

205  
19



**Universidad Nacional Autónoma de México**

Facultad de Ciencias

Biología

**RESPUESTA IN VITRO DEL HIPOCOTILO Y MERISTEMOS  
DE CAPSICUM ANNUUM L. CV. SERRANO**

**TESIS PROFESIONAL**

**María Luisa Barroso García**

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Pag.
RESUMEN	2
1. INTRODUCCION	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. <u>Capsicum annum L.</u>	5
2.1.1. Origen y Descripción	5
2.1.2. Clasificación	7
2.1.3. Importancia Económica en México y en el Mundo	7
2.1.4. Valores Nutritivos	9
2.1.5. Métodos de Producción	10
2.1.6. Problemas Fitosanitarios: virus, bacterias y hongos	11
2.2. Cultivo de Tejidos Vegetales	13
2.2.1. Generalidades	13
2.2.2. Cultivo de Callo	25
2.2.3. Cultivo de Tejidos Vegetales en Solanáceas	28
2.2.4. Cultivo de Tejidos Vegetales en <u>Capsicum</u>	32
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIALES Y METODOS	35
4.1. Material Biológico (Explantes)	35
4.2. Medio de Cultivo	37
4.3. Siembra	41
4.4. Incubación	42
4.5. Cuantificación del Peso Fresco y Peso Seco	42
5. RESULTADOS Y DISCUSION	44
6. CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFIA	84

## ABREVIATURAS

ANA	= ácido naftalenacético
AIA	= ácido indol-3-acético
2,4-D	= ácido 2,4-diclorofenoxiacético
BA	= 6-bencilaminopurina
K	= 6-furfurilaminopurina (cinetina)
CTV	= cultivo de tejidos vegetales
cv.	= cultivar
MS	= medio Murashige y Skoog (1962)
LS	= medio Lin y Staba (1961)

## RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la respuesta in vitro de Capsicum chinense L. (chile habanero) y C. annum L. cv. Serrano.

Los explantes utilizados para este análisis fueron hipocótilos y meristemas.

El medio de cultivo utilizado fué el MS, al cual se le adicionó las auxinas, ANA, AIA, y 2,4-D en combinación con las citocininas BA y K.

En ambos explantes (hipocótilos y meristemas), se indujo la formación de callo.

Los explantes respondieron mejor al estar presente la auxina AIA.

Se obtuvo la mejor respuesta morfogenética con el meristemo e hipocótilo en la combinación K/AIA.

El mejor explante para fines de propagación fué el meristemo.

Dado que se obtuvo una buena producción de callo con las combinaciones 2,4-D/BA y 2,4-D/K, se cultivaron hipocótilos de C. annum L. cv. Serrano y se construyó una curva de crecimiento, los datos de los pesos fresco y seco por semana se trabajaron estadísticamente por medio de un análisis de varianza. Se encontró mayor inducción de callo con la combinación 2,4-D/K.

## 1. INTRODUCCION

Desde que el botánico alemán Haberlandt en 1902 realizó estudios sobre el cultivo de células, dejó la inquietud en muchos investigadores para profundizar en dicho conocimiento, el cual posteriormente daría origen a una rama de la Biología, el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), (Gautheret, 1982).

Hasta antes de la década de 1930, hubo pequeños progresos en relación a la asepsia del cultivo; en 1934 se logra por primera vez el cultivo por tiempo indefinido de un órgano, el cultivo exitoso de raíces aisladas de varias especies. El siguiente avance significativo fué en 1938, cuando se logró el cultivo de callo de zanahoria y tejido tumoral de híbridos de tabaco. Estos éxitos siguieron con el desarrollo de medios de cultivo cada vez más completos y con técnicas que permitieron el cultivo de una amplia variedad de órganos y cultivos de callos de diferentes especies. En 1960, las técnicas se hicieron altamente especializadas para el cultivo de células aisladas, cultivos en suspensión y aislamiento de protoplastos (Butcher e Ingram, 1979).

Las técnicas de CTV han llegado a ser tan sofisticadas y a tener tal impacto, que se consideran como el arte de crecimiento aséptico y heterotrófico de partes aisladas de

vegetales sobre un medio nutritivo apropiado (Steward, 1983).

El Cultivo de Tejidos Vegetales se basa en la teoría de la Totipotencia Celular, que nos dice que se puede regenerar todo un organismo a partir de una sola célula. Schwann propuso que cada célula posee la capacidad (información genética) para crear nuevas moléculas por sí misma para crecer, desarrollarse independientemente y llegar a generar un nuevo individuo, idéntico al que le dió origen. Esto, solamente si se le provee de condiciones externas bajo las cuales pueda expresar su potencialidad (información genética).

Las técnicas de CTV son útiles para: la obtención de productos farmacéuticos y productos naturales, el mejoramiento genético, la recuperación de clones libres de enfermedades, la preservación de germoplasma y la multiplicación clonal masiva y rápida de variedades selectas (Murashige, 1974). Además, pretende resolver problemas básicos de bioquímica, genética, patología y fisiología (Steward, 1983).

Las técnicas de CTV han llegado a ser muy importantes, debido a que con ellas se puede hacer frente a un amplio rango de problemas fundamentales y aplicados en investiga-

ción y desarrollo (Gamborg, et al., 1976). Utiliza una serie de procedimientos entre otros, la inducción del crecimiento de masas de células desorganizadas llamada callo - obtenidas a partir de una estructura o fragmento de la - planta madre (Murashige, 1974). Este tipo de crecimiento en agar o en suspensión se utiliza ampliamente, por ejemplo, en estudios bioquímicos, de crecimiento y de inducción de variabilidad genética (Gamborg, et al., 1976). El cultivo de segmentos de tallo, raíces, hojas o callos provee sistemas para estudiar la diferenciación, morfogénesis y regeneración. Los métodos de cultivo de meristemo enfocados a la regeneración, han sido adoptados para propagación clonal y producción de plantas libres de virus. El - cultivo de polen y anteras provee la formación de plantas haplóides. Recientemente se han incluido el aislamiento y cultivo de protoplastos que se han utilizado en la fusión e hibridización de células somáticas (Gamborg, et al., 1976).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Capsicum annuum L.

#### 2.1.1. Origen y Descripción

El chile, al igual que otras Solanáceas, se cree que es

originario de América Tropical, principalmente de Perú y que de ahí fue traído a México, aunque otros autores sugieren que México puede ser su centro de origen, ya que aquí existe una gran variedad de ellas. Se ha aclimatado en casi todas las regiones del mundo, por lo que su cultivo se halla muy extendido. Según De Candolle (1959), la especie Capsicum annum L. fué introducida a Europa en el siglo XVI. Esta misma especie conocida en Brasil bajo el nombre de quija o quiya, parece ser cultivada desde épocas remotas en las Indias Occidentales.

El chile es una planta anual de tallo anguloso, surcado, simple en la base y ramificado dicotómicamente en su parte superior. Puede alcanzar alturas de 30 a 70 cm. Las hojas son alternas, ovales o lanceoladas. Tiene flores solitarias de color blanco amarillento, hermafroditas. Fructifica en baya semicartilaginosa, de forma y dimensiones variables, con 2 o 3 lóculos o departamentos no completamente aislados, ya que las paredes de separación no llegan hasta el vértice del fruto. Sobre la prolongación carnosa del pedicelo del fruto se encuentran las semillas de color blanco amarillento, disciformes y aplanadas (García Romero, 1959). El principio activo picante del chile es la

capsaicina, es decir la vanililamida del ácido metilnonénico, que se localiza de preferencia en las placentas del fruto, esto es, en los tabiques incompletos del pericarpio, donde se insertan las semillas (Font Quer, 1980).

### 2.1.2. Clasificación

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Asteridae

Orden Solanales Lindley 1833

Familia Solanaceae A. L. de Jussieu 1789 nom. conserv.

Género Capsicum

Especie C. annuum L.

Clasificación taxonómica tomada de Cronquist, 1981.

### 2.1.3. Importancia Económica en México y en el Mundo

El cultivo del chile tiene una función muy importante para el país, ya que su consumo forma parte de la alimentación diaria de la mayor parte de la población. El maíz,

frijol, las calabazas y el chile fueron la base de la alimentación de las diferentes culturas que poblaron Mesoamérica. A esta región se le considera como uno de los principales centros de domesticación del género Capsicum, en particular de la especie C. annuum (Laborde y Pozo, 1984).

Por la gran diversidad de tipos de chiles cultivados y silvestres que tiene México, su fruto tiene diversos usos:

como alimento directo o precesado en salsas, polvo o encurtidos; la importancia económica de este cultivo es evidente por su amplia distribución y uso que tiene en todo el país (Laborde y Pozo, 1984).

En México el chile ha ocupado por siglos un lugar importante en el consumo de verduras, ya que se conserva por largo tiempo almacenado en forma desecada, y facilita su transporte a grandes distancias.

México es uno de los principales abastecedores de chile a los mercados de Estados Unidos y Canadá. Dentro de las variedades introducidas en los Estados Unidos, y que se destinan para el mercado de exportación son:

-chiles dulces (no picantes): Yellow Wonder, California Wonder, Esmerald Giant (resistente al virus del mosaico), Keystone Resistant Giant y Florida Giant.

-chiles picantes: Anaheim, Fresno, Yellow Cuban, Caribe, Floral Gemy 62 M18.

En el ciclo 1979-1980, México exportó 56,453 ton., correspondiendo el 87% a chiles dulces y 13% a chiles picantes, principalmente de las variedades Fresno, Caribe y Anaheim (Laborde y Pozo, 1984).

Los chiles más importantes a nivel nacional, son los anchos, serranos, mirasol y jalapeños, los cuales cubren el 75% del área total sembrada con chile en el país. El 80% de ese total es cultivado con riego y el 20% restante es de temporal y humedad residual, principalmente en las regiones productoras de Veracruz y Oaxaca (Laborde y Pozo, 1984).

#### 2.1.4. Valores Nutritivos

El chile es una verdura que se conserva por largo tiempo, ya que la desecación permite su almacenamiento y transporte a grandes distancias. Es una fuente de energía durante las épocas de malas cosechas o en lugares aislados, ya que por análisis químicos se ha demostrado que el fruto seco conserva un alto valor nutritivo, especialmente de vitaminas A y C.

### 2.1.5. Métodos de Producción

El chile se siembra como cultivo único en 90% del área total sembrada; el otro 10% se siembra como cultivo asociado principalmente con frijol y maíz. También se puede encontrar asociado con frutales, con el fin de hacer más eficiente el uso del terreno.

La preparación de la cama del almácigo debe hacerse con 2 partes de tierra común, una parte de arena y una parte de estiércol fermentado. Estos materiales deben de ser cribados para que la mezcla sea uniforme (Pinto, 1969).

Es necesario fumigar los almácigos con el objeto de evitar malas hierbas y enfermedades; esto puede hacerse con Bromuro de Metilo, aplicando 1 libra para cada almácigo de 10 m<sup>2</sup>. Antes de fumigar se recomienda que haya humedad y calor en el almácigo, debiéndose regar 3 días antes de la aplicación para favorecer la germinación de las semillas presentes y esporas (CIANOC, 1979).

El chile es uno de los cultivos anuales que, si técnicamente es bien llevado, tiene buenas remuneraciones económicas para el productor.

Considerando el área total cultivada con chile verde y seco (81,490 ha), se observa que en 1981, el volumen de producción por tonelada fué 586,946 para chile verde y - 31,862 para chile seco.

La producción de chile seco ha sido constantemente - más baja que la de verde, y las regiones de producción pa - ra uno y otro son diferentes.

Sinaloa, Veracruz y Guanajuato encabezan la producción de chile verde, con más de la tercera parte de la extensión total de cultivo. Zacatecas, San Luis Potosí y Aguascalientes, son tradicionalmente los centros de producción de - chile seco y abarcan cerca de la cuarta parte del total - del área cultivada. Esta división de las regiones de cultivo es el resultado de la intervención de varios factores como el clima, los transportes y el mercado (Chan y Retes, 1973).

#### 2.1.6. Problemas Fitosanitarios: virus, bacterias y hongos

Enfermedades.

Las más comunes y peligrosas en el almacigo son el

ahogamiento (Phythium spp), y la pudricción (Rhizoctonia sp). En el cultivo establecido se presenta la marchitez del chile o tizon (Phytophthora capsici Leo.), que causa la marchitez de la planta, la antracnosis (Gloeosporium piperatum) que causa la mancha de los frutos verdes y rojos, los hongos viven sobre y dentro de la cubierta de la semilla; la pudricción del fruto rojo (Vernicularia capsici) destruye al fruto después de su madurez. Las enfermedades virales que se presentan son el virus causante del mosaico del Tabaco y el virus del mosaico del pepino.

A partir de 1966, enfermedades virales comenzaron a causar daño económico. En ese año se registraron pérdidas en el Sur de Tamaulipas. Desde entonces el problema se ha incrementado y estas enfermedades han invadido nuevas regiones en las cuales no existían. Actualmente, la magnitud del problema de los virus es similar al de marchitez del chile y en algunas regiones como en Veracruz, Yucatán y el Sur de Tamaulipas es aún más severo.

#### Plagas.

Las principales plagas que atacan al cultivo de chile durante su desarrollo son las siguientes: en el almácigo se presentan el pulgón (Myzus persicae) y la pulga saltana

(Epitrix spp.). Después del trasplante, taca al cultivo la pulga saltona, que se alimenta de las hojas tiernas de la planta; a ella se asocian las catarinas (Diabrotica spp.). El pulgón, que se presenta sobre todo en floración y fructificación, es un vector que transmite el virus del mosaico del tabaco. El gusano del fruto (Heliotis spp.), y el gusano soldado (Spodoptero exigua Hbn.), atacan al principiar la fructificación. Al iniciarse la floración y durante la fructificación aparece el ataque del barrenillo o picudo del chile (Anthonomus eugenii Cano.).

## 2.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

### 2.2.1. Generalidades

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), de acuerdo a Gautheret (1982), comenzó como una mera especulación científica del Prof. Haberlandt a principios del siglo. En 1902 Haberlandt estuvo interesado en la autonomía biosintética de células fotosintética y presumía que cada célula podía proveer excelente material para su trabajo de cultivo celular. El basó su trabajo en la suposición de que

Las células vivientes eran verdaderamente totipotentes. Sus ensayos para cultivar células no tuvieron éxito y volvió a los aspectos de desarrollo de biología vegetal.

En 1921 Molliard, demostró con éxito limitado el cultivo de fragmentos de embriones vegetales (Gautheret, 1982). En 1922 Katte, un estudiante de Haberlandt en Alemania, e independientemente Robbins en los Estados Unidos, dan a conocer el éxito del crecimiento de raíces por algunas semanas en solución nutritiva. White (1934), demostró la posibilidad de crecimiento teóricamente por tiempo ilimitado, al cultivar in vitro ápices de jitomate (Gautheret, 1982). Esto representó el primer éxito continuo de cultivo de órganos.

En 1939 Gautheret en París, Nobecourt en Grenoble, Francia y White en Princeton, E.U., publicaron independientemente sus trabajos exitosos del cultivo de cambium de zanahoria y tabaco por periodos prolongados. El trabajo del CTV progresó lentamente hasta 1963, cuando White organizó el Primer Congreso Internacional de Cultivo de Tejidos en Pensylvania, E.U. En 1970 fué el Segundo Congreso de CTV en Strasburgo, Francia, seguido por el Simposio Internacional sobre Morfogénesis en Tejidos y Células Vegetales, y Cultivo de Organos en la

Universidad de Delhi en India. El Tercer Congreso de Cultivo de Tejidos se realizó en 1974, mientras que en 1978, se realizó el Cuarto Congreso Internacional de CTV en Alberta, Canadá. En 1982, se realizó el Quinto Congreso Internacional en Tokio, Japón, y el próximo a realizarse será en Agosto de 1986 en Minnesota, Estados Unidos.

Durante 1970, Street organizó la Asociación Internacional de Cultivo de Tejidos Vegetales.

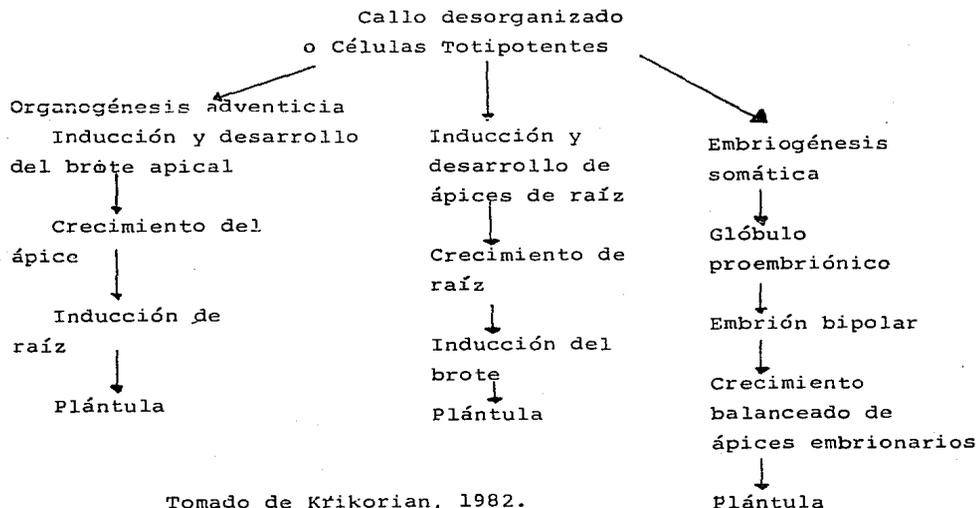
El CTV se basa en la totipotencia celular o la potencialidad para regenerar todo un organismo a partir de una célula simple (Krikorian, 1982), lo cual se desprende de los postulados de la Teoría Celular. La "célula" de Hooke, los "núcleos" de Brown y el "revestimiento semifluido del esqueleto celular" de Dujardin, (Caldas et al., 1975) formaron las bases para la formulación de la Teoría Celular, la cual fué propuesta independientemente por el botánico Schleiden en 1838 y el zoólogo Schwann (1839). Schwann nos dice que las partes elementales (células), no difieren de otras, y son capaces de ser separadas del organismo y continuar creciendo independientemente.

Winkler (1903) reporta que los brotes adventicios que forman generalmente hojas, pueden originarse de una simple

célula epidérmica o de un grupo pequeño de células. La expresión más significativa de totipotencia o competencia - morfogenética fué hecha por Haberlandt en 1902, aunque sin ninguna evidencia experimental (Krikorian, 1982).

Más tarde, Steward, Mapes y Mears (1958) informaron que las células en suspensión derivadas de explantes de raíz de zanahoria fueron capaces de formar células desorganizadas que dieron primero raíces, brotes y después la planta completa (Krikorian, 1982).

El siguiente esquema nos da una visión más completa de la formación de plántulas a partir del callo desorganizado y células totipotentes:



### Medio de Cultivo

El medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog (MS) para cultivo de tejidos de tabaco ha sido utilizado ampliamente para el cultivo de callos en agar así como - cultivos de células en suspensión en medio líquido y para estudios morfogénéticos (Gamborg, et al., 1976; Gamborg, 1982). Una característica distinguible del medio - MS es su alto contenido de nitrato, potasio y amonio en - relación a otros medios de cultivo.

La composición del medio nutritivo es un factor determinante para el crecimiento (Gamborg, et al., 1976). - El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende del medio nutritivo que se elija. Hay dos factores en particular que gobiernan el buen desarrollo de los cultivos celulares: el origen del explante y el medio de cultivo.

El medio contiene las cantidades correctas y proporciones de nutrientes inorgánicos para satisfacer la nutrición; así como las necesidades fisiológicas, de muchos cultivos celulares vegetales. Este sustrato usado para CTV - debe suplir al suelo, fertilizantes, agua, fuente de Carbono y energía solar accesibles para las plantas que crecen en el campo (Caldas et al., 1975). El medio nutritivo-

para la mayoría de los cultivos de tejidos vegetales comprende cinco grupos de ingredientes: sales inorgánicas, - fuente de Carbono, vitaminas, reguladores del crecimiento (fitohormonas) y suplementos orgánicos.

- Sales Inorgánicas. Los nutrientes inorgánicos consisten de sales minerales las cuales proveen los requerimientos para macro y micronutrientes, estos son el N, K, P, Ca, S y Mg; y como micronutrientes Fe, Mn, Zn, B, Cu y Mo.

- Fuentes: Carbono y Energía. La sacarosa a una concentración de 2-4% es preferible para la mayoría de las células. Esta puede ser reemplazada por glucosa. La fructuosa también es utilizada, pero otros azúcares son pobres como fuente de carbohidratos. El m-inositol puede no ser esencial, pero es adicionado porque ha mostrado desencadenar el crecimiento del callo.

- Reguladores del Crecimiento. Los grupos de hormonas son las auxinas, citocininas, giberelinas y dorminas. De estos, los dos primeros son los más importantes en CTV. Las auxinas son una clase de compuestos que estimula la elongación celular y el enraizamiento, se usan normalmente en el inicio y mantenimiento del callo (Caldas et

al., 1975; Dodds y Roberts, 1982). Las auxinas más usadas en CTV son el Acido indol-3-acético (AIA), el Acido 1-Naftalenacético (ANA) y el Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). Algunas de estas son naturales como el AIA, esta es muy sensible a la degradación biológica por enzimas oxidasas (AIA oxidasa) y peroxidasas, y a la luz, no así el ANA y el 2,4-D que son estables en solución (Caldas et al., 1975). El AIA fué aislado en 1885 por el químico Salkowski, durante su investigación sobre la descomposición de proteína (Gautheret, 1982). El AIA es utilizado en concentraciones de  $10^{-5}$  -  $10^{-10}$  M. Dentro de este grupo hay compuestos que son sintéticos como el 2,4-D. La producción de callo en la mayoría de los casos es exitosa usando solamente 2,4-D ( $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M), este induce la división celular, pero también tiende a reprimir la morfogénesis. En general, la acción de las auxinas son: la dominancia apical, extrusión de protones ( $H^+$ ) y cambios en la permeabilidad del plasmalema, formación del etileno, inducción del crecimiento desorganizado a altas concentraciones (herbicida), inhiben la formación del embrión en cultivos en suspensión e irregularidades mitóticas en cultivos por largo tiempo (Jacobsen, 1983).

Las citocininas son por definición sustancias naturales que están presentes en extractos de plantas verdes - (Caldas, et al., 1975). Pocas citocininas han sido aisladas desde que Letham aisló la zeatina (Z) de frutos de maíz. Sin embargo, un rango de sustancias con propiedades de citocininas han sido descritas. Entre éstas está la Kinetina que fué descubierta por Miller, Skoog, Salza y Stron (1955) de semillas inmaduras de Zea mays y sucesivamente en otros tejidos vegetales (Jacobsen, 1983). Las citocininas más utilizadas en CTV son: 2-isopentiladenina (2-iP) y Zeatina (Z), ambas son citocininas naturales y las sintéticas Kinetina (K) y 6-Benzilaminopurina (BA). En general, las citocininas actúan como: estimuladores de la división celular, retardadores de la senescencia y estimuladores para la germinación de semillas (Jacobsen, 1983).

Algunos tejidos no responden sólo con una auxina y requieren de citocininas. La adición de citocininas (K, Z o BA) con el 2,4-D puede ser benéfica para la producción de callo, Si el cultivo de tejidos es utilizado en estudios de morfogénesis, el ANA y BA, Z o 2-iP en combinación podrían dar mejores resultados.

- Vitaminas. Solamente la tiamina puede ser requerida como esencial. El ácido nicotínico y piridoxina pueden estimular el crecimiento (Gamborg, et al., 1976). Algunos medios también contienen pantotenato de calcio y biotina, pero estas y otras vitaminas no se consideran factores limitantes del crecimiento (Gamborg y Shyluk, 1981).

- Suplementos Orgánicos y Aminoácidos. Los aminoácidos no son necesarios, aunque en ocasiones se agregan al medio nutritivo la L-glutamina, asparagina y como base nitrogenada la adenina. Si se añaden solo, deben usarse con precaución, ya que pueden resultar inhibidores del desarrollo (Gamborg y Shyluk, 1981). La L-glutamina (2-10mM) puede reemplazar al hidrolizado de caseína o aminoácidos de la caseína. Se ha probado que gran variedad de sustancias complejas como son proteínas hidrolizadas, extracto de levadura, de malta, agua de coco y jugos de frutas (naranja, piña, jitomate), pueden ser intercambiadas por nutrientes definidos (Murashige, 1974; Caldas et al., 1975; Gamborg et al., 1976; Gamborg y Shyluk, 1981).

Si se desea un sustrato semisólido, otro componente del medio nutritivo es el agar, un polisacárido purificado de algas Rodofitas, que se disuelve al calentarlo

en solución y después de enfriarse forma un gel. El agar tiene ciertas impurezas que pueden influir en el crecimiento del tejido en cultivo.

pH. El medio para CTV es generalmente ajustado a un pH ácido entre 5 y 6. Los efectos directos o indirectos del pH pueden influir en la respuesta de crecimiento. Durante el crecimiento de las células, el pH en el medio cambia - conforme los iones son absorbidos por estas, o por productos de su metabolismo que son excretados al medio.

Entre los factores medio ambientales que tienen acción sobre el desarrollo de los cultivos se encuentran: la temperatura, humedad, aereación, iluminación, efectos gravitacionales y de presión y efectos magnéticos (Caldas et al., 1975).

-Temperatura. La temperatura es el factor más citado en la literatura. Se ha estudiado que el crecimiento de papa tiene su óptimo a 28°C. Estudios con Chondrilla juncea Kefford & Caso (1972), muestran que el régimen de temperatura para una máxima formación de raíces adventicias está entre 21-27°C durante el periodo de día, y para la noche 16 a 22°C. Hasegawa et al. (1973) informan que una constante de 27°C fué satisfactoria para la multiplicación de bro

tes y raíces de Asparagus officinalis (Murashige, 1974).

- Humedad. Los efectos de la humedad se ven directamente sobre el medio más que por efectos en el tejido. - Cuando la atmósfera está muy seca, el medio se deshidrata y concentra las sales disminuyendo así el crecimiento - del callo.

- Iluminación. Se ha visto que el crecimiento del - callo en Allium cepa, zanahoria y meristemos de papa, es mayor en la obscuridad que en la luz. Par algunas especies como Asparagus, Gerbera, Saxifraga y bromelias la intensidad óptima a la cual crecen es a 1000 lux. Otros efectos de luz en el crecimiento son: 1) estímulo de producción de fenoles en células en cultivo; 2) aumento de la actividad enzimática; 3) aumento en la producción de pigmentos (carotenoides, antocianinas, clorofilas) (Kant y Hildebrandt, 1969; Ulrich y Mac Kinney, 1970; Aftermann y Reinhard, 1971 en Caldas et al., 1975, Murashige, 1974).

El método de propagación de vegetales por cultivo de tejidos requiere una secuencia de pasos:

1) Establecimiento del cultivo aséptico. Es necesario que el cultivo este libre de cualquier infección para que el explante sobreviva y crezca en el medio de cultivo.

Además, otros factores que influyen en el crecimiento adecuado del explante son los siguientes: la edad y el estado fisiológico del órgano o tejido aislado, el periodo del año en el cual el explante es obtenido, su tamaño, la estructura (hoja, meristemas, raíz, tallo, hipocótilo etc.) de la planta madre de la cual se obtienen los explantes.

2) Multiplicación del Propágulo. El incremento puede ser realizado a través de la inducción de órganos o embriones somáticos.

3) Adaptación o Aclimatación. Para el establecimiento de las plántulas del medio in vitro a in vivo. Este es un factor limitante del éxito especialmente por el cambio tan drástico que sufre la planta de un estado heterótrofo en que se encontraba bajo condiciones nutricionales y ambientales totalmente controladas, a un estado autótrofo bajo condiciones naturales cambiantes (Murashige, 1974).

Dado que la mayoría de las células vegetales viables pueden dividirse por mitosis in vitro, la regeneración ha sido exitosa a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo, tallo, hoja, meristemo apical, raíz, pecíolos, tejido óvular, embriones etc. (Evans et al., 1981).

Solo un pequeño porcentaje de las células en un ex-

Plante dado contribuye a la formación de callo. El lugar de inicio del callo generalmente es en la en la superficie del inóculo o en la superficie del corte (Evans et al., 1981.)

Es evidente que existe un requerimiento de los reguladores del crecimiento para la expresión de la organogénesis o embriogénesis somática. En general, una alta concentración de auxinas en combinación con una baja concentración de citocininas promueve la proliferación del callo. Alternativamente, una baja concentración de auxinas con alta - de citocininas promueve la formación de yemas o plántulas.

#### 2.2.2. Cultivo de Callo

Durante 1930 Gautheret y Nobecourt en Europa y White en E.U.A. revolucionaron los métodos del cultivo de Tejidos Vegetales. Gautheret en 1939 reportó que del tejido de - raíz de zanahoria proliferaron grandes masas de tejido de - organizado cuando era sembrado en un medio nutritivo en presencia de la auxina AIA. Esta proliferación de células a partir de segmentos de tejido (explantes) y que crecen en una forma desorganizada y sin diferenciación se llama callo (Butcher e Ingram, 1979). Al mismo tiempo White -

reportó independientemente el cultivo de callo del pro-cambium a partir de segmentos de tallo del híbrido de tabaco Nicotiana glauca X N. langsdorffii. Subsecuentemente fueron obtenidos callos de una gran variedad de plantas, incluyendo Dicotiledóneas, Monocotiledóneas y Gimnospermas.

Los tejidos aislados responden a los tratamientos para inducir callo, el aislamiento y éxito para su establecimiento, depende de las condiciones de cultivo y no de la fuente del material vegetal (Street, 1977). El cultivo de callo ha sido enfocado directamente a plantas con flores, en especial dicotiledóneas (Gautheret, 1959; Butenkó, 1964 en Street, 1977). La preferencia de las dicotiledóneas como fuente de material vegetal, es por la disponibilidad de un amplio rango de especies y básicamente porque dan una respuesta rápida para inducir callos. En algunos casos, el crecimiento ocurre solamente con mezclas de aminoácidos, vitaminas, Kinetina y otros factores de crecimiento adicionados al medio.

El tamaño y la polaridad del explante en el medio de cultivo influyen en el desarrollo del callo (Evans et al., 1981). Explantes más pequeños forman callo más fácilmente, mientras que explantes grandes mantienen el potencial -

Morfogenético (Evans et al., 1981).

El cultivo de callo en agar es conveniente para empezar y mantener líneas celulares (Gamborg y Wetter, 1975).

Las características generales de su crecimiento involucran una relación compleja entre el material vegetal usado, la composición del medio y las condiciones ambientales durante el periodo de incubación. Algunos callos son muy lignificados y de textura dura, mientras que otros se separan fácilmente en pequeños fragmentos. Los frágiles, que se disgregan fácilmente, son denominados cultivos "fríasbles" (Dodds y Roberts, 1982).

El crecimiento de un cultivo por un periodo de tiempo, es caracterizado por incremento en el número de células, un incremento en volumen o masa y cambios en la complejidad bioquímica y celular.

Hay diversos parámetros para medir el crecimiento: conteo celular, volumen celular, peso fresco y seco, índice mitótico, conteo de elementos traqueidales, nitrógeno total etc. (Wetter y Constabel, 1982; Dodds y Roberts, 1982). Las tasas de crecimiento en callos se expresan en base al incremento en peso fresco.

La medición del peso seco de un callo da una estimación

de la actividad biosintética de un cultivo (Dodds y Roberts, 1982).

### 2.2.3. Cultivo de Tejidos Vegetales en Solanáceas

Las especies de Solanáceas han sido usadas como modelo de los estudios in vitro. La totipotencialidad fué demostrada primero con Nicotiana tabacum al regenerar plantas maduras a partir de células individuales (Vasil y Hildebrandt, 1965 citado por Flick et al., 1983), y especies relacionadas con ella son ejemplos donde la mayoría de las técnicas de cultivo in vitro han sido exitosamente demostradas (Durbin, 1979 citado por Flick et al., 1983). El primer éxito de producción de plantas haploides fué al cultivar in vitro anteras de Datura innoxia (Guha y Maheshwari, 1964 citado por Flick et al., 1983).

Callos y cultivos en suspensión se han iniciado de hojas o tallos de Nicotiana tabacum y de otras especies de Nicotiana utilizando el medio MS. La regeneración del brote a partir del callo y de cultivos en suspensión es posible para la mayoría de las especies de Nicotiana, en un medio de cultivo sin 2,4-D y adicionando una citocinina o bien combinando auxinas y citocininas (Murashige y Nakano, 1967 citado por Flick et al., 1983).

Con Solanum tuberosum se ha iniciado el cultivo de callo con potencial morfogénico sobre el medio MS a partir de explantes del tubérculo, meristemos, hipocótilos, hoja y tallo. La formación de callo de varias especies de Solanum requieren de un rango alto de auxina-citocinina. Esto mismo se necesita para S. xanthocarpum (Rao y Narayanaswamy, 1968, citado por Flick et al., 1983), S. sisymbriifolium (Fassuliotis, 1975, citado por Flick et al., 1983), S. dalcamara, S. nigrum (Zenkteleer, 1972, citado por Flick et al., 1983), S. khasianum (Bhatt et al., 1979, citado por Flick et al., 1983). En Solanum melongena se ha trabajado con secciones de hipocótilo para inducir callo y cuando este se subcultiva sobre medio MS con zeatina o Kinetina se obtienen brotes. También se ha obtenidos multiplicación clonal in vitro por Kamat y Rao (1978) (citado por Fári y Czakó, 1981), y se han inducido esporofitos haploides (Gu, 1979, citado por Fári t Czakó, 1981).

Con Lycopersicon esculentum, se han trabajado secciones de hoja e hipocótilo para inducir la formación de callo. La formación del brote se ha hecho sobre un medio con alta con centración de citocininas o bien citocininas solas (Kartha et al., 1976 citado por Flick et al., 1983). Se ha explorado también con esta especie el cultivo de embriones (Smith, 1944 citado por Fári y Czakó, 1981),

la inducción del esporofito haploide (Sharp et al., 1971, citado por Fári y Czakó, 1981), la morfogénesis a partir del callo (Padmanabhan et al., 1974, citado por Fári y Czakó, 1981), la cual se logra usando BA y AIA; se han aislado protoplastos (Gregory y Cocking, 1965 citado por Fári y Czakó, 1981), se ha logrado la hibridización intergenérica con los protoplastos (Melchers, 1980, citado por Fári y Czakó, 1981), se han preservado meristemos en nitrógeno líquido (Grout et al., 1978, citado por Fári y Czakó, 1981) y se han cultivado meristemos (Novák y Măsková, 1979 citado por Fári y Czakó, 1981).

Las especies de Petunia son fáciles de trabajar con técnicas in vitro; han sido cultivadas sobre medio MS, - se han utilizado como explantes el tallo y hoja para la regeneración vegetal. La regeneración del brote se ha obtenido con bajas concentraciones de auxinas mientras que simultáneamente se incrementa la de citocininas. La mayoría de los trabajos in vitro de estas especies reportan la facilidad de la regeneración vegetal a partir de protoplastos (Flick et al., 1983).

El género Datura no ha sido estudiado in vitro con gran detalle. D. innoxia representa el material ideal

para estudios de cultivos de anteras (Guha y Maheshwari, 1964, citado por Flick et al., 1983), regeneración vegetal (Engvild, 1973, citado por Flick et al., 1983) e hibridización somática (Schieder, 1978, citado por Flick et al., 1983). El callo de D. innoxia se induce sobre medio MS con 2,4-D y la regeneración vegetal a partir del callo se induce con BA. Las raíces se han obtenido en el medio MS sin reguladores del crecimiento. También se han obtenido brotes de esta especie, de cultivos en suspensión (Hiraoka y Tabata, 1974, citado por Flick et al., 1983), de segmentos de tallo (Engvild, 1973, citado por Flick et al., 1983) y de secciones de hoja (Evans y Gamborg, no publicado).

Dentro de la familia Solanaceae hay además tres especies de Scopalia que han sido regeneradas del cultivo de anteras, estas son: S. carniolica, S. lurida, y S. physaloides (Wernicke y Kohlenbach, 1975, citado por Flick et al., 1983).

La regeneración a partir de protoplastos parece ser más fácilmente inducible con la familia de las Solanáceas. 38 especies de esta familia han sido regeneradas del cultivo de protoplastos (Evans y Bravo, 1983).

La organogénesis es el primer paso para la regeneración

vegetal de la familia Solanaceae. El medio MS ha sido usado para 39 de las 42 especies cultivadas in vitro. Para algunas especies de Solanáceas, si la relación auxina/citocinina es mayor que 1 se desencadena la formación de callo, si es menor que 1 la formación del brote se induce (Flick et al., 1983).

#### 2.2.4. Cultivo de Tejidos Vegetales en Capsicum

En Capsicum se han obtenido plántulas haploides y callo a través del cultivo de anteras (George y Narayanaswamy, 1973; Wang-Yu-Ying et al., 1973 citado por Fári y Czakó, 1981; Kuo et al., 1973 citado por Bajaj, 1983; Nővak, 1974 citado por Bajaj, 1983).

El cultivo de anteras se realizó sobre el medio LS con Kinetina y AIA con el cual se inicia el desarrollo de estructuras multicelulares proembrionarias (George y Narayanaswamy, 1973 citado por Bottino, 1973).

Se han seleccionado líneas celulares mutantes fisiológicas de Capsicum annuum capaces de crecer en medio líquido conteniendo una alta concentración de NaCl (Dix y Street, 1975, 1976 citado por Tal, 1983).

Trabajos de criopreservación se han realizado también con Capsicum annuum (Withers y Street, 1977 citado por Nitzsche, 1983) utilizando como medio de cultivo el LS suplementado con 2,4-D y K. Después de almacenar el cultivo celular a  $-196^{\circ}\text{C}$ , se resuspende y se subcultiva obteniendo un crecimiento lento de callo (Withers, 1978a citado por Nitzsche, 1983).

Se han realizado estudios de biosíntesis en Capsicum annuum para estimular la síntesis de la capsaicina en cultivo, esto se logró reduciendo la concentración de los micronutrientes para inhibir el crecimiento del tejido en cultivo (Collin y Watts, 1983).

Gunat y Rao (1978), Fári y Czakó (1981), reportan la formación de brotes en Capsicum annuum, los primeros utilizaron como explantes el cotiledón e hipocótilo de 4 semanas, sobre medio MS con 2.0 mg/l de BA y 1.0 mg/l de AIA; los segundos utilizaron como explantes el hipocótilo cercano al ápice sobre el medio MS con 2.0 mg/l de BA y 1.0 mg/l de AIA, utilizando segmentos de hipocótilo de la parte media se obtienen raíces y callo abundante y ocasionalmente brotes, con segmentos de la parte basal del hipocótilo se obtienen solamente raíces y callo sin formación de brotes.

### 3.0 OBJETIVOS

Distintas especies de hortalizas se han tratado de mejorar genéticamente por medio del mecanismo de fecundación controlada y rescate de embriones inmaduros, producto de cruces interespecíficas, y así, producir una planta más -- resistente ante factores adversos del medio ambiente como son plagas, sequía, viento etc. y también lograr una mejor calidad de sus productos como: frutos, fibras, semillas, - flores, bulbos etc.

El chile es una hortaliza muy consumida en México y la aplicación del CTV puede ayudar a incrementar la producción de este.

Dado que el chile tiene problemas fitosanitarios y es atacado por virus, sería muy recomendable contar con variedades resistentes, para lo cual, un primer paso es establecer la metodología para regenerar plantas in vitro libres de patógenos.

En particular, los objetivos del presente estudio fueron:

- Aplicar las técnicas de CTV a cultivares que tienen importancia económica y alimenticia en México.

- Conocer la respuesta morfogénica de explantes de plántulas jóvenes del género Capsicum que sirvan de base a la propagación masiva de fitocultivos.
- Analizar la respuesta en la formación del callo para que posteriormente pueda utilizarse el mismo como fuente de embriogénesis somática.
- Analizar la curva de crecimiento a partir de callos de hipocótilo que sirvan como base para futuros trabajos de embriogénesis somática,

#### 4.0 MATERIALES Y METODOS

##### 4.1 Material Biológico (Explantos)

Se utilizaron semillas de Capsicum chinense (habanero), C. annuum (serrano) subtipo típico. Las primeras se obtuvieron de PRONASE (Productora Nacional de Semillas), y las segundas de establecimientos comerciales.

Las semillas fueron esterilizadas con una solución 0.6% de cloro activo (clorales comercial 10% v/v), se mantuvieron en agitación constante durante 15 min. y se enjuagaron cuatro veces en agua destilada esterilizada realizando este paso dentro de la campana de flujo laminar.

Se pusieron a germinar bajo condiciones asépticas en frascos de boca ancha, con una capacidad de 130 ml., que contenían una capa de algodón humedecido con agua destilada. Se colocaron 15 semillas por frasco. Posteriormente, se incubaron en obscuridad en una estufa a 30°C durante 8 a 10 días, y después se pasaron a fotoperíodo 16h luz/8h de obscuridad a una temperatura de 27° ± 1°C y con una intensidad luminosa de 1000 lux. Al cabo de este tiempo las plántulas alcanzaron el desarrollo adecuado para ser disectadas.

Debido a que en algunos casos hubo problemas para lograr la germinación, se probó sembrar las semillas en una solución nutritiva Knop, sustituyendo al agua destilada y sobre medio de cultivo MS sin glicina y sin sacarosa, con 8g/l de agar. También se intentó germinar las semillas sobre un sustrato de vermiculita y perlita 1:1. Los porcentajes de germinación entre los dos primeros no tuvieron diferencias significativas, sin embargo, las plántulas que se obtuvieron sobre el medio nutritivo, eran más robustas. La tercera prueba de germinación ocurrió en un mayor porcentaje, por lo que se optó por seguir empleando ese sustrato.

El material vegetal (explantos) que se utilizó incluyó hipocótilos y meristemas apicales de plántulas de apro-

ximadamente tres semanas. Los explantes se esterilizaron - con la solución citada anteriormente durante 20 min. Se sembraron cuatro explantes por frasco en cada una de las combinaciones hormonales.

#### 4.2. Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado fué el propuesto por Murashige y Skoog (MS) (1962), adicionado con los reguladores del crecimiento utilizados por Fári y Czakó (1981), y cinco combinaciones más para comparar su acción en la morfogénesis de los tejidos in vitro.

Para preparar el medio de cultivo se utilizaron soluciones concentradas de: Macronutrientos, Micronutrientos, Fe con EDTA, Vitaminas, Inositol y Glicina; las cuales se encontraban preparadas en concentraciones de 10X y 20X. Se agregaron 30 g/l de sacarosa (Bioxon de México) y 8 g/l de agar (Agar Bacteriológico, Bioxon de México, S.A.) (Ver Apéndice I). Dependiendo de la cantidad de medio que se preparara, se tomaron alícuotas de las soluciones concentradas de cada uno de los componentes del medio nutritivo.

Los reguladores del crecimiento empleados fueron preparados en soluciones concentradas  $10^{-3}$  M, y de estos se tomaron alícuotas para obtener las concentraciones deseadas.

Los reguladores del crecimiento utilizados fueron:

Citocininas: BA (6-Benzilaminopurina) (ICN., Pharmaceuticals Inc.)

K (6-Furfurilaminopurina) (ICN., Pharmaceuticals, Inc.)

Auxinas: ANA (Acido 1-Naftalenacético) (ICN., Pharmaceuticals, Inc.)

AIA (Acido indol-3-acético) (ICN., Pharmaceu  
ticals, Inc.)

2,4-D (Acido 2,4-Diclorofenoxiacético) (Merck Schardt).

Las citocininas se adicionaron a una concentración de 2.0 mg/l y las auxinas a 1.0 mg/l.

El medio de cultivo se preparó en vasos de precipitados y el volumen final fué aforado en probetas graduadas. Cada uno de los componentes del medio, se agregaron al vaso de precipitados y fueron sometidos a agitación constante sobre una parrilla con agitación magnética. El  $pH$  se ajustó a 5.7 con ayuda de un potenciómetro digital Corning adicionando soluciones de HCl y NaOH 0.5 y 0.1N. Al medio nutritivo se agregó el agar y se calentó hasta obtener un medio perfectamente homogéneo y transparente. Finalmente se repartió en-

frascos con capacidad de 12 ml, a los cuales se les agregaron 20 ml. de medio de cultivo. Los frascos se taparon con papel aluminio grueso y sujetado con ligas de hule. Por último, el medio nutritivo se esterilizó en autoclave a una presión de  $1.5 \text{ kg/cm}^2$  y con una temperatura de  $126^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

El AIA es una auxina natural que puede ser inestable ante reacciones físicas como son: someterla a esterilización en autoclave, a procesos de aereación y a la luz. Se ha reportado que el AIA no se degrada aún cuando se esterilice en autoclave siempre y cuando su solución se encuentre en un rango de  $\text{pH}$  4-10 (Yamakawa et al., 1979), trabajos anteriores nos indican que es preferible esterilizar el AIA por filtración (Gamborg et al., 1976). Estos trabajos nos ponen de manifiesto que hay que tener ciertas precauciones con el AIA, por lo cual para la realización de este trabajo se optó esterilizarlo por filtración.

Para poder incorporar el AIA al medio de cultivo, se procedió primeramente a esterilizar los frascos vacíos y tapados en autoclave bajo las condiciones antes mencionadas. El medio de cultivo se preparó como se explicó anteriormen

te, adicionándole el BA y K en matraces separados. El AIA no se agrega al medio de cultivo. Los dos matraces conteniendo el medio de cultivo, mas dos matraces Erlenmeyer - de 25 ml., los swinnex 13 con las juntas de silicona y el filtro HA con porosidad de 0.45  $\mu\text{m}$  se esterilizan en autoclave.

Para conservar las condiciones asépticas, se trabajó cerca de la flama de un mechero Bunsen y dentro de una campana de flujo laminar VECO. Todo el material a utilizar - así como la campana fueron limpiados con alcohol etílico industrial. El instrumental que se ocupó y una jeringa Millipore de 20 ml. se sumergieron en alcohol etílico industrial. La jeringa se enjuagó con agua destilada esterilizada, se le conectó el swinnex 13 y se agregó la hormona a la jeringa. Esta operación se realizó tres veces sobre el mismo filtrado. Se midió el volumen necesario de AIA con una pipeta estéril y se incorporó a los matraces que contenían el medio nutritivo. Para hacerlo homogéneo se agitó bien y se repartió a los frascos estériles. Para tener la seguridad de que los medios nutritivos no se habían contaminado, se incubaron en una estufa a 30°C durante una semana, si al cabo de este tiempo no había señales de conta-

minación se procedía a la siembra.

#### 4.3. Siembra

Las siembras de los explantes se efectuaron en una campana de flujo laminar (VECO), para tener menos probabilidad de contaminación y asegurar el ambiente estéril se colocaron dos mecheros Bunsen dentro de la campana. Esta última se limpió con alcohol etílico industrial, se introdujo un frasco con alcohol en el cual estaba sumergido todo el instrumental necesario para realizar la disección y la siembra. Se introdujo también un Microscopio Estereoscópico utilizado para la obtención de los explantes, este se limpió muy bien con alcohol etílico industrial al igual que los frascos que contenían el medio de cultivo.

Todo el instrumental se flameó y se dejó enfriar para proceder a la disección. Una vez obtenido el explante, se depositó sobre el medio nutritivo, se flameó la boca del frasco, se tapó con papel aluminio grueso y se selló perfectamente con ligas de hule.

#### 4.4. Incubación

Después de la siembra los cultivos se incubaron en una cámara de cultivo con fotoperiodo 16h luz/8h de oscuridad, con una temperatura de  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y una intensidad luminosa de 1000 lux.

#### 4.5. Cuantificación del Peso Fresco y Peso Seco

Para la realización de este paso se seleccionó el callo de hipocótilo de C. annuum cv. Serrano. La inducción del callo se obtuvo sobre el medio MS adicionado con 2.0 mg/l de las citocininas BA y K en combinación con 1.0 mg/l de la auxina 2,4-D.

El explante se esterilizó como ya se mencionó anteriormente y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Se emplearon 35 frascos por combinación y se sembró un explante por frasco. Se incubaron en una cámara de cultivo bajo las condiciones ambientales antes mencionadas.

Se dejó crecer el tejido por dos semanas y a la tercera se empezó a cuantificar el peso fresco, y peso seco, haciendo un total de 9 semanas desde la siembra, se tomaron

registros de Peso Fresco y Peso Seco hasta la nóvena semana porque en experiencias anteriores se observó que al cabo de este tiempo el callo presentaba necrosamiento y ya no había crecimiento.

Para cuantificar el peso fresco y peso seco, se utilizaron 5 explantes, de estos se obtuvo un valor promedio y se graficó. En una balanza analítica se pesaron los callos sobre un vaso de precipitados de peso previamente conocido. Para saber el peso real del callo se sacó la diferencia del peso del vaso con el callo y del vaso solo, así se obtuvo el peso fresco.

Para el valor del peso seco se utilizó el mismo callo del que se obtuvo el peso fresco. El callo se dejó secar en una estufa a una temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ , y se pesó periódicamente hasta que logró un valor estable aproximadamente a las 12h, considerándose tal valor como el peso seco. En las últimas semanas de cultivo, el callo fué muy abundante y necesitó hasta 18h para lograr un peso estable.

Estos mismos pasos se realizaron cada semana hasta llegar a la nóvena semana.

Los pesos obtenidos se trabajaron estadísticamente haciendo un Análisis de Varianza.

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSION

La respuesta morfogénica del hipocótilo y meristemo de Capsicum chinense L. cv. habanero y C. annum L. cv. Se rrano bajo la influencia de las auxinas ANA, AIA y 2,4-D y de las citocininas BA y K se presenta en las Tablas 1, 2 y 3, en general podemos señalar que los mejores resultados en términos de potencialidad morfogénica se obtuvieron en las combinaciones hormonales que incluían al AIA, independientemente de la citocinina empleada.

En la Tabla 1 observamos que la combinación más efectiva para la inducción del callo fué K/AIA; para la formación de yemas BA/AIA; para la producción de plántulas BA/AIA; para el desarrollo de raíces K/ANA y para la formación de plántulas + raíz BA/AIA. En general, la combinación más efectiva para inducir la respuesta morfogénica fué BA/AIA, estos resultados coinciden con los obtenidos por Fári y Czakó (1981) quienes trabajaron con el hipocótilo de C. annum "T. Hatvani" y obtuvieron la formación de brotes.

Al cultivar los meristemos de C. chinense (habanero), y comparando K/ANA con BA/ANA, observamos en la Tabla 1 que en presencia de la primera combinación fué mayor la

inducción del callo y raíces (86.0% y 77.0% respectivamente) que con BA/ANA (50.0%), sin embargo, la formación de yemas (46.0%) fué mejor en la combinación BA/ANA. La presencia de yemas implica la capacidad potencial del tejido en el sentido morfogénético, que sin embargo, requiere probarse todavía en un barrido hormonal más amplio o buscando generarlas en presencia de diferentes condiciones ambientales, ya que se ha analizado este factor como de gran importancia en el proceso de expresión morfogénética (Rubluo et al., 1984).

Observamos en la Tabla 1 que los meristemas en presencia de BA/AIA fueron más efectivos en la producción de órganos, no así con K/AIA donde la formación de yemas fué baja (21.0%), pero con esta combinación la producción de callo fué muy abundante (96.0%).

La Tabla 1 muestra que con la combinación BA/2,4-D, no se observó el desarrollo de órganos, pero sí hubo producción de callo en un 33.0%, con la combinación K/2,4-D la producción de callo fué más abundante (36.0%) que en el caso anterior, en general los callos formados eran friables y blancos. A pesar de que la auxina 2,4-D se emplea generalmente para la inducción de callo y no para la formación de órganos (Evans et al., 1981) se observó en este caso un -

pequeño porcentaje en la formación de yemas en un 5.0%

No se sembró hipocótilo de C. chinense por la falta de material vegetativo.

Los meristemas tienen un amplio rango de respuesta morfo genética en cultivo. El proceso de diferenciación de meristemas en plántulas, raíces, callo, brotación múltiple o plantas completas depende de muchos factores: 1) el tamaño de los meristemas, 2) el tipo de medio de cultivo, 3) la concentración hormonal, 4) las condiciones ambientales (luz, temperatura y fotoperiodo), 5) fluctuaciones estacionales de las plantas donadoras (Kantha, 1981). Nuestros resultados muestran que el cultivo in vitro de Capsicum aún con meristemas es difícil de establecer, se requieren más investigaciones que exploren en mayor medida los factores que han sido mencionados, con el objeto de encontrar una respuesta adecuada en la morfogénesis in vitro de este importante género. Estos resultados concuerdan en cierta forma con aquellos informados por Rubluo y Kantha(1985) para meristemas del género Phaseolus, en los cuales después de un barrido hormonal amplio y exposición a diferentes condiciones ambientales logran establecer la regeneración de plantas.

En la Tabla 2 observamos que la combinación más efectiva

fué K/AIA tanto para callo como yemas e incluso plántulas, por otro lado el desarrollo de raíces fué mejor en BA/ANA, y para la formación de plántulas + raíz ninguna combinación generó ambas respuestas. En general, la combinación más efectiva para inducir la respuesta morfogénética fué K/AIA.

En la Tabla 2 al comparar las combinaciones BA/ANA y K/ANA vemos que tuvieron un comportamiento semejante en relación a la morfogénesis, es decir, que estas combinaciones fueron efectivas en la inducción del callo y raíces a partir de este, siendo para BA/ANA de un 88.0% y 68.0% respectivamente. Los porcentajes son relativamente menores con la combinación K/ANA pero en ambos casos sólo hubo formación de callo y raíces, pero no de yemas y plántulas.

Observamos en la Tabla 2 que al encontrarse los meristemas bajo la acción de la combinación BA/AIA la producción de callo fué escasa, siendo de un 19.0% y para la formación de yemas de un 10.0%, no hubo desarrollo de plántulas ni de raíz. En contraste, cuando los meristemas de C. annuum se encontraron en presencia de K/AIA, su potencial morfogénético se expresó mejor que en el caso anterior, ya que hubo inducción de callo de un 97.0%, formación de yemas 41.0% y desarrollo de plántulas de 45.0%, aunque no se -

presentó formación de raíces.

Los meristemas en presencia de BA/2,4-D y K/2,4-D, sólo produjeron callo, siendo más abundante al estar presente la BA. En ninguna de las combinaciones se observó la formación de órganos. Estos resultados eran de esperarse dada la acción del 2,4-D la cual tiende a acelerar la división celular y en consecuencia la formación de callo (Evans, et al., 1981)

Correlacionando las Tablas 1 y 2 observamos que la mejor combinación hormonal para la inducción de callo fué K/AIA, ésta coincide con ambas especies, lo cual se puede atribuir a que la combinación hormonal tiene una acción fisiológica similar sobre el tejido. La combinación más efectiva para la inducción de yemas en C. chinense fué BA/AIA (Tabla 1), esta misma en C. annuum (Tabla 2) obtuvo un porcentaje muy bajo en la producción de yemas, pero al estar presente la K con el AIA en esta especie (Tabla 2) resulta ser la mejor combinación para la inducción de yemas, no así para C. chinense (Tabla 1) donde ésta combinación produce un porcentaje bajo de yemas. Resultados similares obtuvieron Fári y Czakó (1981), al emplear la BA con el AIA y obtener formación de brotes del hipocótilo de C. annuum "T. Hatvani".

La combinación que indujo mayor formación de plántulas fué K/AIA con C. annuum (Tabla 2), esta combinación en C. chinense no produjo ninguna plántula. Para la formación de raíces, la combinación más efectiva fué K/ANA para C. chinense (Tabla 1), y la formación de plántulas con raíz se logró al emplear BA/AIA, en este caso el porcentaje de formación fué reducido 8.0%, pero fué la única combinación en la que se obtuvieron plántulas completas en el caso de meristemas. Como se mencionó anteriormente, la combinación BA/AIA fué en la que se obtuvieron brotes usando como estructura vegetativa segmentos de hipocótilo, en los trabajos de Fári y -- Czakó (1981); en el presente trabajo, se emplearon meristemas y se logró la regeneración completa, es decir la formación de yemas, plántulas y plántulas con raíz, (Tabla 1).

En las Tablas 1 y 2 observamos que las auxinas ANA y AIA, en combinación con las citocininas BA y K fueron efectivas en la inducción de la morfogénesis, siendo la mejor BA/AIA para C. chinense (Tabla 1) y K/AIA para C. annuum (Tabla 2), no así el 2,4-D en combinación con BA y K, con las cuales sólo indujo la formación de callo y el crecimiento de éste (a excepción de K/2,4-D en la Tabla 1). Estos resultados concuerdan con la mayoría de los informes donde

interviene el 2,4-D, el cual ha demostrado ser una hormona que induce la división celular en los tejidos in vitro por lo que resultan estos cultivos en una proliferación de callo (Gamborg y Wetter, 1975; Bajaj y Dhanju, 1979; Gamborg y Shyluk, 1981; Street, 1977).

Al cultivar hipocótilo de C. annuum (Tabla 3) observamos que la combinación más efectiva para la inducción del callo fué K/ANA; la mejor combinación para la producción de yemas fué K/AIA; para formación de plántulas BA/AIA, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fári y - Czakó (1981) quienes trabajaron con C. annuum "T. Hatvani". El desarrollo de las raíces se expresó mejor con la combinación K/AIA y para la formación de plántulas + raíz con BA/AIA. En general, la combinación más efectiva para inducir la respuesta morfogénica del hipocótilo de C. annuum fué K/AIA.

Al comparar las combinaciones K/ANA y BA/ANA en los cultivos de hipocótilo de C. annuum (Tabla 3), hubo mejor producción de callo con K/ANA, sin embargo, con BA/ANA el desarrollo de raíz fué mejor (68.0%) que con la primera que fué de un 50.0%.

En las secciones de hipocótilo sembradas en medio con

BA/AIA (Tabla 3), se observa que se generaron callos en un 87.0%, los cuales resultaron amarillentos y poco friables, sin embargo se originaron yemas en un 9.0%, raíces a partir del callo en un 30.0%, las cuales tenían un buen desarrollo pero baja frecuencia y la formación de plántulas y plántulas + raíz en un 4.0%. Resultados similares fueron obtenidos - por Gunay y Rao (1978) y Fári y Czakó (1981), al sembrar hipocótilo y obteniendo la formación de brotes bajo la misma combinación hormonal usada en el presente trabajo. Se ha hecho hincapié en la necesidad de analizar el efecto que una determinada combinación y concentración hormonal presenta en un cierto explante, este hecho ha sido mencionado como altamente específico, incluso con respecto a la variedad (Rubluo y Kartha, 1985), por lo que nuestros resultados adquieren mayor significado en el sentido de presentar una mayor amplitud en un rango de acción ya que se obtuvieron resultados similares en variedades diferentes, a una proyección a futuro del trabajo, podría ser, ampliarlo a una gama mayor de especies y variedades de Capsicum para probar estas combinaciones y concentraciones, buscando optimizar la respuesta morfogénica para distintos explantes del géne-ro y probando diferentes condiciones ambientales, las cuales

han sido también un factor importante en la inducción de morfogénesis (Rubluo et al., 1984).

En el hipocótilo de C. annuum bajo la acción de K/AIA (Tabla 3), se indujo mejor la morfogénesis que con BA/AIA, aunque esta última combinación promovió la formación de plántulas y raíz y la primera no, la combinación K/AIA supera a BA/AIA, ya que la producción de callo fué de 89.0%, la inducción de yemas y raíces a partir del callo en un 68.0% y 79.0% respectivamente. Los mejores resultados que se obtuvieron fueron al estar presente el AIA, que es una auxina natural, la concentración endógena de esta auxina en el hipocótilo disminuye del ápice a la base (Vrga y Szendrő, 1979), ésta se complementa con la concentración exógena en el medio, y de la cual el tejido toma, logrando ciertos niveles internos; siendo entonces la parte superior del hipocótilo la que tiene mayor potencial morfogenético (Fári y Czakó, 1981), por lo que los explantes del hipocótilo que se sembraron fueron de la parte superior. Generalmente se requiere una citocinina en el medio de cultivo de cada especie capaz de organogénesis somática directa, estas, en la mayoría de los casos, se usan en combinación con una auxina. Se han usado frecuentemente combinaciones

de K + AIA, BA + AIA y K + ANA (Evans, et al., 1981) aunque se emplearon en el presente trabajo estas combinaciones, no se logró la organogénesis somática directa, siempre hubo una fase previa de callo.

Aún cuando en un porcentaje muy bajo (4.0%), la potencialidad morfogénica para producir plantas a partir del hipocótilo de C. annuum quedó de manifiesto (Tabla 3) por esta razón se decidió explorar el comportamiento de los callos en cultivo de modo que estas evaluaciones sirvan de base para posteriores trabajos intenten la inducción de embriogénesis somática en esta importante especie.

En la Tabla 3 podemos observar que el hipocótilo en presencia de BA/2,4-D, se induce abundante callo. No se observó respuesta morfogénica debido a la presencia misma de la auxina 2,4-D, que como ya se señaló se emplea para la inducción de la división celular y por lo tanto la formación de callo (Evans, et al., 1981). La producción de callo fue más efectiva con la combinación K/2,4-D teniendo un porcentaje de 80.0% pues con BA/2,4-D fue de 64.0%. Este resultado coincide con los de una gran cantidad de autores que han informado de los efectos del 2,4-D sobre la división celular que propicia la formación de un callo abundante. Este

tipo de respuesta sirve como base para realizar trabajos en la obtención, por ejemplo, de cultivos de células en suspensión, embriogénesis somática (Evans et al., 1981), lo cual es de gran interés para fines prácticos en esta rama.

Observando las tres Tablas, vemos que la mejor producción de callo se obtuvo con K/AIA (Tabla 2) y la combinación menos efectiva fué BA/AIA . La mejor formación de yemas se logró con BA/AIA y la menos efectiva es la combinación K/2,4-D. El desarrollo de plántulas fué mejor con la combinación K/AIA, y donde hubo menor desarrollo de plántulas fué con BA/AIA. La inducción de raíces fué mejor con K/AIA y donde hubo un porcentaje menor fué con BA/ANA. Como se puede observar, algunas combinaciones resultan coherentes en la obtención de respuestas morfogénéticas y otras no, así como para la inducción del callo, pero hay que tomar en cuenta que estamos relacionando dos especies diferentes y dos estructuras distintas, y que cada una de estas tiene necesidades fisiológicas diferentes, tal es el caso de la combinación BA/AIA que produjo mayor porcentaje de plántulas + raíz con meristemos de C. chinense, sin embargo, la misma combinación con hipocótilo de C. annuum fué la de menor porcentaje, en la inducción de plántulas + raíz.

En las Tablas de C. annuum (Tablas 2 y 3) podemos ver que el hipocótilo y meristemo en presenciadel ANA en combinación con las citocininas BA y K, tuvieron una conducta similar en cuanto que estos reguladores del crecimiento no fueron efectivos para la formación de brotes ni de plántulas, pero sí indujeron la producción de raíces, las cuales fueron muy grandes y abundantes. Esto implica que las concentraciones para esta auxina y citocininas no fueron las adecuadas para disparar el proceso morfogénético completo, por lo que será necesario analizar una gama más amplia de combinaciones para estos reguladores del crecimiento, en particular, ya que se ha reportado (Evans et al., 1981), que estas combinaciones tienen en muchas otras especies una adecuada respuesta morfogénética.

TABLA 1

Respuesta Morfogenética in vitro de Meristemas de Capsicum chinense L. cv. habanero, cultivado en medio MS suplementado con diferentes combinaciones de citocininas y auxinas e incubado a 16h luz (1000 lux), 27°C.

Combinaciones y concentraciones(mg/l) de: citocininas (2.0mg/l)      auxinas (1.0mg/l)		Número de explantes y porcentajes(%) formados:				
		Callo	% de Callo con:			
			Yemas	Plántulas	Raíz	Plántula + Raíz
EA	ANA	12/24 (50.0)	11/24 (46.0)	0/24 ( 0 )	4/24 (17.0)	0/24 ( 0 )
BA	AIA	19/25 (76.0)	19/25 (76.0)	10/25 (40.0)	0/25 ( 0 )	2/25 ( 8.0 )
BA	2,4-D	10/30 (33.0)	0/30 ( 0 )	0/30 ( 0 )	0/30 ( 0 )	0/30 ( 0 )
K	ANA	19/22 (86.0)	0/22 ( 0 )	0/22 ( 0 )	17/22 (77.0)	0/22 ( 0 )
K	AIA	23/24 (96.0)	5/24 (21.0)	0/24 ( 0 )	0/24 ( 0 )	0/24 ( 0 )
K	2,4-D	8/22 (36.0)	1/22 ( 5.0)	0/22 ( 0 )	0/22 ( 0 )	0/22 ( 0 )

TABLA 2

Respuesta Morfogenética in vitro de Meristemas de Capsicum annuum L. cv. serrano, cultivado en medio MS suplementado con diferentes combinaciones de citocininas y auxinas e incubado a 16h luz (1000 lux), 27°C.

Combinaciones y concentraciones(mg/l) de: citocininas (2.0mg/l)    auxinas (1.0mg/l)		Número de explantes y porcentajes(%) formados:				
		Callo	% de Callo con:			
			Yemas	Plántulas	Raíz	Plántula + Raíz
BA	ANA	22/25 (88.0)	0/25 ( 0 )	0/25 ( 0 )	17/25 (68.0)	0/25 ( 0 )
BA	AIA	6/31 (19.0)	3/31 (10.0)	0/31 ( 0 )	0/31 ( 0 )	0/31 ( 0 )
BA	2,4-D	16/30 (53.0)	0/30 ( 0 )	0/30 ( 0 )	0/30 ( 0 )	0/30 ( 0 )
K	ANA	16/21 (76.0)	0/21 ( 0 )	0/21 ( 0 )	12/21 (57.0)	0/21 ( 0 )
K	AIA	28/29 (97.0)	12/29 (41.0)	13/29 (45.0)	0/29 ( 0 )	0/29 ( 0 )
K	2,4-D	10/20 (50.0)	0/20 ( 0 )	0/20 ( 0 )	0/20 ( 0 )	0/20 ( 0 )

TABLA 3

Respuesta Morfogenética in vitro del Hipocótilo de Capsicum annuum L. cv. serrano, cultivado en medio MS suplementado con diferentes combinaciones de citocininas y auxinas e incubado a 16h luz (1000 lux), 27°C.

Combinaciones y concentraciones (mg/l) de: citocininas (2.0mg/l)      auxinas (1.0mg/l)		Número de explantes y porcentajes (%) formados:				
		Callo	% de Callo con:			
	Yemas		Plántulas	Raíz	Plántula + Raíz	
BA	ANA	22/25 (88.0)	0/25 ( 0 )	0/25 ( 0 )	17/25 (68.0)	0/25 ( 0 )
BA	AIA	20/23 (87.0)	2/23 (9.0)	1/23 (4.0)	7/23 (30.0)	1/23 (4.0)
BA	2,4-D	21/33 (64.0)	0/33 ( 0 )	0/33 ( 0 )	0/33 ( 0 )	0/33 ( 0 )
K	ANA	22/24 (92.0)	0/24 ( 0 )	0/24 ( 0 )	12/24 (50.0)	0/24 ( 0 )
K	AIA	25/28 (89.0)	19/28 (68.0)	0/28 ( 0 )	22/28 (79.0)	0/28 ( 0 )
K	2,4-D	16/20 (80.0)	0/20 ( 0 )	0/20 ( 0 )	0/20 ( 0 )	0/20 ( 0 )

### Cultivo de Callo

El callo es una proliferación de células del parénquima altamente desorganizadas. Con el tiempo los callos pueden mostrar centros meristemáticos o grupos individuales de traqueidas y células pigmentadas. El callo se inicia y se mantiene sobre un medio nutritivo in vitro, esto con el objeto de estudiar el crecimiento vegetal y desarrollo, así como explotar productos naturales y propagación. La formación de callo se inicia de un fragmento de tejido vegetal aislado y sembrado sobre un medio nutritivo (Constabel, 1984).

El uso del cultivo de callo es la técnica más ampliamente usada para la creación de variación genética via cultivo de tejidos (Reisch, 1983).

Entre 800 somaclones (variación generada en las células cultivadas por CTV), derivados del callo de arroz (Oryza sativa L.) solo 28.1% fué considerado el patron inherente normal para todas las características observadas (Oono, 1978, 1981, citado por Reisch, 1983). Los rasgos alterados fueron analizados a través de dos generaciones, y se encontraron cambios en las plantas, estaban alteradas en su contenido de clorofila, fecha de floración, al-

tura de la planta, fertilidad y morfología. Estas variaciones fueron producidas por las mutaciones ocurridas en las células en cultivo.

La variación somaclonal puede ser explotada por los cambios genéticos que preexisten en toda la planta o cambios que ocurren en las células cultivadas (Barbier y Dulie, 1980 citado por Reisch, 1983). Esta variación puede ser considerada una extensión útil del proceso de inducción de mutaciones, el cual abarca extensamente cualquier proceso por el cual la variabilidad es inducida (Reisch, 1983).

El mantenimiento del tejido vegetal, especialmente callo, por largos periodos in vitro resulta en una gran variabilidad e incremento en el número cromosómico entre los constituyentes celulares (Kao et al., 1966; Murashige et al., 1968; Sacristán, 1971 citados por Murashige, 1974).

El mejoramiento vegetal tradicional se basa en la selección entre variables genéticas individuales. La variación genética expresada entre plantas regeneradas por selección de cultivo celular, es un procedimiento apropiado para usarse hacia el mejoramiento vegetal, tal es el caso de Sorghum bicolor (Sorgo), del cual se obtuvo cultivo de callo de semillas germinadas asépticamente sobre medio MS

con cuatro diferentes concentraciones de aluminio (0, 100, 200 y 400  $\mu$ M), resultandó plantas resistentes al aluminio (Smith et al., 1983), Georges y Rao (1983), reportan que al cultivar callo de cotiledón de Brassica juncea (mostaza), que naturalmente produce semillas oscuras se obtuvieron plantas que formaron semillas amarillas con más aceite. Al cultivar callo de coleóptilo de Triticum aestivum (trigo), se generaron plantas con mayor rendimiento en producción (Charmaine y Mc Hughen, 1984).

Del cultivo de callo se pueden obtener también al pasar éste a medio líquido, cultivos en suspensión para inducir regeneración vegetal mediante organogénesis o bien - por embriogénesis somática.

Lineas celulares variantes son generalmente aisladas de protoplastos o más comunmente de cultivos en suspensión. En algunos casos, por ejemplo, Zea mays la regeneración vegetal ha sido posible por cultivos en suspensión pero no de protoplastos (Flick, 1983).

La resistencia a un herbicida o fitotoxina puede ser seleccionada usando técnicas in vitro. Una simple selección positiva ha producido lineas de maíz resistentes a Helminthosporium maydis (Gengenbach y Green, 1975 citado por Flick, 1983),

y líneas de Nicotiana tabacum resistentes al herbicida picloram (Chaleff y Paisons, 1978a citado por Flick, 1983).

Cultivos en suspensión de Nicotiana sylvestris Speg y Comes y Capsicum annuum L., ambos expuestos y no expuestos al mutágeno etil metano sulfonato (EMS), han sido sometidas por 21 días a  $-3^{\circ}\text{C}$  y  $5^{\circ}\text{C}$ , respectivamente (Dix y Street, 1976 citado por Tal, 1983). Las líneas celulares derivadas de las células sobrevivientes fueron probadas para su resistencia a tratamientos en frío. Algunas de las líneas no mostraron incremento de sobrevivencia cuando se les sujetó de nuevo al stress, mientras que otras retenían su resistencia después de un largo período de crecimiento a  $24^{\circ}\text{C}$ . El tratamiento con el mutágeno promovió el aislamiento de líneas celulares resistentes y estables (Tal, 1983). Una vez lograda una línea celular con los caracteres desados se intenta la regeneración de plantas vía organogénesis o bien vía embriogénesis para probar si el nuevo carácter se mantiene.

En el procedimiento de embriogénesis somática las auxinas y el Nitrógeno juegan un papel muy importante. Este procedimiento se lleva a cabo por dos pasos:

- 1) la inducción de masa embriogénicas o proembrionarias en

la presencia de altas concentraciones de auxina y 2) el desarrollo de esas masas en embriones en la ausencia o en presencia de bajas concentraciones de auxina (Nadar et al., 1978; Fujimura y Komamine, 1979 citados por Thorpe, 1982).

El cultivo de callo en el presente trabajo se inició a partir del hipocótilo de Capsicum annuum L. cv. Serrano y se mantuvo en medio MS en presencia de BA y K (2.0 mg/l) en combinación cada una de éstas con 2,4-D (1.0 mg/l), en ambas combinaciones se obtuvo la mejor calidad y friabilidad del callo entre todas las combinaciones.

Los resultados de los experimentos llevados a cabo por Cultivo de Tejidos, se expresan en descripciones tanto culitativas como cuantitativas. El crecimiento de un cultivo en un periodo determinado, ya sea callo o cultivo en suspensión se caracteriza por un incremento en el volumen o masa y en el número celular (Street, 1977).

Las tasas de crecimiento en callos frecuentemente se expresan en base al incremento en peso fresco. El peso es un parámetro de crecimiento ya que permite seguir el incremento de la masa del tejido (Street, 1977).

La medida del peso seco de un callo da una estimación de la actividad biosintética de un cultivo. El secado pro-

longados de la muestra causa cambios oxidativos en el peso celular seco y pérdida de agua (Dodds y Roberts, 1982).

Como se mencionó en los objetivos se pretendió obtener una curva de crecimiento a partir del peso fresco y peso seco del callo de C. annuum cv. Serrano.

La Tabla 4 nos muestra los promedios de los valores del peso fresco y seco obtenidos de las combinaciones BA/2,4-D y K/2,4-D.

TABLA 4

En las Gráficas 1 y 2 están representadas las medias de la Tabla 4, siendo la Gráfica 1 para el peso fresco, obtenido con ambas combinaciones hormonales y la Gráfica 2 para el peso seco.

En estas gráficas podemos observar que los incrementos en peso para ambas combinaciones son paralelos, siendo mayor con la combinación K/2,4-D. Es importante hacer notar que al pasar de la semana 7 a 8 se registra un aumento muy notable en el crecimiento del callo que se encuentra en K/2,4-D. En contraste, el crecimiento del callo en la combinación BA/2,4-D no presenta este aumento. Debido a que el comportamiento general de los pesos fresco y seco es semejante, se decidió hacer el Análisis de Varianza, con los datos de los

TABLA 4

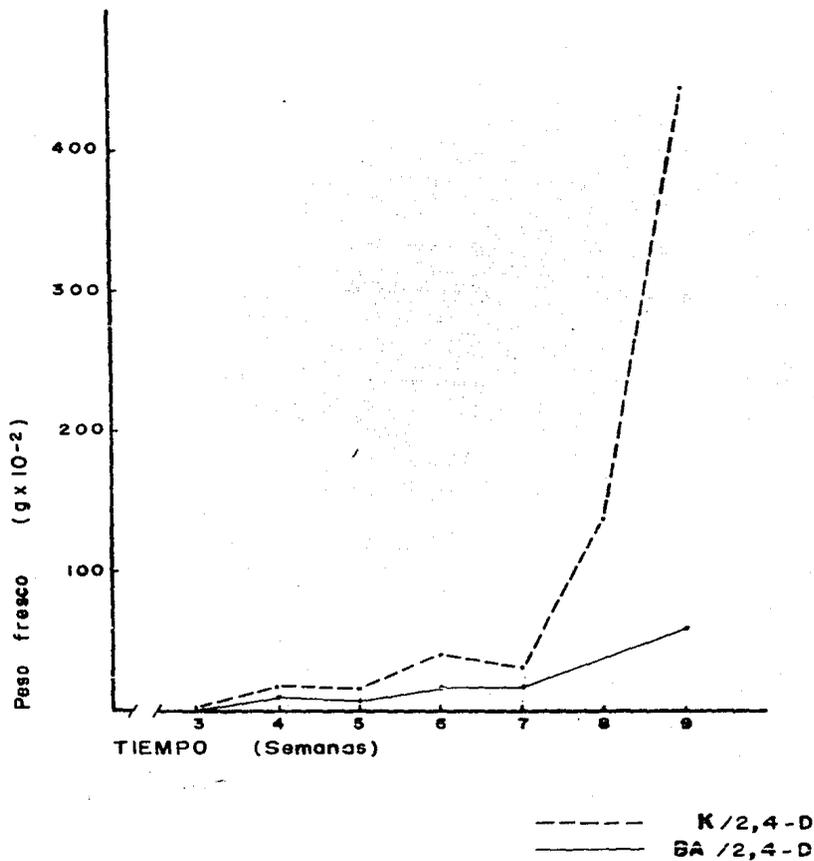
Promedio(a) de los pesos fresco y seco de callo del hipocótilo de C. annuum L. av. Serrano desarrollado en medio MS en presencia de BA/2,4-D y K/2,4-D.

Tiempo (semanas)	$\bar{X}$ Peso Fresco (g) (b)	$\bar{X}$ Peso Fresco (g) (c)	$\bar{X}$ Peso Seco (g) (b)	$\bar{X}$ Peso Seco (g) (c)
3	0.009022	0.033208	0.000464	0.002766
4	0.105284	0.18232	0.00843	0.013256
5	0.066022	0.165666	0.000483	0.011182
6	0.163502	0.414488	0.011002	0.023596
7	0.165214	0.321584	0.011898	0.020212
8	0.411688	1.377388	0.030916	0.077984
9	0.589848	4.483656	0.039132	0.169118

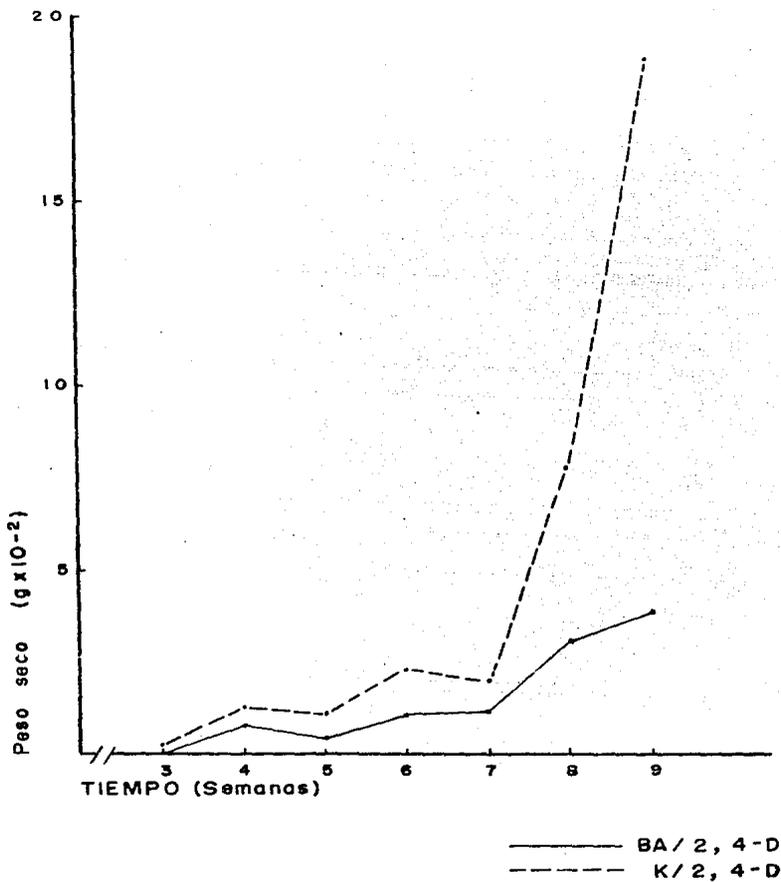
(a) el valor promedio fué obtenido de cinco explantes (repeticiones por semana)

(b) BA(2.0 mg/l) + 2,4-D(1.0 mg/l)

(c) K(2.0 mg/l) + 2,4-D(1.0 mg/l)



GRAFICA 1: Peso fresco de callo del hipocótilo de Capsicum annuum L. cv serrano en medio MS con fotoperíodo 16 h luz, 1000 lux de intensidad y 27° ± 1° C



GRAFICA 2 : Peso seco del hipocótilo de *Capsicum annuum* L. cv. serrano en medio Ms con fotoperíodo 16 h luz 1000 lux de intensidad y  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}C$

pesos frescos obtenidos con ambas combinaciones hormonales y detectar si existen diferencias significativas entre estas dos combinaciones.

Se obtuvieron los intervalos de confianza para observar el rango de crecimiento de callo por cada combinación y para cada semana, con el objeto de estimar el crecimiento de callo en cada combinación (Tabla 5).

TABLA 5

En la Tabla 5 podemos observar que al término de la semana 3 el 95% de los hipocótilos sembrados en la combinación BA/2,4-D van a presentar un incremento entre 0.006941 y 0.011103g. Al cabo del mismo tiempo el 95% de los hipocótilos sembrados en la combinación K/2,4-D tienen un incremento entre 0.02545 y 0.040966g. Si observamos los intervalos de crecimiento de las semanas 8 y 9 en cada combinación, vemos que el crecimiento del callo es siempre superior en la combinación K/2,4-D que con BA/2,4-D.

Se realizó el análisis de Varianza, con el objeto de probar las hipótesis de si hay efecto de interacción o no entre los factores, siendo estos el Tiempo en semanas, (Factor A) y Tratamientos con reguladores del crecimiento, (Factor B), como se muestra en la Tabla 6.

TABLA 5

Intervalos de Confianza(\*) para observar el crecimiento de los cultivos de callo de *C. annuum* L. cv. Serrano con fotoperiodo 16h luz, 1000 lux,  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y los reguladores del crecimiento BA/2,4-D y K/2,4-D en medio MS sólido.

Semana	BA(2.0 mg/l) + 2,4-D(1.0 mg/l)	K(2.0 mg/l) + 2,4-D(1.0 mg/l)
3	(0.006941, 0.011103g)	(0.02545, 0.040966g)
4	(0.009621, 0.200967g)	(0.0953036, 0.2693364g)
5	(-0.0136736, 0.1457176g)	(-0.0145234, 0.3458554g)
6	(0.0976548, 0.2293492g)	(0.0789355, 0.7500405g)
7	(0.0505469, 0.2798811g)	(-0.0086594, 0.6518274g)
8	(0.204289, 0.619087g)	(0.0367224, 1.9180536g)
9	(0.4943527, 0.6853433g)	(2.6802172, 6.2870948g)

(\*) calculados con 95% de confiabilidad y para el peso fresco

TABLA 6

Valores de los pesos fresco(g) de los cultivos de callo a partir del hipocótilo de Capsicum annuum L. cv. Ferrano en medio MS adicionado de BA/2,4-D y K/2,4-D a diferentes semanas.

Factor A (semanas)	Factor B (Reguladores del Crecimiento)		Totales	Medias
	BA/2,4-D	K/2,4-D		
3	*		0.21225	0.021225
	a. 0.00795	a. 0.02987		
	b. 0.00864	b. 0.02955		
	c. 0.01054	c. 0.02673		
	d. 0.01177	d. 0.03261		
e. 0.00621	e. 0.04728			
4	a. 0.03207	a. 0.11617	1.43807	0.143807
	b. 0.03110	b. 0.22512		
	c. 0.04532	c. 0.07563		
	d. 0.25543	d. 0.18702		
	e. 0.1625	e. 0.30766		
5	a. 0.00146	a. 0.058	1.15844	0.115844
	b. 0.03827	b. 0.49502		
	c. 0.21260	c. 0.07632		
	d. 0.03361	d. 0.15464		
	e. 0.04417	e. 0.04435		
6	a. 0.18229	a. 0.87595	2.88995	0.288995
	b. 0.07231	b. 0.0139		
	c. 0.11673	c. 0.47776		
	d. 0.19939	d. 0.58735		
	e. 0.24679	e. 0.11748		
7	a. 0.06832	a. 0.02718	2.43399	0.243399
	b. 0.08103	b. 0.21224		
	c. 0.0839	c. 0.90812		
	d. 0.30969	d. 0.33168		
	e. 0.28313	e. 0.1287		
8	a. 0.15847	a. 1.96133	8.94538	0.894538
	b. 0.41553	b. 1.66152		
	c. 0.4484	c. 0.44937		
	d. 0.74297	d. 1.37802		
	e. 0.29307	e. 1.4367		
9	a. 0.63888	a. 1.84248	25.36752	2.536752
	b. 0.5373	b. 6.08765		
	c. 0.62603	c. 6.27627		
	d. 0.70221	d. 4.90152		
	e. 0.44482	e. 3.31036		
Totales	7.55295	34.89155		

Medias 0.21579857 0.99690143

(Continuación de la Tabla .6)

\* a,b...e repeticiones de los tratamientos (reguladores del crecimiento).

## Hipótesis:

Factor A	$H_0: B_1 = B_2 \dots B_7$
	$H_A: \text{alguna es diferente}$
Factor B	$H_0: \alpha_1 = \alpha_2$
	$H_A: \alpha_1 \neq \alpha_2$
interacción	$H_0: \text{no hay efecto de interacción}$
	$H_A: \text{hay efecto de interacción}$

Los resultados de los cálculos para el modelo de efectos fijos para un experimento completamente aleatorizado de dos factores, se presenta en la Tabla 7 (Ver apéndice II para cálculos aritméticos).

TABLA 7

Tabla de Análisis de Varianza para un experimento completamente aleatorizado de dos factores.

Fuente	Suma de Cuadrados (S.C.)	Grados de Libertad (G.L.)	Cuadrados Medios (C.M.)	Razón de Variancias o F Calculada ( $F_c$ )
A	48.38994	6	8.06499	26.874619
B	10.677129	1	10.677129	35.578938
AB	29.787581	6	4.9645968	16.543313
Tratamientos	88.885465	13		
Residual	16.805425	56	0.3000969	
Total	105.69089	69		

Los valores de cada  $F_c$  se comparan con los valores de  $F$  obtenidos de las Tablas de percentiles de la distribución para: el primer caso el valor de  $F$  de Tablas es  $F(6,56) = 2,25$ ;  $F(1,56) = 4.0$  para el segundo dato y para el tercero  $F(6,56) = 2,25$ .

Dado que el valor de  $F$  de Tablas ( $F_t$ ) es menor que el valor de  $F_c$ , se rechaza la hipótesis nula y se dice que el valor de  $F$  calculada ( $F_c$ ) es significativo. Una vez realizado el Análisis de Varianza, se concluye que hay efecto de interacción entre el tiempo y los reguladores del crecimiento (Factor A y Factor B respectivamente), entonces se obtiene la  $F_c$  con el objeto de observar si el crecimiento de callos en alguna de las combinaciones en cada semana es diferente. Esto se hace porque en el Análisis de Varianza resultó significativa la interacción entre los factores.

Tabla 8

Valores de  $F_c$  con respecto al tiempo (semanas)

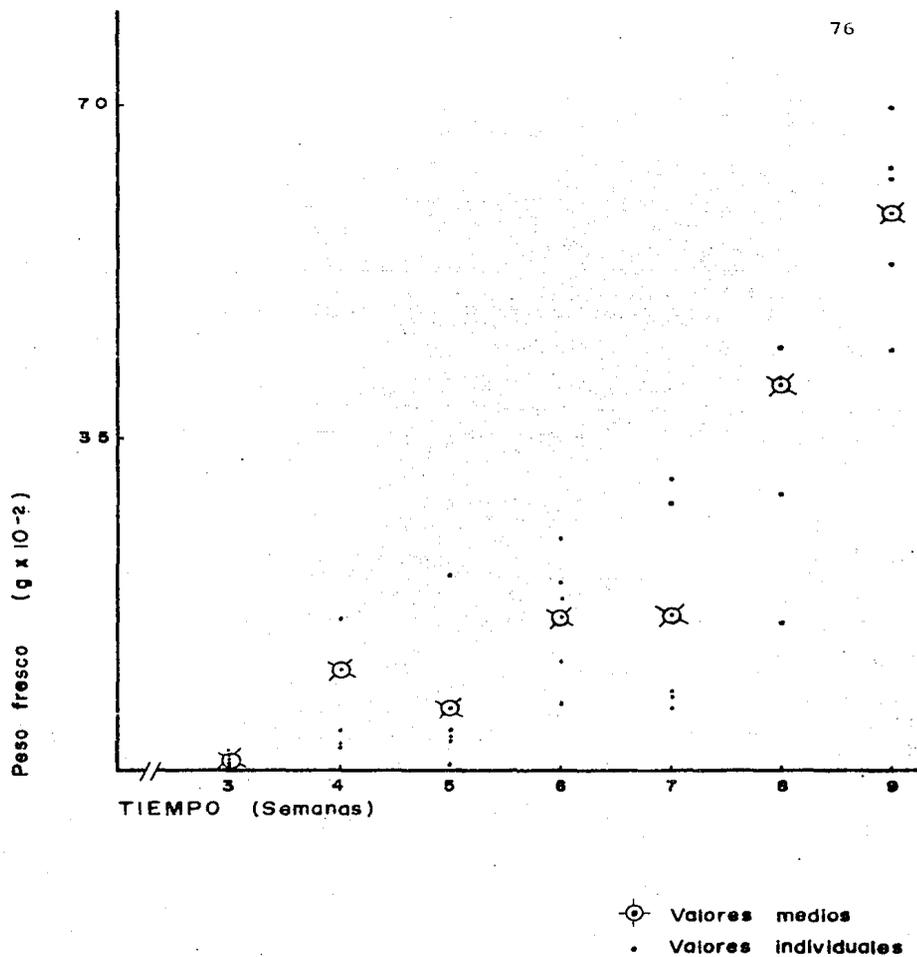
Semana	$F_c$
3	0.0487549
4	0.4944171
5	0.8274106
6	5.2494977
7	2.0376314
8	77.714708
9	1263.4783

Se obtiene el valor de F de las Tablas con 95% de confiabilidad y con valores para el numerador y denominador - de 1 y 13 respectivamente  $F_{(1,13)}^{.95} = 4.67$  y se comparó con los valores de  $F_c$ . Observamos que el valor de la semana 6 resultó significativo, y los de la semana 8 y 9 fué altamente significativo, es decir, hay diferencias muy marcadas en los pesos frescos obtenidos entre las combinaciones BA+2,4-D y K+2,4-D. Las diferencias resultan más significativas en las semanas 8 y 9, y esto lo vemos reflejado en la gráfica 1 donde se observa que el crecimiento se incrementa notablemente en la combinación K/2,4-D para estas semanas.

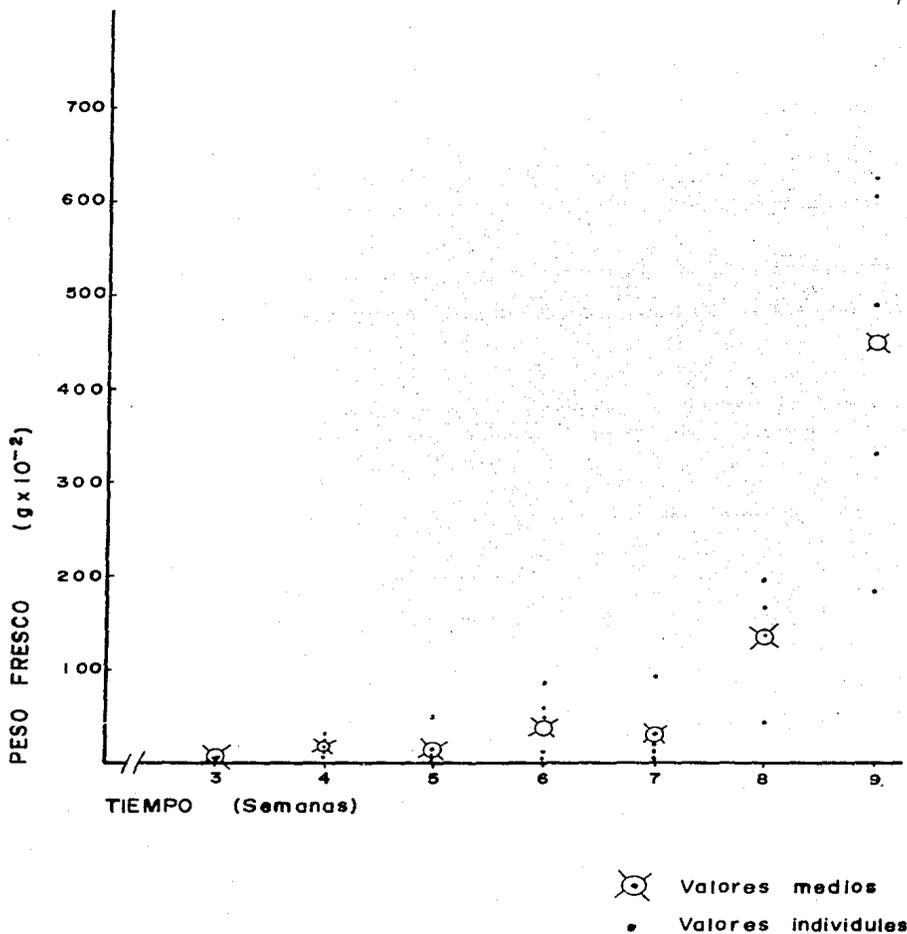
En las gráficas 3,4,5 y 6, se presentan cada uno de los valores del peso fresco que se encuentran tabulados en la Tabla 6 y de los cuales se sacó el valor de las medias por semana para poder construir las gráficas 1 y 2. En las gráficas 3 y 4 se encuentran dispuestos los datos por número de repeticiones en cada semana, y en las gráficas 5 y 6 están graficados por día para ver más claramente la tendencia que tienen estos. En estas gráficas (3,4,5 y 6) podemos observar una clara tendencia a formarse una curva de crecimiento, esta tendencia se ve más clara en las gráficas

4 y 6 cuyo comportamiento es más uniforme y que corresponde a la combinación hormonal K/2,4-D. Estas gráficas tienen semejanza con los reportes hechos por Steward & Caplin (1954) en donde cultivaban explantes del floema de zanahoria bajo condiciones estandar en un medio basal con agua de coco y construyen una curva de crecimiento (peso fresco) contra el tiempo (días), esta curva tiene una definida fase exponencial sin formarse la fase estacionaria. Una curva de este tipo es obtenida también por Yeoman, Dyer & Robertson (1965), Yeoman (1970), Robertson (1966), cultivando explantes de tubérculo de alcachofa, el tejido fué disectado en la luz y cultivado en medio líquido con 2,4-D y agua de coco a 25°C (Street, 1977).

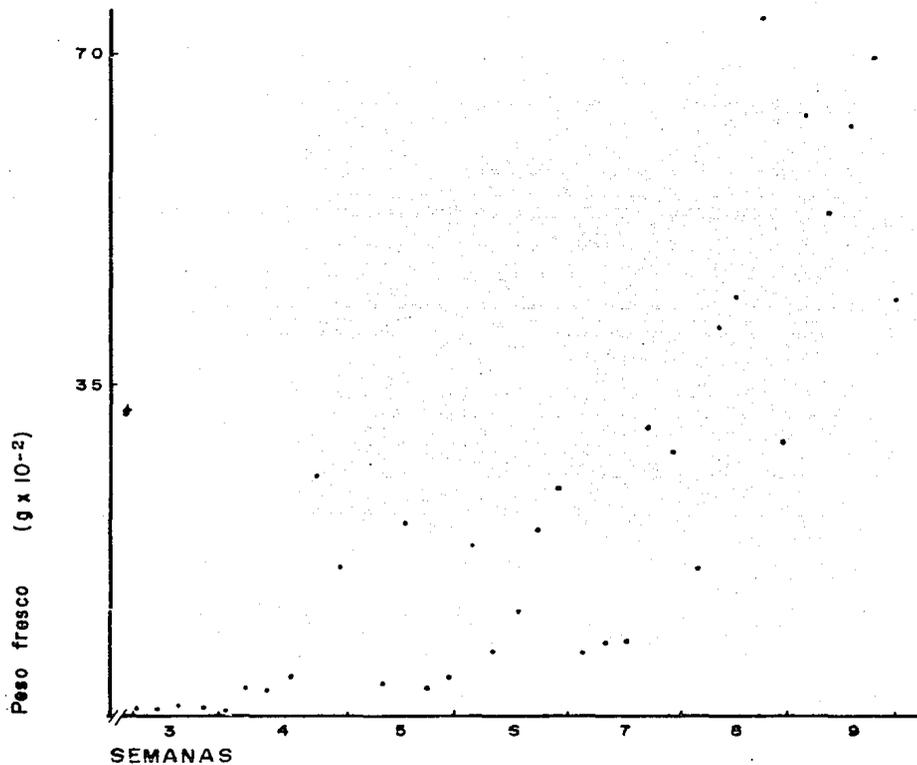
Filner (1965) cultivó células de Nicotiana tabacum var Xanthii (línea XD) en un medio mínimo con una sola fuente de nitrógeno, no se forma una fase lag, pero el peso seco por unidad de volumen se incrementa exponencialmente a los diez días, (Street, 1977). Street (1977) al cultivar células de Rosa sp. Paul's Scarlet en un medio químicamente definido, obtuvo una curva exponencial cuya fase de crecimiento es corta y declina gradualmente antes de alcanzar la fase estacionaria. En general, las gráficas



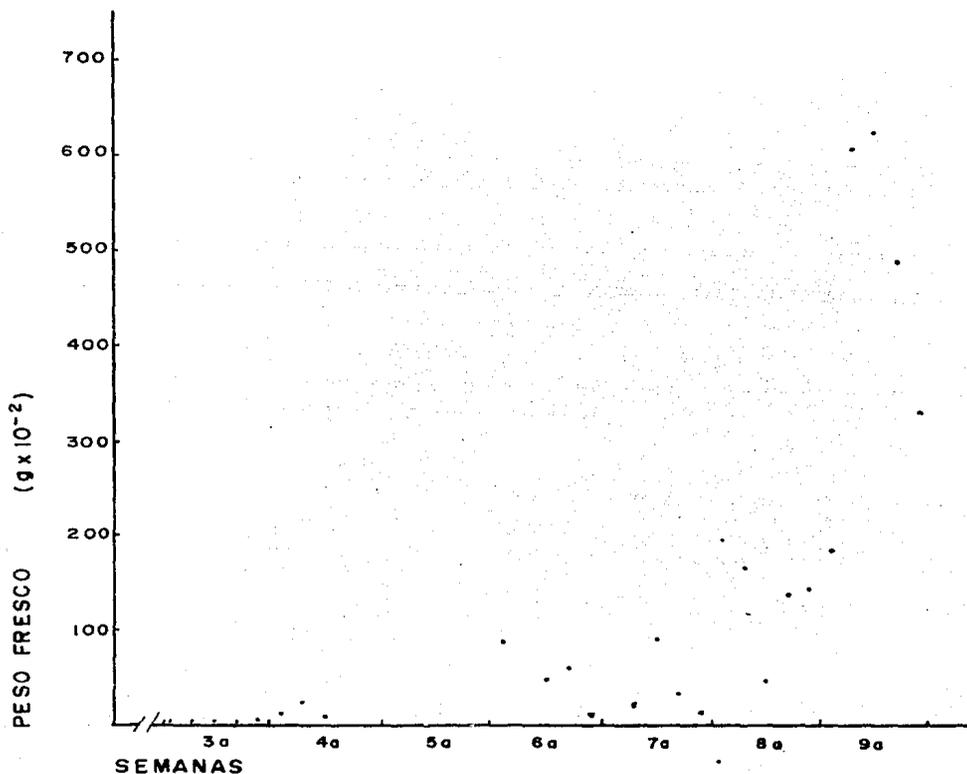
GRAFICA 3: Peso fresco de callo del hipocótilo de Capsicum annum L. cv serrano en medio MS suplementado con BA (2.0 mg/l) + 2,4-D (1.0 mg/l) e incubado a 16 h luz (1000 lux), 27° ± 1° C



GRAFICA 4 : Peso fresco de callo del hipocótilo de Capsicum annuum L. CV. Serrano en medio MS suplementado con K (2.0 mg/l) + 2,4 - D (1.0 mg/l) e incubado a 16h luz (1000 lux), 27° ± 1°C



GRAFICA 5 : Peso fresco de callo del hipocófito de Capsicum annum L. cv serrano en medio MS suplementado con BA (2.0 mg/l) + 2,4-D (1.0 mg/l) e incubado a 16 h luz (1000 lux), 27° ± 1° C



GRAFICA 6: Peso fresco de callo del hipocótilo de Capsicum annuum L. CV. Serrano en medio MS suplementado con K(2.0 mg/l) + 2,4-D(1.0 mg/l) e incubado a 16h luz (1000 lux), 27°±1°C

3,4,5 y 6 tienen un comportamiento similar a lo obtenido por otros autores, ya que en ellas vemos una tendencia a formarse la curva de crecimiento.

Como se pudo observar, los análisis estadísticos apoyan que la combinación K/2,4-D fué la más adecuada para generar abundante callo. Esto nos sirve como base para empezar trabajos de variación somaclonal, cultivos en suspensión o bien trabajos de embriogénesis somática, en los cuales, al obtener una gran producción de callo, este se transfiere a un medio fresco y con ciertos requerimientos que induzcan la formación de embriones, para que estos formen plántulas. La masa del callo es capaz de formar embriones u organizar meristemas, ya que cada célula retiene toda la información genética requerida para desarrollar una planta completa, ya que estas son totipotentes (Butcher e Ingram, 1979).

En las combinaciones, la auxina 2,4-D es común para las citocininas K y BA. En la formación de la curva de crecimiento, se ve que la BA no fué efectiva para desencadenar una producción masiva de callo y por lo tanto ni de la división celular, cuando se combinó con K se desencadena una buena inducción de callo y la división celular fué más rápida, dando como resultado que la masa celular del callo

fuera más abundante que con BA. Esto se ve claramente com probado en los resultados estadísticos, ya que en todos ellos resulta ser la K en combinación con el 2,4-D, las que mejor inducen la formación de callo.

Nuestros resultados muestran (Tablas 2 y 3) que de las dos citocininas probadas (BA y K) la kinetina tuvo una mejor respuesta morfogénica en términos de regeneración, así como en potencialidad (formación de yemas) por lo que al inducirse también una mayor cantidad de callo con esta citocinina es probable que pudiera dispararse el proceso de embriogénesis subsecuentemente.

## 6.0 CONCLUSIONES

1. Se comprobó que al utilizar concentraciones altas de auxinas y bajas de citocininas, se induce la proliferación de callo. Alternativamente, una baja concentración de auxinas, con una alta concentración de citocininas, promueve la formación de yemas y/o plántulas. Por esto, podemos decir que las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales, pueden ser aplicables a cultivares de importancia económica y alimenticia en México, teniendo la seguridad de la recuperación de plántulas, aún cuando en cada caso es necesario afirmar las técnicas para obtener altos rendimientos de plántulas.

2. En las publicaciones dadas a conocer por Gunay y Rao (1978); Fári y Czakó (1981), se obtuvieron mejores respuestas morfogénicas usando el hipocótilo con la combinación BA/AIA; por otra parte, en el presente trabajo se utilizó como explantes el hipocótilo y meristemo bajo diferentes combinaciones hormonales, en donde encontramos que: para el meristemo, la mejor respuesta morfogénica fué bajo la acción de K/AIA e igual respuesta tuvo el hipocótilo. La mejor producción de callo a partir de meristemas se obtuvo con K/AIA y para el hipocótilo fué la com-

binación K/ANA.

3. En general, el mejor explante para fines de propagación fué el meristemo.

4. Al considerarse la auxina 2,4-D en las combinaciones probadas y de acuerdo a la gráfica 1, la mayor y mejor producción de callo se logra con la combinación K/2,4-D.

5. Empleando las técnicas in vitro y de acuerdo a los resultados presentados, se obtiene la inducción de abundante callo, lo cual es un paso preliminar necesario para posteriormente realizar líneas de investigación tendientes a establecer la embriogénesis somática.

6. Las variaciones que presentan los resultados en relación a las respuestas y comportamiento del callo, podemos atribuirlos a la amplia variabilidad genética que presentan los cultivares mejorados como el cv. Serrano.

7. Se logró la obtención de las curvas de crecimiento a partir del callo del hipocótilo de Capsicum annum L. cv. Serrano.

## BIBLIOGRAFIA

- Bajaj, Y.P.S. y M.S. Dhanju. 1979. Regeneration of Plants from Apical Meristem Tips of some Legumes. *Curr. Sci.* 48: 906-907.
- Bajaj, Y.P.S. 1983. In Vitro Production of Haploids. 228-287. En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding*, Mac Millan Publishing Co., New York.
- Bottino, P.J. 1981. Vegetable Crops. 142-154. En: B.V. Conger (Ed.). *Cloning Agricultural Plants Via In Vitro Techniques*. CRC Press, Inc. BocaRaton, Florida.
- Butcher, D.N. y D.S. Ingram. 1979. *Plant Tissue Culture*. Arnold Publ., London.
- Caldas, I., O.J. Cromo y W.R. Sharp. 1975. *Handbook of Plant Tissue Culture. Part I. Application of Nuclear Energy for the Study of Cellular and Developmental Biology*. CENA, Piracicaba. Ed. W.R. Sharp y O.J. Cromo : 1, 13-25, 44, 78-79.
- Candolle, A. De. 1959. *Origin of Cultivated Plants*. Hafner Publishing Company, New York. 289-290.
- CIANOC Col. 1979. *Almácigos del Chile*. 514. CIANOC, México.
- Collin, H.A. y M. Watts. 1983. Flavor Production in Culture, 729-747. En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding*, Mac Millan Publishing C., New York.

- Constabel, F. 1984. Callus Culture: Induction and Maintenance, 27-35. En: I.K. Vasil (Ed.). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants Volume 1. Academic Press, New York.
- Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press. New York. 1261 pp.
- Chan, J.L. y Fetes, J.E. 1973. El Chile. Novedades Hostícolas. 18(4): 110-120.
- Charmaine, M.W. and A. McHughen. 1984. Variant Wheat Regenerants. Crop Development Centre, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada I.A.P.T.C.
- Daniel, W.W. 1979. Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Ed. Limusa, México, 193-241.
- Dodds, J.H. y L.W. Roberts. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp 1-2, 10-20, 21-35, 149-161.
- Evans, D.A., W.R. Sharp y C.F. Flick. 1981. Growth Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis. 45-113. En: T.A. Thorpe (Ed.). Plant Tissue Cultures Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York.
- Evans, D.A. y J.E. Bravo. 1983. Protoplast Isolation and Culture, 124-176. En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). Handbook of Plant Cell Culture Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding, Mac Millan Publishing Co., New York.

- Fári, M. y M. Czako. 1981. Relationship between position and Morphogenetic Response of Pepper hypocotyl explants Cultured In Vitro. *Scientia Horticulturae*, 15: 207-213.
- Flick, C.E. 1983. Isolation of Mutants from Cell Culture. 393-433. En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture, Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding*, Mac Millan Publishing Co., New York.
- Flick, C.E., D.A. Evans and W.R. Sharp. 1983. Organogenesis, 13-81. En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture, Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding*, Mac Millan Publishing Co., New York.
- Font Quer, P. 1980. *Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado*. Ed. Labor. Sexta edición. Barcelona, pp 582.
- Gamborg, O.L. y L.R. Wetter. 1975. *Plant Tissue Culture Methods*. National Research Council, Canada. pp 1-2.
- Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe e I.K. Vasil. 1976. *Plant Tissue Culture Media*. *In Vitro* 12: 473-478.
- Gamborg, O.L. y J.P. Shyluk. 1981. *Nutrition Media and Characteristics of Plant Cell and Tissue Cultures*. En: T.A. Thorpe (Ed.). *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, New York, pp 21-42.
- Gamborg, O.L. 1982. *Callus and Cell Culture*, 1-9. En: L.R. Wetter y F. Constabel. *Plant Tissue Culture Methods*. National Research Council, Canada.
- García Romero, A. 1959. *Horticultura*. 2<sup>a</sup> Ed. Salvat Editores. Barcelona, España.

- Gautheret, R.J. 1982. Plant Tissue Culture: The History.  
En: Plant Tissue Culture. Proc. 5th Intl Congr. Japanese.  
Assoc. of Plant Tissue Culture. Tokio. pp 7-12.
- George, L. y S.N. Narayanaswamy. 1973. Haploid Capsicum  
through experimental Androgenesis. Protoplasma 78: 467-470.
- Gunay, A.L. y P.S. Rao. 1978. In Vitro Plant Regeneration  
from hypocotyl and cotyledon explants of Red Pepper  
(Capsicum), Plant Sci. Lett. 11: 365-372.
- Jacobsen, H.J. 1983. Biochemical Mechanisms of Plant Hormone  
Activity, 672-695. En: D.A. Evans; W.R. Sharp, P.V.  
Ammirato and Y. Yamada (Eds.). Handbook of Plant Cell  
Culture, Volume 1, Techniques for Propagation and  
Breeding, Mac Millan Publishing, Co., New York.
- Kant y Hildebrandt, 1969; Ulrick y Mac Kinnay, 1970;  
Aftermann y Reinhard, 1971. 1975. Environmental Effects  
on Cultures, 78-83. En: W.R. Sharp y O.J. Cromo (Eds.).  
Handbook of Plant Tissue Culture Part I. Application  
of Nuclear Energy for Study of Cellular and Develop-  
mental Biology. CENA, Piracicaba.
- Kartha, K.K. 1981. Meristem Culture and Cryopreservation.  
Methods and Applications, 181-211. En: T.A. Thorpe.  
(Ed.). Plant Tissue Culture, Methods and Applications  
in Agriculture. Academic Press, New York.
- Krikorian, A.D. 1982. Cloning Higher Plants from Aseptically  
Cultured Tissues and Cells. Biol. Rev. 57: 151-218.
- Laborde, C. y O. Pozo. 1984. Presente y Pasado del Chile en  
México. SARH, INIA, México.

- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-494.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through Tissue Culture. *Ann Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- Nitzsche, W. 1983. Germplasm Preservation, 782-805. En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture, Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding*, Mac Millan Publishing Co., New York.
- Pinto, C.B. 1969. *El Cultivo de Chile*. Vol 14: 30-40. Ed. INIA.
- Reisch, B. 1983. Genetic Variability in Regenerated Plants, 756-760. En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture, Volume 1, Techniques for Propagation and Breeding*, Mac Millan Publishing, Co., New York.
- Rubluo, A., K.K. Kartha, L.A. Mroginiski y J. Dick. 1984. Plant Regeneration from Pea Leaflets Culture in vitro and Genetic Stability of Regenerants. *Z. Pflanzenphysiol.*
- Rubluo, A., y K.K. Kartha. 1985. In vitro Culture of Shoot Apical Meristems of various Phaseolus Species and Cultivars. *J. Plan Physiol* 119: 425-433.
- Smith, R.H., S. Bhaskaran and K. Schertz. 1983. Sorghum Plant Regeneration from Aluminium Selection Media. *Plant Cell Reports* 2: 129-132.
- Steward, F.C. 1983. Reflections on Aseptic Cultured, 1-10, En: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture, Volume 1. Techniques for Propagation and Breeding*. Mac Millan Publishing Co., New York.

- Street, H.E. 1977. Plant Cell Culture. En: H.E. Smith (Ed.).  
The Molecular Biology of Plant Cells. Blackwell  
Scientific Publ., Oxford. pp 393-417.
- Tal, M. 1983. Selection for Stress Tolerance, 461-488. En:  
D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada  
(Eds.). Handbook of Plant Cell Culture, Volume 1.  
Techniques for Propagation and Breeding, Mac Millan  
Publishing Co., New York.
- Thorpe, T.A. 1982. Callus Organization and de novo formation  
of Shoot, Roots, and Embryos in vitro, 115-138. En:  
D.T. Tomes, B.E. Ellis, P.M. Harney, K.J. Kasha,  
R.L. Peterson (Eds.). Application of Plant Cell and  
Tissue Culture to Agriculture & Industry. Plant Cell  
Culture Centre. University of Guelph. Guelph, Canada.
- Varga, M. y Z. Szendrő. 1979. Distribution and Transport of  
indoleacetic acid in green and etiolated bean shoots.  
Acta Agron. Acad. Sci. Hung., 28: 47-57.
- Wetter, L.R. y F. Constabel. 1982. Plant Tissue Culture  
Methods. Prairie Regional Lab. Sask., Canada. pp 136-137..
- Yamakawa, T., O. Kurahashi, K. Ishida, S. Kato, T. Kadama  
y Y. Minoda. 1979. Stability of Indole-3-Acetic Acid  
to Autoclaving Aeration and Light Illumination. Agric.  
Biol Chem 43(4): 879-880.

APENDICE I. MEDIO DE CULTIVO MS

SOLUCION CONCENTRADA 1:		10X
MACRONUTRIMENTOS	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ -----	1,650 mg/l -----16,500 mg/10 l.
20 litros X 400 ml	$\text{KNO}_3$ -----	1,900 mg/l -----19,000 mg/10 l.
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----	370 mg/l ----- 3,700 mg/10 l.
	$\text{KH}_2\text{PO}_2$ -----	170 mg/l ----- 1,700 mg/10 l.
SOLUCION CONCENTRADA 2:	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----	440 mg/l ----- 4,400 mg/10 l.
10 litros X 100 ml		
SOLUCION CONCENTRADA 3:	KI-----	0.83 mg/l ----- 8.3 mg/10 l.
MICRONUTRIMENTOS	$\text{H}_3\text{BO}_3$ -----	6.2 mg/l ----- 62.0 mg/10 l.
20 litros X 200 ml	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ----	22.3 mg/l ----- 223.0 mg/10 l.
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----	8.3 mg/l ----- 83.0 mg/10 l.
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----	0.25 mg/l ----- 2.5 mg/10 l.
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ----	0.025 mg/l ----- 0.25 mg/10 l.
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ----	0.025 mg/l ----- 0.25 mg/10 l.
SOLUCION CONCENTRADA 4:	$\text{Na}_2\text{EDTA}$ -----	37.3 mg/l ----- 373 mg/10 l.
20 litros X 100 ml	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----	27.8 mg/l ----- 278 mg/10 l.
SOLUCION CONCENTRADA 5:	Inositol-----	100 mg/l -----1000 mg/10 l.
20 litros X 100 ml		
SOLUCION CONCENTRADA 6:	Acido Nicotínico--	0.5 mg/l -----5.0 mg/10 l.
VITAMINAS	Piridoxina·HCl ---	0.5 mg/l -----5.0 mg/10 l.
10 litros X 100 ml	Thiamina·HCl-----	0.1 mg/l -----1.0 mg/10 l.
	Sacarosa -----	30 g/l
	Agar -----	8 g/l

APENDICE II. FORMULAS ARÍTMETICAS PARA EL ANALISIS DE VARIANZA

Fuente	SC	G.L.	CM	R.V.
A	$SC_A = \frac{\sum_{i=1}^a T_i^2}{bn} - C$	a - 1	$CM_A = SC_A / (a-1)$	$CM_A / CM_{residual}$
B	$SC_B = \frac{\sum_{j=1}^b T_j^2}{an} - C$	b - 1	$CM_B = SC_B / (b-1)$	$CM_B / CM_{residual}$
AB	$SC_{AB} = SC_{tratam.} - SC_A - SC_B$	(a-1)(b-1)	$CM_{AB} = SC_{AB} / (a-1)(b-1)$	$CM_{AB} / CM_{residual}$
Tratamientos	$SC_{tratam.} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b T_{ij}^2}{n} - C$	(ab-1)		
Residual	$SC_{residual} = SC_{total} - SC_{tratam.}$	ab(n-1)	$CM_{residual} = \frac{SC_{residual}}{ab(n-1)}$	
Total	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n X_{ijk}^2 - C = SC_{total}$			

SC= Suma de Cuadrados

G.L.= Grados de Libertad

CM= Cuadrados Medios

R.V.= Razón de Variancia o F Calculada ( $F_c$ )