



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CULTIVO DE CALLOS DE CHILE SERRANO
(*Capsicum annuum* L.) COMO MODELO
BIOLÓGICO: SU CARACTERIZACIÓN Y
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
ARACELI LÓPEZ DE JESÚS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL

VOCAL: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SECRETARIO: TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

1er. SUPLENTE: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

2° SUPLENTE: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 116, LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES CONJUNTO E, DPTO. DE
BIOQUÍMICA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Teresa de Jesús Olivera Flores

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en D. Aracely Arandal Martínez

SUSTENTANTE:

Araceli López de Jesús

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química y a la Sección 024 de AAPAUNAM, por el apoyo económico brindado, a través de la catedra Rosa Ma. Ramírez Gama

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por proporcionar el plásmido utilizado en este trabajo mediante su proyecto: Producción de capsinoides y capsaicinoides en chile serrano expresando la *pirofosfatasa* inorgánica soluble 4 de *Arabidopsis thaliana*.

A la Ma. En C. Mayte Olivera Flores por sus enseñanzas, el tiempo brindado y confianza, por ser una persona con una grandeza espiritual inconmensurable y vastos conocimientos que en todo momento me fueron de gran ayuda, así como toda la ayuda proporcionada a lo largo del este trabajo, y por la paciencia que siempre me tuvo.

A los proyectos PAPIIT-DGAPA-UNAM IN216815 e IN219518 y a PAIP Facultad de Química por el financiamiento para realizar la investigación.

DEDICATORIA

A mis padres Fernando y Rosalía, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y sus ganas por aprender más cada día.

A mis hermanos Ricardo y Luis A., gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida, por su ayuda indirecta y directa, por ayudarme a abrir camino a nuevas experiencias y aventuras.

A todos mis amigos que he conocido en este largo camino de estudio, en especial a mis amigos de carrera Cristian, Ángeles, Guillermo, Rubén, Christopher, Mónica, Viridiana y Noé, que aligeraron el estudio con momentos de risa y alegría, con aventuras y experiencias inolvidables. A mi amigo Alfonso por ser la única persona que entendía las historias locas que inventaba y por apoyarme en momentos de locura. A todos muchas gracias por haber estado y seguir estando en mi vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Planteamiento del problema	4
1.2. Objetivo General	5
1.3. Objetivos Particulares	5
1.4. Hipótesis	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Solanáceas	6
2.1.1. Descripción del género <i>Capsicum</i>	7
2.2. Modelos biológicos	12
2.2.1. Características.....	13
2.2.2. Ejemplos	13
2.3. Cultivo de Tejido Vegetal.....	14
2.3.1. Medios de cultivo.....	15
2.4. Vías morfogénicas.....	19
2.4.1. Embriogénesis somática.....	21
2.4.2. Cultivos de callos y células en suspensión.....	25

2.5. Propagación de Solanáceas	29
2.5.1. Micropropagación de Solanáceas.....	30
2.5.2. Regeneración del género <i>Capsicum</i>	30
2.6. Transformación genética	31
2.6.1. Métodos de transformación genética	32
2.6.2. Agentes de selección de células transformadas.....	34
2.6.3. Marcadores biológicos	35
2.6.4. Microscopia confocal de fluorescencia	37
3. METODOLOGÍA	38
3.1. Materiales biológicos.....	38
3.2. Diagrama general.....	39
3.3. Medio de cultivo	40
3.4. Método de desinfección de semilla	42
3.5. Inducción y proliferación de callo	42
3.6. Cinética de crecimiento y selección de la concentración de Basta®	43
3.7. Transformación genética por biobalística	44
3.8. Evaluación del efecto de compuestos orgánicos en callo fresco.....	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1. Germinación <i>in vitro</i> de Semillas	46
4.2. Inducción y proliferación de tejido indiferenciado	47
4.2.1. Cinética de crecimiento de callo y parámetros de crecimiento.....	49
4.3. Curva de resistencia a Basta®	53

4.4. Transformación genética	56
4.5. Evaluación del efecto de compuestos orgánicos	62
5. CONCLUSIONES	67
6. BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXO I. Mapa del plásmido pEarleyGate serie 100	82
ANEXO II. Composición de medios de cultivo y suplementos.....	83
ANEXO IV. Análisis estadístico.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Chile serrano (<i>Capsicum annum</i> L.).....	10
Figura 2. Distribución puntual del cultivo de <i>Capsicum annum</i> L. en México.	11
Figura 3. Vías morfogénicas: Embriogénesis somática (directa e indirecta) y Organogénesis.....	20
Figura 4. Curva de crecimiento típica: A. Lag; B. Exponencial; C. Estacionaria; D. Muerte.....	27
Figura 5. Célula vegetal con GFP vista en microscopio confocal.	36
Figura 6. Diagrama general del proceso realizado para <i>Capsicum annum</i> L.	39
Figura 7. Cortes de explantes de <i>Capsicum annum</i> L..	43
Figura 8. Cinética de Germinación de <i>Capsicum annum</i> L..	47
Figura 9. Inducción de callos de <i>Capsicum annum</i> L. a partir de cuatro explantes y dos medios diferentes.....	49
Figura 10. Cinética de crecimiento de dos explantes de <i>Capsicum annum</i> L., hipocótilo (A) y ápice (B).	50
Figura 11. Cinéticas de crecimiento de hipocótilo y ápice.....	51
Figura 12. Curva de resistencia al glufosinato de amonio (Basta®) de ápice (A) e hipocótilo (H) a diferentes concentraciones.	54
Figura 13. Peso fresco de callo de ápice de chile serrano al día 25 de tratamiento con Basta®.....	55
Figura 14. Peso fresco de callo de hipocótilo de chile serrano al día 25 de tratamiento con Basta®.....	55
Figura 15. Observación al microscopio de callo de hipocótilo a las dos semanas de transformación..	58
Figura 16. Observación al microscopio de callo de hipocótilo a los tres meses de transformación.	59
Figura 17. Observación al microscopio de callo de ápice a las dos semanas de transformación..	60
Figura 18. Observación al microscopio de callo de ápice a los tres meses de transformación.	61

Figura 19. Evaluación de compuestos orgánicos en la regeneración de callo obtenido del hipocótilo de chile serrano a los dos meses.	63
Figura 20. Evaluación de compuestos orgánicos en la regeneración de callo obtenido del hipocótilo de chile serrano a los seis meses.	64
Figura 21. Evaluación de compuestos orgánicos en la regeneración de callo obtenido del ápice de chile serrano a los dos meses	65
Figura 22. <i>Evaluación de compuestos orgánicos en la regeneración de callo obtenido del ápice de chile serrano a los cinco meses.</i>	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación general por jerarquías taxonómicas para <i>Capsicum</i>	8
Tabla 2. Especies y variedades dentro de la jerarquía taxonómica de <i>Capsicum</i> de acuerdo con la Red de Información de Recursos de Germoplasma.....	9
Tabla 3. Reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales..	18
Tabla 4. Algunos componentes orgánicos del agua de coco (AC).	24
Tabla 5. Medios de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Capsicum annuum</i> L.	41
Tabla 6. Medios de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Capsicum annuum</i> L. compuestos organicos	41
Tabla 7. Distribución de Transformación genética de callo proveniente de hipocótilo y ápice de chile serrano.	44
Tabla 8. Índice de germinación de semillas de <i>Capsicum annuum</i> L. que se pusieron en remojo de 48 y 72 horas.	46
Tabla 9. Índice de obtención de callo en medio MS-B5 por explante de <i>Capsicum annuum</i> L. en medio MS-B5.	48
Tabla 10. Parámetros cinéticos evaluados a dos explantes de <i>Capsicum annuum</i> L.	52
Tabla 11. Velocidad específica de varias especies vegetales.....	52

ABREVIATURAS

°C grado centígrado	IC Índice de crecimiento
μ velocidad específica de crecimiento	l litro
μM milimol	M molar
2,4-D 2,4-diclorofenoxiacético	mg miligramos
ABA ácido abscísico	min minutos
AC agua de coco	ml mililitros
ANA ácido α -naftalenacético	MS Murashige y Skoog
BA bencil adenina	N normal
BAP 6-bencilaminopurina	NaOH hidróxido de sodio
CO₂ dióxido de carbono	nm nanómetros
CONABIO Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad en México	NO₂ dióxido de nitrógeno
CTV cultivo de tejido vegetal	PAT fosfinotricina acetil transferasa
D disparo	psi pounds-force per square inch
DNA ácido desoxirribonucleico	PVP polivinilpirrolidona
ES embriogénesis somática	RNA ácido ribonucleico
ESD embriogénesis somática directa	SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
ESI embriogénesis somática indirecta	SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
Etc etcétera	SINAREFI Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura
g gramos	t tiempo
GFP Green fluorescent protein	t_d tiempo de duplicación
h hora	var variedad
H₀ hipótesis nula	
H₁ hipótesis alternativa	
ha hectárea	
HCl ácido clorhídrico	

RESUMEN

El chile serrano (*Capsicum annuum* L.) es un producto de suma importancia, ya que es uno de los chiles que más se cultiva y consume en México. Ésta especie se coloca como candidata a modelo biológico en el cultivo de tejido vegetal, puesto que es una especie fácil de mantener y que actualmente está siendo ampliamente estudiada por la producción de metabolitos secundarios, por ello se planteó como objetivo caracterizar callos de chile serrano a través de la cinética de crecimiento, obtener parámetros de transformación genética mediante biobalística, así como evaluación de compuestos orgánicos en la obtención de callo embriogénico. Para esto se germinaron semillas de chile serrano var. tampiqueño, una vez obtenidas las plántulas se realizaron cortes de cuatro explantes: hipocótilo, ápice, cotiledón y hoja primaria, las cuales se colocaron en dos medios de cultivo (MS-B5 y C20) que contenían sales MS al 100% , 30 g·L⁻¹ de sacarosa, 10 g·L⁻¹ de adenina, 50 g·L⁻¹ de ácido ascórbico y ácido cítrico, 3 mg·L⁻¹ de 2,4-D y se utilizó como gelificante agar (8 g·L⁻¹). Lo único que variaban los medios de cultivo era la adición de vitamina B5 (100%) y de Coctel 20 (100%), obteniéndose que el medio en el que se obtuvo un callo compacto y poca oxidación fue el medio MS-B5 con los explantes de hipocótilo y de ápice, los cuales obtuvieron un tiempo de duplicación (t_d) y velocidad específica de crecimiento de duplicación (μ) de 4 días y 0.173 días⁻¹ para hipocótilo y para ápice 4.78 días y 0.145 días⁻¹ respectivamente. Posteriormente se realizó una curva de resistencia a Basta® evaluándose cinco concentraciones (0, 2, 4,8 y 10 mg·L⁻¹), para ambos explantes se obtuvo que a partir de 2 mg·L⁻¹ se inhibía el crecimiento del callo. Se procedió a realizar una transformación genética vía biobalística en la que se evaluó tamaño de bala (0.4 y 0.7 μ m) y número de disparos (1D y 2D) a una distancia de 12 cm y una presión de 1100 psi, obteniéndose que para el callo de ambos explantes se requieren dos disparos pero el tamaño de bala para hipocótilo es de 0.7 μ m y 0.4 μ m para ápice. Finalmente se evaluó el efecto del agua de coco (20%) y del 2,4-D en la obtención de callos embriogénicos, obteniéndose que la presencia o ausencia estos

compuestos no ayudaron a la formación de callo embriogénico aun después de seis meses de evaluación.

Como resultado de lo anterior podemos ver que el chile serrano es un buen modelo biológico comparable a otras especies, así mismo que la caracterización realizada en cuanto a la cinética de crecimiento y transformación genética abre las puertas a futuras experimentaciones con callo de chile serrano, y que el uso del agua de coco y 2,4-D no ayudó a la obtención de callo embriogénico para una posterior regeneración vía embriogénesis somática indirecta.

1. INTRODUCCIÓN

En México se produce una gran variedad de chiles, este grupo está constituido por cerca de 64 especies vegetales (SINAREFI, 2013), de las cuales sólo cuatro se cultivan a nivel comercial y constituyen un alimento de gran importancia en la dieta del pueblo mexicano. Este cultivo se liga a la historia de México, ya que se tienen registros de su consumo de por lo menos 600 años. Las especies comestibles de mayor importancia económica en México son chile serrano (*Capsicum annuum* L.), chile tabasco (*Capsicum frutescens* L.) y chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2011). El chile serrano es uno de los cultivos más importantes en México reportándose en 2014 una superficie cosechada de 143,465.17 hectáreas con un rendimiento promedio de 19.05 t ha⁻¹ (SIAP, 2014). Además, dentro de la familia solanácea, a la que pertenecen el chile, la papa, el tomate y el tabaco, destaca el género *Capsicum* ya que a este género pertenecen varias especies que resultan ser buenas candidatas como modelos biológicos, es el caso del chile serrano ya que es una especie que se estudia ampliamente y es fácil de mantener y reproducir en un laboratorio. Por ello en el presente trabajo se propone a los cultivos *in vitro* de chile serrano como modelo biológico para el estudio de diferentes eventos bioquímicos, mediante el cultivo de tejido vegetal, el cual se basa en la totipotencialidad celular, haciendo posible cultivar bajo condiciones *in vitro*, esto es, en condiciones de asepsia, protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones y plántulas y dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células (Solís-Ramos et al., 2010). Sin embargo es importante primero caracterizar los cultivos *in vitro* en cuanto a su crecimiento y desarrollo a través de cinéticas de crecimiento, tiempo de duplicación, índice de crecimiento y velocidad de crecimiento así como su transformación genética.

En el presente trabajo se planteó como objetivo principal caracterizar y transformar cultivos de callos de chile serrano, para lo cual se realizará la

selección de medios de cultivo y explantes adecuados para la obtención de callos, seguido de una cinética de crecimiento y evaluación de diferentes concentraciones de glufosinato de amonio que permita la selección de células transformadas genéticamente vía biobalística, evaluándose el tamaño de bala y número de disparos, finalmente se planea evaluar diferentes compuestos orgánicos para la producción de embriones, como lo es el agua de coco, el 2,4-D y BA.

1.1. Planteamiento del problema

Una de las limitantes en la investigación básica y aplicada, es el contar con modelos biológicos que puedan utilizarse tanto con fines alimenticios como industriales. Hasta el momento se cuenta con algunos modelos como la *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* que han permitido el estudio de eventos bioquímicos y moleculares sin embargo se tiene la condición de que no son reproducibles en especies alimenticias, es por ello que en el presente trabajo se está proponiendo al chile serrano (*Capsicum annuum* L.) como un modelo biológico ya que además de ser una especie muy importante tanto en cultivo como en consumo en nuestro país, es un buen candidato porque tiene un ciclo corto de vida, su descendencia es numerosa, producen grandes cantidades de metabolitos secundarios, cuenta con un fenotipo sencillo de observar o medir, su reproducción es autógama, autocompatible, tiene un genoma diploide, pero principalmente su cultivo está bien establecido y es de fácil manipulación en el laboratorio.

1.2. Objetivo General

Obtener, caracterizar y transformar callos de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) mediante sus cinéticas de peso fresco y parámetros de crecimiento obtenidos de diferentes explantes, medios conteniendo algunos compuestos orgánicos, así como determinar las condiciones de transformación genética.

1.3. Objetivos Particulares

- Obtener plántulas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.).
- Evaluar cuatro explantes diferentes para la obtención de callo de chile serrano.
- Realizar la cinética de crecimiento y obtener los parámetros de índice de crecimiento y tiempo de duplicación.
- Determinar la concentración del agente de selección (Basta®).
- Caracterizar las condiciones de bombardeo de callo de chile serrano con marcador biológico GFP.
- Evaluar la transformación genética mediante la microscopia confocal.
- Comparar el efecto del agua de coco y reguladores de crecimiento en el callo de chile serrano.

1.4. Hipótesis

La caracterización y transformación genética de cultivos de callo de chile serrano permitirá la descripción del comportamiento celular bajo determinadas condiciones de cultivo *in vitro*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Solanáceas

Solanaceae proviene del latín *solamen*, que quiere decir confortar o calmar y se refiere a las propiedades sedativas de algunas de las especies. Esta familia presenta 102 géneros y 2,460 especies (Stevens, 2008) las cuales podemos encontrar distribuida en regiones tropicales y templadas. Existen en todos los continentes, pero se hallan concentradas en Australia y América Central y Sur, de donde son endémicos por lo menos 40 géneros. La gran diversidad de esta familia en América del Sur ha dado lugar a la hipótesis de que pudo originarse en este continente (Zuloaga et. al, 2009).

Las principales características de las plantas de esta familia generalmente son herbáceas, aunque también hay especies arbustivas y arbóreas, susceptibles a daño por heladas y a daño por enfriamiento. Las hojas son alternadas y las flores pentámeras perfectas, cuyos pétalos forman una corola tubular, al menos en la base, y los estambres se alternan con los cinco lóbulos de la corona. El ovario generalmente es bilocular, aunque también puede ser multilocular, con muchos óvulos en placentas axilares, y con un estilo terminal. Los frutos pueden ser bayas o cápsulas. En varias especies existe una reconocida producción de alcaloides o compuestos nitrogenados aromáticos (ej.: atropina, nicotina, solanina, tomatina, etc.) los que, en algunos casos, se usan como drogas medicinales o estimulantes pero fácilmente pueden llegar a ser tóxicos para los animales y el hombre. Esto hace que las solanáceas, en general, hayan sido consideradas como especies venenosas y motivo de desconfianza por muchos años (Martínez, 2011).

Algunas especies destacadas de esta familia son (D'Arcy, 1991):

- Plantas domesticadas: siendo las más importantes la papa, (*Solanum tuberosum* L.), el tomate (jitomate) (*Lycopersicon esculentum* L.), el chile verde

(*Capsicum* L.), el tomate verde (*Physalis* L.) y la berenjena (*Solanum melongena*)

- Plantas tóxicas: el toloache (*Datura innoxia* Mill.), la mandrágora (*Mandragora* L.), el beleño (*Hyoscyamus niger* L.) y la belladona (*Belladonna* Mill.) y algunas plantas de ornato como la petunia (*Petunia* Juss.)
- Plantas con altas cantidades de alcaloides: Flor de la tarde (*Nicotiana longiflora*), flor de sapo (*Nicotiana acuminata* var. *Acuminata*).

Como esta familia es muy grande muchos científicos voltearon a ver a varias especies de esta familia para llevar a cabo experimentos de la ingeniería genética, por ejemplo la papa, el tomate, el tabaco y la flor de la petunia que han contribuido al avance de nuevas técnicas en el mejoramiento de las plantas (López, 1997).

2.1.1. Descripción del género *Capsicum*

El género *Capsicum* pertenece a la familia *Solanaceae* e incluye diferentes variantes de chiles que se reconocen fácilmente por su tamaño, forma, color y gran de pungencia.

La clasificación taxonómica de *Capsicum* se muestra en la *Figura 1* la cual fue aceptada por la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN). El género *Capsicum* incluye 33 especies y 10 variedades (*Figura 2*). Dichas especies se han diferenciado principalmente con base en características fenotípicas como la morfología de la flor o del fruto (Latournerie et al., 2002).

Tabla 1. Clasificación general por jerarquías taxonómicas para *Capsicum*. Tomado y modificado de la base de datos del Sistema Integrado de Información Taxonómica de la Red de Información de Recursos de Germoplasma (GRIN) en línea del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (GRIN,2016).

Jerarquía	
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i> L.
Especie	<i>C. annuum</i> L.
Especie	<i>C. chinense</i> Jacq.
Especie	<i>C. pubescens</i>
Variedad	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> L.
Variedad	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>
Variedad	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>
Variedad	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>

La especie *C. annuum* es la más ampliamente distribuida en México y la que presenta la variabilidad morfológica en tamaño, forma, color de frutos (Pozo et al., 1991) y la mayor variabilidad genética. De las 33 especies de *Capsicum*, cinco se han domesticado: *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* (Kraft et al., 2014). Los estudios morfológicos en *Capsicum* se han restringido a ciertas especies, subespecies, variedades o morfotipos.

Tabla 2. Especies y variedades dentro de la jerarquía taxonómica de *Capsicum* de acuerdo con la Red de Información de Recursos de Germoplasma. Tomado y modificado de la base de datos en línea de GRIN-USDA (GRIN, 2016).

Especie de <i>Capsicum</i>	Variedad
<i>C. annuum</i> L.	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> L. <i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>
<i>C. baccatum</i> L.	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i> L. <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> <i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> <i>C. baccatum</i> var. <i>umbilicatum</i>
<i>C. buforum</i>	
<i>C. campylopodium</i>	
<i>C. cardenasii</i>	
<i>C. chacoense</i>	
<i>C. chinense</i> Jacq.	
<i>C. ciliatum</i>	
<i>C. coccineum</i>	
<i>C. cornutum</i>	
<i>C. dimorphum</i>	
<i>C. dusenii</i>	
<i>C. eximium</i>	<i>C. eximium</i> var. <i>eximium</i> <i>C. eximium</i> var. <i>tomentosum</i>
<i>C. flexuosum</i>	
<i>C. fructencens</i> L.	
<i>C. galapagoense</i>	
<i>C. geminifolium</i>	
<i>C. hookerianum</i>	
<i>C. lanceolatum</i>	
<i>C. leptopodium</i>	
<i>C. lyacanthoides</i>	
<i>C. minutiflorum</i>	
<i>C. mirabile</i>	
<i>C. mositicum</i>	
<i>C. parvifolium</i>	
<i>C. pubescens</i>	
<i>C. rhomboideum</i>	
<i>C. schottianum</i>	
<i>C. scolnikianum</i>	
<i>C. tovarii</i>	
<i>C. villosum</i>	<i>C. villosum</i> var. <i>muticum</i> <i>C. villosum</i> var. <i>villosum</i>
<i>Tubocapsum anomalum</i>	
<i>Witheringia stramonifolia</i>	

2.1.1.1. Descripción del chile serrano (*Capsicum annuum* L.)

El chile serrano pertenece al género de *Capsicum* y es uno de los chiles más cultivados en México, por su alta pungencia. Es un chile pequeño de color verde que se encuentra de forma cilíndrica, a veces su terminación es en punta,

aproximadamente mide de 3 a 5 cm de largo y un centímetro de diámetro (*Figura 3*). Su cáscara es tersa y brillante, nunca arrugada (Castañon-Najera, 2010).

Existe escasa información relacionada con el manejo de las condiciones nutrimentales de la planta y su relación con su rendimiento. El clima predominante en el que suele sembrarse el chile serrano es el subhúmedo, aproximadamente 25° C, y con precipitación de 850 milímetros (SAGARPA, 2014).

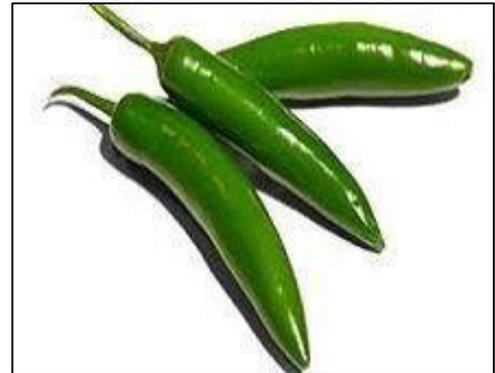


Figura 1. Chile serrano (*Capsicum annuum* L.)

El chile serrano es una planta de comportamiento anual y perenne. Su altura normal es de sesenta centímetros. Tiene tallos erectos con ramas; son de color verde oscuro. Sus raíces llegan a profundizar entre setenta y 120 centímetros. Hacia los lados también se extienden hasta un metro con veinte centímetros. Las hojas son planas, simples y de forma alargada y ovoide. Las flores son hermafroditas, y se forman en las axilas de las ramas; son de color blanco y a veces púrpura (SIAP, 2014).

2.1.1.2. Hábitat y distribución geográfica

El chile serrano tiene su centro de origen en las regiones tropicales y subtropicales de México y América, el chile serrano se cultiva en todos los estados del país. La mayor parte de la superficie cultivada corresponde a zonas de riego, excepto una pequeña superficie en los estados de Veracruz y Oaxaca en donde se cultiva en condiciones de temporal y humedad residual (Baltazar, 1997).

Generalmente se siembra como cultivo único, aunque en ocasiones se asocia, con otros cultivos, tales como maíz y frijol o bien con plantaciones de naranja, piña, plátano y papaya en estados como Veracruz y Oaxaca. Los principales

estados productores del chile serrano son San Luis Potosí, Hidalgo, Nayarit, y Tamaulipas quienes aportan más del 80% de la producción nacional (Figura 4), la cual oscila entre las 160 mil a 180 mil toneladas anuales. Otros estados productores son: Veracruz, Puebla, Nuevo León, Coahuila, Jalisco y Sinaloa (CONABIO, 2015).

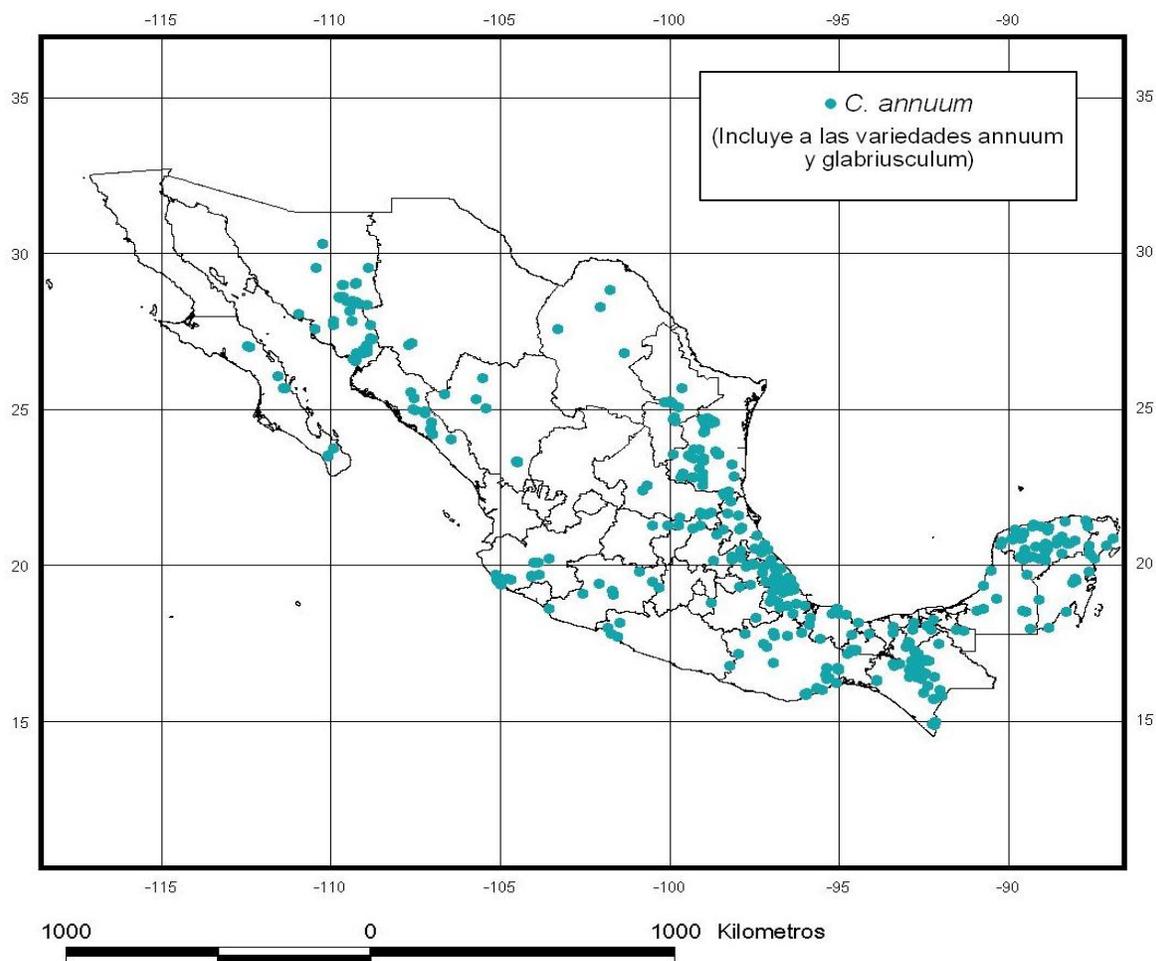


Figura 2. Distribución puntual del cultivo de *Capsicum annuum* L. en México. Tomado de Comisión Nacional para el Conocimiento y el uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2015).

2.1.1.3. Importancia económica y usos del chile

El chile serrano (*Capsicum annuum* L.) es uno de los vegetales más importantes en México, en área sembrada y valor económico para exportación. La gran variación en climas y condiciones para su desarrollo, que van desde el nivel del mar hasta los 2000 metros sobre el nivel del mar, logra una producción tanto para consumo local como para exportación durante todo el año. La superficie cosechada es de 143,975 hectáreas con un rendimiento promedio de 16.22 t ha⁻¹ (SIAP, 2014).

México exporta el chile serrano a Estados Unidos, Japón, Canadá, Reino Unido y Alemania obteniendo así el primer lugar como exportador de este producto.

Los usos que se le suelen dar al chile serrano son múltiples. Aparte del consumo en fresco, cocido, o como un condimento o "especia" en comidas típicas, existe una gran gama de productos industriales que se usan en la alimentación humana: congelados, deshidratados encurtidos, enlatados, pastas y salsas. Además, un uso de gran importancia es como materia prima para la obtención de colorantes y de oleorresinas para fines industriales. Así como en la industria cosmética usándose como ingrediente en algunos shampoos y jabones para cabello.

2.2. Modelos biológicos

Un modelo biológico u organismo modelo es una especie ampliamente estudiada y de la que se ha ido acumulando una gran cantidad de datos, además de que presentan determinadas características útiles para la investigación.

Los modelos biológicos actúan como modelos vivos sobre los cuales se pueden estudiar nuevas funciones biológicas o realizar pruebas experimentales para

obtener información acerca de otras especies que son más difíciles de estudiar directamente y que tienen similitudes con el modelo biológico (Pyke, 2009).

2.2.1. Características

Para que un organismo sea considerado modelo biológico en el cultivo de tejido vegetal debe cubrir algunas características principales como (Marsch, 2010):

- Que sea fácil de mantener y reproducir en un entorno de laboratorio
- Ciclo de vida relativamente corto
- Un fenotipo sencillo de observar o medir
- Genoma diploide
- Reproducción autógena, autocompatible y con descendencia numerosa

Existen algunas otras características que dependen del tipo de experimentación que se busca realizar o de los resultados que se buscan obtener, ejemplo de ello es la producción de metabolitos secundarios, que en algunos casos resulta de interés en la investigación científica.

2.2.2. Ejemplos

En el cultivo de tejidos vegetales se han tenido varios modelos biológicos de los cuales al paso del tiempo se han ido haciendo investigaciones que contribuyen a su caracterización, y la selección de cada uno depende del tipo de investigación que se busca realizar. Algunos ejemplos de modelos biológicos son:

- *Arabidopsis thaliana*. Esta especie presenta varias regiones duplicadas, y familias génicas numerosas en comparación con otros organismos, lo cual lo hace ideal para investigación científica (Marsch, 2010).

- *Physcomitrella patens* ha sido empleado extensivamente en estudios genéticos debido a que es un organismo altamente tolerante a la deshidratación (Engel, 1968).
- *Nicotiana tabacum*. En esta especie se han obtenido buenos resultados en el desarrollo de la transformación genética de cloroplastos (Golds et al., 1993)
- *Distichlis spicata*. Esta halófito se reproduce principalmente mediante rizomas y tiene la habilidad para adaptarse a un gran número de factores ambientales (Shahba et al., 2008).

2.3. Cultivo de Tejido Vegetal

El cultivo *in vitro* de plantas significa cultivo en vidrio, que incluye técnicas biotecnológicas destinadas a cultivar células y tejidos, regenerar nuevos órganos y multiplicar plantas masivamente en condiciones controladas y asépticas. Las plantas cultivadas *in vitro* en el laboratorio se encuentran aisladas del ambiente externo y de los patógenos, por lo que están protegidos de virus, de otras plagas y enfermedades. El cultivo en estas condiciones permite, además modificar las condiciones ambientales y nutritivas, poder controlar el desarrollo de las plantas permitiendo cultivar gran número de individuos en un espacio reducido (Dei-CSIC, 2012).

El cultivo *in vitro* es el método de cultivo de plantas que mejor controla su crecimiento y desarrollo y a diferencia a otros métodos, como el cultivo en invernadero o cultivo hidropónico, el cultivo *in vitro* permite cultivar trozos de plantas gracias a dos aspectos: al uso de hormonas vegetales y a la totipotencia de las células vegetales; una célula totipotente es como una célula madre que

puede convertirse en distintos tejidos y crear órganos como brotes y raíces que luego dan a lugar a plantas enteras a partir de una sola célula (Calva, 2005).

Esta técnica tiene numerosas aplicaciones, como la mejora genética, y permite la obtención de plantas a partir de células que tienen mutaciones o cambios genéticos favorables ya sea espontáneos o transgénicos, además gracias al cultivo *in vitro* se ha podido conocer la función de muchos genes y se han acelerado procesos que de manera natural son lentos.

Las técnicas del cultivo de tejidos pueden clasificarse dependiendo de una característica en particular.

1. Según la ruta morfogénica en cultivos organogénicos directos o indirectos o embriogénicos directos o indirectos;
2. Según el explante en cultivo de órganos, de segmentos de tejidos, de células en suspensión, de callos, de semillas, de granos de polen o de protoplastos;
3. Según el soporte en cultivos sólidos, líquidos, semisólidos y
4. Según su objetivo final para micropropagación de plantas de interés comercial o ecológico, para la producción de metabolitos secundarios y como modelos biológicos.

2.3.1. Medios de cultivo

Existen muchos medios de cultivo reportados para innumerables especies, sin embargo existen algunos medios que son ampliamente utilizados en el cultivo de tejido vegetal (CTV) que en ocasiones se suelen modificar para algunas especies:

1) Medio MS (Murashige y Skoog, 1962), que presenta altas concentraciones de nitrato, potasio y amonio.

2) Medio B5 (Gambor *et al*, 1975) se caracteriza por una alta concentración de nitrato de potasio.

3) Medios MS-SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), presentan altas concentraciones de sales y contienen hierro que forma un quelato con EDTA.

4) Medio N6 (Chu *et al*, 1972), contiene menor contenido de nitratos en comparación con el medio MS, es utilizado para especies monocotiledóneas.

5) Medios de White y de Heller (White, 1963; Heller, 1953), contiene hierro pero como sulfato y cloruro férrico

Estos medios permiten tener una base para el cultivo de tejido vegetal inicial, además los medios de cultivo deben ser suplementados con vitaminas, aminoácidos y generalmente con reguladores de crecimiento, todo de acuerdo a las necesidades de la planta o lo que se desee realizar con ésta.

Los cultivos deben mantenerse en condiciones ambientales semejantes a las naturales. La luz, la temperatura y la humedad relativa son los principales factores del ambiente que inciden sobre el crecimiento y diferenciación celular, por lo que es necesario conocer las condiciones a las que se debe cultivar la especie de interés, aunque comúnmente se utiliza el fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, para la diferenciación y regeneración de plantas, sin embargo existen algunos cultivos que requieren oscuridad (Rojas, 2004).

2.3.1.1. Reguladores de Crecimiento

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas que modulan los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas (Krikorian, 1991). Asimismo resultan útiles para el establecimiento y crecimiento de los cultivos de tejidos vegetales, así como para la producción de metabolitos (*Tabla 3*), la elección de uno de ellos depende de lo que se desee obtener en la experimentación, ya que cada uno de ellos provoca diferentes resultados al ser utilizados:

- Las auxinas son sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y formación de callo y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro* (Abel & Theologis, 1996).
- Las citocininas *in vivo* incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas. En condiciones *in vitro*, las citocininas estimulan la división y diferenciación celular (Salisbury & Ross, 1994).
- Las giberelinas regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray & Estelle, 1998), así como la maduración de los embriones somáticos.
- El ácido abscísico (ABA) actúa en control del cierre estomático. También el ABA actúa durante el desarrollo de la semilla incluyen la inducción de la dormancia, la acumulación de reservas y la adquisición de tolerancia a la desecación. Actúa en la tolerancia a estrés ambiental como condiciones ambientales adversas tales como: salinidad, sequía, y bajas temperaturas. En cultivos *in vitro* de embriones somáticos estimula el desarrollo y sincronización de éstos.
- El etileno regula diversos procesos fisiológicos como la germinación de las semillas, la senescencia de hojas y flores, la abscisión de hojas y frutos y la floración de algunas especies (McKeon et al., 1995) y el ácido abscísico provoca respuestas para proteger a las plantas contra factores como estrés fisiológico
- ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, bajas o altas temperaturas, etc. (Salisbury & Ross, 1994). Esta hormona no se utiliza en cultivos *in vitro* ya
- que induce senescencia y muerte celular.

- Las poliaminas (putrescina, espermidina, cadaverina) ejercen controles regulatorios en el crecimiento y desarrollo de las plantas (metabolismo primario), particularmente en la división celular y en la diferenciación; los jasmonatos, inhiben el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas; el ácido salicílico induce la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis, incrementa la longevidad de las flores, inhibe la síntesis de etileno y la germinación de las semillas y revierte los efectos del ABA y por último los brasinoesteroides promueven la elongación del tallo, inhiben el crecimiento y desarrollo de la raíz e inducen la biosíntesis de etileno (Davies, 1995). Las poliaminas reguladores son ampliamente utilizados en el crecimiento y, específicamente en la diferenciación celular mientras que los jasmonatos son ampliamente utilizados como elicitores en la inducción de metabolitos secundarios.

Tabla 3. Reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Tomada y modificada de Abdelnour-Esquivel & Vicent (1994).

REGULADORES DE CRECIMIENTO		Intervalo de concentración
Auxinas	AIA: Ac. indol 3 - acético ANA: Ac. naftalenacético AIB: Ac indol 3-butírico 2,4 D: Ac. 2,4 diclorofenoxiacético Picloram Dicamba	Para AIA : 1-30 mg·l ⁻¹ El resto de las auxinas: 0.1 - 2 mg·l ⁻¹
Citocininas	BAP: 6 - bencilaminopurina cinetina 6 - furfuralaminopurina Z: Zeatina TDZ: Thidiazuron	0.1 a 1 mg·l ⁻¹
Giberelinas	GA3: Ac. giberélico GA1, GA4, GA7: (giberelinas)	0.1-3 mg·l ⁻¹
Ácido abscísico	ABA	0.1-10 mg·l ⁻¹
Etileno Poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y brasinoesteroides	Putrescina Espermidina Espermina Análogos Biobras 6 Biobras 16	0.1-10 mg·l ⁻¹

2.3.1.2. Otros suplementos

Existen otros componentes que se han adicionado a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, etc. Algunos ejemplos de ellos son (Mronginski, 1991; Azofeifa, 2009):

- Agua de coco, el jugo de tomate, extracto de levadura, jugo de naranja, jugo de zanahoria y el extracto de papa, en variadas concentraciones para el aporte algunas de vitaminas y aminoácidos.
- Aminoácidos como asparagina, cisteína y L-tirosina. En general, no son constituyentes esenciales de los medios e inclusive, en concentraciones relativamente altas, pueden tener efectos inhibitorios sobre los cultivos.
- Ácidos orgánicos como el cítrico, el málico, el succínico y el pirúvico, como precursores de aminoácidos; también es frecuente la adición de L-glutamina y de caseína hidrolizada (0.1-1 %).
- Antioxidantes como el ácido ascórbico, L-cisteína y polivinilpirrolidona (PVP) pueden ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes.
- El carbón activado (0.1-5%), incorporado en el medio han mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por adsorber metabolitos tóxicos.

2.4. Vías morfogénéticas

Las vías morfogénéticas o formas de regeneración vegetal son la embriogénesis somática y la organogénesis, las cuales son vías independientes y excluyentes, reguladas por la concentración de auxinas y citocininas en el medio de cultivo. Son resultado de diferentes procesos de desarrollo, de tal forma que las células pueden ser dirigidas solo a una de las dos vías (*Figura 3*).

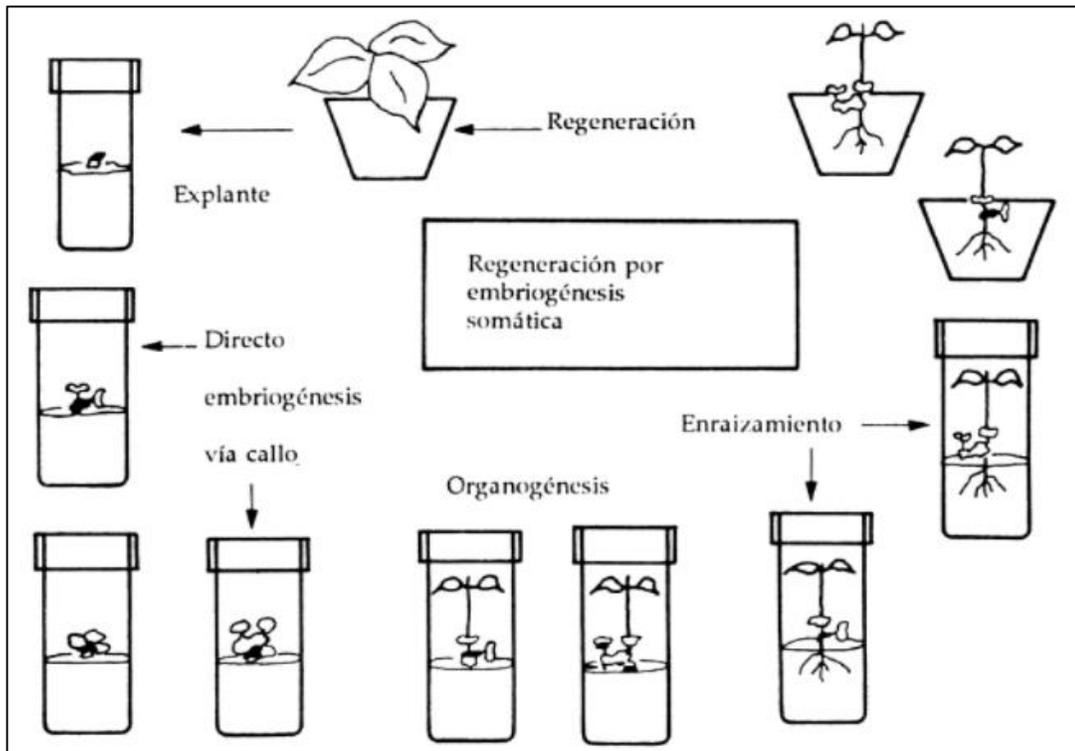


Figura 3. Vías morfológicas: Embriogénesis somática (directa e indirecta) y Organogénesis. Figura tomada de Quintero, 1993.

La organogénesis se desarrolla por inoculación de tejido meristemático estéril (yemas axilares o adventicias) en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, de compuestos orgánicos y de reguladores de crecimiento. La calidad y cantidad de los componentes del medio dependerá de la especie y del explante que se quiera cultivar *in vitro*. Los brotes pueden formarse directamente en el explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (organogénesis indirecta) (Jiménez, 1998).

Por otra parte la embriogénesis somática es la obtención de embriones a partir de células somáticas o sexuales sin que haya habido fusión de gametos, esta inducción al igual que la organogénesis puede ser directa o indirecta.

2.4.1. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática puede ser directa o indirecta, es decir se pueden obtener embriones somáticos a partir de células aisladas o utilizando callos. Los embriones somáticos (asexuales o adventicios) son aquellos que no resultan de la fusión de gametos, por lo que son estructuras bipolares en una o dos células que establecen un eje radical-apical. Estas estructuras no poseen conexión vascular con el tejido materno y son capaces de crecer y formar plantas normales (Litz & Jarret, 1991).

Generalmente se utilizan medios con bajas concentraciones o ausencia del 2,4-D para llegar a la maduración y la germinación de los embriones, además de que el contenido de nitrógeno debe ser reducido. La maduración comienza después que el embrión completa el proceso de histodiferenciación, el crecimiento por mitosis se detiene y la célula comienza a expandirse y a acumular sustancias de reserva. En esta etapa no es necesaria la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, aunque en algunas especies se recomienda el uso de citocininas y en otras la adición de ABA (Gómez-Kosky, 1998).

2.4.1.1. Embriogénesis somática directa

La embriogénesis somática directa (ESD), está asociada con un periodo relativamente corto entre el tiempo de la iniciación cotiledonal y el comienzo de la maduración de los embriones (Maheswaran & Williams, 1985). Durante este tiempo, en el explante aparece una clonación directa, desarrollándose así células embriogénicas en un estado temprano. Los explantes donde eventualmente se da la ESD son microsporas, óvulos, embriones cigóticos y somáticos inmaduros, y plántulas (Malik ed. Al, 2007)

2.4.1.2. Embriogénesis somática indirecta

La embriogénesis somática indirecta (ESI) consiste en establecer un explante en un medio de cultivo con una alta concentración de auxinas, para promover la formación de callo e iniciar la formación de proembriones o células competentes. Los callos formados son transferidos a un medio carente o con bajos niveles de hormonas, lo que facilita el desarrollo de los proembriones a embriones bipolares, los cuales en condiciones favorables pueden germinar y formar una planta (Litz & Jarret, 1991).

En la embriogénesis indirecta, existen tanto callos embriogénicos como no embriogénicos. Por lo general, es fácil distinguir entre ambos tipos de callos por su morfología y color. Los callos embriogénicos presentan características nodulares, son compactos, con una superficie lisa y un crecimiento lento, estando las células embriogénicas que forman los embriones somáticos caracterizados por ser pequeñas e isodiamétricas. Estas células tienen un gran núcleo y un citoplasma denso, poseen pequeñas vacuolas, gruesas paredes celulares y una alta actividad metabólica. Los callos no embriogénicos son rugosos, friables y translúcidos, con células irregulares que poseen grandes vacuolas (Chitra & Narmathadi, 2011).

2.4.1.3. Modulación de la embriogénesis por reguladores de crecimiento y compuestos orgánicos

En el proceso de obtención de embriones somáticos es muy frecuente el uso del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) con algunas modificaciones en el contenido principalmente de la concentración de nitrógeno, de los reguladores de crecimiento como auxinas y citocininas, y en algunos casos se utilizan compuestos orgánicos que proporcionan algunos aminoácidos y vitaminas como el jugo de tomate, zanahoria o agua de coco.

2.4.1.3.1. Auxinas

En la mayoría de los sistemas de embriogénesis somática la inducción requiere una concentración alta de auxinas o de sus equivalentes: AIA, ANA, 2,4-D; 2,4,5-trifenilimidazol, picloram y dicamba. El 2,4-D es el más utilizado y las concentraciones utilizadas son muy variables dependiendo de la especie con la que se esté trabajando ya que van desde los 0.5-27.6 μM hasta 450 μM en presencia de carbón activado (Evans et al., 1981).

2.4.1.3.2. Citocininas

Las citocininas como el BAP, la cinetina y la zeatina son a veces utilizadas en el medio de inducción de la embriogénesis somática, sin embargo son mucho más utilizadas en la fase de diferenciación y maduración del embrión somático, se adicionan en concentraciones bajas entre 0.1 a 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Malik ed. Al, 2007).

2.4.1.3.3. Agua de Coco

En 1942, van Overbeek, Conklin y Blakeslee mostraron que los embriones en desarrollo de *Datura* se podían cultivar *in vitro* hasta su madurez utilizando el endosperma líquido del coco (*Cocos nucifera*) como suplemento de un medio de cultivo estándar (Overbeek et al., 1942); así que rápidamente aparecieron otros usos del agua de coco (AC), como inductor de la división celular en tejidos diferenciados.

El agua de coco es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos (*Tabla 4*); tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y contiene sales a niveles compatibles con el cultivo de tejido vegetal. Aunque el AC es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene son indispensables, y se pueden remplazar por un medio salino basal. El contenido de azúcares totales es de alrededor de

2.5%. Adicionalmente, se encuentra en ella nitrógeno no proteínico soluble en forma de aminoácidos. La ornitina también está presente en cantidades sustanciales, aunque el contenido de muchos de estos depende del origen del AC (Azcón-Bieto & Talón, 2000).

Tabla 4. Algunos componentes orgánicos del agua de coco (AC). Tomado de Azcón-Bieto & Talón 2000.

Componentes del agua de coco	
Aminoácidos	Vitaminas
Aspártico, glutámico	Acido nicotínico
Serina, aminobutírico	Acido pantoténico
Asparagina, Glicina	Biotina, Riboflavina
β -Alanina, Treonina	Acido fólico
Histidina, Glutamina	Tiamina
Arginina, Lisina	Piridoxina
Valina, Metionina	Acido ascórbico
Tirosina, Prolina	
Homoserina	Sustancias de crecimiento
Fenilalanina	Auxina
Hidroxiprolina	Giberelina
Otros compuestos nitrogenados	1,3-Difenilurea
Amonio, Etanolamina	Zeatina
Dihidroxifenilalanina	Glucósido de zeatina
	Ribósido de zeatina
Acidos orgánicos	Otros
Shikímico, quínico	ARN-Polimerasa
Pirrolidona-carboxílico	Uracilo, Adenina
Succínico, málico	Leucoantocianinas
Cítrico y desconocidos	Fosfatasa ácida
Azúcares	Diastasa
Sacarosa, Glucosa	Deshidrogenasa
Fructuosa	Peroxidasa
Alcoholes de azúcar	Catalasa
Sorbitol	
m-Inositol	
Siloinositol	

Actualmente no se conoce la composición precisa del agua de coco, pero su uso se justifica, no solo por su excelente capacidad amortiguadora sino también porque sus cualidades promotoras del crecimiento frecuentemente son superiores en su totalidad a los de otros medios conocidos. Además de que el AC

es más barato que compuestos purificados o sintéticos tales como la zeatina o el inositol (FAO, 2007).

Un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular fue el uso del AC, ya que se demostró que a niveles relativamente bajos (5-10% v/v), podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en situaciones en que por sí sola era ineficiente. El uso de AC y de 2,4-D en tubérculos de papa y del AC y ANA en las monocotiledóneas, fueron otros progresos importantes en la regeneración de plántulas a través de la embriogénesis somática directa así como el incremento del índice de obtención de plantas regeneradas (Pérez-Ponce et al., 2000).

2.4.2. Cultivos de callos y células en suspensión

El callo es una masa amorfa de células que puede tener una variedad de colores, aspectos y grado de compactación, entre otras características dependiendo de la especie, sus células están en constante mitosis y son poco diferenciadas. Normalmente los callos no existen en la naturaleza, pero hay casos donde se presentan; la forma más usual de obtenerlos *in vitro* es colocando un explante a altas concentraciones de auxinas. Los cultivos de callos son a menudo de crecimiento lento y heterogéneo, debido fundamentalmente a la disponibilidad de los nutrientes. Para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en períodos variables según la especie (30-45 días) (Gómez Kosky, 1998). La utilidad de los callos en cultivo de tejidos es también variada, ya que son un paso intermedio en la propagación *in vitro* por embriogénesis somática, pueden utilizarse para producir metabolitos de interés o bien para estudios básicos.

El cultivo de células en suspensión se deriva del cultivo de callo en medio sólido, que se coloca como inóculo de callo en medio líquido. En algunos casos se puede

obtener una suspensión celular a partir de un explante recién extraído de la planta utilizando medio líquido.

La utilidad más grande de las células en suspensión es la producción de metabolitos secundarios importantes, algunos ejemplos son el Taxol[®] que es un antileucémico que se elabora a partir del metabolito secundario proveniente de *Taxus brevifolia* L., otro ejemplo es la *capsaicina* que se utiliza para la elaboración de salsas, como condimento en alimentos procesados y confitería (Ávalos & Pérez-Urria, 2011).

2.4.2.1. Evaluación del crecimiento de los cultivos celulares

La descripción del comportamiento del crecimiento de los cultivos celulares es de gran importancia, ya que esto nos permite conocer el momento en el que se deben realizar los subcultivos, así como el conocer el tiempo de vida de estos mismos. Existen numerosos parámetros para determinar el crecimiento de las suspensiones celulares (Street, 1977). Entre los más utilizados tenemos:

- Número de células. Para usar este método es necesario disgregar el callo en agregados de no más de 10 células, después el conteo de las células se realiza en un microscopio de uso rutinario.
- Volumen celular. En este método se toma un volumen conocido de la suspensión y se centrifuga (3 min/ para provocar la sedimentación de las células. Después se determina el volumen de éstas y se expresa en mL de células por ml de cultivo.
- Peso fresco. En un papel filtro, de peso conocido, se colocan las células lavadas con agua destilada y se pesan.
- Peso seco. Se determina igual al peso fresco, pero antes de pesar las células se secan a 60°C/12h al vacío como mínimo.

- Turbidez. La turbidez se mide en un fotolorímetro con filtro azul a 400-465 nm.

2.4.2.2. Cinética de crecimiento

El crecimiento se puede definir como el aumento irreversible de masa celular, siendo así que no cualquier parámetro sirve para expresar la tasa de crecimiento de callo. Un método que permite describir el comportamiento de un cultivo celular mediante el peso en fresco es la cinética de crecimiento, que consiste en obtener una gráfica de variación del peso en función del tiempo (t), lo que da origen a una curva sigmoidea que representa el crecimiento celular vegetal (Figura 4). A través de la cinética de crecimiento se pueden distinguir cuatro zonas o fases características (Sánchez-Calvo, 2014):

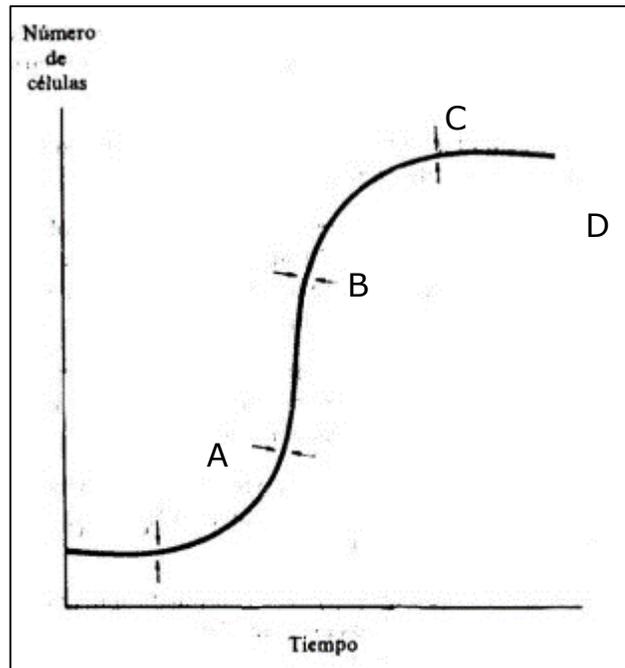


Figura 4. Curva de crecimiento típica: A. Lag; B. Exponencial; C. Estacionaria; D. Muerte.

(Figura tomada y modificada de Davis, 2002).

- *Fase Lag:* En esta fase ocurre un período de adaptación de las células de un cultivo, que son transferidas a un medio nutritivo fresco. En esta etapa se inician una serie de cambios metabólicos, entre los que se encuentran la activación del sistema energético (rutas glicolíticas y de las pentosas) lo que provoca un aumento en las concentraciones de NADH y un incremento en la actividad de invertasa, que se expresa con una síntesis mayor de pared celular y contenido

de RNA en la célula. El objeto de esta fase es preparar a las células para el proceso de división celular (Pérez & Sánchez, 2010).

- *Fase exponencial:* Es el período en el que una vez inducida la división celular, ésta sucede rápidamente. En ésta etapa las células se dividen de manera activa por lo que no se manifiestan notables cambios ni en el tamaño, ni en la diferenciación celular (Pérez, 2015). Existe un notable incremento en la captación de oxígeno (parámetro que se utiliza para evaluar proliferación celular).
- *Fase estacionaria:* Esta fase representa la detención de la división celular, también se ve disminuida la actividad de los sistemas energéticos. En esta fase se puede originar la diferenciación estructural y bioquímica del cultivo, con la consecuente activación de regiones meristemáticas presentes en los agregados. En algunos cultivos en esta etapa se activa o incrementa la producción de metabolitos secundarios, debido a la baja actividad en las rutas del metabolismo primario (Aguilar, 2008).
- *Fase de muerte:* en esta etapa los nutrientes del medio son escasos lo que lleva a la célula a la muerte (Alejo-Santiago et al., 2015).

2.4.2.3. Otros parámetros de evaluación

Existe un modelo clásico para describir la curva exponencial de crecimiento, que está referido solo al crecimiento activo, y se encuentra descrita por las siguientes fórmulas (UNSL, 2010):

$$\frac{dx}{dt} = \mu * X_0$$

$$\ln \left(\frac{X}{X_0} \right) = \mu * (t - t_0)$$

Donde X_0 es la cantidad de callo inicial y μ es la velocidad específica de crecimiento que indica que tan rápido crece un cultivo por unidad de callo.

Otro parámetro muy utilizado es el tiempo de duplicación que es el tiempo que tarda una cierta cantidad de callo en duplicarse y se calcula utilizando la siguiente ecuación (Street, 1977):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

También se utiliza el índice de crecimiento (IC), que es la relación entre la concentración final e inicial del callo y está dado por la siguiente ecuación (Street, 1977):

$$IC = \frac{X}{X_0}$$

Donde $X = X_{final} - X_0$

2.5. Propagación de Solanáceas

La propagación *in vitro* de solanáceas que más se ha estudiado en los últimos años es la de tomate, papa y chile. De ellas se pueden encontrar protocolos de obtención de callos, así como la transformación genética de algunas especies para su mejora en el cultivo en campo, resistencia a plagas, etc. También se encuentran algunas descripciones de estas especies como son la cinética de crecimiento en medio sólido y líquido. (De Silva & Senarath, 2009).

2.5.1. Micropropagación de Solanáceas

En la actualidad hay varias especies de la familia de las *Solanaceae* que se han propagado *in vitro* por lo cual ya se cuenta con suficiente información del medio de cultivo, agentes de crecimiento, condiciones, explantes, etc., un ejemplo es el tomate, sobre el que se han realizado múltiples investigaciones de micropropagación *in vitro* a partir de semillas y diferentes explantes variando las especies (Andrade, 2013). Otro ejemplo es la papa que tiene medios de cultivo ya establecidos y comprobados por varios autores para la obtención de callos a partir de nudos (Castillo, 2010; Fernández, 2010) e incluso se han realizado combinaciones de técnicas entre el CTV y la hidroponia para la regeneración de plántulas de papa (Rigato, 2001). Asimismo, el chile también ha ido adquiriendo importancia en el ámbito biotecnológico, debido a que en los últimos años se han comenzado a establecer algunos medios de cultivo para la obtención de callos de algunas especies (habanero y piquín), e incluso algunos artículos indican haber regenerado mediante organogénesis directa con grandes dificultades (Kehie,2010).

2.5.2. Regeneración del género *Capsicum*

En los últimos años la regeneración de plantas bajo condiciones *in vitro*, es una herramienta de gran importancia en la biotecnología de los alimentos, tanto que cada vez se unen más productos vegetales comestibles a la lista de protocolos que se pueden encontrar para el cultivo *in vitro* de éstos.

Pero en México el chile es un producto vegetal que no solo es muy consumido sino también es utilizado en la industria de alimentos procesados. Aunque existe una gran variedad de éstos como lo son chile de árbol, chile piquín, chile habanero, chile manzano, chile serrano, chile poblano, etc., pero algunas de estas especies del género *Capsicum* han sido utilizadas para la micropropagación

in vitro a las cuales se les han realizado mejoramientos genéticos, extracción de metabolitos, etc. (Pugliese et al., 2014).

Aunque la investigación sobre este producto ha ido en aumento, aun es difícil encontrar protocolos eficientes para la regeneración *in vitro* de varias especies de este género, sin embargo algunos de ellos sirven como base para la elección de explantes, medios, reguladores de crecimiento, vía regenerativa, etc. Muchos investigadores indican que al momento de la regeneración de plántulas se ha tenido que modificar la concentración de los reguladores de crecimiento y que el tiempo para obtener una respuesta suele ser de tres a seis meses, dependiendo de la vía regenerativa que se elija, y que el resultado final no es eficiente o que simplemente la vía utilizada no funciona. Las especies que han tenido una regeneración exitosa son el chile habanero, chile miahuateco y algunos otros artículos reportan al chile piquín. (Martínez, 2010; Jimarez, 2014; Vélez, 2010; Guzmán, 2015; Torres, 2010; Cano-Vázquez, 2013).

2.6. Transformación genética

La transformación genética de plantas se refiere al evento de introducir e integrar ADN foráneo en células vegetales y regenerar plantas transgénicas. Antes de elegir un sistema de transformación vegetal, se debe identificar el tejido o explante para la obtención de callo, establecer los agentes de selección apropiados así como su concentración. Así mismo debe conocerse si se requieren hormonas y los medios de cultivo adecuados para el callo a transformar, el plásmido que se desea introducir, y si se utiliza un gen reportero, etc. (Chaparro et al., 2005). Existen algunas especies del género *Capsicum* que cuentan con protocolos establecidos de CTV y transformación genética (habanero,

miahuateco, etc.), los cuales proporcionan toda la información anterior incluyendo el sistema de transformación junto con las condiciones.

2.6.1. Métodos de transformación genética

Los métodos de transformación desarrollados permiten la expresión transitoria o la expresión estable del ADN introducido. La expresión transitoria ocurre durante un período corto de tiempo (pocos días) o hasta culminar el ciclo de vida de la planta, pero no es heredable por la progenie. La expresión estable permite la integración del ADN foráneo al genoma vegetal y la consiguiente transmisión a las siguientes generaciones.

Los sistemas de transferencia pueden dividirse en dos grupos (Beranova et al., 2008):

I. Sistemas basados en vectores biológicos:

- Transferencia mediada por *Agrobacterium*
- Transferencia basada en virus vegetales.

II. Sistemas de transferencia directa de ADN. Sistemas basados en transferencia física, surgidos como alternativa para transformar especies no susceptibles a *Agrobacterium*, como son las monocotiledóneas:

- Transferencia por bombardeo de partículas o biobalística.
- Transferencia por cationes divalentes y/o electroporación.
- Transferencia con whiskers de carburo de silicio.
- Transferencia por microinyección.

De todos estos métodos de transformación mencionados, la más utilizada es biobalística, debido a que pueden ser utilizados una amplia variedad de tipos de

explantos para ser bombardeados y obtener plantas fértiles, no hay necesidad de utilizar vectores de transformación especializados y es el único método confiable para la transformación de cloroplastos (Cabrera-Ponce & Irapuato, 2005)

2.6.1.1. Biobalística

La transformación genética vía biobalística es un método que permite introducir ADN a cualquier tipo de célula. En este procedimiento el ADN es introducido en las células por medio de micropartículas aceleradas a altas velocidades, que atraviesan la pared y la membrana celular. Las partículas son aproximadamente esféricas (de 0.4 a 2.0 micrómetros de diámetro), están hechas de materiales densos como oro o tungsteno y se recubren con el ADN que se desea transferir a las células vegetales. Para que las micropartículas puedan atravesar las membranas celulares y llegar al núcleo de las células blanco, éstas son disparadas a gran velocidad por explosión de pólvora seca, liberación de gas comprimido a alta presión (aire, helio, CO₂ o N₂), o por una descarga eléctrica de una gota de agua. Una vez dentro del tejido vegetal el ADN se desprende de las micropartículas debido a las modificaciones del entorno iónico (Altpeter et al., 2005).

Si las partículas atraviesan las membranas y son atrapadas en el núcleo, el ADN puede integrarse de forma estable en los cromosomas mediante un proceso de recombinación al azar, lo que se considera como transformación estable. La transformación estable ocurre a muy baja frecuencia, por lo que es necesario utilizar un sistema de selección *in vitro* que permita distinguir células transformadas y no transformadas (Herrera, 2005). Para llevar a cabo la transformación es necesario establecer las condiciones como distancia, tamaño y material de la bala, presión, etc., para tener una transformación celular alta.

2.6.2. Agentes de selección de células transformadas

Los agentes de selección han sido necesarios para el desarrollo de la tecnología de transformación genética en plantas, debido a que sólo una proporción pequeña de células son transformadas y la probabilidad de recuperación de las células transgénicas sin selección es muy baja.

Se han descrito más de 50 sistemas de selección, pero sólo unos pocos han tenido una aplicación práctica (Miki y McHugh, 2004). El agente de selección suele ser un antibiótico o un herbicida, es decir, un agente tóxico para las células vegetales, aunque no hasta un punto de que los productos de las células no transformadas en proceso de muerte promuevan la muerte de las células transformadas adyacentes.

Para que las células vegetales transformadas se distingan de las que no están, las primeras deben tener un gen de resistencia, el más utilizado para Chile es higromicina (*hpt*) (Dolgov, 1998) o el gen de resistencia al herbicida Basta®, de forma que con la adición al medio de la sustancia tóxica se puedan seleccionar las células transformadas, pero previamente se debe establecer la concentración, que inhiba la regeneración para cada una de las especies, variedades y tipos de explantes.

Los marcadores de resistencia dan información a la célula, que ha incorporado el gen, una característica que la hace distinguible de las demás. Un ejemplo es el marcador de la proteína verde fluorescente, GFP (Chiu et al., 1996), que permite detectar las células transformadas de una manera no destructiva y sin necesidad de añadir ningún sustrato al medio.

2.6.2.1. Glufosinato de amonio (Basta®)

El glufosinato de amonio es un compuesto que se usa como herbicida no selectivo, de gran aceptación en la agricultura moderna ya que solo actúa sobre

los tejidos fotosintéticos. Contiene intrínsecamente al isómero L- de la *fosfinotricina*, responsable de la actividad herbicida, que inhibe la actividad de la enzima *glutamina sintetasa*, la cual interviene en la asimilación del nitrógeno y como resultado se alcanzan niveles tóxicos de amonio en las células de la planta (Soto et al, 2007).

Está registrado en más de 80 países bajo diferentes nombres tales como: BASTA®, Liberty®, Finale® y Rely®. La resistencia a este herbicida ha sido desarrollada a través de un sistema de detoxificación. La enzima *fosfinotricina acetil transferasa* (PAT) codificada por el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus* o el gen PAT de *Streptomyces viridochromogenes* convierten el glufosinato de amonio en N-acetil glufosinato que es un compuesto no fitotóxico para la planta (Bayer, 2005). Varios autores han utilizado el glufosinato de amonio para la selección de plantas transformadas en diferentes cultivos. Sin embargo, para *Capsicum annuum* L., existen escasos trabajos que describan la utilización del glufosinato de amonio para la selección de plantas transformadas. La mayoría de las investigaciones refieren el empleo de Basta® en papa o kanamicina, en tomates que son de la misma familia *Solanaceae*.

2.6.3. Marcadores biológicos

Los genes reporteros son ampliamente usados en muchos vectores de expresión para medir la actividad de distintas regiones reguladoras. Idealmente, un gen reportero debe ser fácil de ensayar, si es posible en condiciones no destructivas del tejido. Se requiere también que la actividad endógena asociada al gen reportero sea muy baja o inexistente en las plantas a transformar. Actualmente, se cuenta con un pequeño número de genes reporteros de uso frecuente, siendo los más utilizados el de la *β-glucuronidasa*, la proteína verde fluorescente (GFP),

los de *luciferasa* y, en menor grado, el de *cloranfenicol acetiltransferasa* (Díaz et al., 2004).

Los genes reporteros se han utilizado desde muy temprano como indicadores de que la transformación vegetal realmente ha ocurrido, también son usados para explorar la localización espacio-temporal de la expresión génica y para el seguimiento de un sistema de transformación.

2.6.3.1. Proteína verde fluorescente (GFP)

La fluorescencia es la emisión de radiación electromagnética en la región visible por parte de una molécula o átomo luego de la absorción inicial de un fotón. El descubrimiento de proteínas que tienen capacidad fluorescente (proteínas fluorescentes), nativas de organismos acuáticos que poseen bioluminiscencia, ha sido una revolución en la biología celular. Existen proteínas fluorescentes

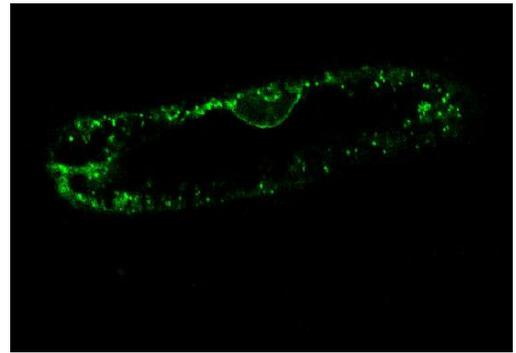


Figura 5. Célula vegetal con GFP vista en microscopio confocal.

naturales que emiten su fluorescencia en rangos de distintos colores, como rojo y verde; éste último proveniente de la medusa *Aequorea victoria*, a la que se le denomina proteína verde fluorescente nativa (Green Fluorescent Protein, GFP), esta proteína ha sido la que más impacto ha tenido debido a que permite obtener datos sobre localización, dinámica y redes de interacción molecular con otras proteínas de gran resolución temporal y espacial. (Chang, 2002; Loening et al., 2007).

La proteína GFP se considera un marcador de localización (o gen reportero) porque permite el monitoreo de los cambios bioquímicos dentro y entre las células, o de cualquier otro fenómeno dinámico que se desee observar sin

necesidad de tinción o fijación de la célula. Este marcador permite observar, de manera no destructiva y sin necesidad de añadir algún sustrato al medio, la inserción del plásmido en la célula (*Figura 5*) mediante la fluorescencia emitida (Chiu et al., 1996). Se debe monitorear de todas formas la actividad esperada del transgénico, para verificar que la transformación se llevó a cabo.

2.6.4. Microscopia confocal de fluorescencia

La microscopía confocal es una técnica, cuyo concepto fue patentado por Marvin L. Minsky en 1957. Su validez práctica se demostró en 1968, cuando los primeros microscopios basados en esta técnica fueron desarrollados por Eggar y Petran. Aun así, hasta 1987 la comunidad científica no empezó a utilizarla de forma generalizada, coincidiendo con la fabricación del primer microscopio confocal comercial por parte de White y Amos (Matsumoto, 2003). Hoy en día su utilización es prácticamente universal en el campo de la biología molecular y celular, debido a que permite el estudio de muestras orgánicas e inorgánicas que por su naturaleza fluorescente o que en su caso, estén marcadas con sustancias específicas (fluoróforos o cromóforos) para destacar rasgos de interés, en base a su composición (Rappaz et al., 2008) . La característica principal de la microscopía confocal es que recoge y detecta la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional. Otra de las principales aplicaciones de la microscopía confocal es el estudio de muestras *in vivo* (como células y tejidos animales y vegetales, embriones de insectos, algas, etc.) a lo largo de una secuencia temporal. De esta forma se obtiene una película en la que se registra el comportamiento de un sistema o estructura biológicos, a los que se les haya aplicado algún tratamiento, a lo largo del tiempo (Cavanagh et al., 2000).

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales biológicos

Para la realización de las investigaciones que se reportan en este trabajo, se utilizaron semillas de chile serrano variedad tampiqueño-74, lote 94D44633BME con una pureza del 99% de la marca ITSCO®.

Para la realización de la transformación genética se utilizó el plásmido *pEarleyGate100 Gateway*® con concentración de 1µg/µl, proporcionado por Dr. Rogelio Rodríguez del departamento de bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM. (*Anexo I*).

3.2. Diagrama general

A continuación se presenta el diagrama general (*Figura 6*) que se siguió para la caracterización de los cultivos celulares de chile serrano.

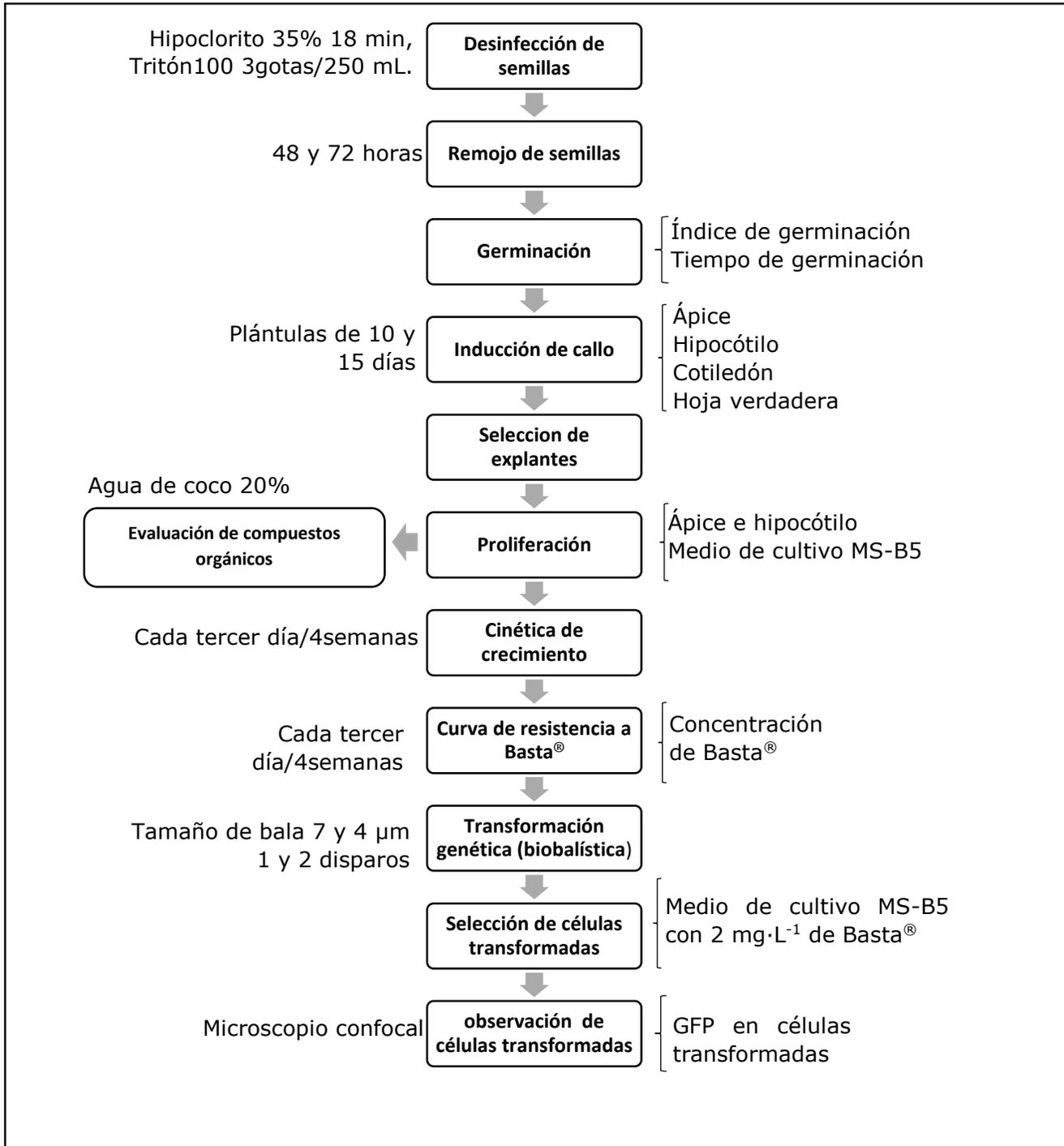


Figura 6. Diagrama general del proceso realizado para *Capsicum annuum* L.

3.3. Medio de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas (100X), utilizándose las sales inorgánicas del medio MS, suplementados con 3% de sacarosa comercial, y diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento (cuyas concentraciones se encuentran en el *Anexo II*). Así mismo, en algunos ensayos se probaron distintas concentraciones de diferentes compuestos orgánicos. Todos los medios se solidificaron con agar gel $8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, excepto el medio de germinación que se utilizó gelzán a razón de $3.3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y el medio utilizado para subcultivar los callos que se sometieron a transformación genética a los que se les aumento $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A todos los medios se ajustó el pH a 5.7 utilizando NaOH o HCl 1 N según fuera necesario con ayuda de un potenciómetro marca HANNA ph213 y una agitadora marca CORNING STIRRER. (*Tabla 5 y 6*).

Para los medios utilizados en la evaluación de compuestos orgánicos en la regeneración, se modificó el medio MS-B5 y se adicionaron diferentes concentraciones de agua de coco, 2,4-D y BA como se observa en la *Tabla 2*. Asimismo todos los medios se esterilizaron en una autoclave vertical marca AESA modelo CV300 a 121°C durante 18 minutos.

Para los medios utilizados en la evaluación de diferentes concentraciones de Basta[®] se usó el medio MS-B5 estéril a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) y se adiciono la concentración del herbicida en Campana de flujo laminar NUAIR3.

Tabla 5. Medios de cultivo *in vitro* de *Capsicum annuum* L., medio de germinación, inducción de callo (MS-B5 y Coctel 20).

Medios de cultivo		Germinación	MS-B5	C20
Sustancia		Concentración		
MS	I	100 %		
	II			
	III			
	IV			
	V			
Sacarosa		30 g·L ⁻¹		
Adenina		10 mg·L ⁻¹		
Ácido ascórbico/cítrico		0 mg·L ⁻¹	50 mg·L ⁻¹	
Cisteína				
Vitamina B5		0 %	100 %	0 %
Coctel 20			0 %	100%
Glicina		2 mg·L ⁻¹	0 mg·L ⁻¹	
AG3				
2,4-D		0 mg·L ⁻¹	2 mg·L ⁻¹	
Agargel		0	8 g·L ⁻¹	
Gelzán		3.3 g·L ⁻¹	0 g·L ⁻¹	

Tabla 6. Medios de cultivo *in vitro* de *Capsicum annuum* L., medio de evaluación de compuestos orgánicos.

Sustancia		Concentración					
MS	I	50%					
	II	100 %					
	III						
	IV						
	V						
Adenina		10 mg·L ⁻¹					
Vitamina B5		100 %					
Cisteína		50 mg·L ⁻¹					
Sacarosa		30 g·L ⁻¹					
A. Cítrico		50 mg·L ⁻¹					
A. Ascórbico							
Medio de cultivo		A	B	C	D	E	F
Agua de coco		20%	0%	20%	0%	20%	0%
2,4-D		[2-0 mg·L ⁻¹]**		[1-0 mg·L ⁻¹]**		0 mg·L ⁻¹	
BA		[0.3-6 mg·L ⁻¹]**					
Agargel		8 g·L ⁻¹					

****A partir del segundo mes se modificó la concentración de BA y 2,4-D para todos los medios.**

3.4. Método de desinfección de semilla

Siguiendo el protocolo correspondiente (*Zaragoza, 2016*) se desinfectaron las semillas: primero se enjuagaron con etanol al 70% (v/v) y después con agua estéril, posteriormente se sometieron a un lavado con hipoclorito de sodio al 35% (v/v) al que se le adicionó Tritón X-100 (2gotas/250 mL) durante 17 minutos, seguido de un enjuague con agua estéril. Finalmente se dejaron en dos tiempos de remojo (24 y 72 horas) en agua estéril (hasta cubrir las semillas) a condiciones de 25°C y fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas de oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de remojo, las semillas se colocaron en el medio de germinación y se expusieron a las mismas condiciones de fotoperiodo que las de remojo. Las observaciones se realizaron después de los tres días de haber colocado las semillas en germinación y posteriormente diario.

3.5. Inducción y proliferación de callo

Ya obtenidas las plántulas germinadas, se indujo callo de los explantes a evaluar: hipocótilo, cotiledón, ápice y hoja primaria (*Figura 7*) en medio de inducción MS-B5 (*Tabla 5*) y en caja Petri. Una vez obtenido el callo se eligieron los explantes que presentaron un callo con poca oxidación y consistencia de callo compacto y un buen crecimiento. A los callos seleccionados se les realizaron subcultivos cada dos semanas en el mismo medio pero en frasco Gerber® para su proliferación.

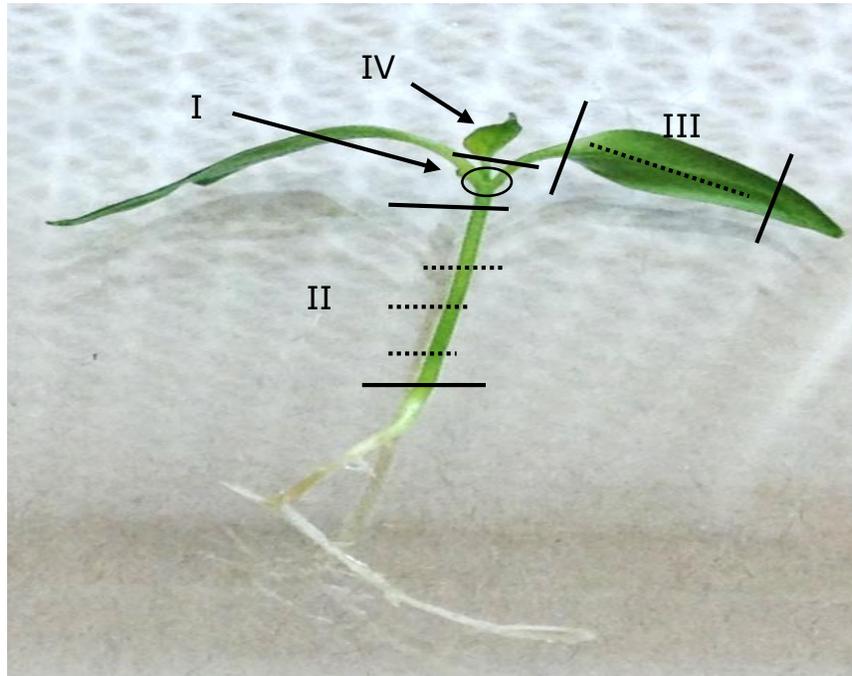


Figura 7. Cortes de explantes de *Capsicum annuum* L. donde I es ápice, II hipocótilo, III cotiledón y IV es la hoja primaria a la cual se le realizaron los mismos cortes que al cotiledón.

3.6. Cinética de crecimiento y selección de la concentración de Basta®

Para la cinética de crecimiento se pesó un gramo de callo sin oxidación y se colocó en medio MS-B5, se realizaron cinco repeticiones y se pesó cada tercer día por cuatro semanas, lo mismo se hizo para la selección de la concentración de Basta® solo que al medio MS-B5 se adicionaron diferentes concentraciones del herbicida (de 0, 2, 4, 8 y 10 mg·L⁻¹). De igual manera se realizaron cinco repeticiones de cada concentración y se pesaron cada tercer día durante cuatro semanas. Al final con los datos obtenidos se obtuvo el peso promedio de cada uno de los tratamientos y se realizó una curva para una mejor visualización del efecto del Basta® sobre el callo fresco de chile serrano.

3.7. Transformación genética por biobalística

Para la transformación vía biobalística el callo de chile serrano que se utilizó se subcultivó previamente (8 días antes) en medio MS-B5 con un aumento de concentración de agar de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Así mismo se preparó todo el material a requerir durante la transformación genética: las puntas, tubos Eppendorff, portafiltros y membranas de nitrocelulosa de $0.22 \text{ }\mu\text{m}$, se esterilizaron en autoclave. Y se solicitó la preparación de las balas ($4 \text{ y } 7 \text{ }\mu\text{m}$), el plásmido (GFP) y los demás reactivos a utilizar (etanol HPLC y al 70%, CaCl_2 , isopropanol, espermidina y agua desionizada estéril) al laboratorio 116 de CTV, de la Facultad de Química.

En la transformación realizada se evaluó el tamaño de bala de tungsteno ($0.7 \text{ }\mu\text{m}$ y $0.4 \text{ }\mu\text{m}$) y número de disparos (uno y dos), manteniéndose una distancia entre la pistola y el explante de 12 cm y una presión de disparo de 1100 psi y se llevó a cabo siguiendo el protocolo correspondiente de Guerrero-Andrade (1998), en una cámara de biobalística marca BIO RAD PD/100, la transformación genética de callos de hipocótilo y de ápice (*Anexo III*). Para cada uno de los explantes se realizaron 32 cajas Petri repartiéndose como se muestra en la *Tabla 7*, en las que los controles de cada una de las evaluaciones se sometieron a las mismas condiciones sustituyendo sol la adición del plásmido por agua estéril.

Tabla 7. Distribución de Transformación genética de callo proveniente de hipocótilo y ápice de chile serrano.

Distancia	Tamaño de bala	No. de disparos	Repeticiones
12 cm	0.7 μm	1	5 +3 controles
		2	5+3 controles
	0.4 μm	1	5+3 controles
		2	5+3 controles
Total			32

Una vez transformados los callos de ápice e hipocótilo se colocaron en selección, con la concentración de Basta® obtenida anteriormente, por un periodo de tres semanas. Transcurrido este tiempo se realizó una observación en microscopio confocal de fluorescencia (40x) FluoView™1000 marca OLYMPUS, de estas células transformadas para detectar la presencia del gen reportero GFP, el cual indicó si la transformación se llevó a cabo y si el plásmido se expresaba. Finalmente los callos se dejaron en medio de selección durante dos meses posteriormente se colocaron en medio MS-B5 durante un mes más, y se realizó una observación al microscopio confocal.

3.8. Evaluación del efecto de compuestos orgánicos en callo fresco

Para observar el efecto que tenían los compuestos orgánicos en la regeneración de chile serrano se probaron diferentes concentraciones de agua de coco, 2,4-D y BA (*Tabla 6*), en la que se realizó cinco repeticiones de cada medio de cultivo para cada explante (ápice e hipocótilo), colocándose un gramo de callo de chile serrano, en frascos Gerber® y se colocó en condiciones de incubación de 25°C y fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas de oscuridad. Cada tercer día se observaron los cambios que tenían los callos y cada 10 días se realizaron los subcultivos a medio de cultivo nuevo. Al segundo mes se realizaron cambios en la concentración de BA la cual se aumentó a los medios E y F a 2 mg·L⁻¹ y los demás se mantuvieron durante dos subcultivos. Consecutivamente se fue aumentando la concentración de BA y disminuyendo la concentración del 2,4-D a todos los medios. Hasta que finalmente para los medios A y B se llegó a una concentración de 0 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 2 mg·L⁻¹ de BA; para los medios C y D 0 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg·L⁻¹ de BA; y para los medios E y F se llegó a una concentración final de 6 mg·L⁻¹ de BA. Las observaciones finales obtenidas fueron después de seis meses de haber colocado el callo en los medios de cultivo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Germinación *in vitro* de Semillas

Durante la germinación de semillas no se observó contaminación bacteriana o de otro microorganismo en ninguna de las repeticiones, por lo que no se obtuvo índice de contaminación, solo el índice de germinación (*Tabla 8*). Para las semillas que se dejaron en remojo, las que se dejaron 72 horas alcanzaron un alto índice de germinación, ya que como lo indica García (2010) y Martín & Isabel (2015) en la evaluación de remojo de semilla de chile piquín y de chile habanero, lo que provoca el remojo de las semillas es el ablandamiento del pericarpio provocando una rápida germinación, y esto es lo que se obtuvo con las semillas de chile serrano con un 94 y 96 por ciento de germinación de semillas para ambos tratamientos. Estadísticamente (*Anexo IV-A*) no existen diferencias significativas entre los tratamientos pero como se muestra en la *Figura 8*, el tiempo en que se obtuvo la germinación de las semillas para cada uno de los tratamientos fue diferente. Las semillas que se dejaron remojando 72 horas germinaron en 10 días y las semillas de 48 horas de remojo tardaron cinco días más en germinar, por lo cual se decidió trabajar con las semillas en remojo de 72 horas en posteriores germinaciones.

Tabla 8. Índice de germinación de semillas de *Capsicum annuum* L. que se pusieron en remojo de 48 y 72 horas.

PARÁMETROS		Medio de germinación
No. de semillas		80
% de germinación	48 horas	94
	72 horas	96

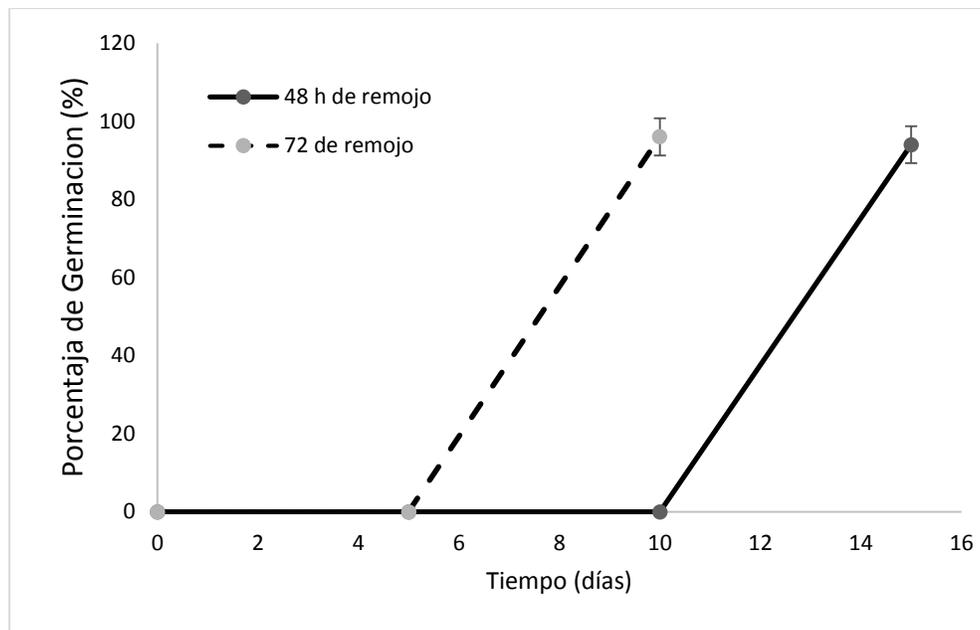


Figura 8. Cinética de Germinación de *Capsicum annuum* L. Evaluación de dos tiempos de remojo de semillas (48 y 72 horas).

4.2. Inducción y proliferación de tejido indiferenciado

En la inducción de callo a partir de cuatro explantes diferentes en dos medios distintos (MS-B5 y C20) se obtuvieron los resultados de la *Tabla 9*, en los cuales se observa que para el hipocótilo y el ápice en medio MS-B5 se obtuvieron altos índices de explantes con callo, así mismo se observó que el callo de éstos dos explantes comenzó a formarse a partir de la primera semana después de haber colocado los explantes en inducción, y a partir de la tercera semana ya se tenía un callo compacto, con poca oxidación y de color amarillento (*Figura 9*). Para los callos de cotiledón y hoja primaria en medio MS-B5 se observó la formación de callo el día 15, y a partir de la cuarta semana comenzó a presentar un callo semicompacto, hiperhidratado y con alta oxidación.

En el medio C20 se observó en los cuatro explantes un bajo índice de crecimiento, además de que a partir de la primera semana de haber inducido callo se comenzó a presentar oxidación de algunos explantes, y no hubo formación de callo. Después de la segunda semana algunos explantes que presentaron formación de callo comenzaron a hiperhidratarse y algunos otros se oxidaron.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en trabajos experimentales de Guzmán, Ruiz y Rebaza (2015) con el chile habanero, en el que señalan al medio MS adicionado con 2,4-D como el que presentó formación de callo en los explantes de cotiledón, ápice e hipocótilo, así mismo Parra-Vega (2015) indica que el mejor explante de pimiento fue el hipocótilo en medio MS con adición de vitaminas, antioxidante, aminoácidos y 2,4-D el que presentó un callo compacto, con baja oxidación e hidratación.

Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico (*Anexo IV-B*) y se obtuvo que existía diferencia significativa entre los medios de cultivo utilizados, pero en cuanto a los explantes no existía ninguna diferencia significativa, por lo cual se eligió el mejor medio y los dos explantes que presentaron un crecimiento de callo mayor, quedando así como explantes hipocótilo y ápice en medio MS-B5.

Tabla 9. Índice de obtención de callo en medio MS-B5 por explante de *Capsicum annuum* L. en medio MS-B5.

PARÁMETROS		Medio MS-B5	Medio C20
No. Explantes		50	50
% de explantes con callo	Hipocótilo	98	16
	Cotiledón	76	32
	Ápice	96	12
	Hoja primaria	82	34

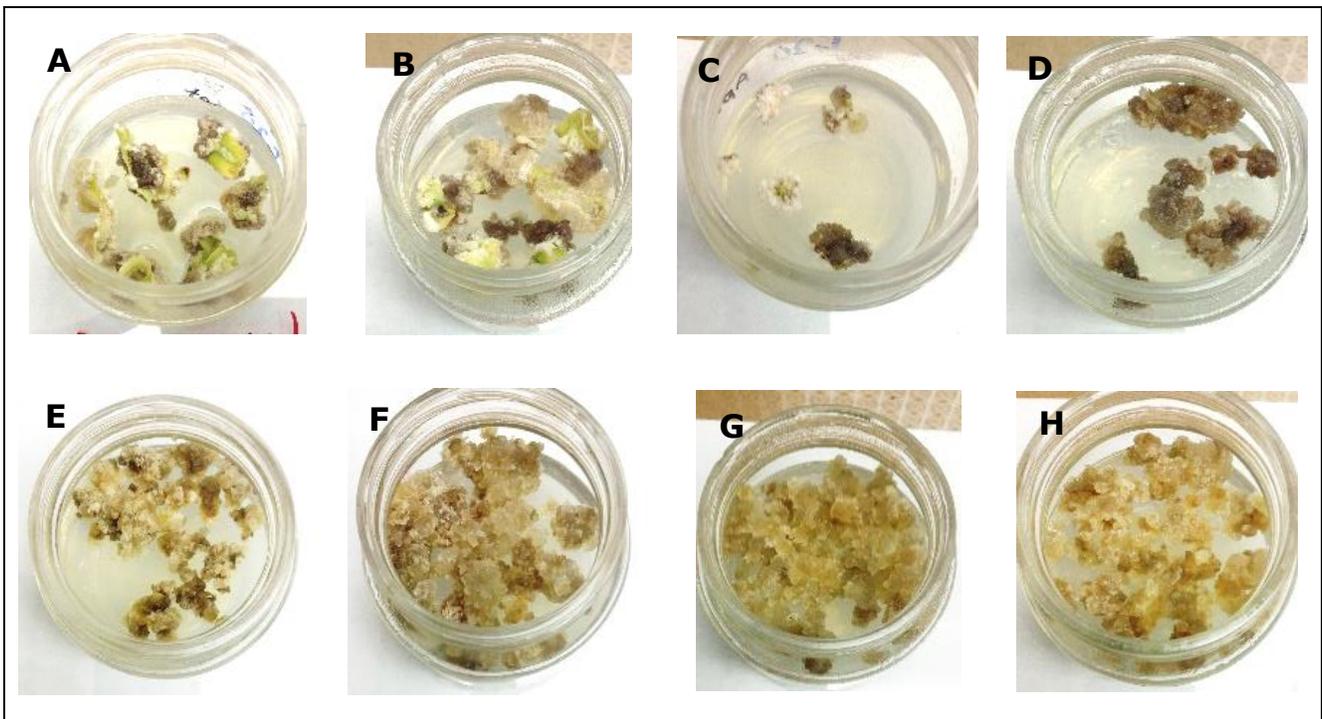


Figura 9. Inducción de callos de *Capsicum annuum* L. a partir de cuatro explantes y dos medios diferentes. A: hoja verdadera en C20, B: Cotiledón en C20, C: ápice en C20, D: hipocótilo C20, E: hoja verdadera en MS-B5, F: cotiledón en MS-B5, G: ápice en MS-B5 y H: hipocótilo en MS-B5.

4.2.1. Cinética de crecimiento de callo y parámetros de crecimiento

Como se observa en la *Figura 10*, la cinética de crecimiento de los dos explantes seleccionados, ápice e hipocótilo, presentan tres etapas visibles del ciclo celular vegetal: *Lag*, *Exponencial* y *Desaceleración*.

La etapa *Lag* es la etapa que va desde el día 0 al 5, para ambos explantes, en esta etapa se observa un crecimiento lento debido a la baja división celular, es decir las células se están adaptando a una condición nueva en cuanto al potencial osmótico y los niveles de sales y compuestos orgánicos del medio de cultivo.

Al final de la etapa anterior y al inicio de la etapa exponencial las células comienzan la síntesis de ADN dando lugar a la mitosis (Camacho, 2014). Esta

transición de etapas debe ser identificada para verificar la inserción del nuevo ADN del plásmido al ADN nuclear (ADN_n), por estar las cadenas del ADN_n de la célula vegetal abiertas. Durante esta etapa se obtendrá una mayor probabilidad de que la inserción ocurra y se obtenga una mayor cantidad de células transformadas, aunque también dependerá de otros factores como lo son el tamaño de bala, presión de disparo, distancia de disparo, etc.

En la etapa *exponencial* que va de día 5 al 15 y del 5 al 10 para hipocótilo y ápice respectivamente, el callo tiene un crecimiento constante debido a una alta división celular, obteniéndose así al final de esta etapa, un peso tres veces superior al inicial para el hipocótilo y dos veces más para el ápice. Durante esta etapa se pueden realizar los subcultivos del callo para garantizar que las células se encuentran en crecimiento activo, manteniéndose su proliferación.

En la etapa de *desaceleración* para el hipocótilo se observa como el callo aumenta su peso en fresco un gramo más del que tenía en la etapa exponencial y sigue creciendo pero más lento debido a que los nutrientes del medio de cultivo disminuyen; en la *Figura 10-B* se observa que el ápice entra a ésta etapa a partir del día 10 y el hipocótilo entra en el a partir del día 8.

Posteriormente hay dos etapas más, que son la etapa *estacionaria* y la de *muerte*, que en las curvas obtenidas no se observan debido a que suceden posteriores a los 25 días de la evaluación.

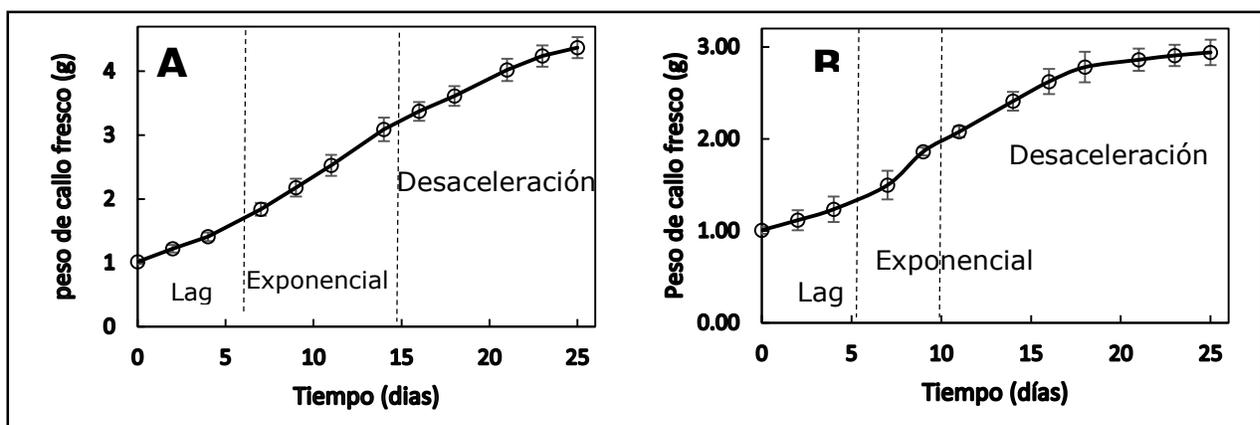


Figura 10. Cinética de crecimiento de dos explantes de *Capsicum annuum* L., hipocótilo (A) y ápice (B). Se observan tres etapas de la curva típica de crecimiento de callos: Etapa Lag, Exponencial y Desaceleración.

Así mismo en la *Figura 11* se puede observar con mayor claridad que hay una diferencia en la cinética de crecimiento entre ambos explantes, y esto es debido a que el tamaño de la célula del ápice es más pequeña comparada a la célula del hipocótilo (Arbo & González, 2006), además de que el crecimiento de las células del ápice se dan por la formación de nuevos protoplasmas (crecimiento plasmático) y las células del hipocótilo crecen por el aumento del tamaño de las vacuolas (crecimiento por dilatación), por lo que al final de la cinética de crecimiento se tiene un peso en fresco de hipocótilo mayor al de ápice.

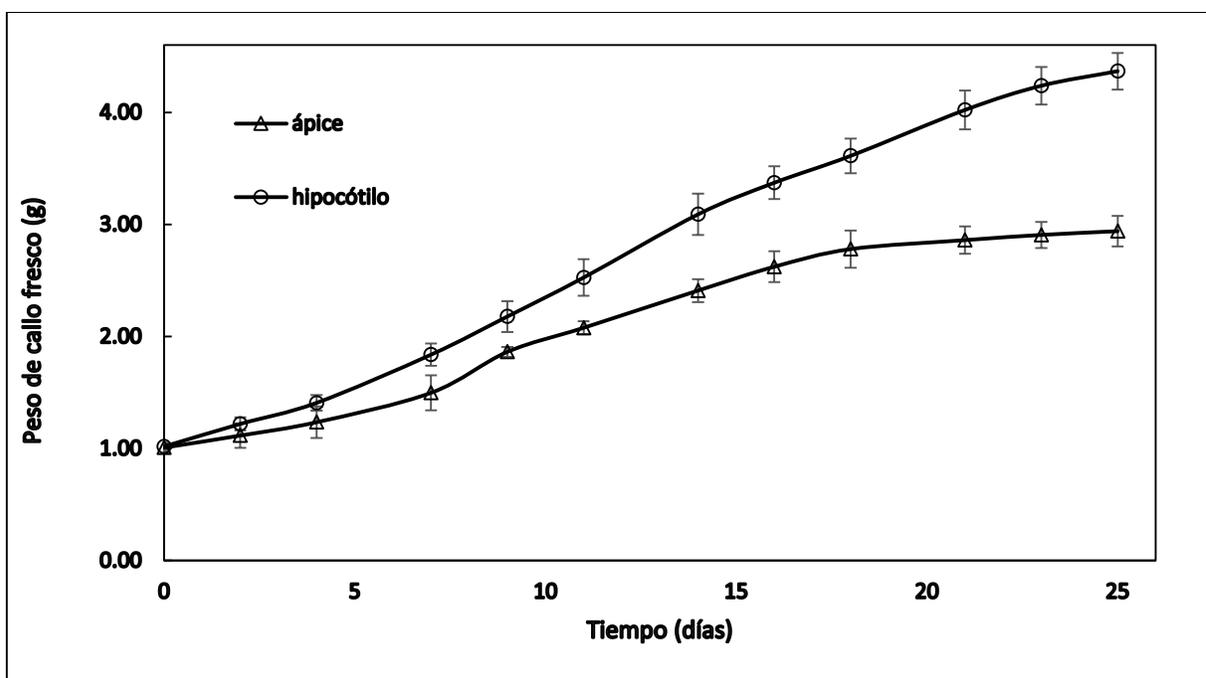


Figura 11. Cinéticas de crecimiento de hipocótilo y ápice. Comparación de las curvas de crecimiento de los dos explantes de *Capsicum annuum* L. en el que se observa un aumento mayor en peso de callo fresco de hipocótilo sobre ápice.

A partir de los datos obtenidos en la cinética de crecimiento (peso fresco) se realizaron los cálculos de índice de crecimiento (**IC**), velocidad específica de crecimiento (**μ**) y tiempo de duplicación (**t_d**), obteniéndose los valores de la *Tabla 10*, donde se comparan los parámetros mencionados entre el hipocótilo y el

ápice, destacándose que tanto el índice de crecimiento como la velocidad específica son mayores en hipocótilo y por ende el tiempo de duplicación es mayor en el ápice.

Tabla 10. Parámetros cinéticos evaluados a dos explantes de *Capsicum annum* L.: Índice de crecimiento (IC), Velocidad específica (μ) y Tiempo de duplicación (td).

Parámetros Explante	Índice de crecimiento	Índice de crecimiento (g-días ⁻¹)	Tiempo de duplicación (días)	Velocidad específica de crecimiento (días ⁻¹)
Ápice	1.93	0.077	4.78	0.145
Hipocótilo	3.35	0.134	4.00	0.173

Esto puede observarse de forma más concreta en la *Figura 11*, donde se comparan las curvas de crecimiento de dichos explantes. Comparando los valores obtenidos para chile serrano con algunas especies vegetales (*Tabla 11*) podemos observar que el chile serrano presenta una velocidad específica muy parecida a la de *Taxus chinensis* y de *Nicotiana tabacum*, posicionando al callo de chile serrano como un callo de crecimiento rápido, lo cual es de importancia en un modelo biológico, en el que se busca tener en menor tiempo una mayor cantidad de callo para su uso en experimentación.

Tabla 11. Velocidad específica de varias especies vegetales. Imagen tomada y modificada de Bran, 2010

Especie	Velocidad específica (μ) días ⁻¹	Tiempo de duplicación (días)
<i>Taxus chinensis</i>	0.120	5.77
<i>Coffea arabica</i>	0.060	11.55
<i>Nicotiana tabacum</i>	0,042-1.10	16.5-0.6
<i>Panax ginseng</i>	0.17	4.07

4.3. Curva de resistencia a Basta®

La *Figura 12* presenta la curva de resistencia a Basta® en callos de dos diferentes explantes de chile serrano. En los primeros cinco días para el explante de hipocótilo no tuvo ningún efecto ya que el crecimiento del callo fue mayor al control, esto como mecanismo de acción de las células (Vega et al., 2001) contra el glufosinato de amonio; pero a partir del día 5 se comienza a ver el efecto del herbicida ya que justo desde ese día el crecimiento del callo es casi nulo que se mantiene durante los días subsecuentes hasta llegar a un peso final de entre 1.5 a 2 g de callo fresco. En el caso de la concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Basta® se puede notar que desde el inicio estuvo por debajo del control por lo que esta concentración es un exceso de uso durante la selección de células transformadas ya que al final de los 25 días se obtuvo un resultado similar a las demás concentraciones.

En el caso de ápice podemos ver como desde los primeros días ocurre una disminución del peso fresco que permanece constante conforme pasa el tiempo, indicando un efecto más rápido del herbicida sobre las células del ápice en comparación a las de hipocótilo.

Para ambos explantes se obtuvo finalmente que la concentración mínima para la posterior selección de células es de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Basta® (*Anexo IV-C*), debido a que estadísticamente no hay diferencia significativa entre los tratamientos, que se puede observar más claramente en las *Figuras 13 y 14* en las que el peso final obtenido al día 25 de cada uno de los tratamientos no están muy alejados el uno del otro, más sin embargo entre explantes si se observa una diferencia de casi un gramo entre los pesos finales de éstos.

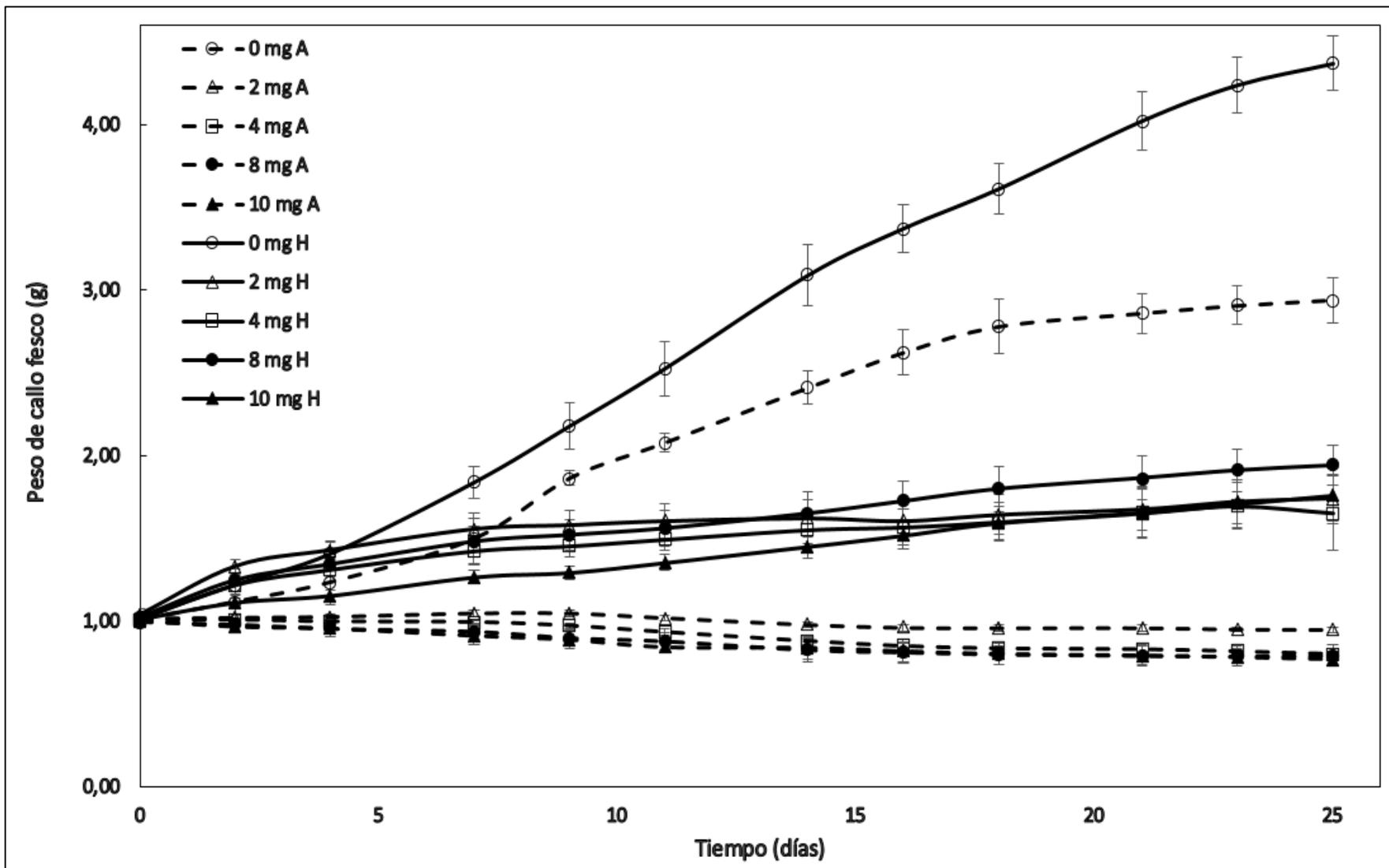


Figura 12. Curva de resistencia al glufosinato de amonio (Basta®) de ápice (A) e hipocótilo (H) a diferentes concentraciones. El ápice resultó ser más sensible al Basta® ya que no presentó aumentos significativos de peso de callo fresco a la concentración mínima.

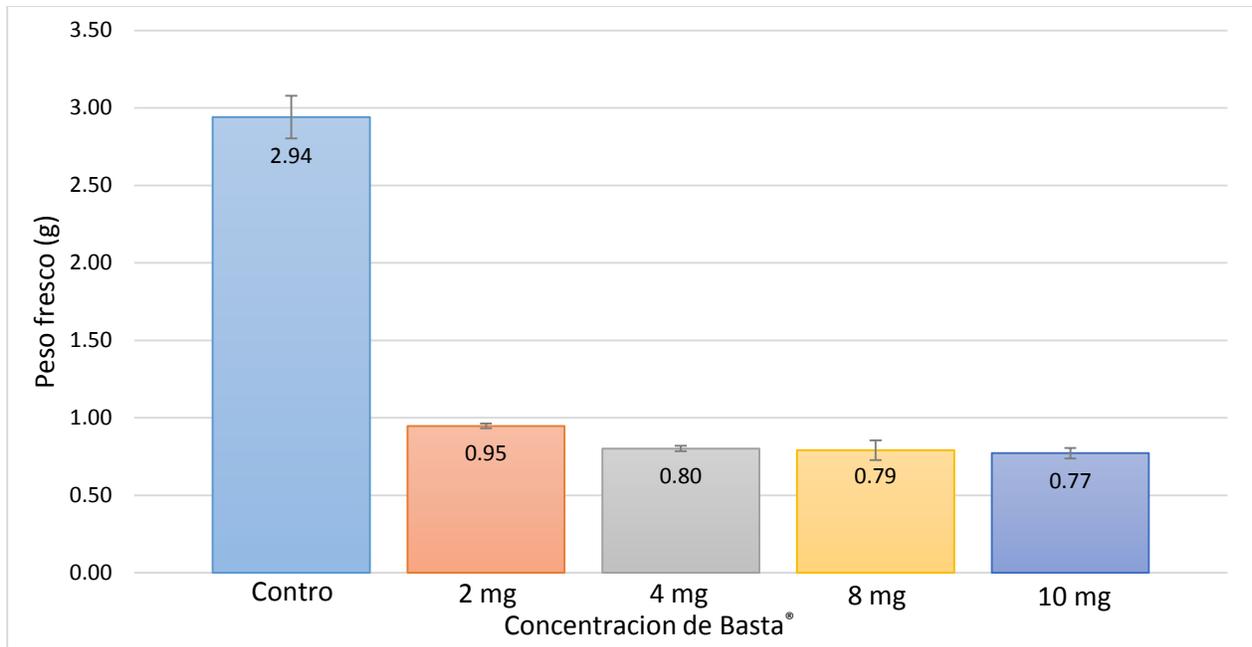


Figura 13. Peso fresco de callo de ápice de chile serrano al día 25 de tratamiento con Basta®.

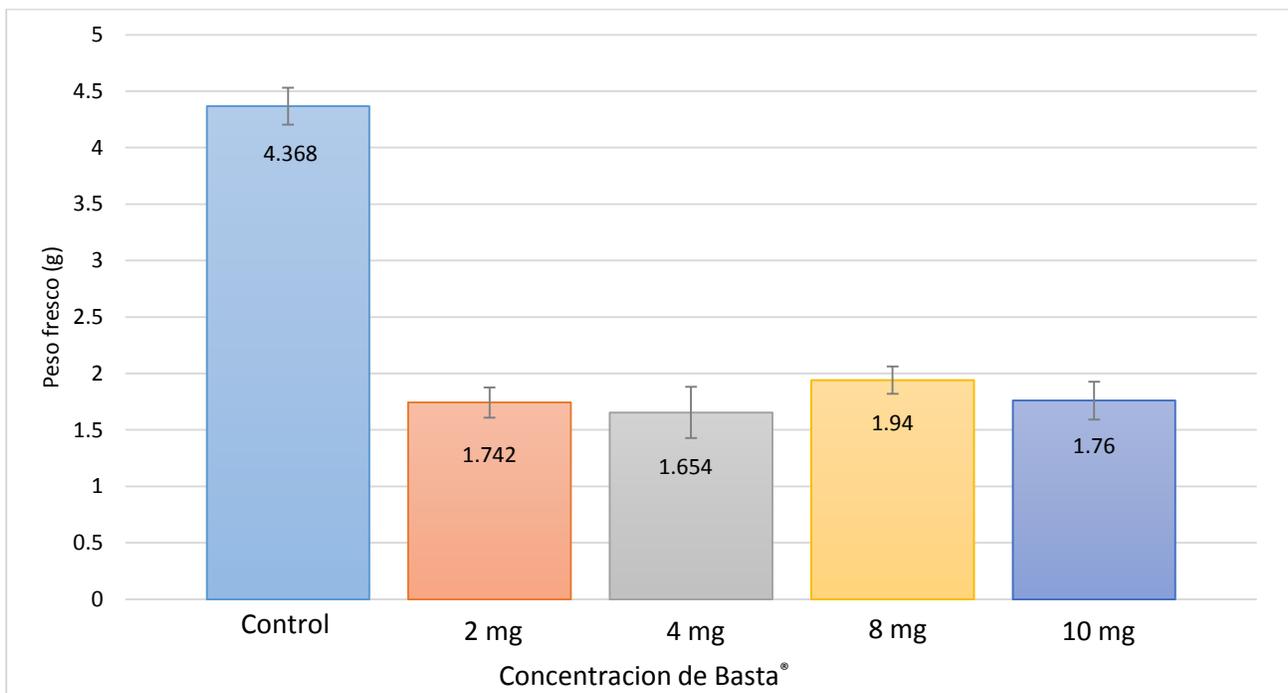


Figura 14. Peso fresco de callo de hipocótilo de chile serrano al día 25 de tratamiento con Basta®.

4.4. Transformación genética

Una vez que pasaron las tres semanas de selección del callo transformado en medio MS-B5 con $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Basta®, se realizaron las observaciones del callo transformado mediante la microscopia confocal, el cual se puede observar la fluorescencia del marcador biológico GFP y ver que este gen se encuentra dentro de la célula vegetal y el lugar donde este actúa.

En la *Figura 15* se puede observar que en todas las condiciones evaluadas de transformación para el callo de hipocótilo presentaron la fluorescencia verde de la GFP, por lo que se puede decir que a partir de un disparo y con el tamaño de bala más pequeña ($0.4 \mu\text{m}$) se pueden tener células transformadas de callo de hipocótilo aunque la cantidad de células transformadas fue menor para las bombardeadas con tamaño de bala de $0.4 \mu\text{m}$ que las transformadas con tamaño de bala de $0.7 \mu\text{m}$ y dos disparos (*Figura 15.F*), estas últimas presentaron una mayor fluorescencia y una mayor cantidad de callo cuando se expusieron al agente selectivo Basta®.

Para el callo de ápice (*Figura 17*) podemos observar que para la obtención de células transformadas se necesitan dos disparos, ya que con un solo disparo la GFP no se logra insertar en gran número de células (*Figura 17.B y 17.C*), en cambio con dos disparos se observan una mayor cantidad de células transformadas y la expresión de la GFP es mayor (*Figura 17.E y 17.F*), esto también se ve reflejado durante la selección de células transformados ya que de donde se obtuvo mayor cantidad de callo fue para las dos disparos con ambos tamaños de bala.

En los dos explantes en las observaciones de las tres semanas (*Figura 15 y 17*) se observa que la localización de la GFP es en la pared celular, lo que nos indica que la GFP se expresa a nivel pared celular.

Para ambos explantes se realizó otra observación a los tres meses de haber sido bombardeado, los resultados obtenidos para los callos de hipocótilo bombardeados con las balas de 0.7 μm es que durante la selección aumentaron su peso en fresco y cuanto a la observación al microscopio mantuvieron la misma fluorescencia de la GFP observada en la *Figura 15*, pero para las bombardeadas con balas de 0.4 μm las células mantuvieron casi el mismo peso en fresco durante su selección y cuando se observaron al microscopio confocal la fluorescencia disminuyó como se observa en la *Figura 16*. Para ápice se observa que a los tres meses (*Figura 18*) la fluorescencia de la GFP aumenta solo un poco en las bombardeadas con tamaño de bala de 0.7 μm (*Figura 18.C y 18.F*) y la fluorescencia de las otras dos se mantiene (*Figura 18.A y 18.B*).

Finalmente se puede observar que ambos explantes necesitan tener dos disparos, aunque para el callo de hipocótilo se requiere utilizar balas de 0.7 μm y el callo de ápice de 0.4 μm . El tamaño de bala utilizada para cada uno de los callos de ambos explantes está relacionado con el tamaño de sus células: las células de ápice son de menor tamaño y por lo tanto requieren una bala más pequeña, y las células de hipocótilo son más grandes y no presentaron daños con ninguno de tamaños de balas. Esto se reflejó tanto en la cantidad de callo obtenido durante la selección con Basta[®], como en las observaciones microscópicas, obteniéndose una cantidad de callo transformado de hipocótilo mayor al de ápice y una fácil localización de las células transformadas al momento de realizar las observaciones al microscopio confocal para hipocótilo. Finalmente puede observarse que la GFP se expresa a nivel pared celular para ambos casos de explante (*Figura 15 y Figura 17*) ya que la fluorescencia se observa en esta parte (Taiz, L.; Zeiger, E., 2002).

Hipocótilo

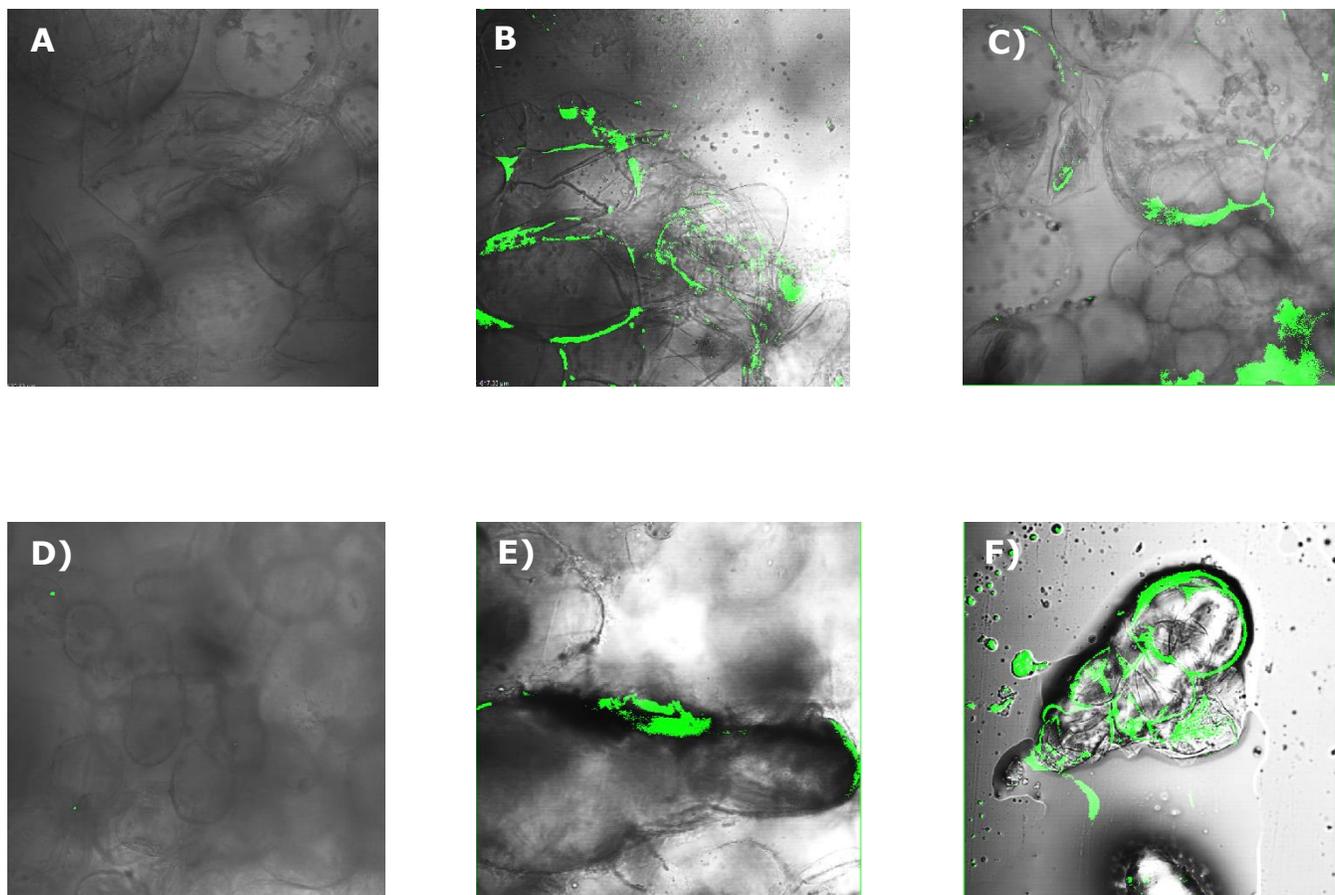


Figura 15. Observación al microscopio de callo de hipocótilo a las dos semanas de transformación. A) y D) son los controles negativos: B) y C) es callo bombardeado con un disparo pero la primera con tamaño de bala de 0.4 μm y la segunda con tamaño de bala 0.7 μm ; E) y F) es callo bombardeado con dos disparos la primera con tamaño de bala de 0.4 μm y la segunda con tamaño de bala 0.7 μm .

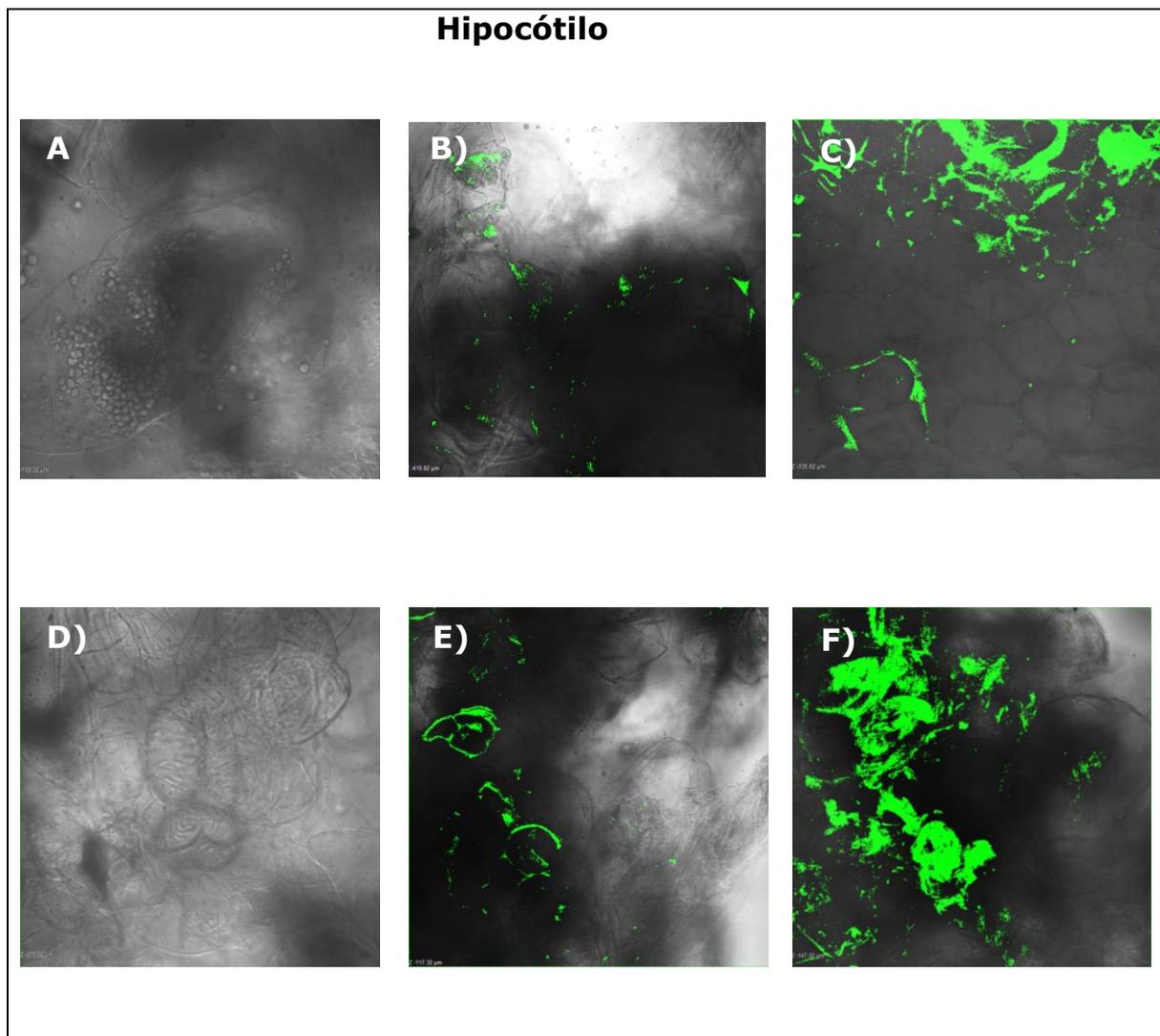


Figura 16. Observación al microscopio de callo de hipocótilo a los tres meses de transformación. A) y D) son los controles negativos: B) y C) es callo bombardeado con un disparo pero la primera con tamaño de bala de 0.4 μm y la segunda con tamaño de bala 0.7 μm ; E) y F) es callo bombardeado con dos disparos la primera con tamaño de bala de 0.4 μm y la segunda con tamaño de bala 0.7 μm .

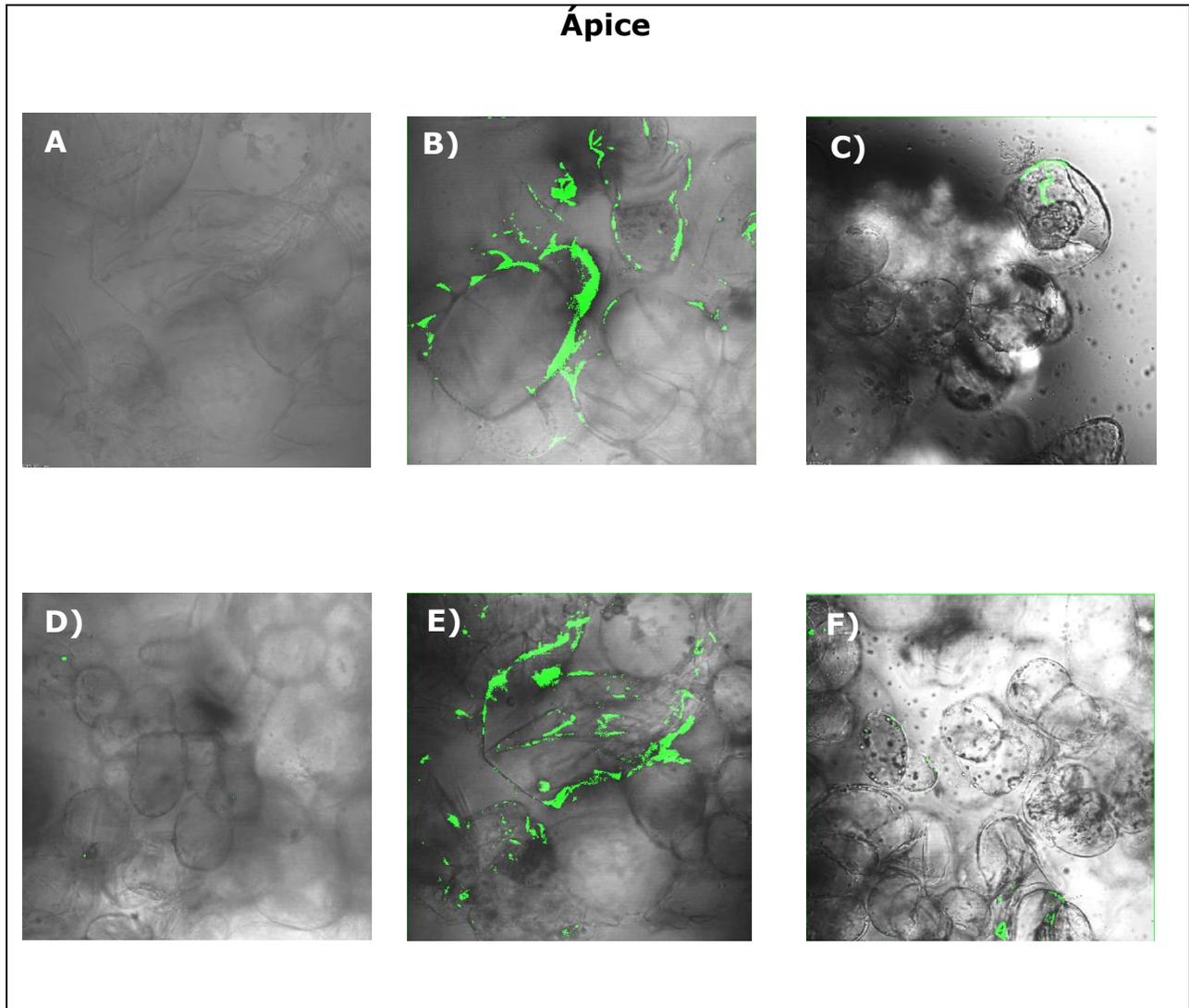


Figura 17. Observación al microscopio de callo de ápice a las dos semanas de transformación. A) y D) son los controles negativos: B) y C) es callo bombardeado con un disparo pero la primera con tamaño de bala de $0.4 \mu\text{m}$ y la segunda con tamaño de bala $0.7 \mu\text{m}$; E) y F) es callo bombardeado con dos disparos, la primera con tamaño de bala de $0.4 \mu\text{m}$ y la segunda con tamaño de bala $0.7 \mu\text{m}$.

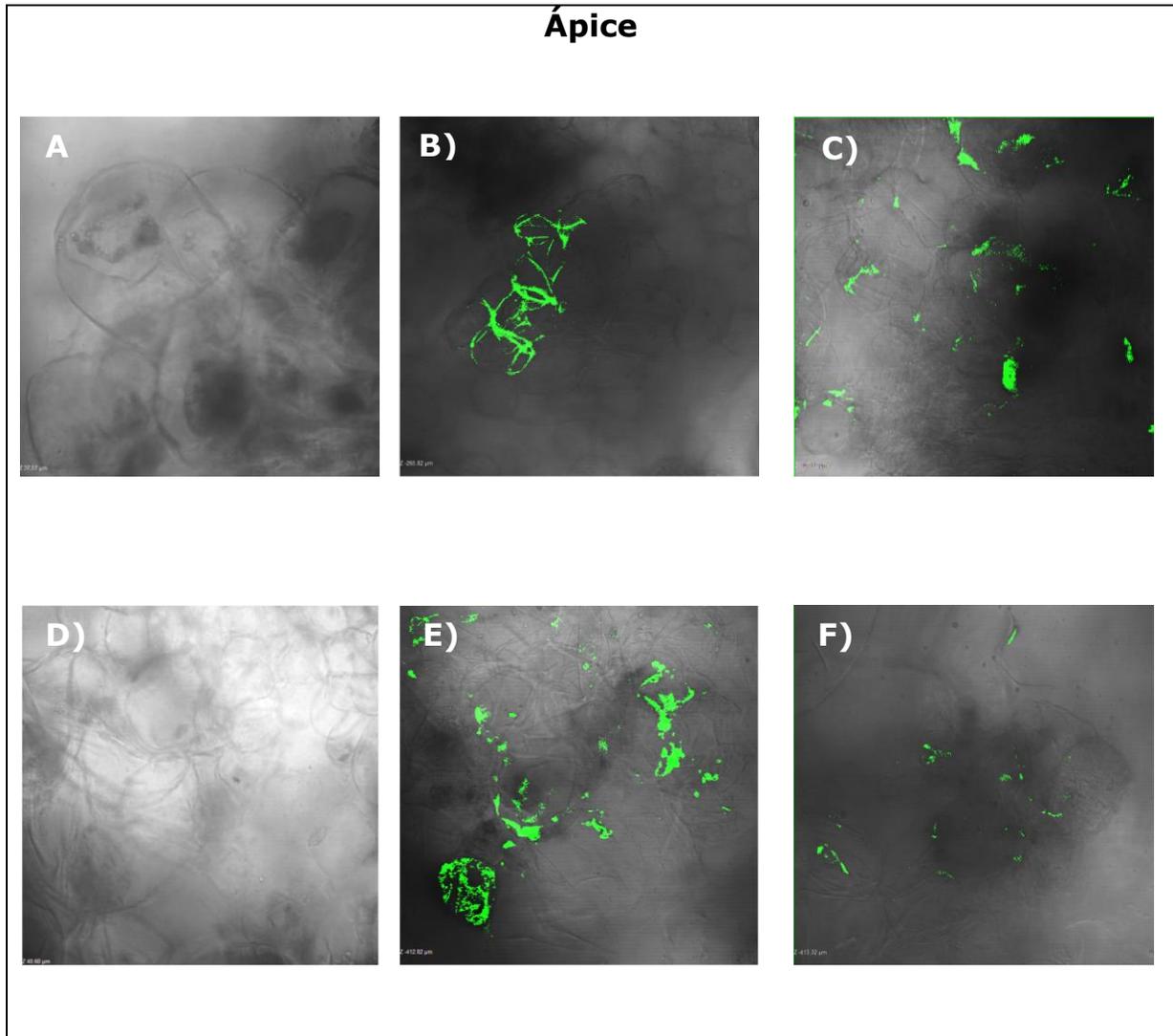


Figura 18. Observación al microscopio de callo de ápice a los tres meses de transformación. A) y D) son los controles negativos: B) y C) es callo bombardeado con un disparo pero la primera con tamaño de bala de 0.4 μm y la segunda con tamaño de bala 0.7 μm ; E) y F) es callo bombardeado con dos disparos, la primera con tamaño de bala de 0.4 μm y la segunda con tamaño de bala 0.7 μm .

4.5. Evaluación del efecto de compuestos orgánicos

Las observaciones del efecto de cada uno de los compuestos evaluados se empezaron a destacar más uniformemente en el callo de hipocótilo a partir del primer mes de haberlo colocado en el medio de cultivo ya que comenzaron a adquirir una pigmentación tenue de coloración verde (*Figura 19*), destacando más los callos de los medios que contenían menor cantidad de 2,4-D (medios *E* y *F*). Conforme el tiempo avanzaba se comenzó a notar la formación de unas estructuras globulares en algunos callos del medio *E*, los cuales crecían y sobre estos mismos salían más estructuras, lo que provocaba que se apelmazaran y el callo se volviera más duro y difícil de disgregar.

Dadas las observaciones anteriores, se decidió eliminar la concentración de 2,4-D a los medios *A*, *B*, *C* y *D* y aumentar gradualmente la concentración de BA hasta $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a todos los medios, por lo que a los seis meses el callo del medio *A* se comenzó a hidratar y a oxidar; los medios *B*, *C* y *D* mantuvieron la dureza adquirida al igual que la pigmentación pero el callo tuvo un crecimiento lento comparado con los de los medios *E* y *F*. Los callos de estos dos últimos seguían formando las estructuras globulares pero no surgía uno que pudiera ser descrito como embrionario y gradualmente el callo del medio *E* fue perdiendo la pigmentación hasta llegar a un callo más blanco (*Figura 20*).

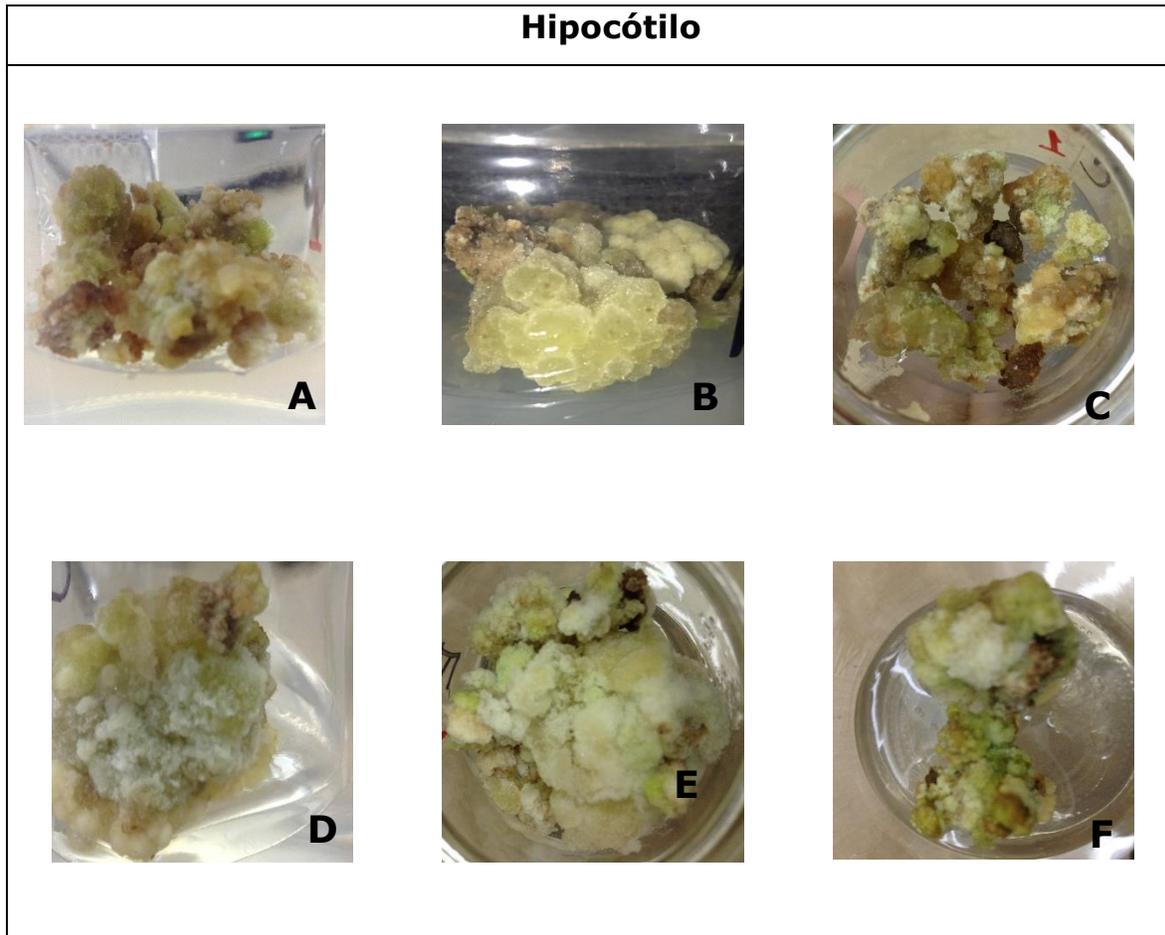


Figura 19. Evaluación de compuestos orgánicos en la regeneración de callo obtenido del hipocótilo de chile serrano a los dos meses. El medio de cultivo de A, C y E contiene 20 % de agua de coco: A contiene $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 2,4-D, C contiene $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 2,4-D y E no contiene 2,4-D. B, D y F no contienen agua de coco: B contiene $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 2,4-D, D contiene $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 2,4-D y F no contiene 2,4-D; todos los medios contiene $0.3\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA.

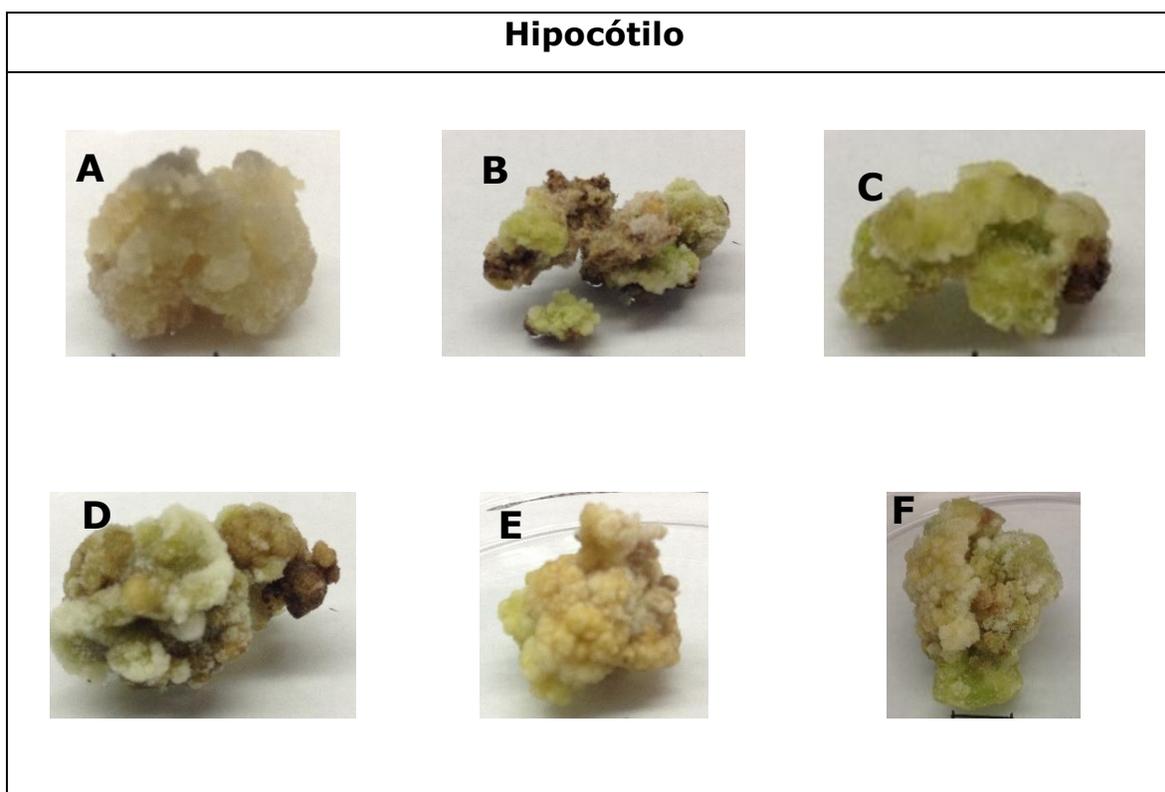


Figura 20. Evaluación de compuestos orgánicos en la regeneración de callo obtenido del hipocótilo de chile serrano a los seis meses. El medio de cultivo de *A*, *C* y *E* contiene 20 % de agua de coco y *B*, *D* y *F* no contienen agua de coco: *A* y *B* contiene $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA, *C* y *D* contiene $4\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y *E* y *F* $6\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA.

Para el callo del ápice a los dos meses, sucedió algo parecido al del hipocótilo en cuanto a los medios *C*, *E* y *F* ya que presentaron formación de estructuras globulares, crecimiento de callo y pigmentación verde, sin embargo los callos de los medios *A* y *B* se hidrataron y presentaron oxidación, y el medio *D* no presento pigmentación, pero sí una ligera oxidación (*Figura 21*).

A los seis meses (*Figura 22*), ya cambiado en el medio de cultivo la concentración del 2,4-D y BA, los medios *A* y *B* perdieron la hidratación adquirida, pero pasados los tres meses el callo se oxidó. En cambio, el medio *D* se recuperó y comenzó a

presentar pigmentación verde y formación de estructuras globulares a partir del quinto mes. Los callos del medio *E* y *F* presentaron la formación de estructuras globulares a los dos meses y cuando se aumentó la concentración de BA cesó la formación de éstas estructuras, pero la pigmentación aumentó. En el caso del medio *C* la pigmentación disminuyó pero la formación de estructuras globulares aumentó.

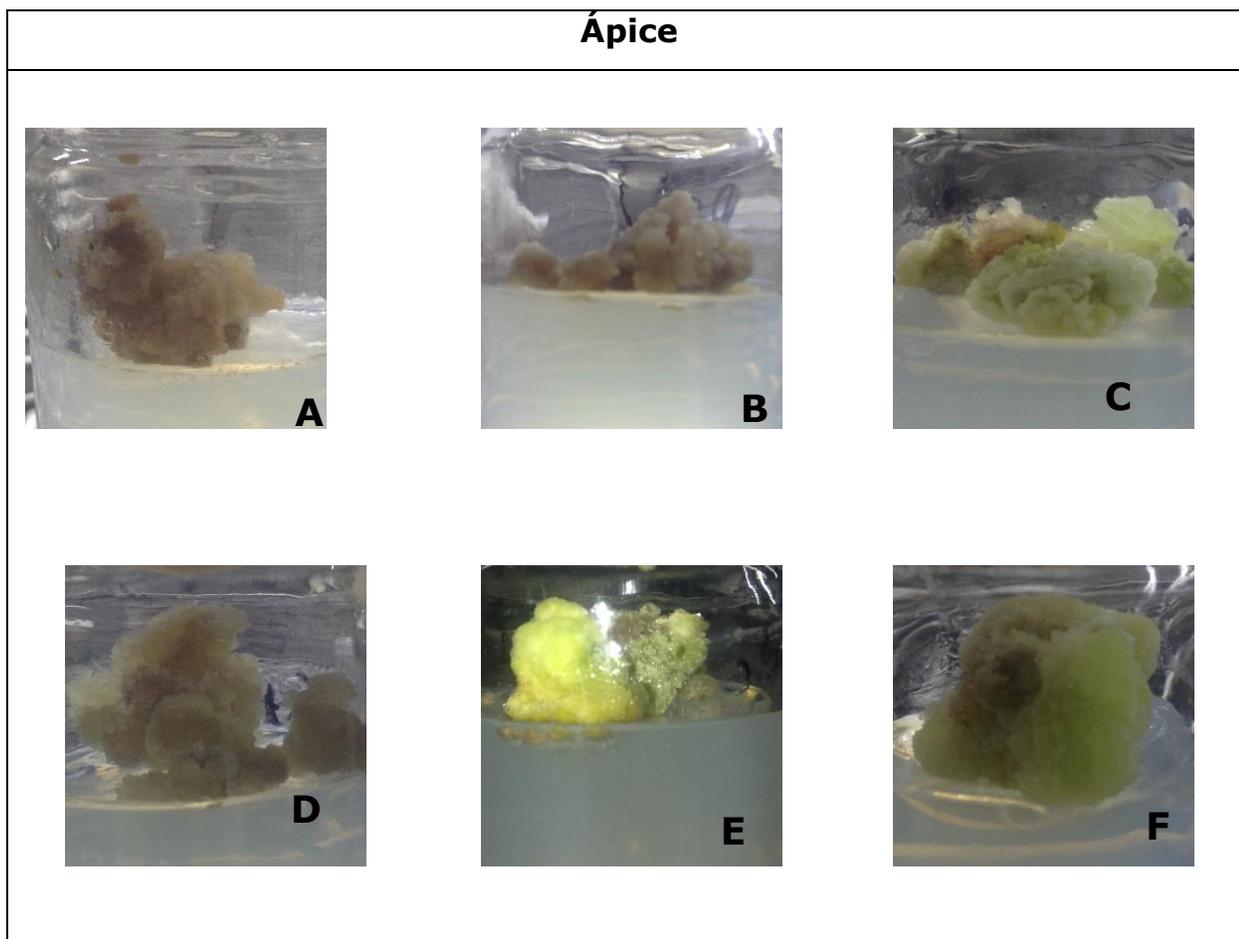


Figura 21. Evaluación de compuestos orgánicos en la regeneración de callo obtenido del ápice de chile serrano a los dos meses. El medio de cultivo de *A*, *C* y *E* contiene 20 % de agua de coco: *A* contiene $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 2,4-D, *C* contiene $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 2,4-D y *E* no contiene 2,4-D. *B*, *D* y *F* no contienen agua de coco: *B* contiene $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 2,4-D, *D* contiene $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 2,4-D y *F* no contiene 2,4-D; todos los medios contiene 0.3 mg de BA.

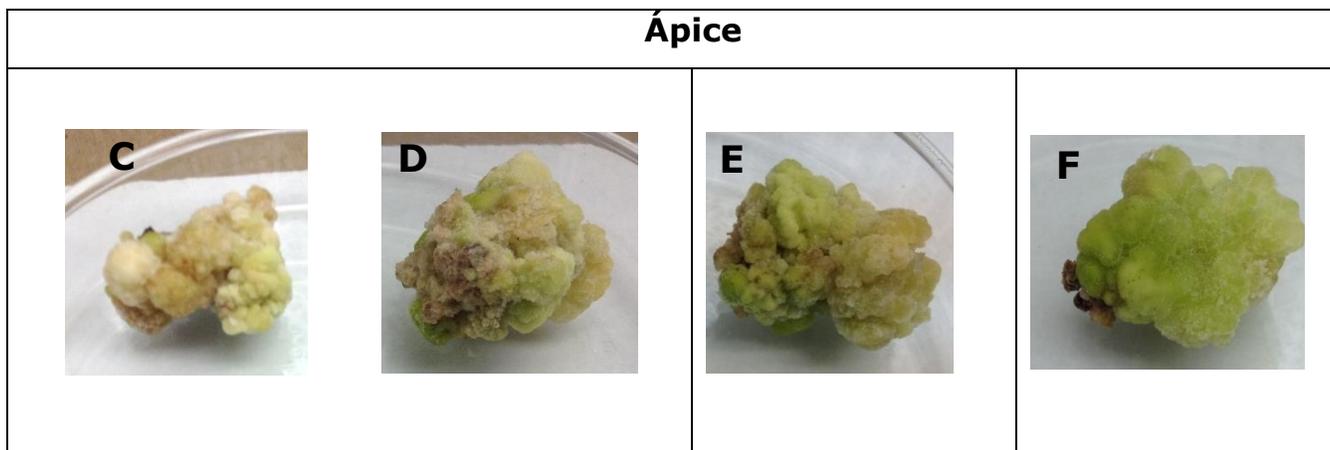


Figura 22. Evaluación de compuestos orgánicos en la regeneración de callo obtenido del ápice de chile serrano a los seis meses. El medio de cultivo de C y E contiene 20 % de agua de coco: C contiene $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y E contiene $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. El medio D y F no contienen agua de coco: D contiene $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA y F contiene $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

De las observaciones de los callos de ambos explantes se puede notar que la ausencia del 2,4-D, una alta concentración de BA y la presencia del agua de coco (20%) tienen un efecto, presentaron una mayor pigmentación verde, una menor oxidación del callo (a excepción del callo del medio A de ápice, Figura 21.A) y formación de estructuras globulares, las cuales se endurecían y eran difíciles de separar, en comparación a los callos que se colocaron en medios con presencia de 2,4-D, ausencia de agua de coco y baja concentración de BA, los cuales no presentaban pigmentación, se hidrataban y se oxidaban.

No se llegó a la formación de callo embriogénico de chile serrano, aun cuando otros autores reportan que la presencia de BA y de agua de coco en el medio de cultivo MS da la formación de brotes de chile habanero y miahuateco (Kumar et al., 2005; Peddaboina et al., 2005; Ramírez-Malagón & Ochoa-Alejo, 1996) justo después de los 30 días de haberse colocado en el medio. Otros autores, López-Puc et al. (2006), Joshi & Kothari (2007), Valera-Montero & Phillips (2005) y Kintzios et al. (2001) reportan el uso de distintas vías de regeneración *in vitro*

del chile habanero, pero aún no se encuentra un protocolo que establezca adecuadamente la regeneración vía embriogénesis somática del chile serrano, ejemplo de estos es el demostrado por el autor Valadez-Bustos et al. (2009) en el que vía organogénesis directa obtuvo un porcentaje de 96.7% de explantes con brotes usando embriones de chile serrano en un medio MS con BA e IAA.

5. CONCLUSIONES

Conforme a la hipótesis planteada inicialmente, la caracterización mediante la cinética de crecimiento permite observar el comportamiento del callo del chile serrano a determinadas condiciones, dando información sobre el tiempo en que se deben realizar los subcultivos, y el tiempo en el que se debe realizar la transformación genética vía biobalística con determinadas condiciones de distancia, presión, tamaño de bala y número de disparos. Finalmente el uso de agua de coco y 2,4-D en el medio de cultivo, no ayudó a la obtención de callo embriogénico para una posterior regeneración vía embriogénesis somática indirecta.

De acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo se concluye que:

1. El tiempo de remojo óptimo resultó ser de 72 horas.
2. Los dos mejores explantes para la inducción de callo son el hipocótilo y ápice ya que se obtuvo una mayor cantidad de callo y en un menor tiempo.
3. Con base en la cinética de crecimiento se concluye que los subcultivos del callo de hipocótilo deben realizarse entre los 10 y 15 días, mientras que los de ápice entre los 5 y 10 días.
4. La concentración mínima de Basta® para la selección de callo transformado es de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para ambos explantes.
5. Las mejores condiciones de bombardeo para hipocótilo son dos disparos con tamaño de bala de $0.7 \mu\text{m}$ y para ápice son dos disparos con tamaño de bala de $0.4\mu\text{m}$.
6. La adición de 2,4-D y agua de coco al medio de cultivo no ayudó a la obtención de callo embriogénico.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abdelnour-Esquivel, A. y Vicent, J., 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Costa Rica. Bib. Orton IICA/CATIE.

Abel, S. and Theologis, A. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* vol. 111, pp.9-17

Aguilar M. E., 2008. *Embriogénesis Somático en Plátanos Y Bananos* (Vol. 27). Bib. Orton IICA/CATIE.

Alejo-Santiago, G., Luna-Esquivel, G., Salcedo-Pérez, E., Sánchez-Hernández, R., & Aburto-González, C. A., 2015. Dinámica de crecimiento y extracción nutrimental del fruto de litchi (*Litchi chinensis* sonn) cv. Brewster. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 1-12.

Altpeter, F.; Baisakh, N.; Beachy, R.; Bock, R.; Capell, T.; Christou, P.; Daniell, H.; Datta, K.; Datta, S.; Philip, J.; Dix, P.; Fauque, C.; Huang, N.; Kohli, A.; Mooibroek, H.; Nicholson, L.; Nguyen, T.; Nugent, G.; Raemakers, K.; Romano, A.; Somers, D.; Stoger, E.; Taylor, N.; Visser, R. 2005. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molec. Breeding*. Holanda. 15:305-327.

Andrade D., Mónica Eliana Córdoba Figueroa, Hernando Criollo Escobar y Tulio César Lagos Burbano. 2013. Evaluation of cultivation media for in vitro propagation of seeds and explants from wild *Solanum* species. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. P 27-36.

Arbo, M.M. & Gonzalez, A.M., 2012. Botánica Morfológica. I. Exomorfología. Editorial Académica Española. ISBN 978-3-8473-6428-3.

Ávalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E., 2011. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3).

Azcón-Bieto, J.; Tálon, M., 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw Hill Interamericana - Ediciones Universitat de Barcelona. Madrid, España. 522 p.

Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.

Baltazar, B. 1997. Diversidad genética del cultivo del chile (*Capsicum spp*) determinada por isoenzimas y RFLP's tipos: serrano, jalapeño, manzano y silvestres en su área de distribución. CONABIO. [Link] <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfG026.pdf>.

Bayer. CropScience, 2005. Disponible en: <http://www.bayercropscience.com> [último acceso 2 de mayo del 2016]

Bayer. 2005. Technical information Glufosinate-ammonium. CropScience, p 38.

Beranova, M.; Rakousky, S.; Vavrova, Z.; Skalicky, T. 2008. Sonication assisted Agrobacterium-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum L.*). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* (Holanda). 94(3):253-259.

Bowen, B. 1993. Markers for gene transfer. En: Kung, S.D. y Wu, R. (eds). *Transgenic plants. Engineering and utilization.* Academic Press, San Diego, CA, E.U. Vol. 1, p. 89-123.

Bran, P., & Alejandro, J., 2010. Evaluación de la producción de fitoquímicos a partir de cultivo de células en suspensión de *Nerium oleander* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín).

Cabrera-Ponce, J. L., & Irapuato, G. C. I. C. G., 2005. Transformación genética de plantas. *Ingeniería Genética.* CINVESTAV-IPN. Guanajuato, México. p 1-12.

Calva, G., 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria.* Vol. 6, Núm. 11, p 3-16.

Camacho Beltrán, E., 2014. Manipulación de los contenidos de carotenoides mediante la expresión del gen *licopeno ciclasa* (*lcy-b*) en cloroplastos de plantas de tabaco y tomate (*Doctoral dissertation*).

Cano-Vázquez, A., 2013. Germinación en semilla de chile piquín (*Capsicum annum* var. *aviculare*) en SAGARPA Link: <http://hdl.handle.net/10521/2114> [Última consulta el 21 de agosto del 2016].

Castañón-Nájera, G., *et al.* 2010. Identificación de variables para caracterizar morfológicamente colectas de chile (*Capsicum spp.*) en Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 26: 225-234.

Castillo, J. G., Vargas, D., Estévez, A., Hernández, M. M., Salomón, J. L., Pérez, A., Arencibia, A. D. 2010. Determinación de la estabilidad genética en cuatro especies del banco de germoplasma de papa en Cuba conservadas *in vitro*. *Cultivos Tropicales*, 31(3), 00-00.

Cavanagh, H. D., El-Agha, M. S., Petroll, W. M., & Jester, J. V., 2000. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea*, 19(5), 712-722.

Chang, R., 2002 *Química*. 7ª edición. McGraw-Hill Interamericana. México.

Chaparro, A.; Cancino, G.; Carvajal, D.; Diazgranados, C.; Moreno, L.; Nemoga, G.; Ramírez, H.; Silva, C.; Yaya, M., 2005. *Introducción a la ingeniería genética de plantas*. Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos. Bogotá, Colombia. 150p.

Chitra Devi G., Narmathabai V., 2011 Somatic embryogenesis in the medicinal legume *Desmodium motorium* (Houtt). *Merr. Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106:409-418.

Chiu, C., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., and Sheen J., 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*. 6: 325-330.

Chu, T. M., Holyoke, D. & Reynoso, G. (1972) Carcinoembryonic Antigen (CEA) in Patients with Carcinoma of the Digestive Tract. *Ann. Surg.*, 176, 559.

Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO). Diversidad genética del cultivo del chile (*Capsicum* spp) determinada por isoenzimas y RFLP's tipos: serrano, jalapeño, manzano y silvestres en su área de distribución. [En línea] (Actualizado JUNIO 2015). Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfG026.pdf> [Último acceso el 29 de junio del 2016).

Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2011. Monografía del chile. Disponible en: <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/MONOGRAFIA%20CHILE2011.PDF> [Última consulta el 12 de agosto del 2016]

Cortez-Baheza, E.; Rivera-Reyes, J.G.; Andrio-Enriquez, E.; Mendoza-Elos, M., 2011. Osmoacondicionamiento de la semilla de chile ancho y sus efectos en el vigor. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*; 27(3), 345-394.

Cüneyt, A., 2005. Effect of plant growth regulators on osmotically stressed callus cultures of some *Capsicum annum* Var. *grussum* L. cultivars. *Journal of Biological Sciences*, 5(3), 257-259.

D'Arcy, W. Ed. Al., 1989. *Solanaceae: Biology and Systematics*. Columbia University Press. New York

Davies, P J., 1995. *Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, London, pp 6–7.

Davis, JM., 2002. *Basic Cell Culture*. Second Edition. Oxford University Press, Oxford, UK

De Silva, M. A. N., & Senarath, W. T. P. S. K., 2009. In vitro mass propagation and greenhouse establishment of *Withania somnifera* (L.) Dunal (*Solanaceae*) and comparison of growth and chemical compounds of tissue cultured and seed raised plants. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 37(4).

Dei-CSIC Estación Experimental de España. 2012. Técnicas del Cultivo *in vitro*. Disponible en: <http://www.eead.csic.es/> [Último acceso el 30 de julio del 2016].

Díaz, M.; Zappacosta, D.; Franzone, P.; Ríos, R., 2004. Transformación genética, Parte III, Capítulo 3. En: ArgenBio (Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología) eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. Disponible desde Internet en: <http://www.argenbio.org/h/biblioteca/libro.php> (con acceso 08/10/2011).

Dolgo S.V., 1998. Genetic transformation of sour cherry (*Cerasus vulgaris* Mill.) leaf disks. Biotecnology. In: Y.P.S. Bajaj (ed.) Agriculture and Forestry, vol. 44, 29-39. Springer-Verlag, Berlin.

Engel P.P, 1968. The induction of biochemical and morphological mutants in the moss *Physcomitrella patens*. Amer. J. Bot. 55(4): 438-446.

Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Flick, C.E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T.A. (ed.): Tissue Culture: Methods and applications in agriculture. Academic. Press, New York. P. 45-113.

Fernández, K. 2010. Micoraización *in vitro* e *in vivo* de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* var. Alfa). Cultivos Tropicales, 31(2), 00-00.

Food and Drug Organization (FAO). 2007. Agua de coco embotellada. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. [Link <http://www.fao.org/ag/esp>].

García F. A., Montes, S., Rangel, J. A., García, E., & Mendoza, M., 2010. Respuesta fisiológica de la semilla chile piquín [*Capsicum annum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill] al ácido giberélico e hidrotermia. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 1(2), 203-216.

Germplasm Resources Information Network (GRIN). 2016. National Plant Germplasm System: Peppers. <http://www.ars-grin.gov/npgs/stats/>. Fecha de consulta 02 de julio 2016.

Golds, T. *et. al.* 1993. Stable transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Biotechnology* 11: 95-97

Gómez-Kosky R., 1998. Selección in vitro a enfermedades. En Pérez Ponce JN (Ed.) *Propagación y Mejora Genética por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 327-353.

Gray, W.M. & Estelle, M. 1998. Biochemical genetics of plant growth. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 196-201.

Guerrero-Andrade, O., 1998. Transformación de células de maíz (*Zea mays* raza tuxpeña) por medio del bombardeo de partículas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Guzmán, B. A., Ruiz, J. R. C., & Rebaza, L. C., 2015. Inducción de embriones somáticos a partir de hojas de *capsicum chinensis*, utilizando diferentes concentraciones de 2, 4-diclorofenoxiacético y 6-bencil amino purina. *SCIÉENDO*, 16(2).

Hauptmann, R.M.; Vasil, V.; Ozias-Akins, P.; Tabaeizadeh, Z.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T.; Horsch, R.B.; y Vasil, I.K., 1988. Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the *Gramineae*. *Plant Physiol.* 6: 602-606.

Heller, R., 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives in vitro. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* Paris. 14:1-223

Herrera, A., 2005. Transformación nuclear y de cloroplastos de sistemas vegetales con genes sintéticos antimicrobianos. Tesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., P. 46.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**:3901–3907

Jimarez Montiel, M. J., 2014. Regeneración de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) a partir de cultivos hidropónicos *in vitro*.

Jiménez-González, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez-Ponce J. (ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 13-24 p.

Joshi A., Kothari, S.-L., 2007. High copper levels in the medium improves shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **88**: 127–133.

Kehie, M., Kumaria, S., y Tandon, P., 2012. En la regeneración de plántulas *in vitro* de segmentos nodales y puntas de los brotes de *Capsicum chinense* Jacq. *CV. Naga Rey chile.* *3 Biotech* , **2** (1), 31-35.

Kintzios S.; Drossopoulos J.-B.; Lympelopoulos C.-H., 2001. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **67**: 55–62.

Kraft, K., Luna-Ruiz, J. Gepts, P., 2014. A new collection of wild populations of *Capsicum* in Mexico and the southern united states. *Genetic Resources and Crop Evolution* **60**: 225-232.

Krikorian A. D. 1991. Medios de cultivo: generalidades y preparación Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, WM y Mroginski LA (eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.* CIAT, Cali pp 41-59.

Kumar V.; Gururaj H.-B.; Narasimha B.-C.; Giridhar P.; Ravishankar G.-A., 2005. Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. *Sci. Hort.* **106**: 237–246.

Latournerie, M.L., J.L. Chávez S, M. Pérez P. M., G. Castañón N, S.A. Rodríguez H, L.M. Arias R y P. Ramírez V., 2002. Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. Revista Fitotecnia Mexicana 25: 25-33.

Litz, R.E. y Jarret, R. L., 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca W.M. y Mrooñgnski L.A., eds. Ciat Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. PP143-171.

Loening, A., Fenn T., Gambhir, S., 2007. Crystal structures of the Luciferasa and green fluorescente proteína from *Renilla reniformes*. Journal Molecular Biology. 374:1017- 1028.

López, G. 1997. Novedades para la flora argentina encontradas en el Parque Nacional Iguazú (Misiones). Bonplandia. 9: 231-236.

López-Puc G.; Canto-Flick A.; Barredo-Pool F.; Zapata-Castillo P.; Montalvo-Peniche M.-C.; Barahona-Pérez F.; Santana-Buzzy N., 2006. Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for in vitro regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* jacq.). Hort. Sci. 41: 1645–1650.

Maheswaran, G., Williams E.G., 1985. Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* in vitro. Ann. Bot. 56:619-630

Malik M.R., Wang F., Dirpaul J.M., Zhou N., Polowick P.L., Ferrie A.M.R., Krochko J.E., 2007. Transcript profiling and identification of molecular makers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. Plant Physiol. 144:134-154.

Marsch Martínez and de Folter, 2010. *Arabidopsis thaliana*: Un “pequeño” gran genoma. Genómicas Hoy. Núm. 7: 5-8

Martín, P., & Isabel, C., 2015. Cinética de la maduración de la semilla de *Capsicum chinense* Jacq. Relacionada al desarrollo del fruto. Acta Agronómicas, 2:234-237

Martinez, M., Cardozo Conde, C. I., & Sánchez Orozco, M. S., 2010. Respuesta fisiológica de semillas de tomate *Solanum lycopersicum* L. var. Unapal-Maravilla y pimentón *Capsicum annuum* L. var Unapal-Serrano en crioconservación. *Acta Agronómica*, 59(4), 401-409.

Martínez, M., et. al., 2011. Catálogo nomenclatura de las Solanaceae de México. CONABIO. Universidad Autónoma de Querétaro.

Matsumoto, B. (2003). Cell biological applications of confocal microscopy (Vol. 70). Academic Press.

McKeon, RJ, Ho¨ke A, Silver, J., 1995. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* 136:32-43.

Miki B., McHugh S., 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotech.* 107:193-232.

Minsky M., 1957. Microscopy Apparatus. US Patent # 3013467.

Mroginski, L. A., & Roca, W. M., 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco *tissue cultures*. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.

Navarro, S.E., 2009. Localización intracelular de algunas isoenzimas de pirofosfatasa en plantas. *Facultad de Química, UNAM*. 9: 45-54.

Parra Vega, V., 2015. Aspectos básicos y aplicados de la inducción de embriogénesis en microsporas de pimiento y colza (Doctoral dissertation).

Peddaboina V.; Thamidala C.; Subhash K., 2005. Selection of atrazineresistant plants by in vitro mutagenesis in pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 83: 75-82.

Pérez M. N., 2015. Perfil fitoquímico de cultivos en suspensión de *Kalanchoe daigremontiana*. Link: <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/14861> [Última consulta el 14 de junio del 2016]

Pérez, J. C. B., & Sánchez, R. A. H., 2010. Efecto de la Relación Agitación-Aireación sobre el Crecimiento Celular y la Producción de Azadiractina en Cultivos Celulares de *Azadirachta indica* A. Juss. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*, 63(1), 5293-5305.

Pérez-Ponce J. N.; Suárez Castellá, M. y Orellana Pérez, P. 2000. Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. *Biotecnología Vegetal*, 1: 3-12.

Pozo, C. O., Montes H., Redondo J., 1991, Chile (*Capsicum* spp.). In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética. R Ortega P, G Palomino H, F Castillo G, V A González H, M Livera M (eds). SOMEFI. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. pp:217.

Pugliese A, O'callaghan Y., Tundis R., Galvin K., Menichini G, O'brien N., Loizzo M.R., 2014. In Vitro Assessment Of The Bioaccessibility Of Carotenoids From Sun-Dried Chilli Peppers. *Plant Food Hum Nutr* 69:8-17.

Pyke, K. 2009. *Plastid Biology*. Cambridge University press. Pp 23-43

Quintero, R. 1993. Prospectivas de las agrobiotecnologías. IICA. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. Costa rica. Núm. 34 P. 141-150.

Ramírez-Malagón R.; Ochoa-Alejo N., 1996. An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Rep.* 16: 226–231.

Rappaz, B., Barbul, A., Emery, Y., Korenstein, R., Depeursinge, C., Magistretti, P. J., & Marquet, P., 2008. Comparative study of human erythrocytes by digital holographic microscopy, confocal microscopy, and impedance volume analyzer. *Cytometry Part A*, 73(10), 895-903.

Rigato, S., González, A., & Huarte, M., 2016. Producción de plántulas de papa a partir de técnicas combinadas de micropropagación e hidroponía para la obtención de semilla prebásica. *Revista Latinoamericana de la papa*, 12(1), 110-120.

Rojas, S., J. García y M. Alarcón. 2004. *Propagación Asexual de Plantas*. Corpoica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. 31-35 p.

Salisbury F.B., Ross C.W., 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. Mexico.

Sánchez-Calvo, L.; Alvarenga-Venutolo, S., 2014. Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa*. *Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120.

Schenk, R. U. y A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Chile verde. [En línea] (Actualizado 2014). Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/chile-verde/> [Último acceso el 12 julio 2016].

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Producción agrícola 2014. [En línea] (Actualizado el 21 de diciembre del 2014). Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> [Último acceso el 13 de febrero del 2016].

Shahba M.A., Quian Y.L. & Lair K.D., 2008. Improving seed germination of saltgrass under saline conditions. *Crop. Science* 48:756-762.

Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI), 2013. *Diversidad de chiles en México*, 2da. Edición. Link: <http://snics.sagarpa.gob.mx/prensa/boletines/Paginas/2014-B041.aspx> [última consulta el 21 de septiembre del 2016]

Solís-Ramos, LY, González-Estrada, T., Andrade-Torres, A., Godoy-Hernández, G., y Castaño de la Serna, E. (2010). La actividad de GUS endógeno similar en *Capsicum chinense* Jacq. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13 (4), 2-3.

Soto, N.; Enríquez, G.A.; Ferreira, A., 2007. Transformación eficiente de segmentos de tallos de papa de la variedad Désirée, utilizando fosfinotricina como marcador de selección. *Biotecnología Aplicada, Elfos Scientiae*, 24, 132-138.

Stephen W. Paddock. 1999. Microscopy. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Volume 122. Confocal Humana Press.

Stevens, P.F., Versión de junio 2008. Angiosperm Phylogeny Website Link: Version 9, June 2008. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [última Consulta: junio 2016].

Street, H.E. 1977. Cell culture-techniques. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. University of California Press, L.A., E.U. p. 61-102.

Taiz, L.; Zeiger, E, 2002. Physiology vegetal, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, (Eds.). 2:31-40.

Torres, M. V., Paz, A. R., Torres, T. C., Rincón, V. H. A., & Ramírez, P. (2010). Obtención de plantas haploides en chile miahuateco (*Capsicum annuum* L.)* obtaining haploid plants from miahuateco chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 189.

Universidad Nacional de la Plata SEDECI. 2005. Cultivo *in vitro*: Tejidos Vegetales, [En línea] (Actualizado el 25 de noviembre del 2013). Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4 -
Cultivo in vitro.pdf?sequence=6](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6) (Último acceso el 26 de febrero del 2016).

Universidad Nacional de San Luis (UNSL), biblioteca digital, 2010. Crecimiento y cultivo vegetal. [En línea] (Actualizado al 25 de marzo del 2011). Disponible en: bd.unsl.edu.ar/download.php?id=1952 [Último acceso el 03 de febrero de 2016].

Valadez-Bustos, MG, Aguado-Santacruz, GA, Carrillo-Castañeda, G., Aguilar-Rincón, VH, Espitia Rangel, E., Montes-Hernández, S., y Robledo-Paz, A., 2009. La propagación in vitro y el comportamiento agronómico de ají regenerada (*Capsicum* spp.) Las plantas de los genotipos de importancia comercial. *In Vitro Cellular & Biología del Desarrollo-Plant* , 45 (6), 650-658.

Valera-Montero L.; Phillips G.-C Long-lasting, 2005. *Capsicum baccatum* organogenic callus' formation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 41: 470-476.

Van Overbeek, J. 1942. Hormonal control of embryo and seedling growth. Cold spring harbor symposia on quantitative biology 10:126-134.

Vega, M. R., Caraballoso, I. B., & Santa Clara, C. U. B. A., 2001. Empleo del herbicida Glufosinato de Amonio en la selección de líneas transformadas de banano cv. *Grande naine* (*Musa* spp. AAA) *in vitro* y en casa de cultivo.

Vélez Torres, M., Robledo Paz, A., Corona Torres, T., Aguilar Rincón, V. H., Ramírez Vallejo, P., & Suárez Espinosa, J., 2010. Obtención de plantas haploides en chile miahuateco (*Capsicum annum* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 1(2), 189-201.

White P. R. , 1963. The cultivation of animal and plant cells, 2nd ed. Ronald Press, New York pp 30-44.

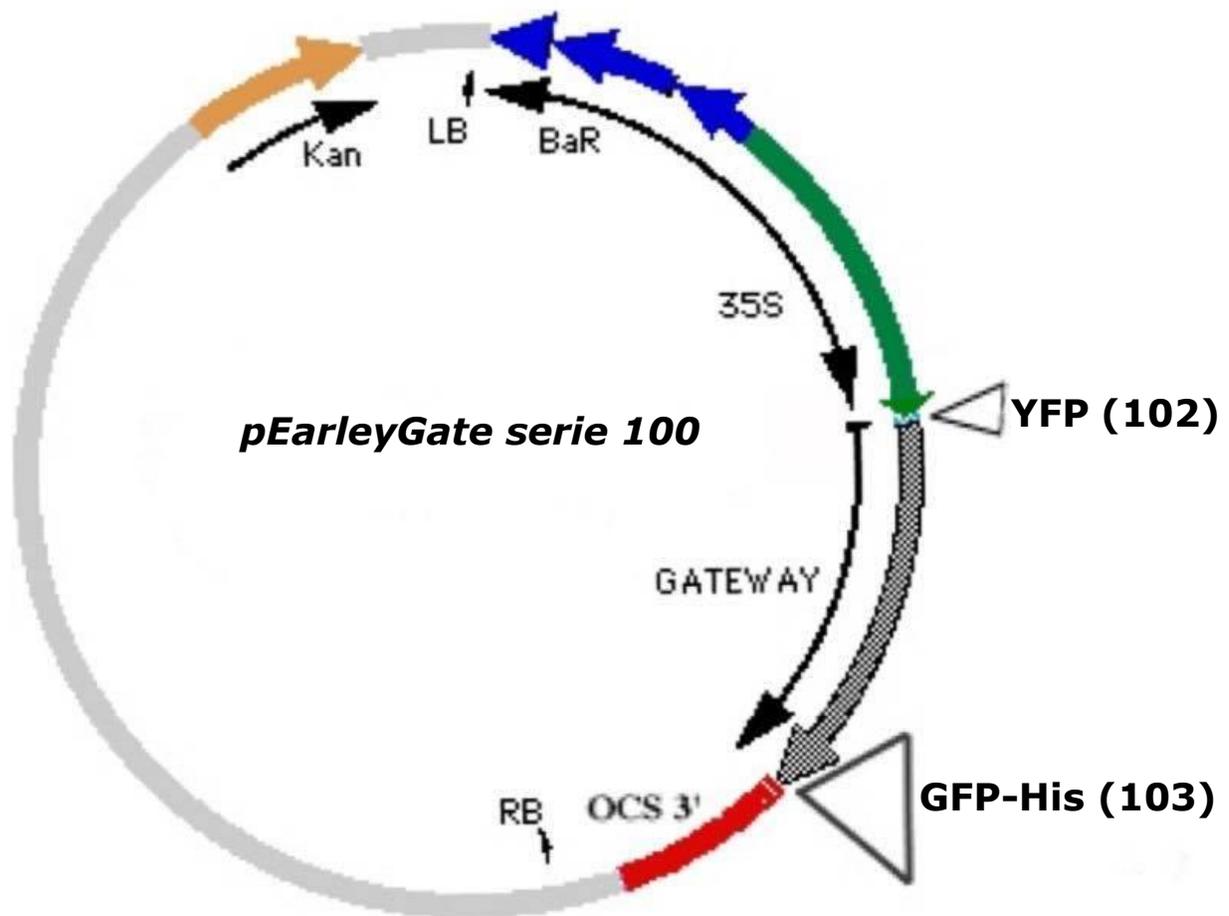
Zaragoza-Pérez, F., 2016. Obtención de plantas cisgénicas de chile serrano *Capsicum annum* L., X coloquio Invernal de Investigación, Facultad de Química (UNAM).

Zivcak, M., Brestic, M., y SYTAR, O., 2016. Ajuste osmótico y adaptación de las plantas a la sequía estrés. En la Sequía tolerancia al estrés en las plantas, Vol 1 (pp. 105-143). Springer Publishing Internacional.

Zuloaga, F. O., Morrone, O. & Belgrano, M. J. 1994 en adelante. Catálogo de las Plantas Vasculares Del Cono Sur. Link: <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.asp>

ANEXO I. Mapa del plásmido pEarleyGate serie 100

El plásmido contiene en su secuencia el gen Kan, marcador de selección por resistencia a kanamicina, la secuencia 35S, promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor (CaMV) y el gen BAR que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (Navarro, 2009).



ANEXO II. Composición de medios de cultivo y suplementos

A. Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) para 1000mL a partir de soluciones Stock 100X.

Sustancia	Cantidad
Solución I (nitratos)	10 mL
Solución II (sulfatos)	10 mL
Solución III (halógenos)	10 mL
Solución IV (Ms, Pb, No)	10 mL
Solución V (EDTA, Fe)	10 mL
Glicina (20 mg/100 ml)	10 mL
Vitamina R2	10 mL
sacarosa	30 g
Gellan	2.5 g
pH	5.7

B. Concentraciones de las sales MS

Para preparar un litro del medio se toman 10 mL de cada una de las sales.

Compuesto	Fórmula	Stock 100x (mM·L ⁻¹)
SALES MS I		
Nitrato de potasio	KNO ₃	2060
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1880
SALES MS II		
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	150
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·1H ₂ O	1
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3
SALES MS III		
Cloruro de calcio	CaCl ₂	300
Yoduro de potasio	KI	5x10 ⁻¹
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1x10 ⁻²
SALES MS IV		
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	125
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	10
Molibdato de sodio	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	1x10 ⁻¹
SALES MS V		
Sulfato ferroso	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10
Tiplex EDTA	Na ₂ EDTA	10

C. Cóctel 20

Mezcla de aminoácidos y vitaminas (patente en trámite)

D. Vitaminas B5

Compuesto	Fórmula	Stock 100x ($\mu\text{M}\cdot\text{l}^{-1}$)
Myo-inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	5.5×10^{-4}
Acido nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	812
HCl-piridoxina	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	490
HCl-tiamina	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS}_2 \cdot \text{HCl}$	593

E. Antioxidantes

Compuesto	Fórmula	Stock 100x ($\mu\text{M}\cdot\text{l}^{-1}$)
L-ácido ascórbico (Vitamina C)	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	50
Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50

F. Reguladores de crecimiento

Compuesto	Fórmula	Stock 10x ($\mu\text{M}\cdot\text{l}^{-1}$)
ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)	$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$	45.2
6-Bencilaminopurina (BA)	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$	100

*Para agregar 2mg del regulador a un litro de medio se toman 20 ml de la solución stock correspondiente; para 1 mg se toma 10 ml.

G. Aminoácidos y otros compuestos

Compuesto	Fórmula	Stock 100x ($\mu\text{M}\cdot\text{l}^{-1}$)
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	133.2
Adenina	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{SO}_4$	543.0

El agua de coco se filtra utilizando una malla de número 60 marca Sigma-Aldrich.

Basta® (Glufosinato de amonio): Solución de concentración de $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, esterilizado mediante filtración con membrana millipore de $0.22\ \mu\text{m}$ de diámetro.

Todos los medios de cultivo elaborados se esterilizaron durante 18 minutos a $1.3\ \text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ o $18\ \text{lb}\cdot\text{pulg}^{-2}$

ANEXO III. Soluciones para bombardeo de partículas (Jefferson et al, 1987)

a. Preparación de balas de tungsteno de 0.4 y 0.7µm

- Pesar 30mg de micropartículas de tungsteno en un tubo de 1.5 ml.
- Agregar 1ml de etanol al 70%.
- Agitar de 3 a 5 minutos en vortéx e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000rpm durante 5 minutos.
- Eliminar sobrenadante con micropipeta.
- Lavar tres veces con agua estéril y quietar sobrenadante.
- Adicionar 500µl de glicerol al 50% para al final tener una concentración de 30mg·ml⁻¹.
- Hacer alícuotas de 500µl almacenar a -20°C.

b. Preparación de espermidina (0.1M) y cloruro de calcio (2.5M)

- Pesa 1.4525g de espermidina y 2.7745g de cloruro de calcio.
- Disolver con 10 ml agua desionizada estéril la espermidina y el cloruro de calcio respectivamente en tubos Falco previamente etiquetados.
- Filtrar con membrana millipore de 0.22 µm.
- Hacer alícuotas de 500µl en tubos Eppendorf de cada uno de los reactivos.

Bombardeo con micropartículas de tungsteno con pistola de baja presión.

1. Preparar una la siguiente solución (para 6 disparos):

- Agitar las micropartículas de tungsteno en vortex por 5 minutos.

- Tomar una alícuota de 50µL de las balas y colocarlo en la pared del tubo Eppendorf de 1500µL.
- Agitar el ADN en vortex por 5 minutos.
- Agregar 5µl del ADN [1µg/µL].
- Tomar 50µl de CaCl₂ [2.5M] en la pared del tubo Eppendorf y tener cuidado de no mezclar con el ADN.
- Tomar 20µl de espermidina [0.1M] y arrastrar toda la mezcla hasta el fondo.
- Homogenizar con agitación suave.
- Dejar incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar por un minuto y retirar sobrenadante.
- Resuspender las balas con 140µL de etanol al 70%. Centrifugar y desechar sobrenadante
- Resuspender las balas con 140µL de etanol absoluto. Centrifugar y desechar sobrenadante
- Resuspender las balas con 48µL de etanol absoluto

2. Se realiza el disparo sobre el callo.

ANEXO IV. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó la herramienta de hoja de cálculo Excel 2013, para todos los casos se utilizó un $\alpha=0.05$.

A. Germinación *in vitro* de semillas

Análisis de varianza de los datos obtenidos de la evaluación de tiempo de remojo de semillas de chile para la germinación, en los que se tenían 8 frascos con 10 semillas cada una de las evaluaciones.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F_c	Probabilidad	F_{tab} ($\alpha=0.05$)
Entre grupos	0.25	1	0.25	0.452	0.513	4.600
Dentro de los grupos	7.75	14	0.554			
Total	8	15				

B. Inducción y proliferación de tejido indiferenciado

Análisis de varianza de dos factores de los datos obtenidos de la inducción de callo de chile serrano, en la que se tenían dos medios de cultivo y en cada uno se evaluaron cuatro explantes, por lo que finalmente se tenían 5 frascos con 10 explantes de los evaluados.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F_c	Probabilidad	F_{tab} ($\alpha=0.05$)
Explantos	0.6	3	0.2	0.118	0.949	2.798
Medios de cultivo	509.2	2	254.6	149.765	0.000	3.191
Interacción	33.2	6	5.533	3.255	0.009	2.295
Dentro del grupo	81.6	48	1.7			
Total	624.6	59				

Análisis de medias mediante la prueba t para los explantes del medio de cultivo MS-B5.

Par de explantes	Valor t calculado	Valor crítico de t (dos colas) ($\alpha=0.05$)	H₀: $\mu_D = 0$ H₁: $\mu_D \neq 0$
Hipocótilo vs cotiledón	2.191	± 2.306	Se acepta H ₀
Hipocótilo vs ápice	-1.789		Se acepta H ₀
Hipocótilo vs hoja prim	0.973		Se acepta H ₀
Cotiledón vs ápice	-4.629		Se rechaza H ₀
Cotiledón vs hoja prim	-2.066		Se acepta H ₀
Ápice vs hoja prim	0.566		Se acepta H ₀

C. Curva de resistencia a basta

En la experimentación se contaban con cinco repeticiones de cada uno de los tratamientos.

Análisis de Varianza (ANOVA) de peso de callo fresco de ápice sometidos a cuatro tratamientos con Basta® a los 2 días.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F_c	Probabilidad	F_{tab} ($\alpha=0.05$)
Entre grupos	0.070	4	0.017	6.019	0.002	2.866
Dentro de los grupos	0.058	20	0.003			
Total	0.128	24				

Se realizó una prueba de Dunnett que nos permitiera comparar los tratamientos con el control en diferentes tiempos de la evaluación con Basta®.

Resultados de análisis de medias mediante la prueba de Dunnett para el callo fresco de ápice sometido a cuatro tratamientos con Basta® a los 2 días.

Tratamiento	$ \bar{y}_i - \bar{y}_c $ calculado (donde i =tratamiento y c =control)	Valor de D_α calculado	$H_0: \bar{y}_i - \bar{y}_c < D_\alpha$ $H_1: \bar{y}_i - \bar{y}_c > D_\alpha$
2 mg	0.096	0.083	Se rechaza H_0
4 mg	0.108		
8 mg	0.138		
10 mg	0.15		

Análisis de Varianza (ANOVA) de peso de callo fresco de hipocótilo sometidos a cuatro tratamientos con Basta® a los 2 días.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F_c	Probabilidad	F_{tab} ($\alpha=0.05$)
Entre grupos	0.124	4	0.031	10.864	7.592×10^{-05}	2.866
Dentro de los grupos	0.057	20	0.003			
Total	0.181	24				

Resultados de análisis de medias mediante la prueba de Dunnett para el callo fresco de hipocótilo sometido a cuatro tratamientos con Basta® a los 2 días.

Tratamiento	$ \bar{y}_i - \bar{y}_c $ calculado (donde i =tratamiento y c =control)	Valor de D_α calculado	$H_0: \bar{y}_i - \bar{y}_c < D_\alpha$ $H_1: \bar{y}_i - \bar{y}_c > D_\alpha$
2 mg	0.112	0.082	Se rechaza H_0
4 mg	0		Se acepta H_0
8 mg	0.028		Se acepta H_0
10 mg	0.108		Se rechaza H_0

Análisis de Varianza (ANOVA) de peso de callo fresco de hipocótilo sometidos a cuatro tratamientos con Basta® a los 4 días.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F_c</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>F_{tab} (α=0.05)</i>
Entre grupos	0.238	4	0.060	14.906	8.486x10 ⁻⁰⁶	2.866
Dentro de los grupos	0.0798	20	0.004			
Total	0.318	24				

Resultados de análisis de medias mediante la prueba de Dunnett para el callo fresco de hipocótilo sometido a cuatro tratamientos con Basta® a los 4 días.

Tratamiento	$\bar{y}_i - \bar{y}_c$ calculado (donde i=tratamiento y c=control)	Valor de D_α calculado	H₀: $\bar{y}_i - \bar{y}_c < D_α$ H₁: $\bar{y}_i - \bar{y}_c > D_α$
2 mg	0.022	0.097	Se acepta H ₀
4 mg	0.096		Se acepta H ₀
8 mg	0.064		Se acepta H ₀
10 mg	0.254		Se rechaza H ₀

Análisis de Varianza (ANOVA) de peso de callo fresco de hipocótilo sometidos a cuatro tratamientos con Basta® a los 7 días.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F_c</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>F_{tab} (α=0.05)</i>
Entre grupos	0.826	4	0.207	32.97	0.0001	2.895
Dentro de los grupos	0.119	19	0.006			
Total	0.945	23				

Resultados de análisis de medias mediante la prueba de Dunnett para el callo fresco de hipocótilo sometido a cuatro tratamientos con Basta® a los 7 días.

Tratamiento	$\bar{y}_i - \bar{y}_c$ calculado (donde i=tratamiento y c=control)	Valor de D_α calculado	$H_0: \bar{y}_i - \bar{y}_c < D_\alpha$ $H_1: \bar{y}_i - \bar{y}_c > D_\alpha$
2 mg	0.282	0.121	Se rechaza H_0
4 mg	0.414		Se rechaza H_0
8 mg	0.358		Se rechaza H_0
10 mg	0.573		Se rechaza H_0