

00322
149



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS MORFOGENETICAS
DE ANTERAS DE CHILE (*Capsicum annuum* L.)
CULTIVADAS in vitro**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
FRANCISCO JAVIER PEREZ GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. NEFTALI OCHOA ALEJO



FACULTAD DE CIENCIAS, MEXICO, D. F.
UNAM

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE Francisco Javier Pérez González

FECHA 25 - XI - 03

FIRMA [Signature]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Estudio de las respuestas morfogénéticas de anteras de chile (Capsicum annum L.) cultivadas in vitro"

realizado por Francisco Javier Pérez González

con número de cuenta 085525715, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Neftalí Ochoa Alejo
Propietario Dr. Rafael Ramirez Malagón
Propietario Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán
Suplente M. en IBB. Gustavo Jesús Ortega Lule
Suplente Biol. Laura Patricia Olguín Santos

[Signature]
[Signature]
[Signature]
[Signature]

Consejo Departamental de Biología

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ESTUDIOS
DE BIOLÓGICAS

B

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a todas las personas que me apoyaron desinteresadamente y que sin su ayuda ésta no hubiese sido posible realizar:

A mis padres: Javier Pérez y Josefina Pérez.

A Doña Maria Mendez.

A mis hermanos: Dolores, Armando, Nely, Claudia y Marina.

A mis sobrinos: Pepillo, Israel, Rosa Maria, Melisa, Elian y Jorge.

A mi esposa: Mónica.

A Don Pancho y Don Valente donde quiera que se encuentren.

A mi amiga: Socorro Parra.

I want to thank to all the Moore's family.

Also, to my teacher Anne Bollati and a friend Chris Green.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco cordialmente por su apoyo y orientación a:

- Dr. Nefali Ochoa Alejo.
- Dr. Rafael Ramírez Malagón.
- Todos los integrantes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CINVESTAV-Unidad Irapuato.
- Sistema de Investigación Miguel Hidalgo (SIHGO/CONACYT) a través del proyecto 19990201008 "Establecimiento del cultivo de anteras y microsporas de chile (*Capsicum annuum* L.) para la generación de líneas puras" por el apoyo financiero para la realización de este trabajo, y por la beca / tesis de licenciatura.
- To the BLACKHAWK COLLEGE and all the Spanish community.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ingeniería Genética de Plantas (Unidad Irapuato) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Neftalí Ochoa Alejo.

ÍNDICE

	PÁGINA
Relación de tablas	i
Relación de figuras	ii
Resumen	iv
1. Introducción	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Origen y distribución	1
1.3 Producción	3
1.4 Características fotoquímicas	6
1.5 Enfermedades	8
2. Antecedentes	10
2.1 Técnicas de cultivo de tejidos vegetales	10
2.2 Importancia del cultivo de anteras.....	11
2.3 Perspectivas	12
2.4. Marco histórico del cultivo de anteras.	12
2.5. Ontogenia del desarrollo haploide	15
2.6 Factores determinantes para la inducción de la embriogénesis	17
2.7. Origen de la embriogénesis	18
3. Justificación	19
4. Objetivos	20
5. Materiales y métodos	21

5.1. Origen y tratamiento del material biológico	21
5.2. Germinación de semillas.....	21
5.3. Determinación del grado de desarrollo de las microsporas en los botones florales de Chile.....	22
5.4. Cultivo de anteras	22
5.5. Trasplante de embriones	24
6. Resultados y discusión	25
6.1. Determinación del tamaño apropiado de los botones florales.	25
6.2. Efecto de antioxidantes sobre la regeneración de embriones a partir de anteras cultivadas <i>in vitro</i>	27
6.3. Efecto de los medios de cultivo	28
6.4. Aportación del trabajo	36
7. Conclusiones	38
8. Anexos	39
9. Literatura citada.	43

RELACIÓN DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Producción mundial de chile por países en el año 2001.....	5
Tabla 2. Composición nutricional de 4 tipos de chile dulce por cada 100 g de producto	6
Tabla 3. Requerimientos climáticos de <i>Capsicum annum</i>	7
Tabla 4. Relación del tamaño en longitud del botón floral con el desarrollo de las microsporas	25
Tabla 5. Número de embriones obtenidos de cada material y variedad de <i>Capsicum annum</i> por tratamiento.	33

RELACIÓN DE FIGURAS

PÁGINA

Fig. 1. Planta de <i>Capsicum annum</i> , tipo pasilla, creciendo en invernadero.	2
Fig. 2. Producción de chile en los diferentes estados de la Republica Mexicana (Primavera-Verano 2002).	4
Fig. 3. Principales eventos citológicos ocurridos en la microesporogénesis y en la androgénesis.	16
Fig. 4. Metodología para la obtención de embriones a partir de anteras de C. Annuum.	23
Fig. 5. Microsporas uninucleadas en <i>Capsicum annum</i> tipo pasilla teñidas con DAPI. La línea azul horizontal mide 50 micras.	26
Fig. 6. Efecto antioxidante de L-cisteina y ácido ascórbico en 100 anteras de chile pimiento Capricho.	27
Fig. 7. Embrión de chile pimiento Capricho (15x) emergiendo de anteras en el medio MS 1 suplementado con L-cisteina.	29
Fig. 8. Fruto del material 95 155 (izquierda) y embriones (18x) emergiendo del cultivo de anteras del mismo material cultivadas en el medio MS 1 + L-cisteina 1 mM.	30
Fig. 9. Formación de callo (6x) a partir de anteras de chile ancho San Luis en el medio MS 2.	30
Fig. 10. Plántula de chile Capricho (2.5x) subcultivados en MS después de la eliminación de callo (izquierda) y la formación del callo que lo invade de nuevo (derecha)	32
Fig. 11. Embrión (4.5x) en desarrollo a plántula (derecha) de <i>Capsicum annum</i> variedad Capricho, obtenido en el medio MS 1 + L-cisteina 1 mM.	34
Fig. 12. Embriogénesis de chile material UAAN 95 155. a) botón floral de chile con el tamaño adecuado para el cultivo de anteras <i>in vitro</i> ; b) antera de chile con indicios de la tonalidad azul en uno de sus	

polos; c) embrión de chile; d) embrión del material UAAN 95 155 en desarrollo; e) plántula de chile en desarrollo; f) plántula mostrando desarrollo de raíces; g) plántula de chile *in vitro* mostrando señales de clorosis.37

RESUMEN

El chile es un recurso económico importante y un organismo que representa todo un reto para la ingeniería genética en la obtención de plantas transgénicas de esta especie. En el presente trabajo se dio un paso más en el cultivo *in vitro* de este organismo. Se logró determinar que el explante adecuado para la androgénesis fueron obtenidos de botones florales de 3 a 4 mm donde los que los pétalos fueron ligeramente mayores que los sépalos y el tamaño adecuado de las anteras fue el de 2.5-3 mm de longitud. El mejor medio para la generación de embriones fue el medio MS 1 (2,4-D 0.01 mg/L + cianobalamina 0.03 mg/L), adicionado con L-cisteína 1 mM y en las condiciones de cultivo de un pretratamiento en oscuridad a 4°C (2 días) posteriormente a 35°C (5 días) y finalmente a 25°C (8 días) para posteriormente ser mantenidos a 25°C y una intensidad luminosa de $70 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}^{-1}$ hasta la obtención de plántulas. La variedad que mejor respondió fue la UAAN 95 155 con el 7 % de embriones / tratamiento. Resultados menos favorables se lograron en los medios MS1 sin L-cisteína con la variedad Pimiento Capricho y el medio N-N con un 1% de carbón activado y en el material UAA 95-26 Tipo Ansheim Loulle generando ambos medios 1% de embriones, esto significó un embrión por antera y 0.01 como la media de embriones por explante, el medio MS 2 no indujo la formación de embrión alguno en ninguna de las variedades y materiales cultivados. Se pudo observar que los embriones de chile presentaron una gran sensibilidad a la manipulación mecánica ya que el simple cambio del embrión a un medio fresco ocasionó la generación de callo. El uso de 0.5 mg/L de AIA generó la formación de callo en los embriones que se desarrollaban a plántulas. Por otra parte, en el medio MS 1 el material UAAN 95 14Z tuvieron una respuesta del 2% esto quiere decir el 2% de anteras con formación de embriones y 0.02 embriones por explante. El material UAAN 99-29 mostró un 1% de generación embriogénica en el medio N-N con carbón activado. En la variedad UAAN 95 155 se obtuvo hasta 5 embriones de un sólo explante.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El chile, junto con el maíz y el frijol fueron los principales pilares de la alimentación de las culturas de Mesoamérica (Laborde-Cancino y Pozo-Campodico, 1984). Desde tiempos precolombinos, el chile era para los nahuas muy importante desde el punto de vista alimentario, y también como parte de los ritos o como amuleto contra el mal. Por ejemplo, ellos usaban el chile para infringir castigos; el código Mendocino habla de cómo el chile era usado para el castigo de niños colocándolos directamente sobre el humo de chiles. Esta tradición perdura hasta el día de hoy en algunos grupos indígenas en Oaxaca. Colón fue el primer europeo en introducir a Europa estas picantes bayas, que rápidamente se dispersaron por todos los rincones del planeta (Andrews, 1995).

Capsicum annuum (Anexo 1), mejor conocido para la mayoría de los mexicanos como "chile" pertenece a la familia Solanaceae y se compone de aproximadamente 20 a 30 especies que crecen en los climas tropicales y subtropicales del continente americano. Cinco especies son de importancia agrícola: *Capsicum annuum* L., *C. chinense* Jacquin, *C. pendulum* Willdenow, *C. frutescens* L., y *C. pubescens* Ruiz y Pavón. Estas especies representan un recurso de suma importancia económica para distintos países y principalmente para México (Pérez-Grajales *et al.*, 1997).

El chile (Fig.1) es una planta con una gran heterogeneidad genética, lo cual posiblemente sea una consecuencia de largos periodos de selección y relativo aislamiento por las distintas regiones de México y sus pobladores (Rzedowski, 1981).

1.2 Origen y distribución

El género *Capsicum* probablemente ya era consumido por los seres humanos antes de su domesticación. El arqueólogo R.S. MacNeish descubrió semillas de chile en Tamaulipas y en Tehuacan, Puebla que datan de 7,500 años A.C. Hallazgos similares en Perú fueron descubiertos en la cueva del Guitarrero, donde las semillas datan de 6,500 A.C.

Sin embargo, los expertos están convencidos que los chiles fueron domesticados hasta 3,300 A.C. (DeWitt y Bosland, 1993).

El posible ancestro de las variedades de *C. annum* es el tipo silvestre chiltepin (*Capsicum annum* var. *aviculare*). Esta especie tiene una amplia distribución desde Sudamérica hasta el sureste de Arizona. En contraste, las variedades *annuum* cultivables estuvieron originalmente localizadas en México y América Central. Esta distribución sugiere que *C. annum* fue domesticada en México entre 7,500 y 2,500 A.C. (DeWitt y Bosland, 1993). Aunque el origen del género *Capsicum* es incierto, se puede suponer que el chile se originó en Sudamérica (Andrews, 1995).

La mayoría de las especies comerciales pertenecen a *Capsicum annum* (Anexo 2) y su amplia distribución en América (aún antes de Colón) y en otros países se debe en parte a una tendencia natural de *Capsicum* a la hibridación, así como al hecho de que estas plantas son colonizadoras por naturaleza, lo cual se refleja en su amplia distribución alrededor del mundo (Andrews, 1995).

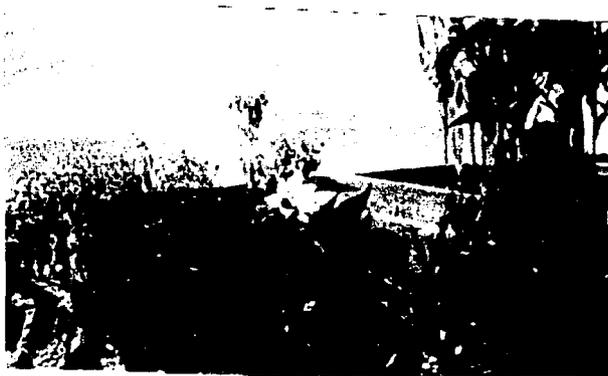


Fig. 1. Planta de *Capsicum annum*, tipo pasilla, creciendo en invernadero

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3 Producción

El chile tiene múltiples usos y su popularidad como comestible está creciendo rápidamente. El uso del chile como especia es ampliamente explotado por las grandes industrias de alimentos acompañando productos cuyos nombres comunes son "catsup", "nachos", cacahuates, salsas picantes, etc. El chile se usa como verdura, principalmente acompañando comida étnica, como es el caso de la comida mexicana: enchiladas, chalupas, carne con chile; y platillos chinos.

El consumo de chile en forma de especia es mucho mayor en México que en ningún otro país. La venta del chile deshidratado en México, centro y Sudamérica es una importante fuente de ingresos para esos países. Los tipos de chile más importantes que se venden en esta forma son: serrano, jalapeño, ancho, mulato, chiltecpin, chile piquin, pasilla, cascabel, guajillo, catarina, new méxico, anaheim, de árbol, cuzqueño en Perú (Andrews, 1995).

Como ya se mencionó, el chile representa un cultivo de mucha importancia económica para México, lo cual se puede observar en los volúmenes de producción de chile en los estados de Chihuahua y Sinaloa y también por su producción mundial. Al 30 de septiembre del 2001 se reportaron 1,190,405 toneladas de chile producidas en los distintos estados de la República Mexicana (Fig.2) (página en red: www.siea.sagarpa.gob.mx).

La producción mundial de chile fresco (Tabla 1) es de cerca de 10 millones de toneladas métricas, 46% de la cual se centra en Asia donde China es el principal productor. Los países del sureste de Europa son los segundos en importancia con el 24% de la producción mundial. África, Norte y Centro América producen una cantidad menor de chile fresco (Wien, 1997).

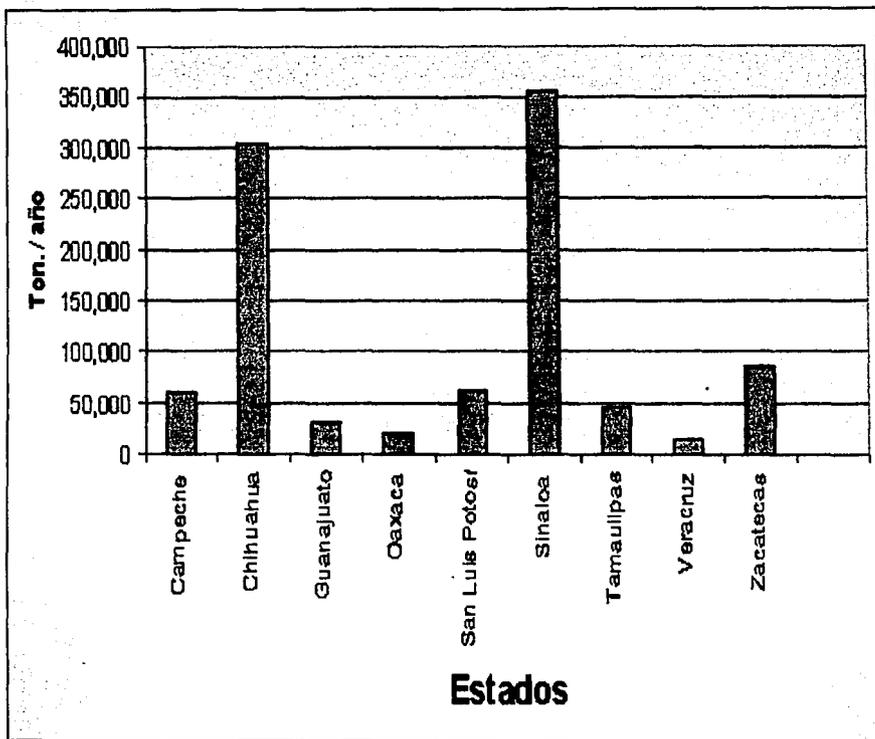


Fig. 2. Producción de chile en los diferentes estados de la República Mexicana (Primavera-Verano 2002)(página en red: www.siea.sagarpa.gob.mx).

Tabla 1. Producción mundial de chile por países en el año 2001 (página en red:
www.chilepepperinstitute.org/stats.htm).

Principales países productores de chile	Toneladas métricas / año
China	8,238,000
México	1,961,191
Turquía	1,400,000
España	965,200
USA	885,630
Nigeria	715,000
Indonesia	550,000
Egipto	448,331
Italia	380,876
Corea	380,000
Rumania	222,000
Tunes	210,000
Bulgaria	205,000
Rumania	191,376
Marruecos	180,000
Algeria	175,000
Japón	170,900
Yugoslavia	131,000
Macedonia	109,000
Grecia	100,000
Venezuela	80,000

1.4 Características fitoquímicas

El sabor típico de algunas de sus variedades del chile se debe a una serie de compuestos llamados capsaicinoides, que a su vez se les relaciona con sus propiedades digestivas y diuréticas (Lorente-Herrera, 1999). Los frutos de chile son especialmente ricos en vitamina C (Tabla 2).

Tabla 2. Composición nutricional de 4 tipos de chile dulce por cada 100 g de producto (Lorente-Herrera, 1999).

Tipo de chile	Sweet green	Sweet red	Hot green	Hot red
Proteínas	1.2 g	1.4 g	2.3 g	2.3 g
Lípidos	0.2 g	0.3 g	0.2 g	0.4 g
Azúcar	4.8 g	7.1 g	9.1 g	15.8 g
Fibra	1.4 g	1.7 g	1.8 g	2.3 g
Vitamina A	420 IU	4,450 IU	770 IU	21,600 IU
Vitamina B1	0.08 mg	0.08 mg	0.09 mg	0.1 mg
Vitamina B 12	0.08 mg	0.08 mg	0.06 mg	0.2 mg
Niacina	0.5 mg	0.5 mg	1.7 mg	2.9 mg
Vitamina C	128 mg	204 mg	235 mg	369 mg
Calcio	9 mg	13 mg	10 mg	16 mg
Fósforo	22 mg	30 mg	25 mg	49 mg
Hierro	0.7 mg	0.6 mg	0.7 mg	1.4 mg
Sodio	13 mg	----	----	25 mg
Potasio	213 mg	----	----	564 mg
Valor energético	22 calorías	31 calorías	37 calorías	65 calorías

*IU- Unidades Internacionales.

En la tabla de requerimientos climáticos podemos observar que las plantas de Chile son sensibles a temperaturas menores a 16°C y mayores de 18°C. El rango adecuado de humedad oscila entre 50 a 70%, niveles más bajos de humedad afectan negativamente a esta planta. El Chile también requiere suelos profundos y con buen drenaje como por ejemplo el tipo franco con poca cantidad de arcilla pero rico en materia orgánica, calcio, potasio y magnesio con un pH que oscila entre 6 y 7. (Tabla 3) (Lorente Herrera, 1999).

Tabla 3. Requerimientos climáticos de *Capsicum annum*.

Temperaturas críticas	Punto de congelamiento	-1°C
	Crecimiento cero	10°C
	Mínimo requerido para su crecimiento	15°C
	Temperatura óptima	16-18°C
	Máxima temperatura para crecimiento	30°C
Temperatura nocturna	Óptima	16-18°C
Germinación	Temperatura mínima	13°C
	Temperatura óptima	25°C
	Temperatura máxima	40°C
Fructificación	Temperatura mínima	18-20°C
	Temperatura óptima	25°C
	Temperatura máxima	35°C

1.5 Enfermedades

Capsicum annum es atacado por distintos tipos de microorganismos que pueden provocar desde el amarillamiento de la planta hasta su muerte. Dentro de las enfermedades provocadas por bacterias se encuentran: el ablandamiento de la raíz causado por *Erwinia carotovora*, la mancha bacteriana producida por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y el marchitamiento bacterial causado por *Pseudomonas solanacearum* (DeWitt y Bosland, 1993).

Dentro de los hongos que producen enfermedades tenemos a *Cercospora capsici* que afecta las hojas; *Phythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, que están asociados con la pudrición de la raíz; *Phytophthora capsici* relacionado con marchitamiento del chile y *Leveillula taurica* el cual ataca las hojas de las plantas (DeWitt y Bosland, 1993).

Hasta antes de 1966, el chile presentaba como principal problema el ataque por hongos, sin embargo, a partir de esta fecha las enfermedades causadas por virus han ido en aumento causando daños importantes a este cultivo (Laborde-Cancino y Pozo-Campodónico, 1984). Los virus atacan a *Capsicum annum* alterando su metabolismo y causando anomalías del crecimiento tales como el enchinamiento y la coloración anormal de las hojas, tejido muerto y mosaico de las hojas y frutos. Una planta puede ser atacada por diversos virus y puede expresar distintos síntomas a la vez. Los virus pueden ser transmitidos de planta a planta por insectos, áfidos, o por el manejo de plantas infectadas. Algunos ejemplos de virus que atacan al chile son: el virus del mosaico de la alfalfa (AMV), el virus del enchinamiento superior de la remolacha (BCTV), el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus moteado del chile (PeMV), el virus del mosaico de tabaco (TMV) y el virus de la papa (PVY); éste último es el virus más común en el chile y es transmitido por áfidos.

Los insectos también pueden ser un problema en los cultivos de chile y causar daños a las plantas. Pérez-Grajales *et al.* (1997) cita por ejemplo al Barrenillo o picudo del chile (*Antonomus eugenii* Cano) como una plaga muy común en México; el pulgón verde (*Myzus persicae* Sulzer), el cual se presenta en el ciclo vegetativo de la planta, es un vector

transmisor de virus. Otras especies no se encuentran con una distribución tan amplia y solo se les encuentra en ciertas regiones, como es el caso del minador de la hoja (*Liriomyza munda* Frick), o el caso de otros organismos como la araña roja (*Tetranychus shoenei* Mc Gregor), la pulga saltona (*Epidrix* sp.), la mosquita blanca (*Trialeurones vaporariorum* West) y la diabrotica (*Diabroticas* spp.) (Pérez-Grajales *et al.*, 1997).

2. ANTECEDENTES

2.1. Técnicas de cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales consiste en una serie de técnicas que permiten el cultivo y manipulación, bajo condiciones artificiales y controladas, de células, tejidos y órganos vegetales. Mediante estas técnicas se permite el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo complejo (Pérez-Molphe Balch *et al.*, 1999).

Los métodos que son teóricamente posibles para la propagación de plantas *in vitro* son esencialmente:

1. La multiplicación de brotes a partir de yemas axilares.
2. Mediante la formación de brotes adventicios y o de embriones somáticos adventicios (George, 1984).

Una forma de obtener embriones no cigóticos en el cultivo de tejidos vegetales, es mediante un proceso llamado embriogénesis.

La embriogénesis, dependiendo del origen del embrión, esta dividida en embriogénesis somática y embriogénesis androgénica.

La embriogénesis somática es un proceso asexual por lo que las nuevas plantas serán exactamente iguales a la donadora de la célula o tejido inicial. Se pueden obtener embriones somáticos a través de dos vías (Ezura, 1997):

- a. Directa. La embriogénesis somática directa consiste en la formación de embriones somáticos o tejido embriogénico directamente del explante sin la formación de una fase intermedia de callo (Gamborg, 1995).
- b. Indirecta. A partir de callo o cultivos en suspensión, obtenidos a partir de la proliferación de células de los explantes, o bien de embriones originados a partir de callo obtenido de explantes de los órganos especializados de la planta (George, 1984).

La embriogénesis androgénica se logra mediante el cultivo de anteras o microsporas de plantas, y da como resultado la producción de haploides o dobles haploides (Ezura, 1997). Las células gametofíticas (microsporas o megasporas) se pueden inducir, en el cultivo, a abandonar su curso ontogenético normal para seguir una vía esporofítica que conduzca a la formación de esporofitos haploides. Se llama androgénesis cuando las microsporas originan embriones y plantas, y ginogénesis cuando se obtienen los mismos productos a partir de óvulos y de ovarios (Roca y Myroginski, 1991).

3. Organogénesis. La Organogénesis consiste en la producción de órganos (raíces, brotes y flores) a partir de callo o cultivos en suspensión (Dodds, 1995).

La organogénesis se divide en directa e indirecta.

- a. Directa. En este método de micropropagación, brotes adventicios surgen directamente de los tejidos del explante y no de un callo formado previamente.
- b. Indirecta. Brotes y órganos son generados indirectamente cuando ellos son formados a partir de callo desorganizado o de cultivo de células (George, 1984).

2.2. Importancia del cultivo de anteras

Debido a la importancia cultural y económica de esta especie se propone el cultivo de tejidos vegetales y particularmente, el empleo del cultivo de anteras en Chile. Esta metodología es importante ya que mediante este procedimiento podemos obtener líneas puras en un tiempo más reducido que el que normalmente tomaría autofecundando una planta (cinco o seis ciclos de aproximadamente 3 meses o más). Además por esta técnica se pueden eliminar los genes no deseados. Las plantas haploides obtenidas por medio del cultivo de anteras permiten una reducción de la

variabilidad genética lo cual resulta ideal en el mejoramiento de plantas de interés agrícola como lo es el chile.

Sin descartar otras ventajas de esta técnica para la generación de plantas haploides como lo son la ausencia de variación dentro de la segregación de familias, ausencia de variabilidad debida a dominancia y disminución en los efectos de variación debida al medio ambiente (Ochoa-Alejo, 2002).

2.3. Perspectivas

La generación de plantas haploides de chile a partir del cultivo de anteras *in vitro* requiere un estudio más extenso acerca de los requerimientos nutricionales y la concentración adecuada de reguladores de crecimiento para las plántulas de chile obtenidas en estas condiciones.

Este trabajo solo es el principio de una serie de experimentos que pueden contribuir al conocimiento de la genética de esta especie, en específico, acerca de la embriogénesis androgénica y los factores que intervienen en ella. Por otro lado, también nos permite la posibilidad de generar plantas haploides de chile en tiempos relativamente cortos a través de la androgénesis, lo cual nos permitirá incursionar más rápidamente en el fitomejoramiento de esta planta y, por ende, todas sus aplicaciones económicas.

2.4. Marco histórico del cultivo de anteras

La obtención de plantas a partir de granos de polen se ha venido realizando *in vitro* tanto en plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas (George, 1973). Se han tenido reportes de la ocurrencia de plantas haploides desde 1922, pero fue hasta 1933 que la obtención de embriones de la misma semilla en una de las especies de *Linum* se dio a conocer como un recurso para la obtención de plantas haploides (Christensen y Bamford, 1943).

Los primeros intentos para la obtención de plantas haploides a partir de granos de polen *in vitro* se registran a partir de 1950. Utilizando polen de diferentes gimnospermas, se lograron obtener pequeños brotes a partir de callo. En 1967, Guha y

Maheshwari, obtuvieron las primeras plantas a partir del cultivo *in vitro* de anteras de *Datura innoxia* (Toloache). Éste fue el punto de partida en las 200 especies que proseguirían en ser estudiadas exitosamente en medios artificiales (Pérez-Molphe Balch *et al.*, 1999).

El cultivo de anteras *in vitro* de chile ha venido avanzando en el tiempo con el fin de obtener plantas haploides. Wang *et al.*, en 1973 reportaron por primera vez la obtención de plantas haploides mediante el cultivo *in vitro* de anteras de chile (Saccardo *et al.*, 1974). George y Narayanaswamy (1973) encontraron que la aplicación exógena de ácido indolacético (AIA) en sus experimentos fue determinante para promover la embriogénesis; sin embargo, solo pudieron obtener un 1% de plantas regeneradas. Muchos otros estudios se han llevado a cabo después de ellos, investigando no solo el medio de cultivo sino también tomando en cuenta otros factores que pudiesen afectar la frecuencia en la inducción de embriogénesis; por ejemplo, Sibi *et al.*, (1979) lograron obtener de 1 a 3 plantas por cada 100 anteras cultivadas; ellos usaron como indicador de la primera mitosis de la microspora el momento en que los pétalos y los sépalos eran de la misma longitud. También con el fin de inducir la embriogénesis, aplicaron a las anteras un pretratamiento de 4 °C por 48 horas, utilizando como medio base el Cm (variación del medio MS, ya que existe una diferencia en la concentración de sales en ambos medios así como ausencia de vitamina B₁₂ en el medio MS el pH es de 5.7 y de 5.9 en el Cm.) conteniendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (2 mg/L), cinetina (2 mg/L), vitamina B12 (0.03 mg/L), EDTA, sacarosa (3%) y agar (8%). En 1981a Dumas de Vaulx *et al.*, determinaron que pretratamientos a altas temperaturas (35 °C) y ausencia de luz por un periodo de 2 a 8 días provocaron en las anteras cultivadas *in vitro* que los reguladores de crecimiento disminuyeran (ya que altos niveles de 2,4-D no son necesarios para estimular las divisiones en la microspora), mejorando la calidad de la embriogénesis y la obtención de plantas. También estos autores lograron el método de cultivo *in vitro* realizando innovaciones en el cultivo de anteras de chile en medio artificial logrando altos niveles de plantas n y 2n, para lo cual consideraron como factores importantes: un pretratamiento a 35 °C y periodos de oscuridad durante los primeros 8 días en un medio llamado C suplementado con cinetina 10⁻³ mg/L y 2,4-D 10⁻³ mg/L o en la concentración de 2 mg/L de cinetina y 2x10⁻¹ mg/L de 2,4-D,

respectivamente. Con esta técnica obtuvieron de 5 a 40 plantas por 100 anteras cultivadas.

Vagera y Havránek (1985) determinaron la adición de carbón activado al medio incrementaba la frecuencia de la androgénesis y prolongaba la vitalidad embriogénica en cultivo de anteras de *Capsicum annuum*; desde entonces, sus técnicas han sido usadas en diferentes programas de cultivo de tejidos vegetales, como los realizados por el mismo Dumas (1981) por Daubéze *et al.*, (1990) citados en Mitykó *et al.*, 1995.

Otros datos interesantes han sido aportados por Johansson *et al.*, (1982) lo cuales señalaban que un medio de doble capa, que consistía en una capa de medio conteniendo carbón activado y capa líquida, era superior en comparación con los medios sólidos o líquidos en el cultivo de anteras. Estos últimos señalaron, que una elevación del 2% en la concentración de CO₂ promovía la embriogénesis en el cultivo *in vitro* de anteras de los géneros *Anemone*, *Clematis*, *Papaver* y *Nicotiana*.

Kristiansen y Andersen (1993) investigaron el efecto de la temperatura y fotoperíodo para embriones desarrollados en cultivo de anteras de *Capsicum annuum* y las relaciones de éstas con la edad de la planta donadora. Los resultados que obtuvieron fueron que la temperatura óptima para el desarrollo embrionario era de 26.4 °C; mientras que el fotoperíodo no ejerció ningún efecto importante en este desarrollo. Ellos también observaron que los botones florales de plantas jóvenes fueron los mas adecuados para el cultivo de anteras ya que a medida que aumenta la edad de la planta donadora, la respuesta embriogénica disminuye. González *et al.*, (1996), realizaron estudios acerca de los factores que intervienen en la inducción de la embriogénesis en *Capsicum annuum*, y los relacionaron con cambios de DNA, RNA y proteínas. Las conclusiones a las que llegaron fueron que la microspora vacuolada era la fase que mejor respondía para la inducción de la embriogénesis, y que era posible cambiar la dirección de desarrollo normal del gametofito a una fase esporofítica bajo condiciones de estrés *in vitro* del polen bicelular inmaduro.

Otro de los avances en la obtención de líneas isogénicas fue el realizado por Davies y Morton (1998), los cuales compararon el cultivo *in vitro* de anteras y microsporas aisladas de plantas de cebada, llegando a la conclusión de que el cultivo de

microsporas aisladas origina un número mucho mayor de plantas regeneradas por antera que el propio cultivo de anteras.

El medio MS fue exitoso en la inducción de embriogénesis a partir de anteras de tomate de cáscara en estudios realizados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CINVESTAV-Unidad Irapuato (Escobar, 2002).

Los tejidos de chile *in vitro* liberan gran cantidad de compuestos fenólicos que producen la necrosis temprana de las anteras y, por lo mismo, se reduce el índice de embriogénesis (Hartmann *et al.*, 1997).

Los métodos para el cultivo de anteras *in vitro* descritos por Dumas de Vaulx *et al.*, (1981b), para *Capsicum annuum* y después usados por Vagera (1990) han demostrado ser los más importantes en la inducción de la embriogénesis. Por ello, las variedades mexicanas de *Capsicum* que fueron usadas en este trabajo se cultivaron en los medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y N-N (Nitsch y Nitsch, 1969) descritos por Vagera (1990).

2.5. Ontogenia del desarrollo haploide

El polen en su desarrollo sigue una secuencia de eventos muy precisa: la pérdida de la calosa por parte de las tétradas post meióticas que resulta en la liberación de 4 microspora no vacuoladas de pared relativamente delgada (Fig. 3), dentro del locus de la antera. Posteriormente la microspora aumenta su tamaño y se desarrolla una vacuola. Un poro es evidente en la exina opuesta al núcleo. En este momento la síntesis de DNA se lleva a cabo seguida de la mitosis, la cual da como resultado una célula generativa pequeña y una gran célula vegetativa. La célula vegetativa toma la posición adyacente al poro donde la síntesis de los almidones comienza; la célula generativa prosigue hacia una segunda mitosis resultando en un grano de polen maduro con dos células espermáticas. En una etapa específica durante la diferenciación de la microspora, su desarrollo normal puede ser cambiado *in vitro* al desarrollo esporofítico originando la formación de embriones haploides. No está claro si todas las microsporas vuelven a adquirir esta dirección en su desarrollo después de haber estado comprometidas a la ruta gametofítica o si existe una fracción embriogénica específica dentro de la población de microsporas y requiere solo la señal proporcionada por el medio de cultivo para la completa expresión de esta capacidad (Thorpe, 1995).

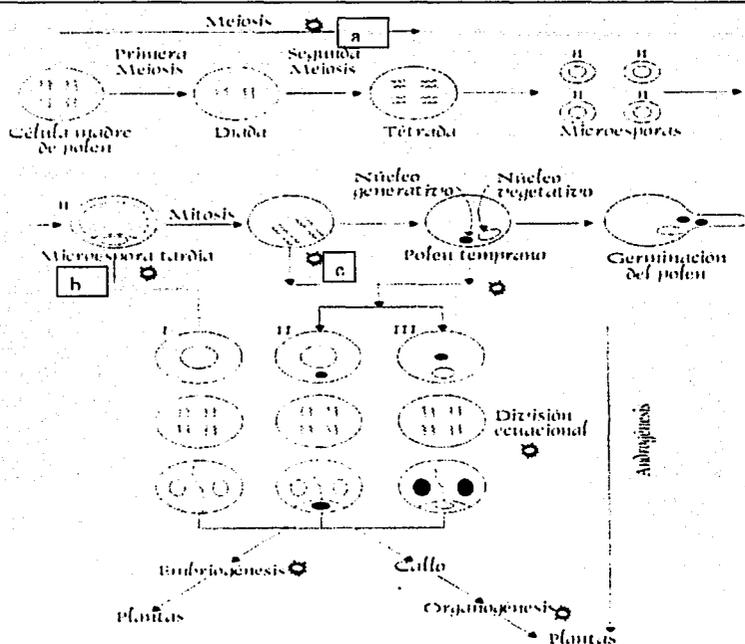


Fig. 3. Principales eventos citológicos ocurridos en la microesporogénesis y en la androgenesis. "En la fig. 3 se observan que los mecanismos de control del proceso se encuentran en diferentes sitios marcados con (*): a) en la meiosis, para lograr la determinación de los granos de polen embriogénicos; b) entre las etapas de la última microspora y el polen temprano, para obtener la etapa apropiada de polen que responda al cultivo *in vitro*, c) cuando ocurren divisiones mitóticas en las microsporas, para lograr la iniciación de proembriones; y d) durante la regeneración de la planta a través de la organogénesis o la embriogénesis. I, II, y III son las posibles vías que, según la especie de que se trate, puede tomar la microspora tardía o el polen temprano para llegar a la vía embriogénica o a la organogénica" (Roca y Mroginski, 1991).

2.6. Factores determinantes para la inducción de la embriogénesis

Smykal (2000), estableció como los factores más importantes para el desarrollo esporofítico del polen los siguientes:

1. El efecto genotípico de la planta donadora. El genotipo es uno de los factores más importantes para la embriogénesis, ya que la androgénesis está controlada por más de un gen y esos genes son recesivos, como lo han demostrado estudios en *Solanum tuberosum*.

También, propone que las condiciones fisiológicas y de crecimiento de las plantas donadoras son importantes para inducir la embriogénesis; esto se debe a que las inflorescencias jóvenes contienen granos de polen con respuesta embriogénica.

2. El estado de desarrollo del polen. El efecto genotípico de la planta androgénica se encuentra entre el punto intermedio entre el estado unicelular y bicelular de la microspora, debido a que no existe una homogeneidad en el desarrollo del polen. Para *Capsicum annuum* el estado más favorable para la inducción de la embriogénesis es cuando el núcleo muestra señales de una transcripción activa.

3. La composición del medio de cultivo y la concentración de los reguladores del crecimiento. La composición del medio es importante ya que elementos como auxinas, citocininas, aminoácidos como la serina o glutamina, promueven el proceso de embriogénesis.

4. Pretratamientos a distintas temperaturas. Un pretratamiento a bajas temperaturas (4 °C) altera el plano de división del grano de polen y da como resultado células simétricas. La simetría de la división nuclear debida a estrés ha sido relacionada como uno de los factores determinantes en la formación de embriones. Por otro lado, un pretratamiento a alta temperatura (30-35 °C) cambia la ruta de desarrollo normal del polen hacia la ruta esporofítica.

2.7. Origen de la Embriogénesis

El origen de la Embriogénesis del polen sigue en duda. La totipotencia de las células de las plantas a sido tradicionalmente usada como una explicación a éste fenómeno. Sin embargo esta explicación no considera que el grano de polen es una estructura altamente diferenciada la cual debe tener una capacidad muy reducida para regenerar a una planta completa, además en algunos híbridos del genero *Solanum* la inducción de la androgénesis parece ocurrir con mayor facilidad que la embriogénesis somática. En adición, algunas microsporas parecen tener una tendencia a la morfogénesis y organogénesis; la androgénesis espontánea ocurre de forma natural en varias especies y también muchos ejemplos de dimorfismo del polen. La totipotencia parece ser insuficiente para explicar la androgénesis. El origen de este proceso debe encontrarse relacionado al fenómeno del atavismo (reaparición de caracteres perdidos de ancestros remotos o típicos los cuales no se observan en los padres o ancestros recientes de los organismos que muestran el carácter atavístico). Deacuerdo a estudios publicados acerca de los precursores ancestrales del polen, estas estructuras debieron haber tenido una gran capacidad de proliferación. La habilidad para formar una estructura multicelular a partir de una sola célula haploide es compartida por los meiocitos de algas ancestrales, de las primeras plantas terrestres, y en los helechos actuales, los cuales están evolutivamente relacionados al polen. El atavismo solo se expresa bajo ciertas circunstancias como ocurre en la androgénesis debida a una concecuencia del estrés ambiental. Existe suficiente evidencia que sugiere que la androgénesis podría ser el resultado de la expresión de genes arcaicos de meiocitos con capacidad morfogenética la cual fue expresada naturalmente en los ancestros de las plantas con flores (Bonet *et al.*, 1998).

3. JUSTIFICACIÓN

A partir de 1999, se ha buscado mejorar la calidad de los chiles que se producen en el bajo por lo que la obtención de líneas puras mediante técnicas simples, rápidas y eficientes es el objetivo a lograr. El cultivo de anteras in vitro a sido considerado como una alternativa importante para posteriormente generar híbridos con características deseadas.

El presente trabajo forma parte de un proyecto mayor llamado "Establecimiento de cultivo de anteras y microsporas de chile, para la generación de líneas puras" encabezado por el Dr. Nefalí Ochoa, en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN, el CINVESTAV-Irapuato. Este proyecto se realiza conjuntamente con el Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA) de la Universidad de Guanajuato y del INIFAP quienes pueden llevar el conocimiento generado en esta investigación a los agricultores para que se beneficien de ello.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar las respuestas morfogénicas de anteras de *Capsicum annuum* cultivadas *in vitro*.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el indicador morfológico del estado uninuclear de las microsporas en los botones florales de chile.
- Evaluar el efecto del ácido ascórbico y L-cisteína como antioxidantes en la embriogénesis de *Capsicum annuum* var. Pimiento.
- Evaluar la respuesta embriogénica de anteras de 14 materiales y 6 variedades de *Capsicum annuum* en 3 tipos de medios (MS 1, MS 2, y N-N).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Origen y tratamiento del material biológico

Las anteras de 6 variedades distintas de *Capsicum annuum* fueron obtenidas apartir de plantas proporcionadas por el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Guanajuato (ICA) y de plantas germinadas a partir de semillas de 14 materiales donadas por el mismo instituto. Las plantas donadoras fueron desarrolladas en condiciones de invernadero. Los materiales proporcionados por el ICA consistieron de 6 variedades de *Capsicum annuum* llamados ancho San Luis (ASL), chile Grosso, chile Pimiento (Capricho), ancho Mulato Bajío, Anaheim y chile Pasilla. Los restantes 14 materiales se designaron con las claves: UAAAN 9579, UAAAN 95 I 1996, UAAAN 95118, UAA 9578, UAAAN 95 119, UAAAN 9526, UAAAN 95 155, UAA 9526 tipo Anaheim Loulle, UAAAN 96 I 22 a, UAAAN 96 I 118 d, UAAAN 9529, UAAAN 95 14Z, UAAAN 9929 y UAAAN 95 112. Todos estos materiales eran tipo pasilla y presentaban diferente resistencia o tolerancia al hongo *Phytophthora capsici* causante de la marchites o secadera del chile.

5.2. Germinación de semillas

Las semillas de los 14 materiales fueron germinadas en cajas de petri de 100x15 mm., con la adición de un antifúngico e insecticida (Rodamina y Captán) y selladas con Vitafilm. Las plántulas obtenidas fueron transplantadas a pequeños envases conteniendo aproximadamente 5 cm³ de tierra y se mantuvieron en estos recipientes hasta que las plantas alcanzaron la talla aproximada de 15 cm y fueron colocadas en macetas y llevadas al invernadero. Durante este periodo, las plantas fueron nutridas con el fertilizante comercial FerviaFol 20-30-10 (Anexo 3). Este fertilizante fue un concentrado de nutrientes NPK y microelementos generalmente para aplicación foliar. Se disolvieron 8 g / 20 L de agua, y se aplicaron dos veces por semana aproximadamente 200 ml de esta solución por planta. En los botones florales que se removieron, los pétalos y sépalos eran del mismo tamaño (o los pétalos ligeramente mayores 2 mm) ya que esta correlación nos indicó que las anteras contenían microsporas en el estado uninuclear, lo cual favorece la inducción de la androgénesis (Vagera, 1990). Solo se usaron los botones florales de la primera floración.

5.3. Determinación del grado de desarrollo de las microsporas en los botones florales de Chile.

Para determinar el tamaño del botón floral con mayor número de microsporas uninucleadas, se procedió a observar en microscopio de fluorescencia las microsporas de anteras de Chile en distintas etapas de desarrollo previamente teñidas con DAPI (4,6-diamidino-2-fenil indol), este último es un colorante muy específico para el núcleo, el cual se une a las regiones de A=T del ADN emitiendo una gran fluorescencia (Singh *et al.*, 1995).

El protocolo fue el siguiente:

1. Se realizó un corte transversal de dos anteras provenientes de botones florales con las longitudes de 2.5, 3, 4, 5 y 6 mm y mediante presión se extrajo el mayor número posible de microsporas.
2. Se fijaron las muestras de polen provenientes de las anteras en solución de DAPI (1 g/L en 0.1 M fosfato de sodio, pH 7.0) por 5 minutos.
3. Se cubrió la muestra con un cubreobjetos y realizando el "squash" con presión uniforme de la placa.
4. Se removió el exceso de DAPI lavando 3 veces con agua destilada los portaobjetos con las muestras.
3. Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de emisión de 450 nm.

5.4. Cultivo de anteras

Los botones florales fueron desinfectados superficialmente en una solución de blanqueador comercial (NaOCl, 6% cloro activo) al 50% (v/v) por 30 minutos. Al término del tiempo se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril. Bajo campana de flujo laminar se procedió a disectar los botones florales para obtener las anteras y se sembraron en los medios MS 1, MS 2 y N-N. El medio fue esterilizado a 120°C con una presión de 1.5 atm durante 20 minutos.

MS 1 = 0.01 mg/L 2,4-D + 0.03 mg/L de cianobalamina

MS 2 = 0.1 mg/L 2,4-D + 0.3 mg/L de cianobalamina

Al medio N-N (Anexo 4), donde también se inocularon 100 anteras de cada material, no se le aplicó ningún regulador de crecimiento, y se suplementó con carbón activado 1%.

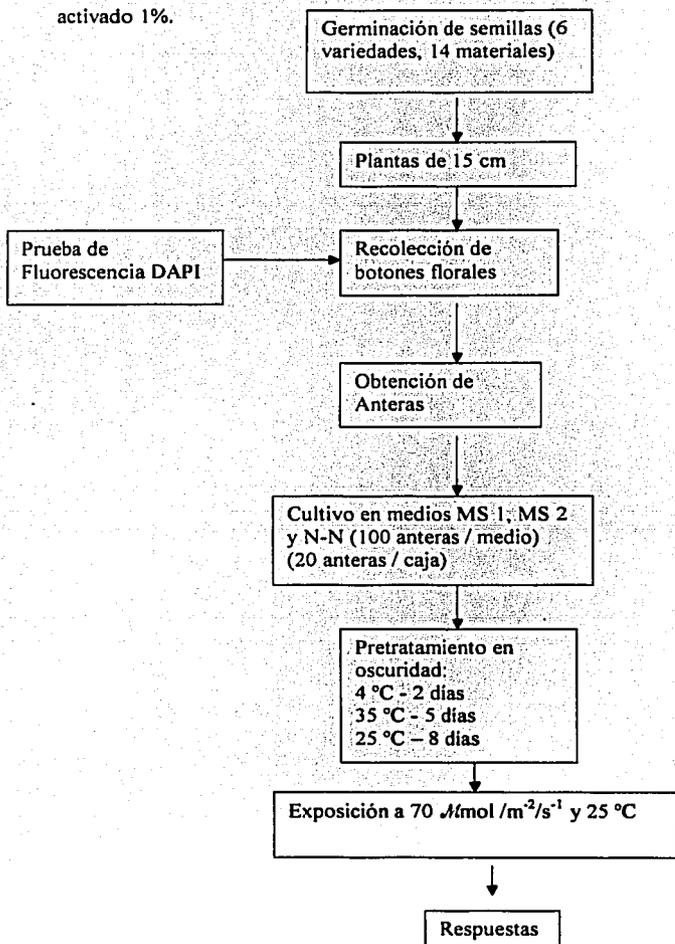


Fig. 4. Metodología para la obtención de embriones a partir de anteras de *C. Annuum*.

Se sembraron un total de 100 anteras de cada variedad de chile en cada medio de cultivo, colocando 20 anteras por caja de petri (100x15 mm). Cada caja de petri fue sellada con Vitafilm y cubiertas con papel aluminio para mantenerlas en oscuridad. Posteriormente, todas las cajas de petri se sometieron a un pretratamiento a 4 °C por dos días, y luego se transfirieron a 35 °C por espacio de 5 días, al término de los cuales las anteras fueron transferidas a una cámara de 25 °C y oscuridad por una semana más.

Al finalizar este periodo, se sacaron de la oscuridad y fueron expuestos a una longitud de 70 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}^{-1}$.

Para evitar la necrosis temprana de las anteras se realizó una prueba preliminar con antioxidantes en la variedad Capricho. Se utilizó el medio MS 1 adicionado de ácido ascórbico y L-cisteína, cada una en concentraciones de 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 mM, y se sembraron 100 anteras por cada tratamiento.

Después de determinar su efecto se procedió a usar la concentración y el antioxidante más efectivo en el medio MS 1 con todas las variedades de chile para los fines embriogénicos deseados. Las anteras se mantuvieron bajo el efecto de los reguladores de crecimiento hasta que se formaron los embriones, de ahí se transfirieron a medio MS libre de fitoreguladores.

5.5. Trasplante de embriones

Los embriones obtenidos fueron transferidos al medio MS conteniendo 50 mg/L de caseína hidrolizada y 0.1 mg/L de AIA (inicialmente se usó una concentración de 0.5 mg/L se disminuyó la concentración dada la formación frecuente de callo). En este medio los embriones obtenidos se desarrollaron en plántulas para su posterior trasplante a suelo en maceta mantenidas en invernadero.

Cabe mencionar la gran problemática que se enfrentó en el presente trabajo ya que existió una gran limitante para la obtención de los botones florales de cada variedad. Se sembraron las semillas de cada material y para la obtención de los botones florales fue necesario esperar un promedio de 3 meses para la obtención de los mismos, no pudiendo aprovecharse las floraciones siguientes ya que sólo se usaron los botones de las primeras floraciones, teniendo que repetir el largo proceso de espera. También se tiene que mencionar que muchos de los tratamientos se repitieron debido a problemas de contaminación.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación del tamaño apropiado de los botones florales

De las observaciones realizadas con la tinción con DAPI y al microscopio de fluorescencia se obtuvieron los resultados del conteo de anteras con distintos grados de desarrollo que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 4. Relación del tamaño en longitud del botón floral con el desarrollo de las microsporas.

Botones florales (mm)	Anteras (mm)	Microsporas en estado de tétrada	Microsporas uninucleadas centrales	Microsporas uninucleadas laterales	Microsporas binucleadas
2.5	2	96	2	2	0
3	2.5	0	13	84	11
4	3	0	35	52	13
5	3	0	20	59	21
6	3	0	5	3	81

De manera general, se puede observar en la Tabla 6 que botones florales de 3 a 6 mm presentaron microsporas en distintos estados de desarrollo, ya que se encontraron microsporas uninucleadas centrales, microsporas uninucleadas laterales y microsporas binucleares. En los botones florales de 2.5 mm, el estado de microsporas en tétradas fue el dominante, aunque cabe señalar que ya se presentaban indicios de maduración hacia microsporas uninucleares centrales y laterales. En los trabajos llevados a cabo por Escobar (2002) el 69.4% de las microsporas cultivadas correspondieron a microsporas en estado uninucleado lateral, a lo cual se atribuye en parte los altos índices de Embriogénesis que obtuvo. Otro aspecto importante observado es que la coloración ligeramente azul de las anteras [característica indicadora de maduración de microsporas uninucleares (Vagera y Havránek, 1985)] no siempre se presentaba en los botones florales con el tamaño adecuado para que se pudiese inducir la embriogénesis (3-4 mm).

Los resultados confirman la información proporcionada por Saccardo y Devreux, (1974) de que en *Capsicum annum* las anteras obtenidas de botones florales de 3 mm y con un tono ligeramente azul fueron las que contenían en términos generales una mayor cantidad de microsporas uninucleadas y en donde el tamaño de las anteras oscilaba entre 2.5 y 3 mm . Por lo mismo, se seleccionaron los botones florales de 3 y 4 mm de longitud ya que, como lo muestran nuestras observaciones al microscopio de fluorescencia fueron en este momento cuando se contó una mayor cantidad de microsporas uninucleares laterales y centrales (Fig. 5). Otro indicador usado para saber cuando las microsporas se encontraban en el estado uninuclear tardío fue cuando los pétalos fueron 1 mm más grande que los sépalos (Dumas de Vaulx *et al.*, 1981b) donde las anteras presentaron ya una ligera tinción en azul (Sibi *et al.*, 1979).

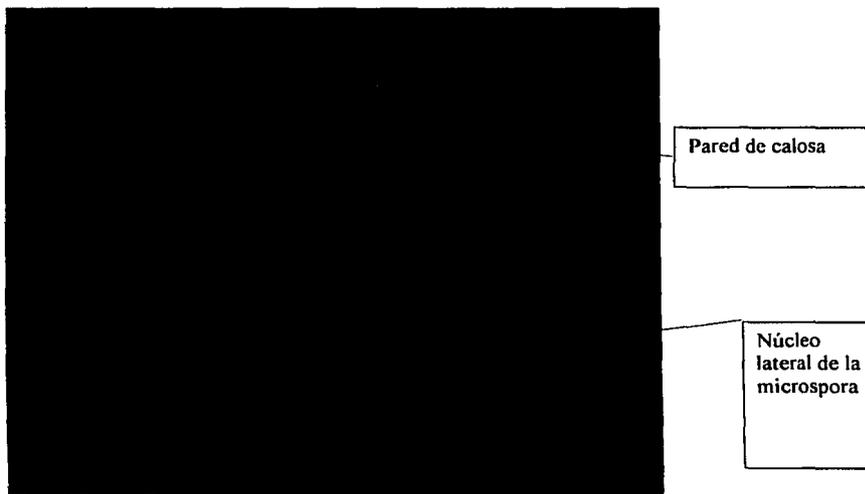


Fig. 5. Microsporas uninucleadas en *Capsicum annum* tipo pasilla teñidas con DAPI. La línea azul horizontal mide 50 micras.

6.2. Efecto de antioxidantes sobre la regeneración de embriones a partir de anteras de chile Capricho cultivadas *in vitro*

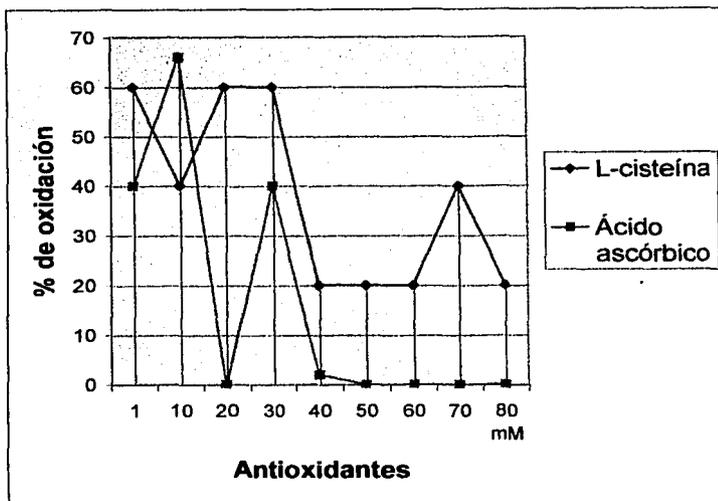


Fig. 6. Efecto antioxidante de la L-cisteína y ácido ascórbico en 100 anteras de chile pimienta Capricho.

En la micropropagación *in vitro* de *Capsicum* no se reporta el uso de antioxidantes (Pérez-Mora, 2002). Se probó el efecto de dos antioxidantes: L-cisteína y ácido ascórbico en distintas concentraciones sugeridas por Escobar (comunicación personal) usando la variedad de chile llamada pimienta Capricho ya que esta variedad presentó una buena respuesta embriogénica.

En la Fig. 6 se puede observar que el ácido ascórbico ejerció un efecto antioxidante mayor a medida que la concentración aumentó. Aún en concentraciones bajas 20 mM, 40 mM, y 60 mM, fue clara su acción antioxidante siendo que a partir de 20 mM ninguna antera mostró oxidación. En contraste, la L-cisteína ejerció un efecto antioxidante

solamente a partir de 10 mM, pero aún en concentraciones más altas se pudo observar la presencia de anteras oxidadas. Sin embargo, se logró obtener dos embriones a partir de 2 anteras en el medio MS 1 con L-cisteína 1 mM, siendo ésta la concentración más baja de todas las usadas y donde en consecuencia se observó una mayor oxidación, de hecho los embriones surgieron de las anteras ya con cierto grado de oxidación. Esto indicó que la oxidación de las anteras de la variedad Capricho no tuvo un papel determinante en la inhibición de la formación de embriones y que la embriogénesis es posible aun en anteras oxidadas.

Ya que al usar las distintas concentraciones de ácido ascórbico no se logró obtener ningún embrión a pesar de que éste inhibió efectivamente la oxidación de las anteras y aunque no inhibió la oxidación de las mismas, se procedió a probar las variedades de *Capsicum* en el medio MS 1 con L-cisteína 1 mM debido a que la concentración 1 mM de L-cisteína mostró ser favorable para la formación de embriones de éstas.

En futuros trabajos es recomendable proseguir los ensayos con L-cisteína a concentraciones cercanas o menores a 1 mM.

6.3. Efecto de los medios de cultivo

- **MS 1 (0.01 mg/L 2,4-D+0.03 mg/L Cianobalamina)**

De los 4 embriones obtenidos en la variedad pimiento Capricho en el medio MS 1 + L-cisteína 1 mM, tres de ellos provinieron de la misma antera y el restante de otra antera diferente. Para el caso del material UAAN 95-155, cinco embriones se obtuvieron de una sola antera y dos de ellos de otra antera más. En los casos restantes todos los embriones provinieron de una sola antera es decir sólo respondió en este caso el 1% de las anteras.

En el medio MS 1 se obtuvo un 1% de generación de embriones para la variedad Capricho. Se logró obtener un 2% de regeneración de embriones para el material UAAN 95 14Z en el mismo medio. La respuesta de anteras y de embriones por antera fue del 0.001 (tabla 5).

- **MS 1 (0.01 mg/L 2,4-D+0.03 mg/L Cianobalamina)+L-cisteína 1 mM**

De los resultados podemos deducir que en el medio MS 1 suplementado con L-cisteína 1 mM se obtuvo que el 4% de las anteras formaron embriones para la variedad Capricho y 7% en el material UAAN 95-155 lo cual es bajo si se compara con los

resultados obtenidos por Escobar (2002) para tomate, donde encontró un 44.4 % de embriogénesis en cultivo de anteras de tomate de cáscara en las mismas condiciones.

Sin embargo, este fue el medio con un mayor índice de respuesta de anteras y de embriones por antera (0.002) de todos los medios usados.

En la Fig. 7 se muestra como los embriones emergen de la misma antera y ésta se abre para dar paso a embriones con distinto grado de desarrollo ya que no todos tienen el mismo tamaño. Se puede ver que la oxidación de la antera es notable. Algo similar se observa en la Fig. 8, donde además del fruto del material UAAN 95 155 se puede ver claramente el embrión saliendo de la antera. Esto posiblemente es consecuencia del hecho de que el desarrollo del polen no se realiza uniformemente en la antera (Pechan y Smykal, 2001).

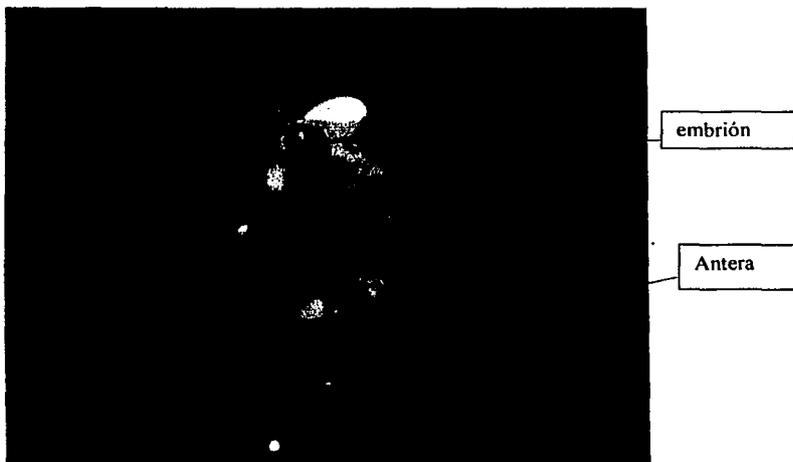


Fig. 7. Embrión de Chile pimiento Capriño (15x) emergiendo de la antera en el medio MS 1 suplementado con L-cisteína.



Fig. 8. Fruto del material WAA 95 155 (izquierda) y embrión (18x) emergiendo de una antera del mismo material cultivada en el medio MS 1 + L-cisteína 1 mM.

- MS 2 (0.1 mg/L 2,4-D+0.3 mg/L Cianobalamina)

En el medio MS 2 Escobar (2002) obtuvo un 50% de respuesta en la frecuencia de la androgénesis en *Physalis ixocarpa* Brot. *Capsicum* en el medio MS 2 no generó ningún embrión en ninguna de las variedades, observándose que las anteras se abrían originando callo de color blanco y verde el cual se necrosaba y moría. En la Fig. 9 se observa la formación de callo duro en anteras de chile ancho San Luis.

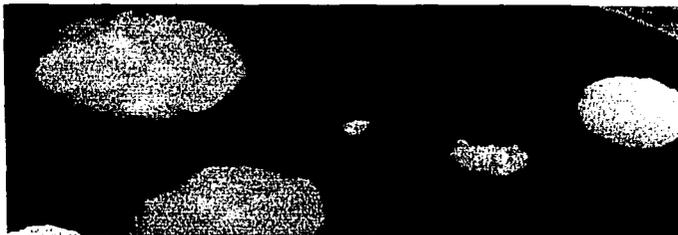


Fig. 9. Formación de callo (6x) a partir de anteras de chile ancho San Luis en el medio MS 2.

La concentración alta de 2,4-D podría ser una de las causas por la cual no se generó ningún embrión ya que esa sustancia podría haber ejercido un efecto tóxico para las microsporas. Autores como Vagera (1990) reportan el uso del 2,4-D como más adecuado en la androgénesis del chile en comparación de otros reguladores de crecimiento como la cinetina o el uso de ANA y agua de coco.

Comparando ambos medios, el MS 1 y el MS 2, los genotipos que generaron embriones en el MS 1 no lo hicieron en el MS 2 lo cual sugiere el uso de concentraciones menores a 0.1 mg/L 2,4-D y 0.3 mg/L de cianobalamina, para futuros trabajos.

En los medios MS 1 y MS 2 no se conocen los mecanismos bioquímicos de la acción de la cianobalamina sobre la androgénesis, pero probablemente interviene como coenzima (Coenzima B₁₂) de alguna reacción involucrada con el desarrollo de embriones (Escobar, 2002).

- **N-N+Carbón Activado 1%**

También se probó el medio N-N con carbón activado al 1% ya que en los experimentos llevados a cabo por Vagera (1990) en *Capsicum* se logró una regeneración de plantas a partir del cultivo de anteras de 0.017% por antera cultivada lo cual resulta ser de los índices mayores obtenidos en sus ensayos. Comparativamente los resultados en las mismas condiciones para los materiales usados se muestran en la Tabla 5. los cuales reflejan de igual forma una respuesta embriogénica muy baja. A diferencia de lo observado por Vagera y Havránek (1985) donde el carbón activado incrementó el número de embriones y prolongó su vitalidad en el medio, en nuestros cultivos se observó únicamente en algunos de los explantes de UAA 95-26 Tipo Anaheim y UAAN 99 29 mientras que en las anteras de los distintos materiales no respondieron de manera similar a lo dicho por los investigadores. Ellos han propuesto que el efecto inductivo del carbón activado en sus experimentos se debió a que este compuesto probablemente absorbe algún inhibidor de un factor promotor de la androgénesis.

En el medio N-N, el material UAA 95-26 tipo Anaheim Loulle tuvo una respuesta del 1%, lo mismo que el material UAAN 99-29 en el mismo medio. Si observamos la frecuencia de androgénesis reportada por Vagera(1990) en *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Vesna para este medio el numero de embriones por antera cultivada es de 1.07 lo cual reafirma la aseveración de que el chile presenta una frecuencia muy baja de androgénesis.

En este caso la respuesta de antera por embrión y embrión por antera fue de 0.001, similar a los resultados obtenidos en el medio MS 1.

Si consideramos los resultados de Kristiansen y Andersen (1993) para *Capsicum*, a partir de 119,782 anteras obtuvo un total de 2468 embriones lo cual corresponde a una frecuencia de 2.1 embriones por 100 anteras valor muy cercano al 2% de los resultados obtenidos. De acuerdo con Vagera (1990) la frecuencia de desarrollo de embriones a partir del cultivo de anteras *in vitro* es muy baja.

Un aspecto interesante en el desarrollo de los embriones de pimiento Capricho fue la obtención de un organismo trifoliado, y en el cual las raíces se desarrollaron rápidamente. Este embrión se obtuvo en el medio MS 1 sin adición de L-cisteína 1 mM.

La generación de embriones sólo es la fase inicial en la generación de plantas haploides, ya que la segunda fase presenta otra problemática que es el desarrollo del embrión a planta adulta.



Fig. 10. Plántula de Chile Capricho (2.5x) subcultivado en MS después de la eliminación de callo (izquierda) y la formación del callo que lo invade de nuevo (derecha).

La degeneración de los embriones hacia la formación de callo fue frecuente; por ejemplo, en la Fig. 10 un embrión de Chile Capricho al cual ya se le había extirpado el callo a nivel de la raíz, presentó indicios de nueva formación de este tejido que al final lo invadió completamente. Se usó AIA ya que las raíces presentes en los organismos eran muy delgadas y escasas lo cual requería lograr un mayor número de ellas, pero se observó un efecto adverso, esto es, la degeneración de estas plantas en callo por lo que se tuvo que disminuir la concentración de AIA a 0.1 mg/L, a esta concentración no se formó callo pero las plántulas carecían del vigor que mostraron en la concentración de 0.5 mg/L. Por otra

parte en un medio libre de AIA no se desarrollaron raíces secundarias alcanzando las plántulas un tamaño de 5 cm permaneciendo con esta talla hasta su muerte.

También se pudo observar cómo se formaron las raíces nuevamente y el tamaño considerable que la plántula que alcanzó rápidamente. Comparativamente, en la Fig.11 se observa un ejemplo de Chile Capricho desde fase de embrión a una plántula más desarrollada; con hojas bien definidas, al igual que la raíz y el tallo. Cabe mencionar, que esta planta alcanzó un tamaño de 7 cm rápidamente en dos semanas; la concentración de AIA que se usó fue de 0.5 mg/L en el medio MS 1.

En el caso del material UAAN 95 155 se obtuvieron 7 embriones que se desarrollaron hasta cierto grado de plántula es decir, desarrollando hojas. Sin embargo, signos de clorosis fueron visibles (Fig. 12 g) lo cual provocó la muerte de las plántulas.

Tabla 3. Número de embriones obtenidos de cada variedad de *Capsicum annum* por tratamiento.

Variedades	MS 1		MS 2		MS 1+ L- cisteína		N-N	
	a/e/100 ; e/a	A/e/100; e/a	a/e/100; e/a	a/e/100; e/a	a/e/100; e/a	a/e/100; e/a	a/e/100; e/a	a/e/100; e/a
Pimiento (Capricho)	1	1	-	-	2	4	-	-
UAA 95-26 Tipo Anaheim Louille	-	-	-	-	-	-	1	1
UAAN 95-155	-	-	-	-	2	7	-	-
UAAN 95 14Z	1	2	-	-	-	-	-	-
UAAN 95-26	-	-	-	-	-	-	1	1
Total	2	3	-	-	4	11	2	2
Anteras que Responden por Tratamiento	0.001		0.0		0.002		0.001	

a = anteras

$$3/400 = 0.0075$$

$$1/400 = 0.0025$$

$$1/400 = 0.0025$$

$$2/400 = 0.0050$$

e = embriones

$$1/400 = 0.0025$$



Fig. 11. Embrión 4.5 x (izquierda) en desarrollo a plántula (derecha) de *Capsicum annuum* variedad Capricho, obtenido en el medio MS 1+ L-cisteína 1 mM.

El tiempo de formación de embriones a partir de que los explantes fueron expuestos a la luz fue variable, los primeros indicios de la formación de embriones en unos casos se dio desde la primer semana, donde se observó cómo se abrían paso a través de la antera, hasta tres meses después también se podía observar el surgimiento de embriones aún en anteras oxidadas.

Toda esta problemática nos lleva a la necesidad de un estudio más detallado en la búsqueda de las concentraciones adecuadas de reguladores del crecimiento, tanto para el desarrollo de embriones como para el desarrollo de raíces en las plántulas obtenidas a partir de anteras. También debe realizarse un mayor número de pruebas acerca de los requerimientos nutritivos de las plántulas de chile cultivadas *in vitro* y del uso de antioxidantes en la prevención de la necrosis de las anteras cultivadas de esta forma.

La importancia de los pretratamientos radicó en que al someter a bajas temperaturas (4°C) las anteras, es probable que se haya promovido la división simétrica de las microsporas, y al someterlas a 35°C favorecer la expresión de cierto tipo de proteínas de

choque térmico que probablemente cambiaran el rumbo del desarrollo gametofítico a uno esporofítico (Escobar, 2002).

Por otra parte, el uso de reguladores de crecimiento en la concentración adecuada juega un papel importante para el completo desarrollo de embriones a plántulas evitando que el tejido pase por callo y de esta manera regenerar plantas vía embriogénesis directa; en los experimentos realizados por George y Narayanaswamy (1973) demostraron la importancia de la aplicación externa de auxinas para la generación de embriones sin pasar por la etapa de callo.

Aunque distintos análisis citológicos y morfológicos han demostrado la presencia de individuos haploides, diploides y triploides así como dihaploides en el cultivo de anteras *in vitro* (Vagera, 1990); no se puede asegurar que las plantas obtenidas hayan sido de origen gametofítico y por lo tanto haploides. Existe la posibilidad que estas plántulas pudieran haberse originado del tejido esporofítico proveniente de la pared de la antera. Para asegurar su origen debe realizarse un examen histológico de la antera o bien un análisis con marcadores moleculares (AFLP'S) de las plantas regeneradas.

En este trabajo se puede observar que el genotipo es determinante para la generación de embriones a partir de microsporas ya que como se puede ver existen básicamente dos genotipos (Capricho y UAAN 95-1559) los cuales reportan la mayor generación de embriones de los genotipos probados.

Los medios MS 1 y MS 2 resultaron los más exitosos para la inducción de embriones en tomate de cáscara (Escobar, 2002); en contraste, ninguno de los materiales de chile respondió al medio MS 2 y solo algunos materiales respondieron positivamente en el medio MS 1 con y sin L-cisteína. De lo anterior, se puede decir que debe existir algún factor determinante en la inducción hacia la embriogénesis de *Capsicum*. Por ejemplo, Vagera (1990) propone que la frecuencia de la androgénesis esta determinada por la presión osmótica del medio debida a los altos niveles de sacarosa presentes. De cualquier manera el trabajo para la optimización de un medio adecuado para incrementar la frecuencia de la androgénesis en chile apenas comienza.

6.4. Aportación del trabajo

Se sabe ahora que la oxidación de las anteras no es un obstáculo para la obtención de embriones a partir del cultivo de anteras de chile *in vitro*; dado que solo se usan las anteras de la primera floración se podrá disponer de un material más constante en número al no desechar las anteras oxidadas.

El medio MS 1 (0.01 mg/L 2,4-D + 0.03 mg/L cianobalamina) adicionado con 1mM L-cisteina es la base en la optimización del medio adecuado para la androgénesis del chile.

La variedad pimiento Capricho y el material UAAN 95-155 son el inicio en la obtención de haploides de chile vía androgénesis de manera extensiva y en corto tiempo.

Este trabajo es la base para el incremento de la tasa de embriogénesis de chile ya que los parámetros establecidos respecto a los medios son el comienzo en la optimización del medio de cultivo para hacer de la vía androgénica la forma más adecuada para la obtención de haploides así como también la mas económica en cuanto tiempo y recursos.

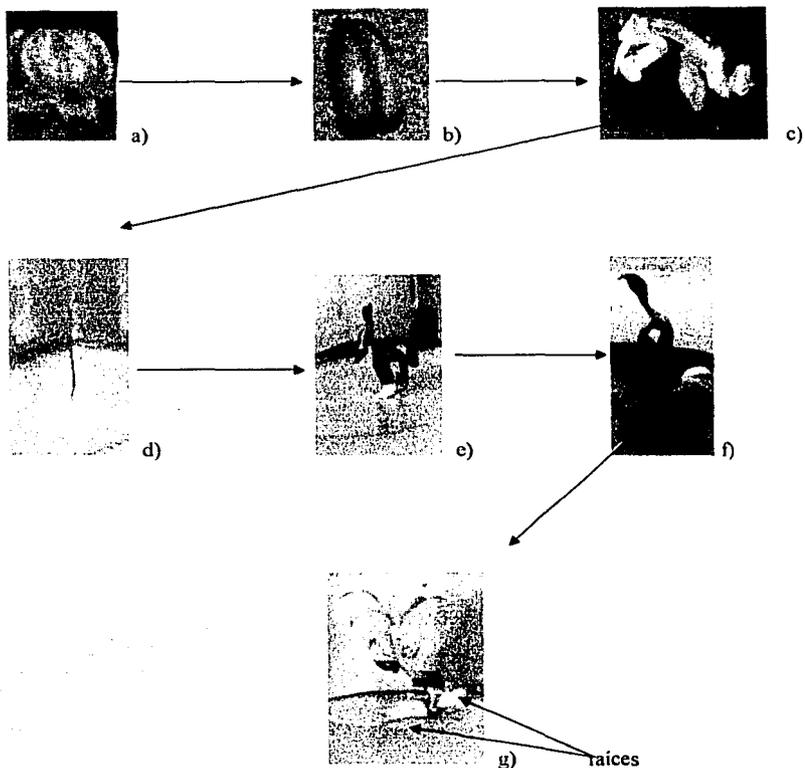


Fig. 12. Embriogénesis de chile material CIAQ 95 155. a) Botón floral (3-4 mm) del tamaño adecuado para el cultivo de anteras *in vitro*. b) antera (2.5-2.9 mm) con indicios de la tonalidad azul en uno de sus polos; c) embrión regenerado; d) embrión (separado de la antera) en desarrollo en el medio MS 1 con L-cisteína 1 mg/l; e) plántula en desarrollo; f) plántula mostrando desarrollo de raíces; g) plántula mostrando señales de clorosis.

7. CONCLUSIONES

Sobre la base de los experimentos realizados y a la literatura consultada, podemos concluir lo siguiente:

- Los botones florales con el mayor porcentaje de microsporas uninucleares laterales fueron los de 3 mm de longitud y donde la antera presento de 2.5-3 mm con una ligera tonalidad azul en uno de sus polos.
- El ácido ascórbico disminuyó la oxidación de las anteras aún a concentraciones bajas (20 y 30 mM) pero no promovió la formación de embriones..
- El mejor medio para la generación de embriones fue el MS 1 (2,4-D 0.01 mg/L + Cianobalamina 0.03 mg/L)adicionado de L-cisteina 1 mM.
- El medio MS 2 solo promovió la formación de callo no embriogénico.
- El medio N-N + carbón activado 1% solo generó el 1% de embriones para los materiales UAA 95 26 tipo Anaheim Loulle y el material UAAV 99 29.
- En el resto de los materiales y variedades la respuesta fue nula.
- Las variedades que tuvieron la mayor respuesta embriogénica fueron la UAAN 95-155 en el medio MS 1 (2,4-D 0.01 mg/L + Cianobalamina 0.03 mg/L) + L-cisteina 1 mM donde se obtuvo 7% embriones, y la variedad pimiento Capricho con 4% embriones.
- La mejor variedad en la obtención de embriones a partir de anteras fue la UAAN 95-155 y el mejor tratamiento con los mismos fines fue el MS 1 (2,4-D 0.01 mg/L + Cianobalamina 0.03 mg/L) + L-cisteina 1mM.
- El tiempo de formación de embriones a partir de que los explantes están expuestos a la luz varió desde una semana a tres meses.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Descripción botánica de *Capsicum annuum* (Pérez *et al.*, 1997)

El chile es una planta perenne, la cual Linneo en 1753-54 la colocó dentro del género *Capsicum*. Esta planta posee un sistema de raíces muy ramificado y muchos pelos radicales, llegando a profundidades de 70 a 120 cm y 120 cm de diámetro. El tallo es cilíndrico o prismático angular con ramificación pseudodicotómica. El tallo puede crecer hasta una altura de 30 a 120 cm. Los frutos poseen distintas formas y tamaños. Las semillas del chile tienen generalmente forma deprimida reniforme, lisas, sin brillo y color blanco amarillento. Las especies cultivadas en México tienen flores blancas, anteras de azul a púrpura, cáliz cerrado y típicamente nudos simples del fruto con posibles excepciones de una ocasional axila de doble flor en una horqueta más baja. Las flores se forman en los lugares en donde se ramifica el tallo; en una ramificación se forman de 1 hasta 4-5 o más flores. Las flores son hermafroditas, normalmente con 6 sépalos, 6 pétalos y 6 estambres. El chile es una planta de autofecundación facultativa (Pérez Grajales *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha comprobado también la polinización cruzada en especies cultivadas, en parte debido al viento, pero en mayor proporción debida a distintos tipos de abejas, áfidos, mariposas y hormigas como principales polinizadores (Andrews, 1995).

El género *Capsicum* pertenece a la familia Solanaceae, y se compone de aproximadamente 20 a 30 especies que crecen en los climas tropicales y subtropicales del continente americano (Pérez Grajales *et al.*, 1997).

ANEXO 2

Clasificación del genero *Capsicum* (DeWitt y Bosland, 1997).

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Solanales

FAMILIA: Solanaceae

GENERO: *Capsicum*

ESPECIE: *Capsicum annuum*

ANEXO 3

Composición química del FerviaFol.

Nitrógeno	20%
Fósforo	30%
Potasio	10%
Fierro	0.20% Quelado
Zinc	0.20%
Magnesio	0.20% Quelado
Cobre	0.05 % Quelado
Manganeso	0.05% Quelado
Boro	0.10 %
Molibdeno	0.01%
Cobalto	0.001%

ANEXO 4

Composición del medio N-N y del medio MS usados por Vagera (1990).

Componentes	MS (mg/L)	N-N (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650	720
KNO ₃	1990	950
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	166
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	68
H ₃ BO ₃	6.2	10
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	10
KI	0.83	---
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl.6H ₂ O	0.025	---
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8
Glicina	2	2
Mesoinisitol	100	100
Acido nicotínico	0.5	5
Acido fólico	---	0.5
Piridoxina (HCl)	0.5	0.5
Tiamina	0.1	0.5
Biotina	---	0.05
Carbón activado	---	1%
Sacarosa	30 g/L	20 g/L
Agar	8 g/L	8 g/L
pH del medio	5.7	5.5

9. LITERATURA CITADA

- Andrews, J. 1995. Peppers, The Domesticated Capsicum. University of Texas Press, Austin. 186 p.
- Bonet F.J., Azbaid L., Olmedilla A. 1998. New Ideas in Cell Biology. Protoplasma 202: 115-121.
- Christensen H.M and Bamford, R. 1943. Haploids in twin seedlings of pepper *Capsicum annuum* L. J. Heredity 34:99-104.
- Davies P.A., Morton, S. 1998. A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. Plant Cell Rep. 17:206-210.
- DeWitt D., Bosland, W.P. 1997. Peppers of the World. Ten Speed Press. Berkeley, California. 239 p.
- DeWitt, D. and Bosland, W.P. 1993. The Pepper Garden. Ten Speed Press. Berkeley, California. 219 p.
- Dumas de Vaulx, R., Chambonnet D., Sibi M., 1981a. Stimulation of *in vitro* androgenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.) by elevated temperature treatments. C.R. N.S.F.-C.N.R.A. Meeting, Orsay, Juillet 1980, Dr. Earle (Ed.), (sous presse). 92-98.
- Dumas de Vaulx R., Chambonnet D., Pochard, E. 1981b. Culture *in vitro* d'anthers de piment (*Capsicum annuum*): Amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotype par de traitements a +35 °C. Agronomie 1: 859-864.
- Escobar-Guzmán R, 2002. Obtención de líneas isogénicas y estudio de la variabilidad genética intra y entre variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) Tesis de Maestría. CINVESTAV-Irapuato. Guanajuato. México.
- Ezura H. 1997. Micropropagation of *Capsicum* Species (Pepper). In: Bajaj Y.P.S.(ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry 39. High-tech Micropropagation V. Springer Verlag, Berlin. 395 p.
- Gamborg O. L., Phillips G. C. 1995. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer. 349 p.

- George E. F. and Sherrington P. D. 1984. Plant Propagation by tissue culture. Exegetics Limited. Great Britain. 347 p.
- George L. and Narayanaswamy, S. 1973. Haploid *Capsicum* through experimental Androgenesis. *Protoplasma* 78:467-470.
- González M. P., Testillano S.P., Ahmadian P., Fadón B., Risueño, M.C. 1996. New *in situ* approaches to study the induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *Eur. J. Cell. Biol.* 69:373-368.
- Hartman H.T., Kester D.E., Davies Jr. F.T., Geneve, R.L. 1997. *Plant Propagation: Principles and Practices*. Prentice Hall. New Jersey. 770 p.
- Johansson L., Andersson B., Eriksson T. 1982. Improvement of anther culture technique: Activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. *Physiol. Plant.* 54: 24-30.
- Kristiansen K., Andersen S. B. 1993. Effects of donor plant, temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 67:105-109.
- Laborde-Cancino J.A. y Pozo-Campodonico O. 1984. Presente y pasado del chile en México. SARH. México, D.F. 80 p.
- Lorente-Herrera J. B. 1999. *Handbook of Agriculture*. Marcel Dekker, Inc. New York. 768 p.
- Mitykó J., Andrásfalvy A., Csilléry G., Fári, M. 1995. Anther culture response in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breed.* 114: 78-80.
- Ochoa-Alejo, N. 2002. Puro chile puro. SIHGO Gaceta regional. *Sistemas de Investigaciones regionales*. SEP.CONACYT.
- Pechan P.M., Smykal P. 2001. Androgénesis: Affecting the fate of the male gametophyte. *Physiol. Plant.* 111: 1-8.
- Pérez-Grajales. M., Márquez Sánchez F., Peña Lomelí A. 1997. *Mejoramiento Genético de Hortalizas*. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo pp. 113-143.

- Pérez Molphe Balch E. M., R. M. Ramírez., H.G.P. Núñez. y Ochoa-Alejo N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. 179 p.
- Pérez-Mora. E. 2002. Caracterización de la resistencia a geminivirus en plantas de Chile: Propagación vegetativa *in vitro* y herencia de la resistencia. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Celaya. Guanajuato. México.
- Roca, W.M y L.A. Myroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. C.I.A.T. Cali, Colombia. 969 p.
- Rzedowski, J. 1981. Vegetación de México. Editorial Limusa. México. 432 p.
- Saccardo F. and Devreux, M. 1974. *In vitro* production of plantlets from anther culture of *Capsicum annuum*. Eucarpia 1-4:45-49.
- Sibi M., Dumas de Vaulx R., Chambonnet, D. 1979. Obtention de plantes haploïdes par androgénèse *in vitro* chez le piment (*Capsicum annuum* L.). Ann. Amél. Plantes 29:583-606.
- Singh U.M., Kumar J., Sachan A., Singh, P. 1995. Use of DNA-binding fluorochromes for the nuclear staining in fungi. Mol. Meth. Plant Path. 4:53-59.
- Smykal, P. 2000. Pollen embryogenesis the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. Biol. Plant. 43:481-489.
- Thorpe T.A. 1995. *In vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, Netherlands. 558 p.
- Vagera J. 1990. Pepper (*Capsicum* spp.): *In vitro* induction of haploïds. In: Biotechnology in agriculture and forestry. 12: 347-392.
- Vagera J. and Havránek P. 1985. *In vitro* induction of androgenesis in *Capsicum annuum* L. and its genetic aspects. Biol. Plant. 27:10-21.
- Wien H.C. 1997. The Physiology of Vegetable Crops. Cab International. New York, NY. 662 p.
- www.chilepepperinstitute.org/stats.htm
- www.siea.sagarpa.gob.mx