* 1996).

Macro y microelementos de MS, adicionado con 1 mg/l, de biotina, 100 mg/l de glutamina, 100 mg/l de extracto malta , 1 mg/l de 2,4-D, el medio se ajusta un pH: 5.3.

Cuadro 2. Medio de regeneración Ma3 (Cotê *et al.* 1996)

Sales orgánicas	MS mg/l concentración
KNO ₃	2500
CaCl ₂ . 2H ₂ O	200
MgSO ₄ . 7H ₂ O	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
MnSO ₄ . H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	5
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1
KI	1
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.2
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.1
Fuente de hierro	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	15
Na ₂ MEDTA	20
Vitaminas MS	
Biotina	1
Glutamina	100
Extracto malta	100
Prolina	230.2
ANA	0.2
Zeatina	0.05
2Ip	0.2
Kinetina	0.1
Lactosa	10 g/l
Sacarosa	45 g/l
Azarosa	7 g/l
pH	5.3

Anexo 3

Cuadro 1. Análisis de la varianza para el desarrollo de callo en condiciones de oscuridad. Es posible ver el nivel de interacción entre el medio (M1, M2, M3 y M4) con la especie

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F. Calculada	Pr > F
medio	3	374.057925	8.40	0.0014
especie	1	695.093548	15.62	0.0011
medio*especie	3	38.008207	0.85	0.4848

Cuadro 2. Análisis de la varianza para el desarrollo de callo en condiciones de luz. Es posible ver el nivel de interacción entre el medio (M1, M2, M3 y M4) con la especie

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F. Calculada	Pr > F
medio	3	365.113993	7.89	0.0019
especie	1	758.126007	16.38	0.0009
medio*especie	3	29.470361	0.64	0.6023

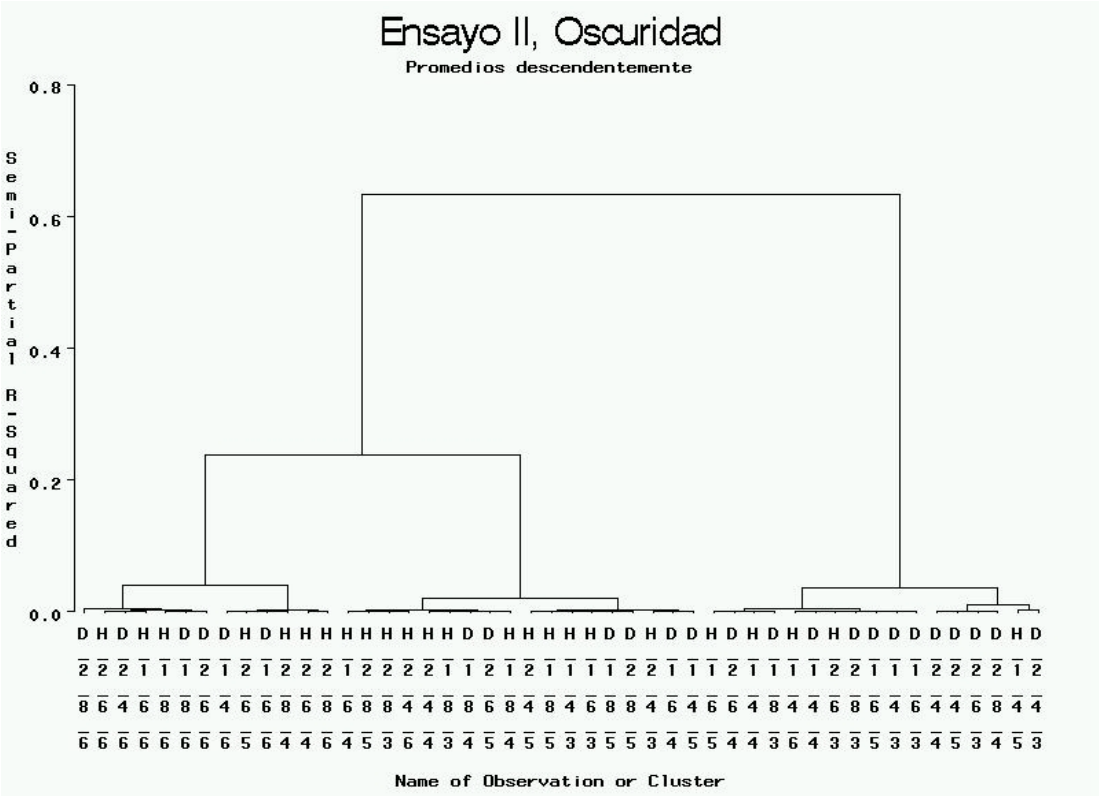
Anexo 4

Cuadro 3. Análisis de la varianza para el desarrollo del callo evaluados a la (3, 4, 5 y 6 semanas de oscuridad), donde es posible observar el nivel de interacción entre los factores en estudio: medio, especie, sacarosa y semanas de oscuridad (SemOsc).

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Especie	1	1731.49833	12.34	0.0007
medio	1	175.03273	1.25	0.2669
Especie*medio	1	823.09599	5.87	0.0173
sacarosa	2	1717.00534	12.24	<. 0001
Especie*azucar	2	262.96950	1.87	0.1591
medio*azucar	2	137.65460	0.98	0.3787
Especie*medio*azucar	2	350.42157	2.50	0.0877
SemOsc	3	5540.83333	39.48	<. 0001
Especie*SemOsc	3	1276.79022	9.10	<. 0001
medio*SemOsc	3	516.61317	3.68	0.0147
Especie*medio*SemOsc	3	409.69165	2.92	0.0380
azucar*SemOsc	6	122.38737	0.87	0.5184
Especie*azucar*SemOsc	6	290.25146	2.07	0.0640
medio*azucar*SemOsc	6	187.05783	1.33	0.2501
Espe*medi*azuc*SemOs	6	133.43621	0.95	0.4628

Anexo 5

Figura 1. Dendrograma en la cual se aprecia los mejores grupos de tratamientos en las dos especies de *Capsicum*. En la primera fila corresponde a especies (*C. annuum* y *C.Chinenses*), en la segunda fila corresponde al medio (1 y 2), tercer fila concentraciones de sacarosa (4, 6 y 8%) y la cuarta fila semanas de oscuridad (3, 4, 5 y 6 semanas).



Anexo 6

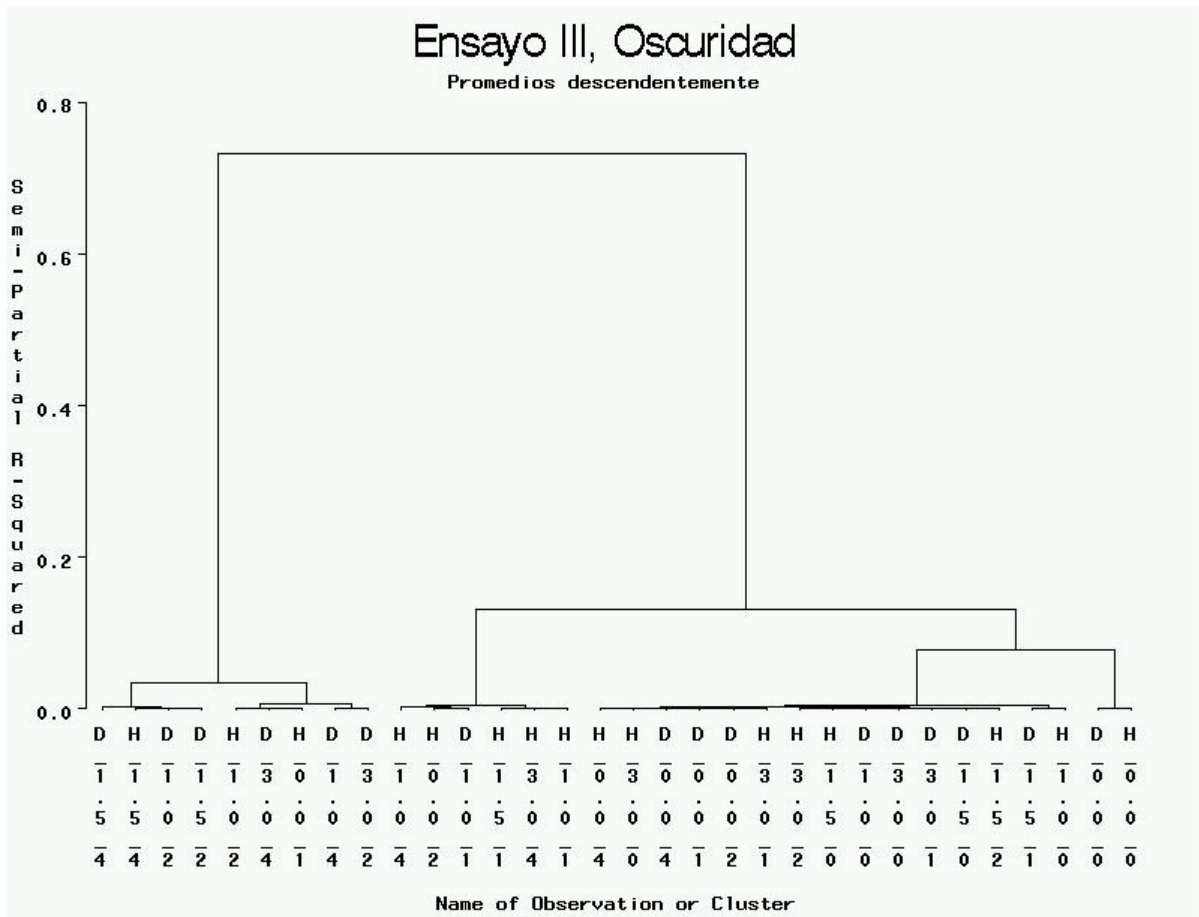
Cuadro 4. Análisis de la varianza para el desarrollo del callo evaluados para las dos especies de *Capsicum* en combinación con BAP (0, 1.0, 1.5 y 3 mg/l) y 2,4-D (0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l) en un medio MS.

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Especie	1	257.63846	1.70	0.1969
BAP	3	1943.42298	12.82	<.0001
Especie*BAP	3	924.82589	6.10	0.0010
2,4-D	3	137.94865	40.50	<.0001
Especie*2,4-D	3	1065.22977	7.03	0.0004
BAP*2,4-D	9	1134.45681	7.49	<.0001
Especie*BAP*2,4-D	9	388.86349	2.57	0.0138

Anexo 7

Figura 2. Dendograma en la cual se aprecia los mejores grupos de tratamientos en las dos especies de *Capsicum*. En la primera fila corresponde a especies (*C.annuum* y *C.*

chinenses), en la segunda fila corresponde a concentraciones de BAP (0, 1, 1.5 y 3 mg/l) y la tercer fila corresponde a concentraciones 2,4-D (0, 1,2 y 3 mg/l).



Anexo 8

Análisis de frecuencia para el color de callo primario en las dos especies de *Capsicum*.

Especie	cb	cba	ct	cv
<i>C. annuum</i>	33.81	40.39	17.50	9.30
<i>C. chinense</i>	24.66	4.64	51.46	19.23