



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Establecimiento, caracterización y  
transformación de cultivos *in vitro* de dos  
especies del género *Capsicum* (*C. annuum* L. y  
*C. chinense* Jacq.)**

**T E S I S:**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**FREDY ALAN ZARAGOZA PÉREZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Ing. Teresa de Jesús Olivera Flores**

**2016**



Ciudad Universitaria, CDMX



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.

## Hoja de datos del jurado.

### 1. Datos del alumno

Zaragoza  
Pérez  
Fredy Alan  
01 (714) 14 00 486  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
Facultad de Ciencias  
Biología.  
411098713

### 2. Datos del tutor.

Ing.  
Olivera  
Flores  
Teresa de Jesús

### 3. Datos sinodal 1

Dra.  
Herrera  
Santoyo  
Josefina

### 4. Datos sinodal 2

Dr.  
Chávez  
Pacheco  
Juan Luis

### 5. Datos sinodal 3

Dra.  
Cancino  
Rodezno  
María de los Ángeles

### 6. Datos sinodal 4

Dr.  
Cristians  
Nizawa  
Sol

### 7. Datos del trabajo escrito

Establecimiento, caracterización y transformación de cultivos *in vitro* de dos especies del genero *Capsicum* (*C. annuum* L. y *C. chinense* Jacq.).

79

2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Al proyecto: Obtención de plantas cisgénicas de Chile *Capsicum annuum* "serrano" UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN216815 por el financiamiento y a los laboratorios 115 y 116 del edificio E de la Facultad de Química UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme tener la dicha de haber formado parte del alumnado y por la educación de calidad que recibí. Un orgullo ser parte de la mejor universidad del país.

A los profesores de la Facultad de Ciencias que con mucho entusiasmo me mostraron lo maravillosa que es la Biología y que también me inculcaron que esta carrera es de constante aprendizaje.

Al laboratorio 115 y 116 del Departamento de Bioquímica perteneciente a la Facultad de Química, por permitirme el uso de sus instalaciones para llevar a cabo los experimentos para la realización de mi tesis.

Al Dr. Rogelio Rodríguez por permitirme participar en su proyecto de laboratorio.

A la M. en C. Teresa de Jesús Olivera Flores por haberme brindado su apoyo y haber compartido su conocimiento sobre cultivo de tejidos vegetales.

A la Bióloga Araceli Arandal por su gran apoyo recibido para la realización de este trabajo.

A la estudiante de Doctorado Morayna Gutiérrez Luna por haber brindado su apoyo incondicional para la obtención del plásmido que se utilizó para la transformación genética.

## **DEDICATORIA.**

A mis padres Martha Pérez Castañeda y Delfino Zaragoza Leguisamo por ser mis principales impulsores para salir adelante, que con mucho amor me han enseñado que las metas que te propones llegan con mucho trabajo y humildad, que para alcanzarlas incluso tienes que dejar tu núcleo familiar. También me han enseñado que va haber momentos difíciles y a pesar de ello nunca debes de desistir.

A mis hermanos Josué y Mariana por ser unos buenos hermanos, que siempre me alentaron para que terminara la carrera.

A mis primos Griselda, Erick, Edgar, German por haberme motivado a ser parte de la UNAM, por su gran apoyo en el inicio de la carrera y cada que los visitaba había palabras emotivas para continuar con la licenciatura.

A mis tíos Carmen y Julio por su gran apoyo y por haberme brindado un segundo hogar mientras estudiaba la licenciatura.

A mis primos Julio, Edgar, Rocio y a mi sobrino Luisito por haberme compartido momentos gratos.

A mis amigos de la carrera y del laboratorio 116; Luis, Sara, Eli, Clau, Cris, Arita, Gaby, Gary, Úrsula, Gus, Naye, Vero, Diana, Felix, Harold, Jorge y Toño, por haber compartido buenos momentos, risas y buena convivencia.

## Índice.

Índice de figuras.....	VIII
Índice de cuadros.....	VIII
Índice de tablas.....	VIII
Índice de graficas.....	IX
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES	
2.1 ASPECTOS GENERALES DE <i>Capsicum annuum</i> L. y <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	2
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	2
2.1.2 Descripción botánica.....	2
2.1.3 Centro de origen y distribución del género <i>Capsicum</i> .....	3
2.1.4 Importancia económica.....	3
2.2 EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	
2.2.1 Aplicaciones del CTV.....	4
2.2.2 Factores determinantes en la respuesta morfogénica de los cultivos <i>in vitro</i> .....	4
2.2.3 Medio de cultivo.....	5
2.2.4 Cultivo de callos y células en suspensión.....	5
2.2.5 Caracterización de los cultivos <i>in vitro</i> .....	6
2.2.6 Vías de regeneración <i>in vitro</i> de plantas (Embriogénesis somática y organogénesis).....	8
2.2.7 Cultivos <i>in vitro</i> del género <i>Capsicum</i> .....	9
2.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA	
2.3.1 Plásmidos; promotores, genes reporteros, genes de selección.....	13
2.3.2 Métodos de transformación genética ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y biobalística) .....	16
2.3.3 Transformación genética de <i>Capsicum annuum</i> L. y <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	18
2.4 MODELO BIOLÓGICO	
2.4.1 Modelos biológicos: importancia y su aplicaciones.....	21
2.4.2 Plantas como modelos biológicos.....	21
2.4.3 Importancia de las pirofosfatas.....	21
2.4.4 El chile como modelo biológico.....	22
III. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos particulares.....	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	24

4.2	ASPECTOS GENERALES	
4.2.1	Preparación de medios de cultivo.....	24
4.2.2	Condiciones de incubación y subcultivo.....	25
4.2.3	Método de desinfección / establecimiento de cultivos asépticos.....	25
4.2.4	CULTIVOS DE CALLOS	
4.2.4.1	Selección del explante y medio de cultivo para inducir del callo.....	26
4.2.4.2	Proliferación y evaluación del crecimiento de los cultivos de callo.....	26
4.2.4.3	Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® en medios sólidos.....	27
4.2.5	CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN	
4.2.5.1	Establecimiento y proliferación de células en suspensión.....	28
4.2.5.2	Evaluación del crecimiento de células en suspensión.....	28
4.2.6	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA	
4.2.6.1	Ensayos de transformación genética.....	28
V.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
VI.	CONCLUSIONES.....	55
VII.	ANEXOS.....	56
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	65

## Índice de figuras.

<b>Figura 1.</b> Cinética típica de crecimiento celular. Se muestran las diferentes fases de crecimiento.....	7
<b>Figura 2.</b> Construcción típica de un plásmido para la transformación en plantas.....	13
<b>Figura 3.</b> Reacción enzimática en donde L-fosfinotricina se acetila por medio de la enzima PAT dando a la síntesis de L-ac-Ft.....	15
<b>Figura 4.</b> Transformación genética de células vegetales por medio de <i>Agrobacterium sp.</i> .....	17
<b>Figura 5.</b> Ruta experimental para la obtención y caracterización de cultivos celulares de dos especies de Chile.....	24
<b>Figura 6.</b> (A) Plántulas de <i>Capsicum annuum</i> L. con hojas verdaderas. (B) Plántulas de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. con hojas verdaderas.....	26
<b>Figura 7.</b> Plántulas con las dos primeras hojas verdaderas utilizadas para la inducción de callo.....	31
<b>Figura 8.</b> Imágenes de diferentes explantes de <i>Capsicum annuum</i> L., que presentan callo a tres semanas de inducción, vistas en microscopio estereoscópico (10X).....	38
<b>Figura 9.</b> Imágenes de diferentes explantes de <i>Capsicum chinense</i> Jacq., que presentaron callo a tres semanas de inducción, vistas en microscopio estereoscópico (10X).....	39
<b>Figura 10.</b> Células de <i>Capsicum annuum</i> L. vistas a microscopio confocal (40X).....	52
<b>Figura 11.</b> Células de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. vista a microscopio confocal (40X).....	53

## Índice de cuadros.

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica de las especies de estudio.....	2
<b>Cuadro 2.</b> Reportes de regeneración <i>in vitro</i> de <i>Capsicum annuum</i> L.....	10
<b>Cuadro 3.</b> Reporte de regeneración <i>in vitro</i> de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	12
<b>Cuadro 4.</b> Reporte de transformación por medio de diferentes cepas de <i>Agrobacterium sp.</i> , en <i>Capsicum</i> ( <i>C. annuum</i> L. y <i>C. chinense</i> Jacq.).....	19
<b>Cuadro 5.</b> Medios de cultivo utilizados en diferentes fases del proyecto.....	25
<b>Cuadro 6.</b> Tipo de callo obtenido de diferentes explantes en medio MSB5 y MSC20...	37

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de transformación genética por medio de biobalística para <i>Capsicum annuum</i> L. y <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	29
<b>Tabla 2.</b> Tipo y número de explantes evaluados para la oxidación de dos especies de <i>Capsicum</i> en dos diferentes medios de cultivo. MSB5 y en medio MSC20.....	34

## Índice de gráficas.

<b>Grafica 1.</b> Porcentaje de plántulas obtenidas de <i>Capsicum annuum</i> L., con hojas verdaderas.....	31
<b>Grafica 2.</b> Porcentaje de plántulas obtenidas de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc., con hojas verdaderas.....	32
<b>Grafica 3.</b> Porcentaje de explantes de <i>Capsicum annuum</i> L., que presentaron diferentes niveles de oxidación en dos medios de cultivo (MSB5 y MSC20).....	34
<b>Grafica 4.</b> Porcentaje de explantes de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc., que presentaron diferentes niveles de oxidación en dos medios de cultivo (MSB5 y MSC20).....	34
<b>Grafica 5.</b> Porcentaje de explantes de <i>Capsicum annuum</i> L., que presentaron callo en dos diferentes medios de cultivo (MSB5 y MSC20).....	36
<b>Grafica 6.</b> Porcentaje de explantes de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc., que presentaron callo en dos medios de cultivo (MSB5 y MSC20).....	37
<b>Grafica 7.</b> Caracterización del crecimiento de callo de <i>Capsicum annuum</i> L. en medio sólido por medio de una cinética de crecimiento y regresión lineal de las medias.....	41
<b>Grafica 8.</b> Caracterización del crecimiento de callo de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc. en medio sólido por medio de una cinética de crecimiento y regresión lineal de las medias.....	41
<b>Grafica 9.</b> Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de callo en medio sólido de <i>Capsicum annuum</i> L.....	43
<b>Grafica 10.</b> ANOVA de medias de la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de callo en medio sólido de <i>Capsicum annuum</i> L. y prueba de Tukey.....	43
<b>Grafica 11.</b> Caracterización del crecimiento de callo de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc. en medio sólido por medio de una cinética de crecimiento.....	44
<b>Grafica 12.</b> ANOVA de medias para la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de callo en medio sólido de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc. y prueba de Tukey.....	45
<b>Grafica 13.</b> Cinética de crecimiento de células en suspensión y tolerancia a Basta® de <i>Capsicum annuum</i> L. en medio líquido.....	46
<b>Grafica 14.</b> ANOVA de medias para la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión medio líquido de <i>Capsicum annuum</i> L. y prueba de Tukey...	46
<b>Grafica 15.</b> Cinética de crecimiento de células en suspensión y tolerancia a Basta® de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc, en medio líquido.....	47
<b>Grafica 16.</b> ANOVA de medias para la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión medio líquido de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc. y prueba de Tukey.....	48
<b>Grafica 17.</b> Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión de <i>Capsicum annuum</i> L. en medio líquido.....	49
<b>Grafica 18.</b> ANOVA de medias para la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión de <i>Capsicum annuum</i> L. y prueba de Tukey.....	49
<b>Grafica 19.</b> Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc.....	50
<b>Grafica 20.</b> ANOVA de medias para la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc. y prueba de Tukey.....	51

## I. Introducción.

El género *Capsicum* es uno de los cultivo de mayor importancia a nivel mundial. Los frutos que producen estas plantas son conocidos como chile, chilli, pimiento, pimiento dulce, pimienta, los cuales son utilizados en forma fresca, deshidratados o procesados para preparación de comida, también se utilizan en la industria farmacéutica y cosmética (Ortiz *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2016; Valadez-Bustos *et al.*, 2009). Los principales productores de chile a nivel mundial son China, México, Turquía, Indonesia y España. (FAOSTAT 2013).

Dentro del género *Capsicum* se reconoce alrededor de 200 variedades las cuales están agrupadas en 30 especies, de las cuales cinco son cultivados extensivamente: *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* Mill., y *C. pubescens* Ruiz & Pavón (Kothari *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2016).

Las especies *Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq. radica su importancia económica en sus frutos, ya que provee de nutrientes esenciales y metabolitos secundarios que son utilizados por el humano (Kothari *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2016). La demanda de los frutos de estas especies ha propiciado a buscar nuevas formas de propagación masiva y mejoramiento agronómico por medio de herramientas Biotecnológicas.

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica que nos permite controlar factores físicos, ambientales y químicos para así poder establecer sistemas biológicos y con ello llevar a cabo diversos estudios. (George *et al.*, 2008; Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006; Pierik, 1997) . En el caso del género *Capsicum* las células pueden ser utilizadas como modelos biológicos ya que tiene características sobresalientes en el ámbito agronómico, fisiológico, bioquímico y molecular (Ochoa-Alejo & Ramirez-Malagon, 2001).

El cultivo de tejidos vegetales bajo condiciones *in vitro* nos permitirá manipular plantas del género *Capsicum*, así como preservar de material genético, propagación de genotipos y fenotipos sobresalientes, obtener plantas libres de patógenos, producción de plantas transgénicas y producción de metabolitos secundarios (do Rêgo *et al.*, 2016; Mezghani *et al.*, 2007; Valadez-Bustos *et al.*, 2009).

La aplicación de la tecnología de DNA recombinante y el cultivo de tejidos vegetales ha dado pauta a la generación de plantas transgénicas. Las formas más usuales para obtener este tipo de plantas han sido por medio de *Agrobacterium tumefaciens* y biobalística. El género *Capsicum* tiene reportes para la producción de plantas transgénicas en su mayoría es por medio de *Agrobacterium tumefaciens* y no hay reportes de transformación de plantas del género por medio de biobalística.

En este trabajo se va utilizar la técnica de la biobalística para llevar a cabo la transformación genética de dos especies de chile (*C. annuum* L. y *C. chinense* Jacq.) en el cual se va insertar el plásmido pEarly101-AtPPiase4-YFP, con el cual se va establecer un sistema biológico para estudiar la actividad de la pirofosfatasa inorgánica de *Arabidopsis thaliana*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS CHILES HABANERO Y SERRANO

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica de los chiles serrano y habanero.

La clasificación de *Capsicum annuum* L y *Capsicum chinense* Jacq. se presenta en el cuadro 1.

División	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Orden	Solanales	Solanales
Familia	Solanaceae	Solanaceae
Género	Capsicum	Capsicum
Especie	<i>Capsicum annuum</i> L.	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.
Nombre común	Chile serrano	Chile habanero.

#### 2.1.2 Descripción botánica de los chiles.

Descripción botánica de *Capsicum annuum* L.

Planta herbácea pequeña con ramificación dicotómica, arbusto anual o perene, de 30 a 80 cm de alto, con raíz corta y pivotante. Los tallos son glabrescentes. Hojas alternadas, solitarias o en pares; peciolo de 4-7cm; hoja de forma oblonga-ovada, ovada u ovado-lanceolada, con un tamaño de 4-13 x 1.5- 4 cm, glabrescentes, base estrecha y ondulada, ápice corto acuminado o agudo. Flores solitarias y si racimos solo hasta 2; flores de color blanquecino, colgantes. Cáliz acampanado, 2-3 x 3 mm, cinco dientes, ondular, verde. Corola en roseta, cinco lóbulos blancos, de tamaño de 10 mm. Estambres 5, anteras, insertadas, de color azulada-purpura de tamaño de 1.8-2 mm. Ovario supero, 2-3 lóculos con numerosos óvulos, estilo corto con el estigma capitado. Fruto una baya, pericarpio carnosa y firme, hueco, colgantes, de color verde cuando joven para su mayoría de color rojo anaranjado, amarillo, marrón o púrpura, cuando está maduro, de formas diversas, hasta 15cm. Las semillas son de color amarillo pálido, discoide o reniformes, de 3,5 mm de diámetro (Lim, 2013).

Descripción botánica de *Capsicum chinense* Jacq.

Planta pequeña, muy ramificada, erecta, sub-arbusto anual o perenes, tamaño de 30-120 cm. Las hojas son de color verde medio, generalmente en forma oval, y por lo general se arrugan, es un rasgo distintivo. Flores y frutos se producen en grupos de 2-3 o más por cada nodo y este rasgo distingue de las otras especies del género *Capsicum*, que lleva uno por nodo. Las flores blancas tienen corola ligeramente verdosa y las anteras de color púrpura sin distender en los puntos de fusión de la base de los lóbulos; lóbulos de la corola

son usualmente erectos. Pedicelos erectos o se inclinan en la antesis. Los frutos varían mucho en tamaño y forma, que van desde tamaño de 0,5 cm de diámetro, globosos a cilíndrica, de 2-5 x 1,5-3 cm, con vainas alargadas hasta 10 cm de largo, arrugada, usualmente colgante, rojo a naranja a amarillo o blanco cuando está maduro (Lim, 2013)

### **2.1.3 Centro de origen y distribución del género *Capsicum*.**

El género *Capsicum* es originario de América del sur, su centro de origen se encuentra en la región que comprende Bolivia, el norte de Argentina, el centro y sur de Brasil. Estudios biogeográficos y arqueo-botánicos indican que durante su dispersión por el continente Americano, algunas especies fueron domesticadas de manera independiente en distintos lugares: *C. annuum* L., en México o en el norte de centro América; *Capsicum bataccum* L. en el sur de Bolivia; *Capsicum chinense* Jacq., en el norte del Amazonas; *C. frutescens* en Costa Rica y posiblemente también en México; *C. pubescens* Ruiz & Pavón., en las elevaciones medias de los Andes (Andrews, 1995; Hernández-Verdugo *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 2007)

### **2.1.4 Importancia económica.**

*Capsicum annuum* L. es el segundo vegetal más consumido y más importante económicamente alrededor del mundo, sus frutos proveen de nutrientes esenciales para el humano como lo es la vitamina A, C y E, compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, capsicinoides y calcio (Rao *et al.*, 2016)

Los chiles en México son de gran importancia ya que *C. annuum* L., se cultiva en gran parte del país; *C. chinense* Jacq., se cultiva principalmente en la Península de Yucatán (Hernández-Verdugo *et al.*, 1999).

## 2.2 EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) se basa en la teoría de la totipotencialidad que postula que a partir de una célula u órgano de la planta se puede regenerar una planta completa.

El cultivo de tejidos es una herramienta biotecnológica con la cual podemos utilizar para aislar células, tejidos u órganos vegetales y así promover su crecimiento y multiplicación en medio de cultivo artificiales, bajo condiciones medioambientales controladas y asépticas. Con el CTV podemos controlar diferentes factores físicos (pH, luz, temperatura), químicos (composición del medio de cultivo, nutrientes orgánicos e inorgánicos, fuente de carbono y reguladores de crecimiento), biológicos (fisiología de la planta donadora y tamaño del explante) y ambientales (humedad y ambiente gaseoso dentro del recipiente de cultivo) (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Loyola-Vargas & Vázquez-Flota 2006; Smith, 2001)

### 2.2.1 Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales (CTV).

El cultivo de tejidos vegetales se desarrolló y estableció para resolver problemas relacionada con desordenes de plantas. El CTV es una herramienta biotecnológica que nos permite resolver esos problemas y tiene una serie de diversas aplicaciones como son (do Rêgo *et al.*, 2016; Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo 2012; Smith 2001):

- Micropropagación de diferentes especies de plantas por medio de organogénesis y embriogénesis.
- Obtención de plantas libres de patógenos, eliminado bacterias, hongos y virus.
- Producción de plantas haploides o doble haploides.
- Inducción de variación epigenética y genética a partir de una variedad de planta.
- Obtención de plantas híbridas por medio del rescate de embriones híbridos o células somáticas.
- Conservación de germoplasma vegetal de alto valor.
- Clonación de genotipos resistentes a estrés biótico abiótico.
- Permite establecer un sistema para estudiar diferentes procesos bioquímicos, fisiológicos y morfogénesis de las plantas.
- Obtención de metabolitos secundarios, como una alternativa para la biofarmacia.
- Generación de plantas transgénicas resistentes a plagas y enfermedades.
- Caracterización del crecimiento de células.

### **2.2.2 Factores determinantes en la respuesta morfogénica de los cultivos *in vitro*.**

El éxito de la propagación por medio de cultivo de tejidos vegetales depende de tanto de factores extrínsecos e intrínsecos de la planta, algunos factores involucrados son:

- Estado fisiológico de la planta.
- Estado bioquímico de la planta.
- Condiciones de incubación.
- Medios de cultivo y reguladores de crecimiento.
- Explante utilizado.
- Oxidación.
- Genotipo.

Los problemas que se presentan en el cultivo de tejidos vegetales del género *Capsicum* principalmente son (do Rêgo *et al.*, 2016):

- La naturaleza recalcitrante de la planta: el término recalcitrante se refiere a la inhabilidad de las células, tejidos u órganos vegetales a responder a condiciones de cultivo *in vitro*.
- La morfogénesis no está bien definida ya que los brotes no se forman de una manera correcta, pero si se llegan a formar no ocurre la elongación de los brotes.
- La dependencia del genotipo es muy importante ya que existen diferentes variedades y estas responden de diferente manera, lo que dificulta establecer un protocolo de regeneración para dichas variedades.

### **2.2.3 Medio de cultivo**

El crecimiento y desarrollo de células vegetales en condiciones *in vitro* se lleva a cabo porque se les proporciona macronutrientes (nitrógeno, potasio, fósforo, etc.), micronutrientes, (cobalto, cobre, hierro, zinc, magnesio etc.) en forma absorbible, algunas fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, fructosa), vitaminas y diferentes reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas) y agente gelificante (agar-gel, agar, gelzan) (Bhojwani & Dantu, 2013).

### **2.2.4 Cultivo de callos.**

Los cultivos celulares en su mayoría se inician a partir de diferentes tejidos u órganos los cuales son sembrados en medios de cultivo que contienen auxinas fuertes como el 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), picloram, y en algunas ocasiones ANA (ácido naftalenacético), las cuales promueven una masa de células indiferenciadas llamada "callo".

El crecimiento y desarrollo de los cultivos de callos pasan por tres fases: (1) inducción de la división celular, (2) periodo de activación de la división celular durante el cual las células diferenciadas pierden algunas características especializadas que pudieron haber adquirido y se convierten en indiferenciadas, (3) periodo en donde se disminuye la división celular y el callo comienza nuevamente a tomar un proceso de rediferenciación (George *et al.*, 2008).

Los callos son utilizados como una fuente de material para llevar a cabo estudios bioquímicos y moleculares, así como estudios de embriogénesis somática y organogénesis, también son utilizados para obtener células en suspensión, obtener protoplastos y metabolitos secundarios (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2012).

### **2.2.5 Cultivo de células en suspensión.**

Las células en suspensión son iniciadas a partir de callo que se denomina “friable” el cual tiene la característica de ser disgregable. Para obtener células en suspensión se utilizan callos friables los cuales son colocados en medio líquido, esta mezcla se somete a agitación constante por un determinado tiempo, logrando así obtener células disgregadas, también se puede hacer uso de un tamiz para quitar los agregados celulares y poder así tener una suspensión más homogénea de células. Las células en suspensión se caracterizan por ser células individuales o grupos pequeños de células que están suspendidas en un medio líquido, además que tienen una tasa alta de división y más uniforme que los callos (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2012).

### **2.2.6 Caracterización de los cultivos *in vitro*.**

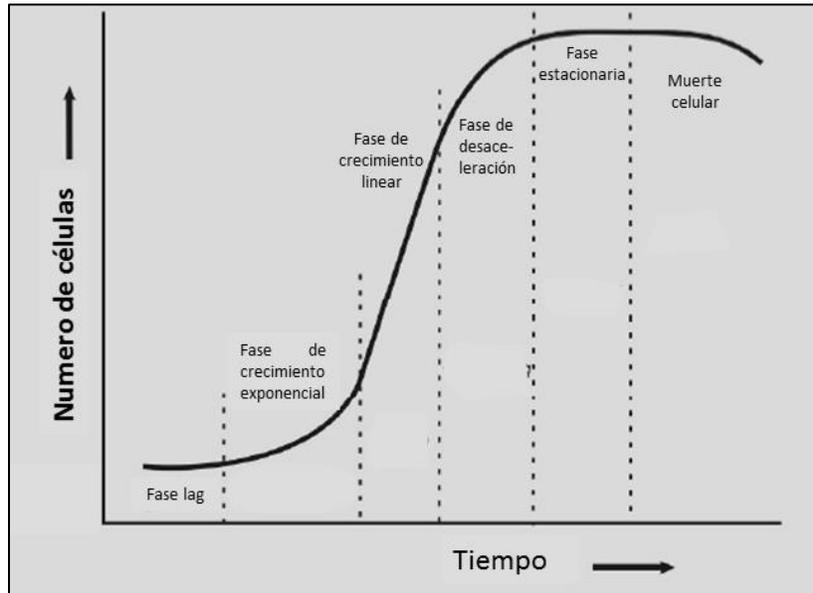
En cultivo de tejidos vegetales es muy importante caracterizar el crecimiento celular. Este proceso principalmente se lleva a cabo por medio de cinéticas de crecimiento de callos o de células en suspensión y una vez realizado esto, se pueden realizar diferentes estimaciones que sirven en diferentes procesos de biotecnología.

La caracterización de crecimiento de callos y células en suspensión se puede realizar por medio de mediciones de diferentes parámetros que darán como resultado la obtención de cinéticas de crecimiento. Algunas mediciones que se realizan para observar el comportamiento del crecimiento celular son: índice de crecimiento, monitoreo del peso seco y fresco, volumen de células sedimentadas, volumen de células suspendidas, conteo de células por unidad de área, densidad de celular, conductividad eléctrica, pH de cultivos líquidos (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

Para saber cómo es el comportamiento del crecimiento de células vegetales se realiza un monitoreo a través del tiempo, dando como resultando la obtención de una curva sigmoidea (Figura 1)

El crecimiento de las células vegetales tiene varias fases que pueden ser apreciables dentro de una curva de crecimiento: (1) La fase lag en la cual las células se adaptan al medio fresco y por cambios en el potencial osmótico puede disminuir el peso, (2) fase exponencial

de crecimiento en el cual las células inician la división celular aumentando su peso, (3) fase lineal de crecimiento se mantienen en división en la mayor parte de la población y otra comienza su alargamiento celular, (4) fase de desaceleración, en donde la tasa de crecimiento disminuye, ya que la mayoría de las células se están alargando y comienza el metabolismo secundario, (5) fase estacionaria en donde la tasa de división disminuye a la mitad (Figura 1) (George *et al.* 2008, Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2012).



**Figura 1.** Cinética típica de crecimiento celular. Se muestran las diferentes fases de crecimiento. Tomada y modificada de George *et al.*(2008).

Existen otros parámetros de crecimiento indirectos que se calculan con las cinéticas de crecimiento tanto del peso seco y peso fresco, estas estimaciones son el índice de crecimiento, tasa específica de crecimiento y el tiempo de duplicación (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2012).

El índice de crecimiento (IC) es la estimación relativa de dicha capacidad, en la que se correlaciona con la biomasa acumulada en un tiempo de muestreo con el tiempo inicial. Es la diferencia entre la biomasa final ( $P_f$ ) y la biomasa inicial ( $P_i$ ) da como resultado la biomasa acumulada:

$$IC = \frac{P_f - P_i}{P_i}$$

La tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) se refiere a la pendiente más pronunciada de una curva sigmoidea, y se define como la tasa de aumento de la biomasa de una población de células por unidad de concentración de biomasa. Este período de tiempo se produce entre

la fase lag y fase estacionaria. Durante este período, el incremento en la población de células se ajusta a una ecuación de línea recta y se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$\ln x = \mu t + \ln x_0$$
$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$$

Donde  $t$ = tiempo,  $x$ = es la biomasa al tiempo  $t$ ,  $X_0$ = es la biomasa inicial.

Una vez realizada la cinética de crecimiento se puede calcular el tiempo que tardaría en duplicarse ( $dt$ ) nuestro material biológico (callo, células en suspensión), para esto ya se realizó el cálculo de la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) y se realiza la siguiente ecuación:

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

### **2.2.7 Vías de regeneración *in vitro* de plantas.**

Las vías de regeneración para obtener nuevamente plantas completas en cultivo de tejidos vegetales son: Embriogénesis directa o indirecta y la organogénesis directa o indirecta. En ambos casos, el proceso morfogénético indirecto involucra la dediferenciación de las células de tejidos u órganos para dar lugar a la formación de callo y, posteriormente, las células se rediferencian en un embrión o un grupo de ellas da lugar a un órgano. La morfogénesis directa tiene lugar en células predeterminadas por su estado bioquímico y pueden dar origen rápidamente a embriones somáticos u órganos adventicios (Bhojwani & Dantu, 2013; George *et al.*, 2008; Thorpe, 2012).

#### **Embriogénesis somática.**

La embriogénesis es el proceso de formación de embriones a partir de células somáticas o sexuales sin que sean producto de una fusión de gametos y que tienen el mismo proceso de desarrollo que los embriones cigóticos compartiendo características similares tanto los embriones cigóticos como los somáticos (Thorpe, 2012).

Hay dos tipos de embriogénesis: (1) embriogénesis directa es el proceso en el cual se forman los embriones a partir del explante. (2) en la embriogénesis indirecta se forman los embriones a partir de una masa celular que es el callo.

#### **Organogénesis**

La organogénesis es el proceso de formación de órganos tales como hojas raíces o brotes a partir de un explante. Este proceso también puede llevarse a cabo de forma directa e indirecta.

En la organogénesis directa se lleva a cabo la formación de órganos vegetales directamente de la superficie del explante, en cambio en la organogénesis indirecta los órganos vegetales se forman a partir de una fase intermedia que es el callo y la cual debe de ser modulada con reguladores de crecimiento para lograr dicho proceso (Bhojwani & Dantu, 2013).

### **2.2.8 Cultivo *in vitro* en el género *Capsicum*.**

Los estudios que se ha reportado en las especies; *Capsicum annuum* L., y *Capsicum chinense* Jaqc., ha sido la regeneración de plantas mediante embriogénesis somática y organogénesis. Cabe destacar que para estos proceso *in vitro* se han utilizado el medio de cultivo formulado por Murashige & Skoog, 196 y las vitaminas B5 formuladas por Gamborg (1968) son las que han sido mayormente utilizadas.

La organogénesis es la vía de regeneración que más reportes ha tenido. Los primeros reportes de la regeneración de *Capsicum annuum* L., son de Gunay & Rao (1978), Agarwal & Chandra (1983), Phillips & Hubstenberger (1985), Agrawal *et al.*, (1989); en sus trabajos mencionan el uso de reguladores de crecimiento vegetales como el BA (6-Bencilaminopurina) que es una citocinina, la cual se utilizó para inducir brotes en los explantes. Reportes más recientes mencionan que para *Capsicum annuum* L., se ha seguido utilizando el BA en combinación con otros reguladores de crecimiento como AIA, ANA, AG<sub>3</sub>, AIA (Golegaonkar & Kantharajah, 2006; Khan *et al.*, 2011; Dafadar *et al.*, 2012). En el caso de *Capsicum chinense* Jaqc., para la inducción de la organogénesis se ha hecho uso de TDZ (Santana-Buzzy *et al.*, 2005) y también se ha realizado combinación de reguladores como BA, AIA y KIN (Gogoi *et al.* 2014).

La embriogénesis somática en *Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jaqc. ha tenido pocos reportes, pero se ha mencionado que el regulador de crecimiento utilizado para este proceso ha sido la auxina; 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), este regulador de crecimiento también tiene efecto en la formación de callo (Buyukalaca & Mavituna 1996, Kintzios *et al.* 2001, López-Puc *et al.* 2006, Zapata-Castillo *et al.* 2007).

En el cuadro 2 y 3 se muestran en orden cronológico reportes de investigaciones que se han hecho en las especies *Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jaqc., se menciona el tipo de explante que se ha utilizado, el medio de cultivo y reguladores de crecimiento utilizados para cada proceso (organogénesis y embriogénesis). Las investigaciones realizadas no han resultado eficientes ya que no se ha podido obtener un gran número de plantas a partir de un solo explante, pero muchos factores no han sido analizados los cuales deben de investigarse para enriquecer la investigación.

**Cuadro 2. Reportes de regeneración in vitro de *Capsicum annuum* L.**

No.	Especie	Explante	Vía de regeneración	Medio de cultivo + reguladores de crecimiento.	Referencia
1	<i>Capsicum annuum</i> L.	Cotiledón	Organogénesis directa	BA (8.88 µM)+IAA (2.85–5.71 µM)	Gunay & Rao (1978)
2	<i>C. annuum</i> L.	Embrion cigotico	Organogénesis directa	MS + BA (22.2 µM)	Agarwal & Chandra (1983)
3	<i>C. annuum</i> L.	Plántulas	Organogénesis directa	MS + BA (2.22–44.4 µM)	Phillips & Hubstenberger (1985)
4	<i>C. annuum</i> L.	Hipocótilo, hoja cotiledonar, tallo, hoja, raíz, embrión.	Organogénesis directa	MS + BA (22.2 µM)+IAA (2.85–5.71 µM)	Agrawal <i>et al.</i> , (1989)
5	<i>C. annuum</i> L.	hoja cotiledonar, hipocótilo	Organogénesis directa	MS + BA(2.22, 4.40, 8.90 µM)+IAA (0.57, 5.71 µM)	Arroyo & Revilla (1991)
6	<i>C. annuum</i> L.	Hipocótilo	Organogénesis	MS+ BA (5 mg ) + AIA (3 mg)	Valera-Montero & Ochoa-Alejo (1992)
7	<i>C. annuum</i> L.	Explantos de semilla	Organogénesis directa	MS + BA (22.2 µM)+NAA (0.54 µM)	Ebida & Hu (1993)
8	<i>C. annuum</i> L.	Semillas maduras	Organogénesis directa	MS sin reguladores de crecimiento	Ezura <i>et al.</i> , (1993)
9	<i>C. annuum</i> L.	Meristemos apicales	Organogénesis directa	MS + BA (8.88 µM)	Madhuri & Rajam (1993)
10	<i>C. annuum</i> L.	Embrión cigótico maduro	Embriogénesis somática directa	MS + 2–10% sacarosa, 10% CW, 2,4-D (4.53–22.6 µM)	Harini & Lakshmi Sita (1993)
11	<i>C. annuum</i> L.	Meristemo con cotiledones	Organogénesis	MS + 3% sacarosa + BA (66.6, 88.8 µM)	Christopher & Rajam (1994)
12	<i>C. annuum</i> L.	Embrión cigótico maduro	Embriogénesis somática indirecta	MS + 3% sacarosa 2,4-D (4.52 µM)	Buyukalaca & Mavituna (1996)
13	<i>C. annuum</i> L.	Embrión cigótico inmaduro	Embriogénesis somática directa	MS + 6–10% sacarosa, 2,4-D (9 µM) TDZ (10 µM)	Binzel <i>et al.</i> , (1996a)
14	<i>C. annuum</i> L.	Mitad de semillas	Organogénesis directa	MS + 3% sacarosa + KIN, BA, 2iP, ZEA, IAA, NAA (10, 20, 30,µM)	Binzel <i>et al.</i> , (1996b)
15	<i>C. annuum</i> L.	Hoja cotiledonar	Organogénesis directa	MS + BA (8.88 µM) + IAA (2.85 µM) + AgNO <sub>3</sub> (5.85 µM) + AG3(6 µM)	Hyde & Phillips (1996)

16	<i>C. annuum</i> L.	Hipocótilos	Organogénesis directa	MS sin reguladores de crecimiento al inicio, para enraizar AIA (60 mg/l)	Ramírez-Malagón & Ochoa-Alejo (1996)
17	<i>C. annuum</i> L.	Cotiledón	Organogénesis	MS + BA (13, 35 $\mu$ M) + AIA (3.4–5.9 $\mu$ M)+ EBr (0.1 $\mu$ M)	Franck-Duchenne <i>et al.</i> , (1998)
18	<i>C. annuum</i> L.	Cotiledón	Organogénesis directa	MS + BA (22.2–31 $\mu$ M) + PAA (14.7 $\mu$ M) + ANA (5.37 $\mu$ M)	Husain <i>et al.</i> , (1999)
19	<i>C. annuum</i> L.	Hoja primer, segundo y tercer nivel.	Embriogénesis somática indirecta	MS + BA (12.9 $\mu$ M) + 2,4-D (9 $\mu$ M)	Kintzios <i>et al.</i> (2000)
20	<i>C. annuum</i> L.	Embrión maduro y diferentes niveles de hojas	Embriogénesis somática indirecta	MS + sacarosa 8% + BA (12.9 $\mu$ M) + 2,4-D (9 $\mu$ M) + tiamina 0.5 mg + diferentes vitaminas.	Kintzios <i>et al.</i> (2001)
21	<i>C. annuum</i> L.	Embrión cigótico	Organogénesis directa	MS + BA (22.2 $\mu$ M)+NAA (5.37 $\mu$ M)	Arous <i>et al.</i> , (2001)
22	<i>C. annuum</i> L.	Plántulas y explantes de semilla	Organogénesis directa	MS + TDZ (4.5–9 $\mu$ M)	Dabauza & Pena (2001)
23	<i>C. annuum</i> L.	Embrión maduro	Embriogénesis somática indirecta	MS + sacarosa (200 mM) + 2,4-D (0.40-0.45 $\mu$ M) + centrophenoxine (1.15-1.30 $\mu$ M) + carbón activado (5.0 g)	Steinitz <i>et al.</i> (2003)
24	<i>C. annuum</i> L.	Plántulas	Organogénesis	MS + TDZ (1.0-3.0 mg/L )	Venkataiah <i>et al.</i> (2003)
25	<i>C. annuum</i> L.	Semillas	Organogénesis directa	MS1.95 g/l MES + BA (17.74–44.38 $\mu$ M) + AIA (1.44–4.57 $\mu$ M) + AgNO <sub>3</sub> (10 $\mu$ M)	Kumar <i>et al.</i> (2005)
26	<i>C. annuum</i> L.	Hoja cotiledonar y hojas jóvenes	Organogénesis directa	MS + BA (17.8, 26.6, and 35.5 $\mu$ M), BA (4.4 $\mu$ M) + AG <sub>3</sub> (2.9 $\mu$ M), AIA (2.9 $\mu$ M).	Golegaonkar & Kantharajah (2006)
27	<i>C. annuum</i> L.	Cotiledón	Organogénesis directa	MS + CuSO <sub>4</sub> (0–5 $\mu$ M) + BA (22.2 $\mu$ M) + ácido fenil acético PAA (14.7 $\mu$ M), BA (13.3 $\mu$ M) + AG <sub>3</sub> (0.58 $\mu$ M), AIA (5.7 $\mu$ M)	Joshi & Kothari (2007)
28	<i>C. annuum</i> L.	Embrión inmaduro	Embriogénesis directa	MS + sacarosa + 2 mg/L 2,4-D + agua de coco 10%	Kaparakis & Alderson, (2008)
29	<i>C. annuum</i> L.	Internodos	Organogénesis indirecta	MS + 2,4-D (10 $\mu$ M) + BA (2.0 $\mu$ M). BA (5.0 $\mu$ M) + TDZ (2.5 $\mu$ M). AIB (1.0 $\mu$ M).	Khan <i>et al.</i> (2011)
30	<i>C. annuum</i> L.	Hojas	Organogénesis directa	MS + BA (6.66–44.38 $\mu$ M), Kn (2.32 $\mu$ M), AG <sub>3</sub> (5.20–13.00 $\mu$ M), IAA (2.85–5.71 $\mu$ M).	Dafadar <i>et al.</i> (2012)

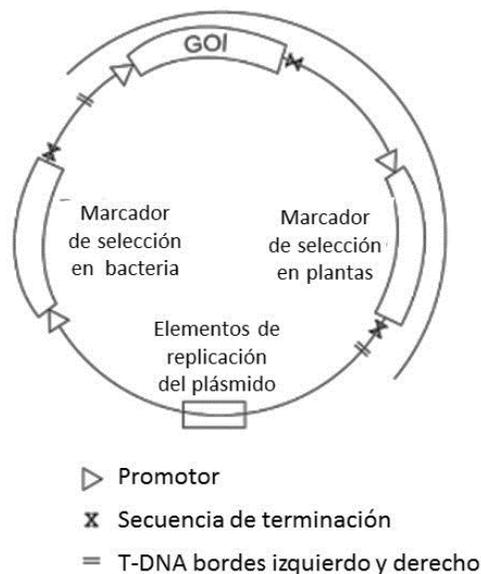
<b>Cuadro 3. Reporte de regeneración <i>in vitro</i> de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.</b>					
<b>No.</b>	<b>Especie</b>	<b>Explante</b>	<b>Vía de regeneración</b>	<b>Medio de cultivo + reguladores de crecimiento.</b>	<b>Referencia</b>
1	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.	Nudos y tallos	Organogénesis directa	MS + TDZ (3.4 µM)	Santana-Buzzy et al., (2005)
2	<i>C. chinense</i> Jacq.	Hoja cotiledonar, embrión cigótico, hipocotilo.	Embriogénesis somática directa	MS + 2,4-D (9.05 µM), ácido absicico (ABA) (1.89 µM), AG <sub>3</sub> (1.1 µM).	López-Puc et al. (2006)
3	<i>C. chinense</i> Jacq.	Nodo, internodo, hipocótilo, semillas.	Embriogénesis somática directa	MS + 2,4-D (9.05 µM). TDZ (3.4 µM)	Zapata-Castillo et al. (2007)
4	<i>C. chinense</i> Jacq.	Segmentos de embriones maduros	Embriogénesis somática indirecta	MS+ ANA (8.9 µM) + AIA (11.4 µM) + BA (8.9 µM)	Solís-Ramos et al. (2010)
5	<i>C. chinense</i> Jacq.	Hojas cotiledonares	Organogenesis indirecta	MS + TDZ (18.16 µM), AIA (5.70 µM), putrescina (Put) (5.6 µM), TDZ (4.54 µM).	Kehie et al. (2012)
6	<i>C. chinense</i> Jacq.	Hoja cotiledonar	Organogenesis	MS + BA (35 µM) + KIN (15 µM). BA (14.8 µM) + KIN (60 µM), AIB (5 µM).	Gogoi et al. (2014)

## 2.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

En el área de biotecnología, la transformación genética se define como el proceso de inserción de DNA de un cierto organismo al interior de células receptoras, conduciendo a cambios de ciertos rasgos o características permanentes en el genoma de la célula blanco y en su descendencia, esta nueva información puede provenir de especies diferentes o de la misma especie (do Rêgo *et al.*, 2016; Hull *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Plásmido:

En la ingeniería genética hacen uso de construcciones de plásmidos para llevar a cabo transformaciones, los cuales están conformados por diferentes secuencias de genes y/o marcadores moleculares los cuales son: promotores, secuencia de inicio y termino, genes de interés, genes de resistencia/selección, genes reporteros (Figura 2) (Hull *et al.*, 2009; Pua & Davey, 2007).



**Figura 2.** Construcción típica de un plásmido para la transformación en plantas. El recuadro muestra genes (GOI= gen de interés) y secuencia necesaria para su expresión. Las flechas abiertas indican promotores, las flechas dobles cerradas, indican terminación de la secuencia. En el caso de transformación por medio de *Agrobacterium*, los bordes derecho e izquierdo de T-DNA son necesarios; para biobalística estos no son necesarios. Modificado de Hull *et al.* (2009)

### Promotores de expresión.

Al llevar a cabo inserción de genes dentro de células, estos van a ser regulados por promotores, los cuales van a dirigir su expresión, así como también su posición dentro del genoma. Las secuencias de los promotores nos permiten regular los niveles y patrones de

expresión transgénica. Hay dos grandes categorías de promotores; Promotores constitutivos y promotores que se expresan en tejidos específicos (Pua & Davey, 2007):

Los promotores constitutivos dirigen la expresión de genes insertados en las plantas, la expresión se da en todos los tejidos y en todos los estadios de desarrollo de la planta aunque puede variar la expresión entre tejidos de diferentes órganos y estadios de desarrollo. Algunos ejemplos de promotores de este tipo son: el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV 35S), el promotor de la actina del arroz (*Act 1*), promotor de ubiquitina del maíz (*Ubi 1*), promotor del alcohol deshidrogenasa del maíz (*Adh 1*).

Los promotores de expresión específica dirigen la expresión espacial y temporal de los transgenes en ciertos tejidos de la planta y en diferentes estadios de la planta. El promotor más estudiado en monocotiledóneas es fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), que dirige la expresión del color verde en tejidos. También hay promotores inducible por lesión, promotores que son específicos de raíz, promotores específicos de endospermos, promotores específicos de granos de polen y promotores inducibles por estrés.

### **Marcadores de selección.**

Una vez llevada a cabo la transformación de células vegetales por diversos métodos, ya sea por *Agrobacterium tumefaciens* o por biobalística, es necesario llevar a cabo una selección de células transformadas. Las células transformadas van a ser seleccionadas por medio de resistencia a antibióticos o herbicidas, la cual es conferida por el plásmido insertado.

Los genes más utilizados para que las células transformadas presenten resistencia a antibióticos son los siguientes (Hull *et al.*, 2009):

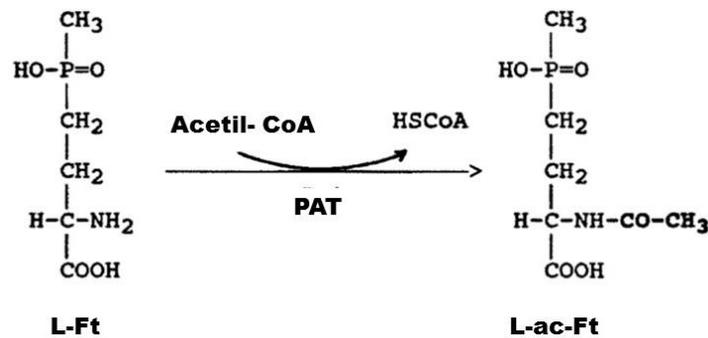
- Gen *nptII* confiere resistencia a kamamicina o neomicina.
- Gen *aphIV* confiere resistencia a higromicina.
- Gen *bla* confiere resistencia a ampicilina.
- Gen *aad* confiere resistencia a estreptomycinina y a espectomicina.

La transformación genética en células vegetales también se hace uso de genes que confieren resistencia a herbicidas. Algunos de los genes más utilizados en cultivos son los genes *bar* y *pat*, que le confieren a las células transformadas resistencia al herbicida glufosinato de amonio también llamado L-fosfinotricina (L-Ft) y comercialmente conocido como Basta® (Pua & Davey, 2007). Estos genes (*bar* y *pat*) son muy similares con una compatibilidad de secuencia entre nucleótidos del 87%, ambos codifican a la enzima fosfinotricina-N-acetil-transferasa (PAT) de 183 aminoácidos con 83% de parecido en la secuencia de aminoácidos, su peso es aproximadamente es de 22kDa. Estos genes producen la enzima que tienen la misma actividad bioquímica y afinidad al mismo sustrato (Carbonari *et al.*, 2016).

La L-fosfinotricina es un herbicida de amplio espectro, que actúa como un inhibidor competitivo de la glutamina sintetasa, la cual es una enzima central en el metabolismo del nitrógeno en plantas (Dröge *et al.*, 1992). La glutamina sintasa (GS) es una enzima que cataliza la reacción de L-glutamato a L- glutamina por medio de la asimilación del amonio en el citoplasma y en los plastidios, pero predominantemente en los cloroplastos (Tan *et al.*, 2006).

La forma de acción de la L-fosfinotricina se da por la competencia del sitio de unión a la enzima GS, lo que trae como consecuencia la deficiencia en la conversión de L-glutamato a L- glutamina, causando un alto nivel de acumulación de amonio que resulta toxico para las plantas (Hoerlein, 1994). La inhibición de la enzima GS y la acumulación de amonio acarrea problemas secundarios como son: la inhibición de la enzima ribulosa 1,5- bisfosfato carboxilasa / oxigenasa (RUBISCO), también interfiere en el flujo de electrones de los fotosistemas teniendo afectación en la fotosíntesis (Carbonari *et al.*, 2016).

La sobre expresión de la enzima PAT en células transformadas en un medio con presencia de Basta®, puede rápidamente convertir el agente de selección en un metabolito no toxico llamado *N-acetil-L-glufosinate* (NAG / L-ac-Ft) esto por medio de la acetilación del glufosinato, como consecuencia no se va a inhibir la acción de la enzima GS (Figura 3) (Tan *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Reacción enzimática en donde L-fosfinotricina se acetila por medio de la enzima PAT dando a la síntesis de L-ac-Ft.

### Genes reporteros.

Los genes reporteros son de importancia en algunas áreas de la investigación de la Biología, ya que con ellos podemos llevar a cabo mediciones cualitativas y cuantitativas. Los genes reporteros son de utilidad para estudiar la actividad de transcripción de genes tanto en condiciones *in vivo* e *in vitro*, estudiar el comportamiento de algunos linajes celulares y visualizar la eficiencia de los diferentes formas de transformación genética en las células (Anson, 2007).

Los marcadores más utilizados son los genes que codifican para proteínas fluorescentes, genes que codifican para la proteína luciferasa y genes de bacterias como el *LacZ* proveniente de *E. coli*, estos marcadores da ventajas para hacer análisis histológico.

Las proteínas de fluorescencia son un marcador que permite monitorear la expresión activa de genes, visualizar proteínas intracelularmente y en la ingeniería genética son usadas como un biosensor para monitorear la dinámica de proteínas de interés (Sample *et al.*, 2009).

Las proteínas fluorescentes están constituidas por alrededor de 230 aminoácidos los cuales se pliegan de forma rígida, en 11 hebras alineadas y en forma beta (Nienhaus & Nienhaus, 2014). Estas tienen una gama amplia de colores las cuales pueden ser observadas en el espectro visible y ultravioleta (Sahoo, 2012). Las proteínas fluorescentes son divididas en siete espectros las cuales están agrupadas en su espectro máximo de emisión, estas son: azul (BFPs; 440–470 nm), azul claro (CFPs; 471–500 nm), verde (GFPs; 501–520 nm), amarillo (YFPs; 521–550 nm), naranja (OFPs; 551–575 nm), rojo (RFPs; 576–610 nm), rojo oscuro (FRFPs; 611–660 nm) (Sample *et al.*, 2009).

La microscopía electrónica es una herramienta útil para visualizar proteínas fluorescentes, permitiendo observar en tiempo y espacio procesos biológicos a nivel celular y hasta molecular. La visualización de la fluorescencia es posible ya que el microscopio emite fluorescencia en el tejido blanco en diferentes planos para así coleccionar datos y generar una imagen (Nienhaus & Nienhaus, 2014).

### **2.3.1 Métodos de transformación genética en plantas.**

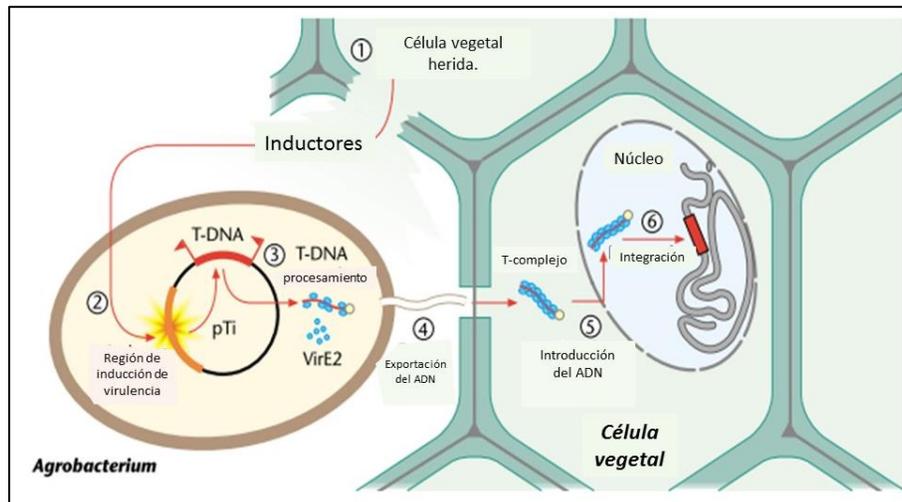
La transformación genética de células vegetales se puede llevar a cabo de manera directa o indirecta. La forma de transformación genética indirecta más usada es por medio de bacterias del género *Agrobacterium* y de manera directa es por medio de biobalística.

#### ***Agrobacterium tumefaciens***

La transformación genética que se realiza de manera directa se hace por medio de bacterias (principalmente por *Agrobacterium tumefaciens*), la cual tiene un plásmido llamado T-DNA, este plásmido le confiere a la bacteria la capacidad de infectar células vegetales y provocarles tumores. El proceso de transformación requiere de órganos vegetales dañados los cuales producen precursores para regenerar las paredes celulares de la planta, los precursores son censados por la bacteria e inducen la síntesis de proteínas de infección (VirD2 y VirD2), las cuales forman un complejo para ser exportado junto con el gen de interés hacia la célula vegetal, posteriormente este complejo se dirige hacia el núcleo para así integrarse al genoma de la planta (Ver figura 4.) (Crouzet & Hohn, 2002)

La transformación genética por este método se da al azar, respecto al sitio de inserción cromosómica, pero tiene la característica que la inserción de genes se da en sitios donde

la transcripción es activa. También otra característica de las células que resultan transformadas por este método es que el 50% de estas células solo tienen una copia en su genoma de los transgenes insertados (Crouzet, P., & Hohn, 2002).



**Figura 4.** Transformación genética de células vegetales por medio de *Agrobacterium spp.* Imagen tomada y modificada de (Crouzet & Hohn, 2002).

### Biobalística

La biobalística es un método de transformación genética directa en donde se emplean microproyectiles de tungsteno u oro, a las cuales se les añade DNA de interés. Esta mezcla se coloca en una cámara, en su interior genera una presión producida por algún gas inerte para así poder acelerar a altas velocidades las partículas para conseguir que estas puedan entrar a las células de interés (Kikkert, 2001; Sanford, 1988).

La transformación mediada por biobalística permite la transformación de numerosos tipos de tejidos vegetales, como lo son células en suspensión, callo, tejidos meristemáticos, embriones inmaduros, protocormos y granos de polen (Southgate *et al.*, 1995).

El éxito que se obtenga con la transformación genética por medio de biobalística depende de los factores como: (1) tipo de microproyectil (tamaño y concentración), (2) la adherencia del DNA a los microproyectiles, (3) tipo de tejido, (4) distancia entre el microacarreador y el tejido blanco, (5) presión y vacío en la cámara de bombardeo, (6) construcción y concentración del plásmido (Southgate *et al.*, 1995)

Se ha demostrado que la transformación por medio de biobalística ha resultado exitosa ya que se han obtenido plantas transgénicas como maíz, trigo, arroz, algodón, caña de azúcar, arándano y especies como *Arabidopsis thaliana*. Estas plantas han sido seleccionadas por medio de agentes selectivos como son antibióticos y herbicidas (Klein & Fitzpatrick-Mcelligott, 1993).

### **2.3.3 Reportes de transformación genética de *Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jaqc.**

La especies (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jaqc) tienen reportes de transformación genética en su mayoría por medio de *Agrobacterium tumefaciens*.

El primer reporte de transformación genética de varias variedades de *Capsicum annuum* L. lo llevó a cabo Liu *et al.* (1990) por medio de *Agrobacterium tumefaciens*. En esta investigación se menciona que se transformaron hojas jóvenes y cotiledonares, se utilizó un plásmido conteniendo un promotor constitutivo (CaMV 35S), un gen de selección que confería resistencia Kanamicina y un gen reportero (GUS).

En el cuadro 4 se enlistan las investigaciones que se han hecho para la transformación de los chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jaqc), la mayoría de los reportes menciona que las transformaciones se ha realizado con plásmidos con promotor constitutivo (CaMV 35S), gen (*nptII*) que confiere resistencia a kanamicina y gen (GUS) que produce la enzima beta-glucoronidasa.

Investigaciones recientes reportan transformación genética en *Capsicum annuum* L., por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, en donde se insertaron genes de interés (*BABY BOOM*) los cuales están implicados en la embriogénesis somática (Heidmann *et al.* 2011)

En *Capsicum chinense* Jaqc., sólo hay dos reportes de transformación y se realizó por medio de *Agrobacterium tumefaciens* (Arcos-Ortega *et al.* 2010; Solís-Ramos *et al.* 2009). Estas investigaciones son las primeras que reportan el uso de genes reporteros como lo son las proteínas fluorescentes.

Cuadro 4. Reporte de transformación por medio de diferentes cepas de <i>Agrobacterium spp.</i> , en <i>Capsicum</i> ( <i>C. annuum</i> L. y <i>C. chinense</i> Jaqc.)								
No.	Especie/ variedad	Cepa de <i>Agrobacterium</i>	Plásmido	Promotor	Marcador de selección/ resistencia	Genes reporteros / Gen de interés	Tejido transformado	Referencia
1	<i>Capsicum annuum</i> L. Early California, Wonder, NVH3051, Jupiter, Liberty, Bell, Silvestre Guatemala	A281, C58 (GV3850)	pCV 3850	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	GUS ( <i>beta</i> - glucuronidasa)	Hojas jóvenes, hojas cotiledonares	Liu <i>et al.</i> (1990)
2	<i>C. annuum</i> L.	LBA 4404	p5T35 AD	CaMV 35S	<i>sur B</i> / <i>chlorsulfuron</i>	GUS / <i>Acetolactato</i> (ASL)	Cotiledón	Engler <i>et al.</i> (1993)
		LBA4404 (eLBA)	pSLJ 1911	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	GUS		
3	<i>C. annuum</i> L. - Golden tower	LBA 4404	pROK1/105	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	( <i>CMV I<sub>17</sub> N-Satellite RNA</i> )	Cotiledón	Lee <i>et al.</i> (1993)
3	<i>C. annuum</i> var. <i>grossum</i> - Zhong Hua No 2	GV 3III-SE	pHCM40	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	<i>CMV-CP</i>	Hojas juvenes	Zhu <i>et al.</i> (1996)
4	<i>C. annuum</i> L. - Pusa jwala	EHA 105	pBI 121	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	GUS	Hojas cotiledonares	Manoharan <i>et al.</i> (1998)
5	<i>C. annuum</i> L. - New Mexico	A. rizogénesis K 599	p35S	CaMV 35S		GUS	Hipocotilo	Jayashankar <i>et al.</i> (1997)
6	<i>C. annuum</i> L. - Golden tower	LBA4404	pGA1209	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	<i>OsMADS1</i>	Hipocotilo	Kim <i>et al.</i> (2001)
7	<i>C. annuum</i> L. - Nockkwang	LBA4404	pWTT2132	CaMV 35S	<i>sur B</i> / <i>chlorsulfuron</i>	<i>CaCel1</i>	Tejido embriogénico / cotiledones	Harpster <i>et al.</i> (2002)

8	<b><i>C. annuum</i> L.</b> - Golden tower	LBA4404	pMBP2	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	<i>CMV-CP, ToMV-CP</i>	Cotiledone, Hipocotilo	Shin <i>et al.</i> (2002a)
9	<b><i>C. annuum</i> L.</b> - Nockkwang		pMBP2	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	<i>Tsi</i>	Cotiledon , Hipocotilo	Shin <i>et al.</i> (2002b)
10	<b><i>C. annuum</i> L.</b> - F1 Xiangyan 10 - Zhongjiao - Zhongjiao 5 - Zhongjiao 6	LBA4404	pBI121	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	<i>GUS</i>	Cotiledón	Li <i>et al.</i> (2003)
11	<b><i>C. annuum</i> L.</b> P915, P4090, P410, P101	EHA 105  LBA4404	pCAMBIA 2300	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	<i>TMV-CP, PPI1</i>	Cotiledón Hipocotilo	Lee <i>et al.</i> (2004)
12	<b><i>C. annuum</i> L.</b> P915, P2377, Ph 240	EHA 105	pCAMBIA	CaMV 35S	<i>nptII</i> / kanamicina	<i>CMVP0-CP</i>	Cotiledon	Lee <i>et al.</i> (2009)
13	<b><i>C. annuum</i> L.</b> - Híbridos F1: Fiesta, Ferrari y Spirit	GV3101	pMP90 Ti	CaMV 35S		<i>Brassica napus Gen BABY BOOM (BnBBM) / GUS</i>	Cotiledones	Heidmann <i>et al.</i> (2011)
14	<b><i>Capsicum chienese</i> Jaqc.</b>	C58C1	pER10W	CaMV 35S		<i>Red Fluorescent Protein / WUSCHEL</i>	Embrión cigóticos Maduro	Solís-Ramos <i>et al.</i> (2009)
15	<b><i>C. chienese</i> Jaqc.</b>	LBA4404	pCAMBIA2301  pCAMex	CaMV 35S  CaMV 35S		<i>GUS</i>  <i>Green Fluorescent Protein (GFP), GUS</i>	Hoja maduras	Arcos-Ortega <i>et al.</i> (2010)

## 2.4 MODELOS BIOLÓGICOS

Un modelo biológico o sistema biológico es una especie de planta que permite llevar a cabo estudios básicos para poder comprender diferentes procesos bioquímicos, metabólicos y moleculares que son desconocidos (Serino & Gusmaroli, 2011).

Los modelos biológicos son especies de plantas bien establecidas que ya han sido aceptadas y otras que recientemente se proponen. Las especies nuevas que se proponen para ser aceptadas como modelos biológicos deben de proporcionar información sobre procesos que antes se desconocían (Mandoli & Olmstead, 2000).

En el año de 1943 Laibach lleva a cabo varios experimentos y como resultado muestra algunas características de *Arabidopsis thaliana* como: tiempo corto entre generaciones, facilidad para obtener cruza específicas y posibilidad de llevar a cabo mutagénesis, por lo que se estableció como un modelo biológico (Meyerowitz, 2001).

En años recientes a *Arabidopsis thaliana* se le ha asignado otros atributos para ser considerada como modelo biológico, entre ellos está que es de un tamaño pequeño y requiere un pequeño espacio para su crecimiento, tiempo corto de generaciones que aumenta el ritmo de la investigación, una progenie grande que facilita un análisis genético, su genoma es pequeño (125 Mb) que además ya se tiene secuenciado, número pequeño de cromosomas ( $n=5$ ), es fácil de llevar a cabo mutaciones específicas (Bahadur *et al.*, 2015).

Con el uso de la planta (*Arabidopsis thaliana*) se ha podido comprender procesos biológicos como: (1) formación de hojas, raíces, granos de polen, óvulos, semillas, frutos y hojas, (2) inducción de la floración, (3) percepción, adaptación a repuestas como fototropismo, gravitropismo, fotoperiodo, ritmos circadianos, (4) modo de acción de hormonas vegetales, (5) interacción planta-patógeno, (6) resistencia a frío y heladas (Meyerowitz, 2001; Serino & Gusmaroli, 2011).

### 2.4.1 Plantas como modelos biológicos.

Se ha propuesto a varias especies para estudiar diferentes procesos biológicos, entre ellas esta: el tomate (*Solanum lycopersicon.*) el cual fue mutado para estudiar la pigmentación y forma de las hojas (Meissner *et al.*, 1997), también se ha propuesto a *Nicotiana glauca* Link & Otto. para estudiar la incompatibilidad entre el grano de polen y el estigma (Cornish *et al.*, 1987), cabe destacar que la zanahoria (*Daucus carota* L.) ha sido propuesta como modelo para estudiar la embriogénesis somática *in vitro* (Osuga *et al.*, 1999).

### 2.4.2 Importancia de las pirofosfatasas.

Las pirofosfatasas (PPasas) son enzimas en las cuales se ha centrado la atención, ya que estas catalizan la hidrólisis del pirofosfato a fosforo inorgánico ( $PPi \leftrightarrow 2Pi$ ). El pirofosfato es utilizado en reacciones de fosforilación de intermediarios de la glucólisis y

gluconeogénesis en algunos microorganismos y en algunas rutas metabólicas de plantas, por lo que estos estudios muestran que el pirofosfato es una molécula de alta energía y puede utilizarse en lugar del ATP (Schulze *et al.*, 2004).

Se ha clasificado a las pirofosfatasas en dos grupos: pirofosfatasas citosólicas y pirofosfatasas de membrana. Las primeras hidrolizan el pirofosfato proveniente de rutas metabólicas como síntesis de polisacáridos, ácidos nucleicos, urea, lípidos entre otros, con la finalidad que estos productos se sigan sintetizando. Las pirofosfatasas asociadas a membrana hidrolizan el pirofosfato y conservar energía que se verá reflejado en el transporte de protones (H<sup>+</sup>) a través de la membrana (García-Contreras & Romero, 2003).

Investigaciones han demostrado que las pirofosfatasas se expresan en condiciones de estrés, tales como la deficiencia de nutrientes (Rea *et al.*, 1992).

En *Arabidopsis thaliana* se tiene documentado que existen seis isoformas de pirofosfatasa las cuales ya se han llevado a cabo estudios y donde se ha encontrado que la isoforma AtPPasa-4 ha resultado con mayor actividad catalítica, por lo que se requiere establecer un sistema en el que se inserte el gen de esta pirofosfatasa y así poder estudiar los efectos de esta en otros organismos tales como los chiles.

### **2.4.3 El chile como modelo biológico**

Las células del género *Capsicum* pueden ser utilizadas como modelo biológico ya que tiene características sobresalientes en el ámbito agronómico, fisiológico, bioquímico y molecular (Ochoa-Alejo & Ramirez-Malagon, 2001).

Las especies del género *Capsicum* tienen características agronómicas que se ha descubierto recientemente como lo es la resistencia a virus y a algunos efectos ambientales como la sequias y resistencia a patógenos.

En el ámbito bioquímico, los chiles tienen un metabolismo secundario diverso ya que producen una variedad de compuestos de interés, los cuales no se sabe la ruta de biosíntesis de compuesto como lo son los capsianoides y capsianoides.

Al ser aceptado alguna de las especies de chiles como modelo biológico, nos ayudaría a comprender procesos biológicos que podrían ser extrapolados a especies del mismo género.

### III OBJETIVOS.

#### 3.1 Objetivo general.

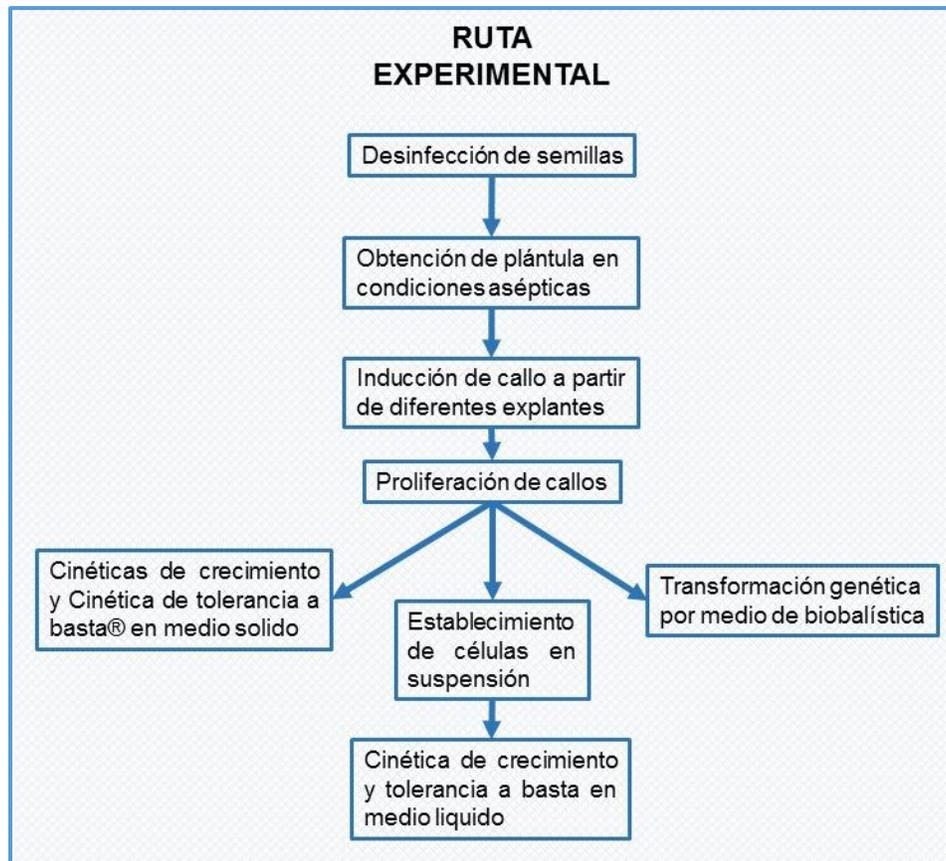
Establecer un protocolo para la inducción, proliferación, caracterización y transformación genética de callos de dos especies del género *Capsicum* (*Capsicum annuum* L. y *C. chinense* Jaqc.).

#### 3.2 Objetivos particulares.

- Establecer un método para la desinfección y establecimiento de semillas en condiciones asépticas.
- Seleccionar un medio de cultivo y explante adecuado para la inducción y proliferación de callo.
- Realizar cinéticas de crecimiento de callo de las dos especies (*Capsicum annuum* L. y *C. chinense* Jaqc.) en medio sólido para monitorear su crecimiento.
- Realizar cinética de crecimiento de células en suspensión de las dos especies (*Capsicum annuum* L. y *C. chinense* Jaqc.).
- Realizar cinéticas de tolerancia a Basta® de las dos especies (*Capsicum annuum* L. y *C. chinense* Jaqc.) en medio líquido y sólido.
- Establecer parámetros de transformación de callos de las dos especies (*Capsicum annuum* L. y *C. chinense* Jaqc.) por medio de biobalística.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo, se siguió la ruta experimental presentada en la figura 5.



**Figura 5.** Ruta experimental para la obtención y caracterización de cultivos celulares de dos especies de chile.

### 4.1 Aspectos generales

#### 4.1.1 Material biológico.

Se utilizó como material biológico semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) proporcionadas por el CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatan) y chile serrano (*Capsicum annuum* L.) variedad tampiqueño.

### 4.2 Aspectos generales

#### 4.2.1 Preparación de medios de cultivo.

Todos los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100X (ver anexo 1), del medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Así mismo se suplementaron con sacarosa y vitaminas. El pH se ajustó a 5.7 utilizando NaOH 1 N o HCl 1N según fuera el

caso. La esterilización tuvo lugar en una autoclave vertical a 121°C y a una presión de 1.2 kg/cm<sup>2</sup> durante 18 minutos. Los diferentes de medios de cultivo que se utilizaron en cada fase se presentan en el cuadro 5.

<b>Cuadro 5. Medios de cultivo utilizados en diferentes fases del proyecto.</b>			
Componente	Medio de germinación	Medio MSC20	Medio MSB5
Medio MS	100%		
Vitaminas MS	100%		
Sacarosa	30 g		
Glicina	2 mg		
Ácido giberélico.	2 mg		
2,4-D		2 mg	
Vitaminas B5			100%
Adenina		2 mg	
Coctel 20		100%	
Caseína		200 mg	
Prolina		2 g	
PVP (polivinilpirrolidona)		1 g	
Ácido ascórbico		100 mg	
Ácido cítrico		100 mg	
Agar		8 g	
Gelzan	3.3 g		
Condiciones de incubación	Fotoperiodo 18/6 h, 23°C ± 2		

#### **4.2.2 Condiciones de incubación y subcultivos**

Todos los cultivos se mantuvieron en un cuarto con ambiente controlado, con fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas de oscuridad y con una temperatura de 23°C ± 2°C.

Todos los subcultivos se subcultivaron cada tres semanas a medio fresco según la etapa de crecimiento. Durante el subcultivo se eliminó todo el tejido oxidado. Se realizaron evaluaciones periódicas de parámetros durante cada fase del proyecto.

#### **4.2.3 Método de desinfección / establecimiento de cultivos asépticos**

Para la germinación de semillas *Capsicum chinense* Jacq. y *Capsicum annuum* L. fueron sometidas a un proceso de desinfección y posteriormente se sembraron en un medio de cultivo.

La desinfección se realizó bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar y el método de desinfección consistió en realizar un lavado con etanol al 70% durante un minuto, posteriormente se llevaron a cabo tres enjuagues, las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) + tritón X-100 (3 gotas por cada 250 ml de solución) y se mantuvieron en agitación constante durante 15 minutos, al finalizar este último paso se procedió a realizar tres enjuagues con agua desionizada estéril.

Una vez realizada la desinfección de semillas se procedió a colocar un lote directamente en el medio de germinación y otro lote se colocó en un matraz estéril con agua desionizada estéril por un periodo de 24 horas. Transcurrido el tiempo de remojo, se procedió a colocar las semillas en medio de cultivo para germinación (ver cuadro 5) y se incubación en condiciones de 16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad y  $25 \pm 2$  °C.

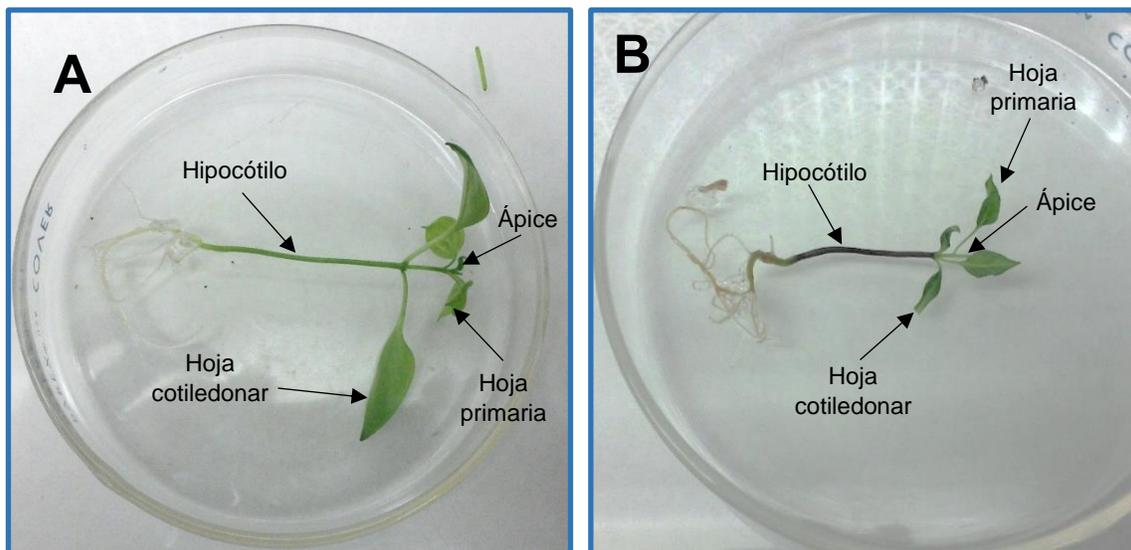
#### 4.2.4 Cultivo de callos.

##### 4.2.4.1 Selección del explante y medio de cultivo para la inducción del callo

La inducción de callo de ambas especies (*C. annuum* L. y *C. chinese* Jacq.) se hizo con plántulas de 15-18 días de germinadas. Se utilizaron como explantes: hipocótilo, cotiledón, hoja primaria y ápice (Figura 6).

En la inducción de callo se utilizaron dos medios de cultivo denominaron: medio MSB5 y MSC20 (ver cuadro 5). Cabe destacar que el coctel 20 es una mezcla de aminoácidos que se tienen en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Química y que están en trámite de patente por lo cual no se puede mostrar las concentraciones de sus componentes.

Durante la fase de inducción se evaluó la oxidación, la producción de callo sobre la superficie de los explantes y el tipo de callo obtenido, esto se realizó a las cuatro semanas de haber comenzado la inducción. Estas evaluaciones se realizaron para seleccionar el mejor explante y el mejor medio de cultivo para la proliferación de callo el cual se utilizó en los ensayos siguientes.



**Figura 6.** Plántulas con las dos primeras hojas verdaderas utilizadas para la inducción de callo. (A) *Capsicum annuum* L. (B) *Capsicum chinese* Jacq.

La oxidación y la presencia de callo sobre los explantes se evaluaron de forma cuantitativa. Esta evaluación consistió en registrar la presencia de estos parámetros en los explantes de 0-100%, siendo 0% la ausencia de oxidación o de producción de callo y 100% la oxidación total del explante o que el explante presentaba callo en toda su superficie. El porcentaje (100%) de los parámetros evaluados (oxidación y presencia de callo) fue dividido en tres categorías iguales; baja, media y alta.

Esta fase de inducción se llevó a cabo durante tres semanas, posteriormente el callo obtenido del mejor explante con una menor oxidación y un alto porcentaje de callo producido, pasó a la etapa de proliferación.

#### **4.2.4.2 Proliferación de callo, cinética de crecimiento y cinética de tolerancia a Basta®.**

Después de la fase de inducción, los callos presentes en los explantes se limpiaron eliminando el tejido oxidado así como el resto del tejido madre. Los callos se subcultivaron pasándose al medio fresco para iniciar la etapa de proliferación. La fase de proliferación celular tuvo lugar durante dos meses y medio realizándose subcultivos cada tres semanas. En ambas especies (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinese* Jacq.) se subcultivaron hasta obtener alrededor de 30 gramos de callo para realizar las cinéticas de crecimiento y tolerancia a Basta®.

Una vez obtenido el callo necesario de los diferentes explantes se seleccionó el callo en base a la friable, coloración y capacidad de proliferación (abundancia). Al finalizar la evaluación se eligió el callo proveniente del hipocótilo para realizar las cinéticas de crecimiento, así mismo el medio de cultivo que se seleccionó fue MS adicionado con vitaminas B5 (MSB5).

#### **4.2.4.3 Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® en medios sólidos**

Para caracterizar el crecimiento y la resistencia a Basta® del callo de ambas especies, se realizaron varios tratamientos con diferentes concentraciones del herbicida. Los tratamientos consistieron en un control y tres concentraciones de Basta®: 2 mg, 4 mg y 8 mg. Se realizaron 5 repeticiones.

Al iniciar la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® para ambas especies, se pesó 1 gramo de callo, por repetición para todos los tratamientos. Durante tres semanas se pesó cada tercer día el callo de todos los tratamientos. Una vez terminada la cinética, se procedió a elaborar los promedios y desviaciones estándar de cada tratamiento para así generar una gráfica del crecimiento del callo durante las tres semanas de monitoreo.

#### **4.2.5 Cultivo de células en suspensión.**

##### **4.2.5.1 Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® en medio líquido.**

Para realizar la cinética de crecimiento en medio líquido de ambas especies, se establecieron los cultivos madre, para ello se utilizó callo proveniente del hipocótilo. En matraces de 250 ml se pusieron 60 ml de medio líquido (MS B5.) y cada matraz se inoculó con 6 gramos de callo.

Todos los matraces se colocaron en agitación constante a 100 rpm y bajo condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas de oscuridad, durante 15 días. Transcurridos el tiempo se procedió a obtener las suspensiones celulares, para ello los cultivos madre se pasaron por un disgregador celular con la finalidad de quitar todos los agregados celulares. Una vez obtenidas las suspensión de células homogéneas se midió el volumen y se agregó la misma cantidad de medio de cultivo fresco. La suspensión celular se repartió en 4 matraces y se dejaron en agitación constante de 100 rpm y bajo condiciones de fotoperiodo.

Transcurrido los 15 días se procedió a colocar medio de cultivo nuevo a los 4 matraces y se prepararon los diferentes tratamientos para así iniciar la cinética de crecimiento y resistencia a Basta®. La cinética de crecimiento y la resistencia a Basta® se llevó a cabo en matraces de 50 ml conteniendo 15 ml de suspensión celular. Se probaron diferentes concentraciones de Basta®; 2, 4 y 8 mg.l<sup>-1</sup> y su respectivo control que fue sin herbicida.

Se tomaron muestras de 1 ml de células en suspensión, cada muestra se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml habiéndose registrado previamente su peso y la cual fue centrifugada a 1300 rpm y una vez precipitadas las células se procedió a quitarle el sobrenadante. Una vez que los tubos Eppendorf tenían las células ya sin medio líquido fueron pesadas en balanza analítica, para así determinar el peso fresco de las células por diferencia de peso. Para determinar el peso seco, los tubos eppendorf se dejaron secar en un cuarto de ambiente controlado a una temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar un peso constante. La toma de muestra se realizó cada tercer día durante tres semanas, y se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Al término de las cinéticas de crecimiento y de tolerancia a Basta® se procedió a realizar los promedios y desviaciones estándar de cada tratamiento, para así generar una gráfica de dispersión en Excel 2010. También se realizó análisis de varianza (ANOVA) de un factor para observar si había diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Una vez realizada la ANOVA se procedió a realizar la prueba de Tukey.

## 4.2.6 Transformación genética.

### 4.2.6.1 Ensayos de transformación por medio de Biobalística.

La transformación genética por medio de biobalística se llevó a cabo en callos de ambas especies. Para dicho proceso se hizo uso de una cámara de alta presión de Bio-Rad modelo PDS-1000.

Los callos para poder ser transformados, tuvieron que ser subcultivados ocho días antes. Un día antes del bombardeo se colocó una monocapa de callo en forma circular de aproximadamente 1 cm en el centro de cajas Petri. Cabe destacar que el medio de cultivo en el que fue colocado el callo para la transformación se le aumento 0.3 gramos de agar.

Basados en el trabajo realizado por Maliga (2014) donde presenta protocolos de transformación genética de algunas especies pertenecientes a la familia Solanaceae, se seleccionaron los más adecuados para llevar a cabo la transformación de callo de las especies de *Capsicum*. Los parámetros que se evaluaron para la transformación por medio de biobalística fueron los que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de transformación genética por medio de biobalística para <i>Capsicum annuum</i> L. y <i>Capsicum chinense</i> Jacq.				
	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Presión	1,100 psi	1,100 Psi	1,100 psi	1,100 psi
Número de disparos	1	2	1	2
Distancia Macrocarrier-Disco de ruptura	3 cm	3 cm	3 cm	3 cm
Distancia Macrocarrier-Callo	12 cm	12 cm	12 cm	12 cm
Tamaño de bala de tungsteno	5M (4 µm)	5M (4 µm)	10M (7 µm)	10M (7 µm)

Para cada uno de los tratamientos de transformación genética se llevaron a cabo tres controles negativos y seis replicas que contenían el plásmido de interés. El control negativo sólo se bombardeó con los micro proyectiles (sin plásmido). Los tratamientos de transformación genética se utilizaron microproyectiles a los cuales se les añadió el plásmido de interés como se muestra en el anexo II.

Se utilizó el plásmidos de la serie pEarlyGen 100 (ver anexo III), el cual fue clonado por recombinación con la pirofosfatasa 4 (PPasa-4) de *Arabidopsis thaliana*. La clonación del plásmido se realizó en el laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. El plásmido en su construcción tiene resistencia a Basta®, gen reportero que sintetiza proteína fluorescente (amarillo) en las células transformadas y gen el que sintetiza proteínas de interés.

Una vez llevada a cabo la transformación por biobalística, se procedió al quinto día a observar las células transformadas bajo el microscopio confocal para detectar la fluorescencia que emiten las proteínas reporteras en callos. Una vez detectadas la fluorescencia en las células transformadas se procedió a colocarlas en medio de selección. El medio de selección de células transformadas es el que denominamos medio de proliferación, al cual se le añadió 2 mg de Basta®.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Establecimiento de plántulas en condiciones asépticas.

El método de desinfección es un paso importante para el establecimiento cultivos *in vitro*, ya que si se presenta contaminación no se podrá seguir con las siguientes fases. En este caso la desinfección de semillas resultó adecuada, ya que no se presentó algún tipo de contaminación, ya sea por hongos o bacterias.

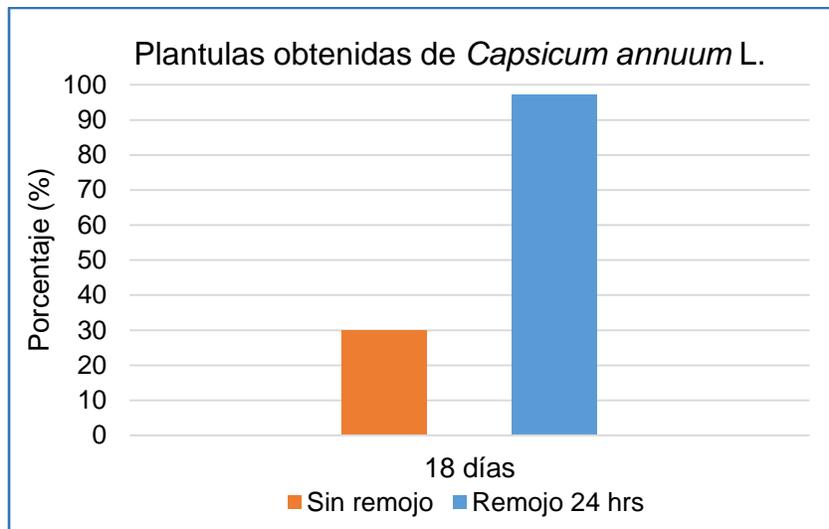
El establecimiento de semillas en condiciones *in vitro* se logró por medio del uso de agentes químicos como lo fue el alcohol, hipoclorito de sodio y trito X-100. Ramos-Rodriguez (2006) menciona que el etanol actúa sobre las semillas de forma que desorganiza las capas de lípidos y proteínas que componen a las membranas, produciéndose un efecto de permeabilidad y por lo que con esto se permitirá la acción de otros agentes desinfectantes, además que inhibe la acción de varios microorganismos, pero no su eliminación total del material vegetal.

El triton X-100 un detergente ([www.cientificasenna.com](http://www.cientificasenna.com)) también es utilizado para la desinfección de material vegetal, el cual actúa rompiendo los conglomerados de proteínas que al igual que el etanol promueve la permeabilidad de las membranas de microorganismos a eliminar.

Agramonte (*et al.*, 1993) menciona que para incrementar la eficiencia de la desinfección en el cultivo de tejidos vegetales se debe de hacer uso de hipoclorito de sodio, en donde su mecanismo de acción es oxidar e hidrolizar proteínas, como consecuencia es liberando el ion cloro y ácido hipocloroso, como consecuencia final se da la deshidratación de células y/o microorganismo como bacterias y hongos.

Una vez establecidas las semillas en condiciones asépticas, se van a obtener plántulas las cuales van a crecer libres de patógenos.

Una de las fases que tiene la semilla en su ciclo de vida es la germinación. En la gráfica 1 muestra el porcentaje de plántulas obtenidas a partir de semillas que no se sometieron a remojo y con remojo durante 24 horas. En el caso de las semillas de *Capsicum annum* L. que no fueron remojadas en agua hubo una baja tasa de producción de plántulas a los 18 días de haber colocado las semillas en el medio de germinación, en cambio las semillas sometidas a un tratamiento de remojo de 24 horas se logró obtener una alta tasa de plántulas con hojas verdaderas a los 18 días de haberlas sembrado en el medio de germinación (Figura 7). El tratamiento sin remojo de semillas dio una obtención de plántulas con hojas verdaderas del 30%, en cambio el tratamiento con remojo se obtuvo 97% de plántulas con hojas verdaderas. La alta tasa de plántulas obtenidas a partir de semillas que fueron sometidas a remojo en agua, resulto favorable.



**Grafica 1.** Porcentaje de plántulas obtenidas de *Capsicum annuum* L., con hojas verdaderas los 18 días de haber colocado las semillas en medio de germinación. Se llevó a cabo dos pretratamientos para la germinación.

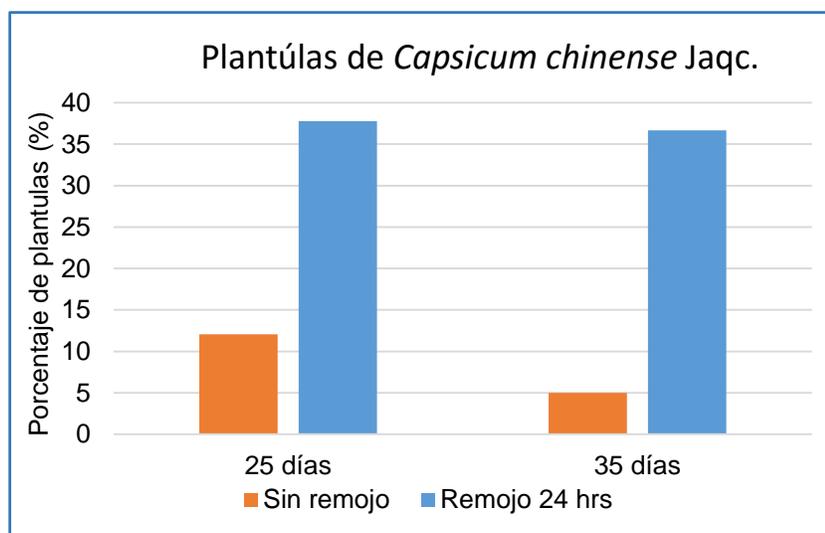


**Figura 7.** (A) Plántulas de *Capsicum annuum* L. con hojas verdaderas a 18 días de haber colocado las semillas en el medio de germinación. (B) Plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. con hojas verdaderas a 25 días de haber colocado las semillas en medio de germinación.

La obtención de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. fue baja, aún con el remojo de semillas durante 24 horas. En la gráfica 2 se muestra el porcentaje de plántulas obtenidas con hojas verdaderas a partir de semillas que fueron sometidas a remojo en agua y semillas

que fueron sometidas a remojo en agua. Las semillas que no se remojaron produjeron plántulas con hojas verdaderas a los 25 días, con un tasa del 12%, se dejó transcurrir diez días más para monitorear el aumento del porcentaje de plántulas, lo cual resultó en un aumento del 5% (Figura 7). De las semillas que se remojaron durante 24 horas se obtuvieron plántulas con hojas verdaderas transcurrido veinticinco días de haber colocado las semillas en medio de cultivo de germinación, con una tasa del 37.7 % de plántulas, las semillas que no germinaron se dejaron *in vitro* y pasando diez días más se obtuvo un aumento en la obtención plántulas con un porcentaje de 36.66% respecto a las semillas inicialmente colocadas.

La producción de plántulas con hojas verdaderas resultó mayor y en un periodo más corto de tiempo en *Capsicum annuum* L. que en *Capsicum chinense* Jaqc.



**Grafica 2.** Porcentaje de plántulas obtenidas de *Capsicum chinense* Jaqc., con hojas verdaderas a los 25 y 35 días de haber colocado las semillas en medio de germinación.

Nonogaki (2008) menciona que la germinación de las semillas tiene tres fases, la primera fase comienza con la absorción de agua, con lo cual comienzan algunos procesos como lo es la respiración y el inicio de síntesis de nuevos mRNA. La segunda fase de germinación la síntesis de mRNA se sigue dando así como síntesis de hormonas, también el endospermo comienza a degradarse y comienza la fase la ruptura de la testa. En la tercera fase de germinación la radícula comienza a emerger y las reservas de energía (como son: proteínas, carbohidratos, lípidos) son hidrolizadas para estar disponibles para el embrión que formara a la plántula.

Como lo menciona Nonogaki (2008) es importante que las semillas se pongan en contacto con agua para promover la germinación. El remojo de las semillas en agua de *Capsicum annuum* L. es esencial para la obtención de plántulas bajo condiciones *in vitro*, ya que el

porcentaje de plántulas es mayor que el tratamiento de semillas que no fueron sometidas a remojo.

En el caso de *Capsicum chinense* Jacq. se obtuvo una baja producción de plántulas. Este problema puede estar asociado a que en la primer fase de germinación las semillas pueden tener un efecto negativo al estar en contacto con agua, por lo que se sintetizan proteínas que inhiben la acción de procesos fisiológicos y por lo cual esta acción es utilizada como una medida de defensa contra microorganismos invasores (Nonogaki 2008). También la inhibición de la germinación está asociada a que las reservas de energía no se hidrolizan debido a que no se producen las enzimas necesarias para el proceso, o también ocurre que las reservas de energía no son las necesarias para alimentar al embrión. La propuesta para geminar semillas de *Capsicum chinense* Jacq. es que se realicen pruebas para determinar la viabilidad de las semillas y/o utilizar otros métodos para aumentar la geminación de estas.

### **Inducción de callo a partir de diferentes explantes**

En el cultivo de tejidos vegetales al iniciar la inducción de callo a partir de explantes los cuales se cortan, algunas veces se presentan estrés oxidativo por lo cual se producen especies reactivas de oxígeno (ion superóxido, peróxido de hidrogeno, peróxido, y radicales alcoxil) las cuales al estarse sintetizando constantemente en las células producen muerte celular. El estrés oxidativo también está relacionado con los componentes del medio de cultivo como son la concentración de los macro y micro nutrientes, vitaminas y aminoácidos (Cassells & Curry, 2001; Gupta & Datta, 2003). Los aminoácidos algunas veces son esenciales para la producción o proliferación de callo según lo menciona George *et al.*, 2008.

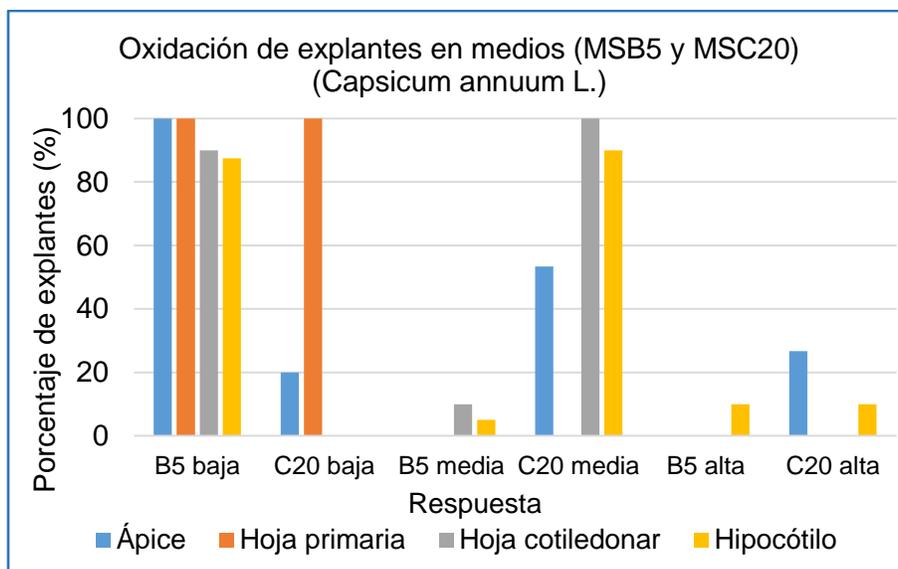
Según varios autores como Buyukalaca & Mavituna, (1996); Kaparakis & Alderson, (2008); López-Puc *et al.*, (2006); Zapata-Castillo *et al.*, (2007) reportan la formación de callo en el en diferentes especies del género *Capsicum* en presencia del medio de cultivo MS, adicionado con reguladores de crecimiento como lo es el 2,4-D, En este trabajo también se logró la inducción del callo en medio MS.

La inducción de callo en medio MS suplementado con vitaminas B5 y C20 se evaluó al transcurrir tres semanas de iniciado este proceso, por lo que se evaluó el porcentaje de oxidación y producción de callo para ambas especies (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.). Esta evaluación tuvo como objetivo seleccionar el medio de cultivo y el explante que presentaba menor oxidación y un porcentaje mayor de callo en la superficie.

En la tabla 2 se muestran el tipo y número de explantes evaluados, para monitorear la oxidación y producción de callo para las dos especies de *Capsicum*.

En la gráfica 3 se muestra la evaluación de la oxidación de explantes de *Capsicum annuum* L. en los dos medios de cultivo. Los resultados muestran que los explantes utilizados presentaron una oxidación baja en el medio de cultivo MSB5, siendo el ápice y la hoja primaria los que presentan el 100% de los explantes con oxidación baja y en el medio MSC20 la mayoría de los explantes presentan una oxidación media, excepto para hoja primaria que presentó una 100% de los explantes con oxidación baja.

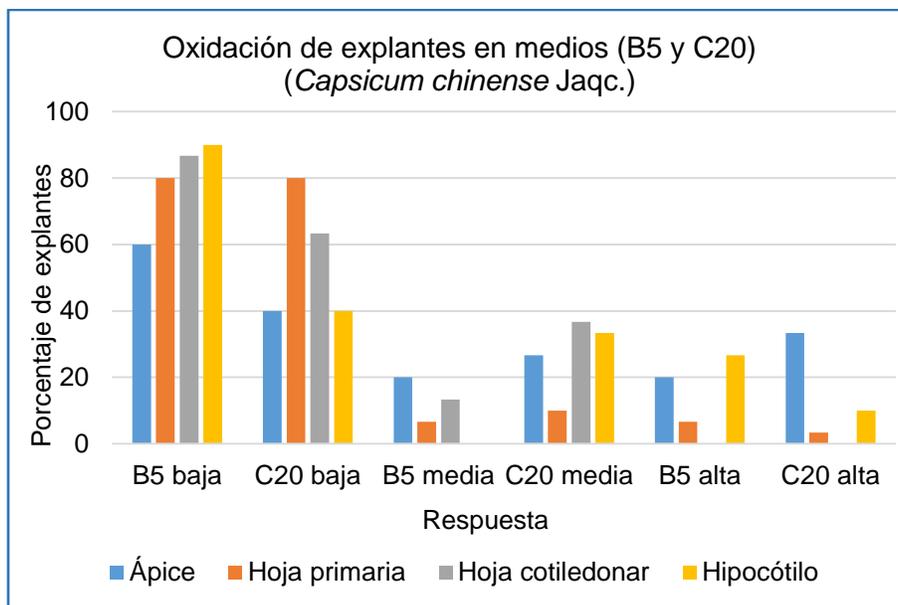
Tabla 2. Tipo y número de explantes evaluados para la oxidación de dos especies de <i>Capsicum</i> en dos diferentes medios de cultivo. MS+vit. B5 y en medio MS+C20.					
<i>Capsicum annuum</i> L.			<i>Capsicum chinense</i> Jacq.		
Tipo de explante	Total de explantes evaluados		Tipo de explante	Explantes evaluados	
	Medio MSB5	Medio MSC20		Medio MSB5	Medio MSC20
Ápice	15	15	Ápice	15	15
Hoja primaria	15	15	Hoja primaria	30	30
Hojas cotiledonares	30	30	Hojas cotiledonares	30	30
Hipocótilo	40	40	Hipocótilo	30	30



**Gráfica 3.** Porcentaje de explantes de *Capsicum annuum* L., que presentaron diferentes niveles de oxidación en dos diferentes medios de cultivo (MSB5 y MSC20)

En la gráfica 4 se muestra la evaluación de la oxidación de diferentes explantes de *Capsicum chinense* Jacq. en dos diferentes medios de cultivo. El medio de cultivo en el que

los explantes presentaron una menor oxidación fue en el medio MSB5, siendo el ápice, hoja cotiledonar e hipocótilo los explantes que presentaron una respuesta igual o superior al 80% de oxidación baja. En el medio MSC20, el explante que presentó una respuesta del 80% a la oxidación baja, fue la hoja primaria.



**Grafica 4.** Porcentaje de explantes de *Capsicum chinense* Jaqc., que presentaron diferentes niveles de oxidación en dos diferentes medios de cultivo (MSB5 y MSC20).

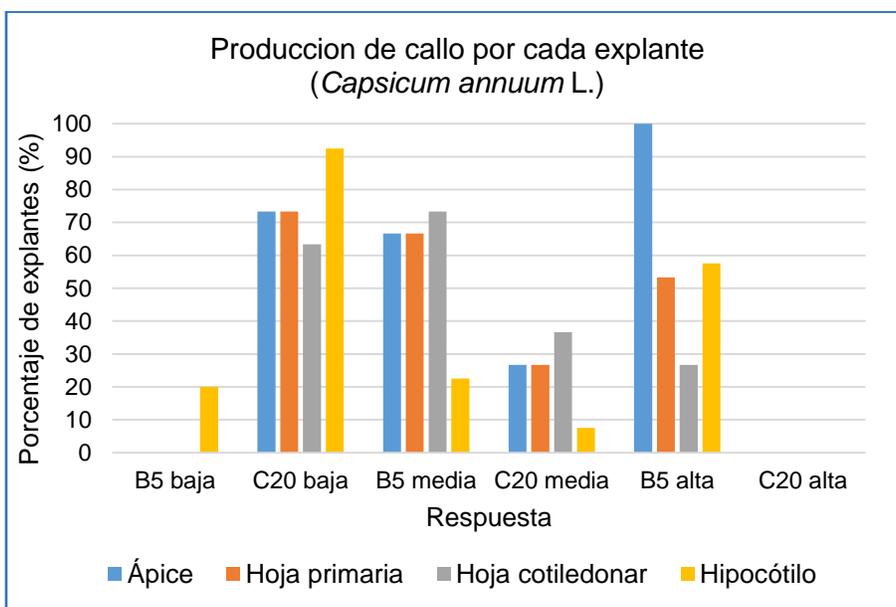
Los resultados muestran que el medio MSB5 resultó favorable por presentar baja oxidación de tejidos de ambas especies del género *Capsicum*, esto pudo estar influido por la adición de compuestos antioxidantes como el ácido cítrico y el ácido ascórbico. El ácido ascórbico y cítrico ha sido utilizado en *Solanum tuberosum* a concentraciones de 50 mg/l, lo que resulta favorable para la producción de callo. En el caso del ácido ascórbico es un compuesto que inhibe la acción de las quinonas que son producidas por la enzima polifenol oxidasa, las quinonas producen efecto en las células como el crecimiento lento y el necrosamiento (Elmore *et al.*, 1990).

En el caso del medio MSC20 que contenía una mezcla de vitaminas, aminoácido y urea, la oxidación en los explantes fue alta, por lo que se sugiere que se aumente la concentración de ácido ascórbico y ácido cítrico. En trabajos de *Capsicum chinense* Jaqc. se ha utilizado el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) para disminuir la producción de etileno y por consecuencia disminuir la oxidación en los explantes y mejorar su respuesta, por lo que se sugiere utilizar este compuesto para mejorar la producción de callo. También la oxidación puede estar relacionada con la baja cantidad de micronutrientes en el medio de cultivo, ya que estos están asociados en reacciones de óxido-reducción, Joshi & Kothari (2007) aumentaron la cantidad de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) para mejorar la respuesta de organogénesis.

### Evaluación de la producción de callo de diferentes explantes.

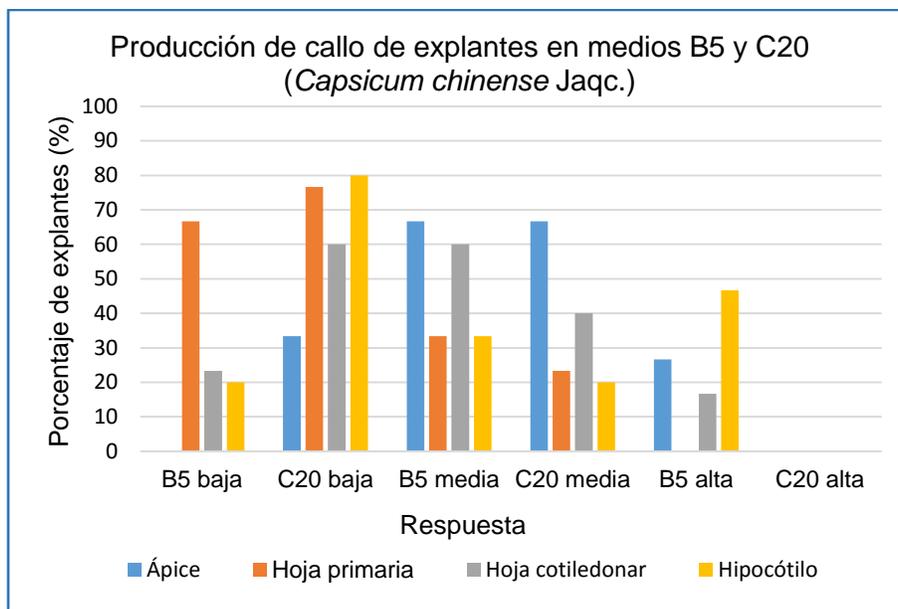
Se procedió a monitorear la producción de callo en la superficie de los explantes para ambas especies, esto se realizó con la finalidad de elegir el explante que presentó una mayor cantidad de callo a las cuatro semanas de haber iniciado la inducción.

En la gráfica 5 se muestra la respuesta a la producción de callo de diferentes explantes de *Capsicum annum* L. en dos medios de cultivo MSB5 y MSC20. El medio de cultivo que resulto mejor para la producción de callo fue MSB5, ya que los explantes presentaron en su mayoría una respuesta media y alta a la producción de callo, en este medio el ápice mostro una respuesta del 100% del total de los explantes para la producción alta de callo, pero cabe destacar que el número de ápices utilizados fueron 15. La mayoría de los explantes que se colocaron en medio MSC20 dieron como resultado una producción baja de callo, esto podría deberse a que la oxidación de los explantes no permite que se produzca callo en los explantes.



**Gráfica 5.** Porcentaje de explantes de *Capsicum annum* L., que presentaron callo en dos diferentes medios de cultivo (MSB5 y MSC20).

En el caso de *Capsicum chinense* Jacq. la producción de callo se muestra en la gráfica 6, en donde resulto favorable el medio MSB5, ya que la mayoría de los explantes presentaron una respuesta media y alta a la producción de callo, el hipocótilo fue el que presento una respuesta mayor comparado con los otros explantes, la cual fue de 46% del total de los explantes para la producción alta de callo. En cambio en el medio MSC20 los explantes presentaron respuesta baja y media para la producción de callo.



**Grafica 6.** Porcentaje de explantes de *Capsicum chinense* Jaqc., que presentaron callo en dos diferentes medios de cultivo (MSB5 y MSC20).

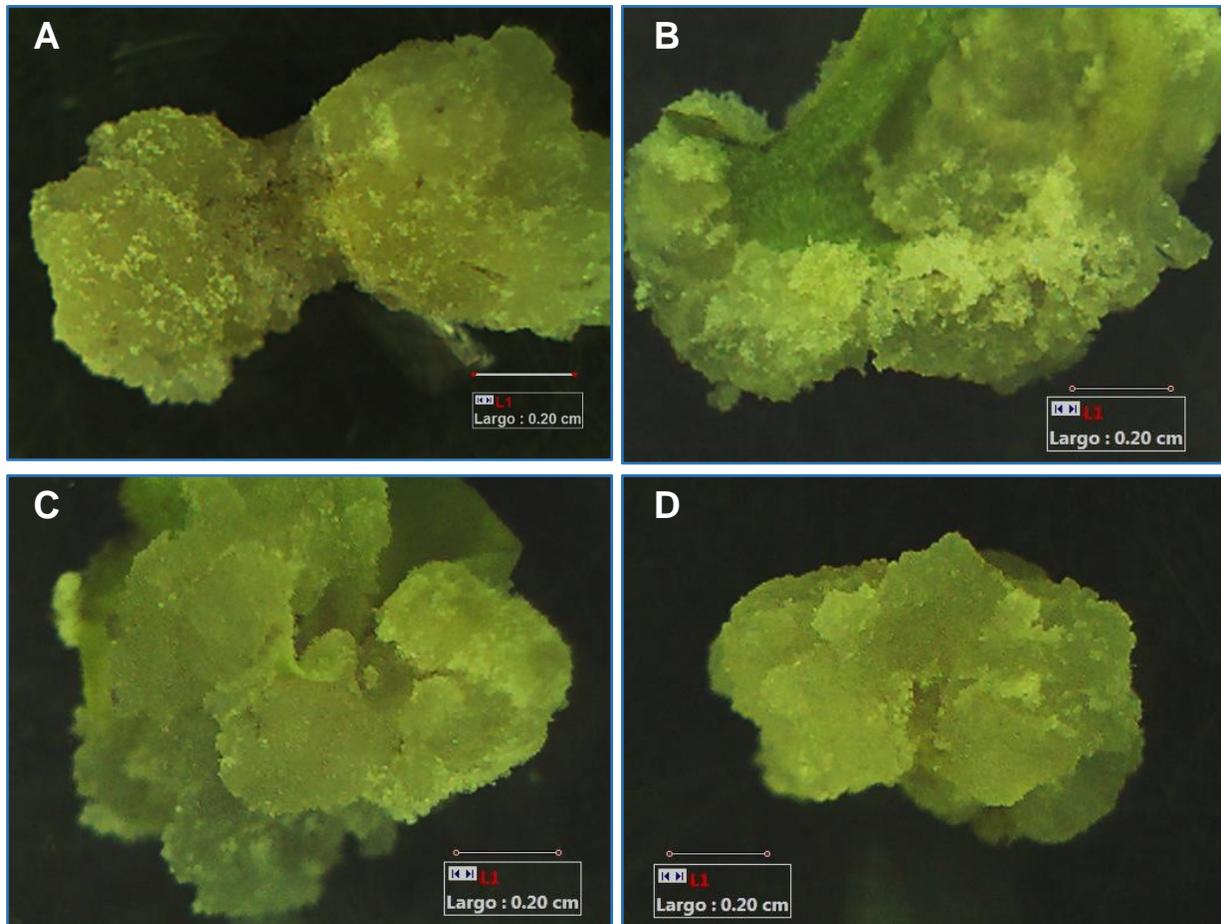
Una vez realizada la evaluación de oxidación y la producción de callo de los diferentes explantes se procedió a evaluar el tipo de callo obtenido. El cuadro 6 muestra el tipo de callo obtenido a partir de explantes tales como el ápice, hoja primaria, hoja cotiledonar e hipocótilo.

Los resultados muestran para *Capsicum annuum* L. que el medio de cultivo MSB5 los explantes producen un callo friable, excepto para la hoja cotiledonar, ya que este explante produce callo friable-compacto. El ápice y el hipocotilo son los explantes que sólo producen callo friable en el medio MSC20 y la hoja primaria y la hoja cotiledonar producen un callo friable-compacto.

En el caso de *Capsicum chinense* Jaqc. los cuatro tipo de explantes que se colocaron en medio MSB5 produjeron un callo friable. En el caso del medio MSC20 sólo el ápice e hipocótilo produjeron callo friable, en tanto la hoja primaria y la hoja cotiledonar produjeron callo friable-compacto.

<b>Cuadro 6. Tipo de callo obtenido de diferentes explantes en medio MS B5 y MS C20.</b>					
<i>Capsicum annuum</i> L			<i>Capsicum chinense</i> Jaqc.		
Tipo de explante	Tipo de callo		Tipo de explante	Tipo de callo	
	MSB5	MSC20		MSB5	MSC20
Ápice	Friable	Friable	Ápice	Friable	Friable
Hoja primaria	Friable	Friable-compacto	Hoja primaria	Friable	Friable-compacto
Hojas cotiledonares	Friable-compacto	Friable-compacto	Hojas cotiledonares	Friable	Friable-compacto
Hipocótilo	Friable	Friable	Hipocótilo	Friable	Friable

En la figura 8 se muestran imágenes de explantes de *Capsicum annuum* L. que mostraron una respuesta alta a la producción de callo y con baja oxidación, también la figura 9 muestra imágenes de explantes con callo y baja oxidación de *Capsicum chinense* Jaqc.



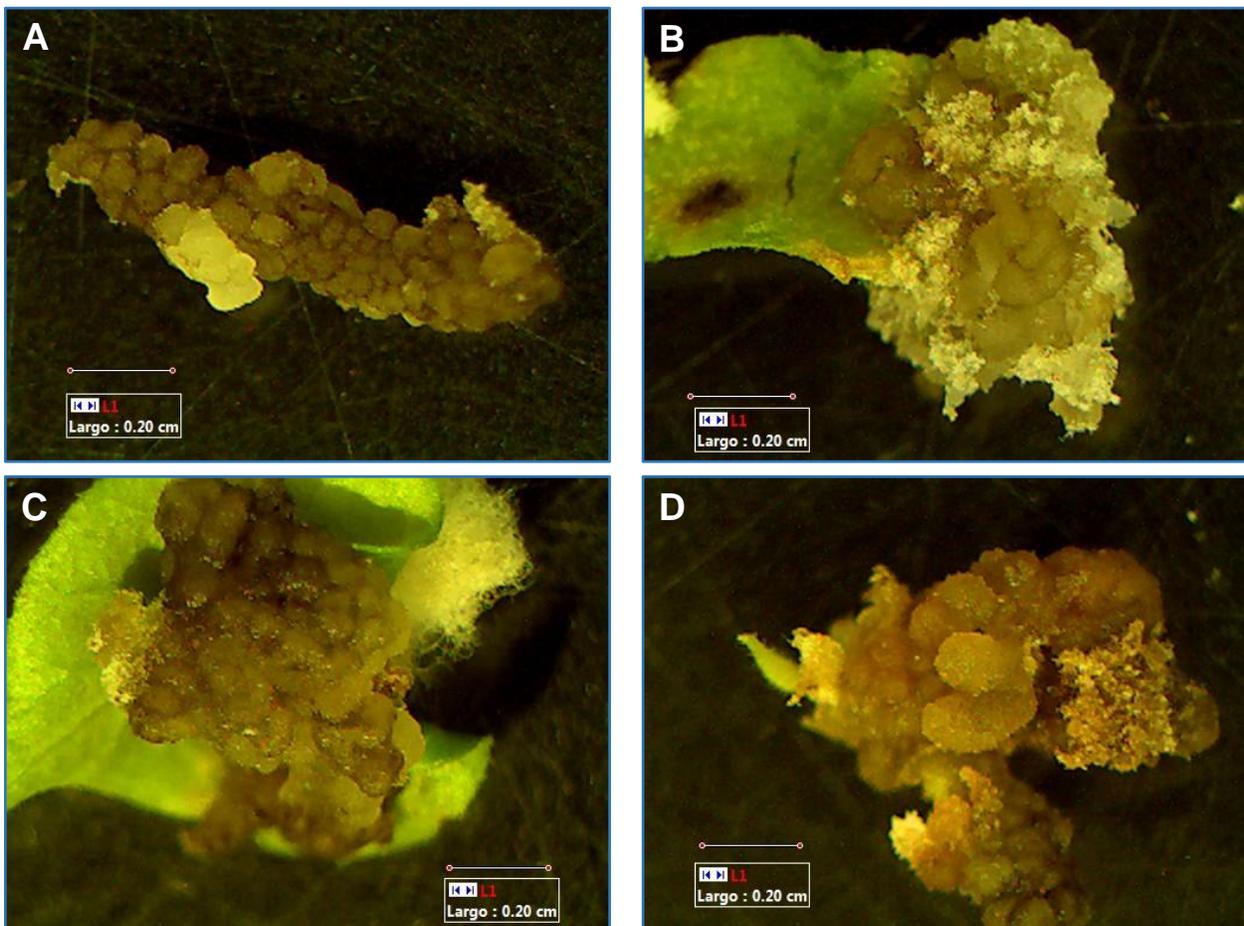
**Figura 8.** Imágenes de diferentes explantes de *Capsicum annuum* L., que presentan callo a tres semanas de inducción, vistas en microscopio estereoscópico (10X). (A) Hipocótilo. (B) Hoja cotiledonar. (C) Hoja primaria (D) Ápice.

La evaluación de los explantes para producir callo y que presentaron menor oxidación, se obtuvo como resultado que el mejor explante fue el hipocótilo y el medio de cultivo que dio mejor respuestas fue en medio MSB5. La utilización del hipocótilo como explante para producir callo también ha sido utilizado en estudios de embriogenesis somática de *Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jaqc. (Buyukalaca & Mavituna, 1996; Solís-Ramos *et al.*, 2010), también se ha reportado que el callo proveniente de hipocótilo ha sido utilizado para la producción de metabolitos secundarios como son los capsicinoideos (Johnson *et al.*, 1990; Kehie *et al.*, 2012).

El uso del hipocótilo como explante en el cultivo de tejidos vegetales, se debe que es un órgano que al momento de la germinación emerge después de la radícula, el cual tiene una tasa de división constante ya que mantiene una síntesis continua de DNA, RNA, organelos,

membrana (Nonogaki, 2008) y por lo cual puede ser mantenida con ayuda de reguladores de crecimiento vegetales y medios de cultivo, para así obtener células desdiferenciadas las cuales vamos a poder modular su comportamiento para varios fines en el área de la Biotecnología vegetal.

En el caso del ápice es un órgano que tiene células meristemáticas las cuales tienen una característica llamada totipotencialidad (Barclay, 2001), la cual se pueden seguir manteniendo al ponerlas en contacto en un medio de cultivo con presencia de reguladores de crecimiento. Este tipo de células tendrían mayor capacidad para poder regenerar una planta completa, ya que estas células desde su comienzo no tienen funciones especializadas y por lo cual se podría modular más fácilmente la embriogénesis somática u organogénesis.



**Figura 9.** Imágenes de diferentes explantes de *Capsicum chinense* Jaqc., que presentan callo a tres semanas de inducción, vistas en microscopio estereoscópico 10X. (A) Hipocótilo. (B) Hoja cotiledonar. (C) Hoja primaria (D) Ápice.

En el caso de los cotiledones no sería un buen explante para obtener células indiferenciadas, ya que este órgano tiene una función de suplir los nutrientes a la futura plántula y tiene un tiempo de vida corto y cuando termina su función, muere (Nonogaki, 2008). Aunque el cotiledón es usado en estudios de morfogénesis *in vitro* como lo es la organogénesis y la transformación genética por medio de biobalística.

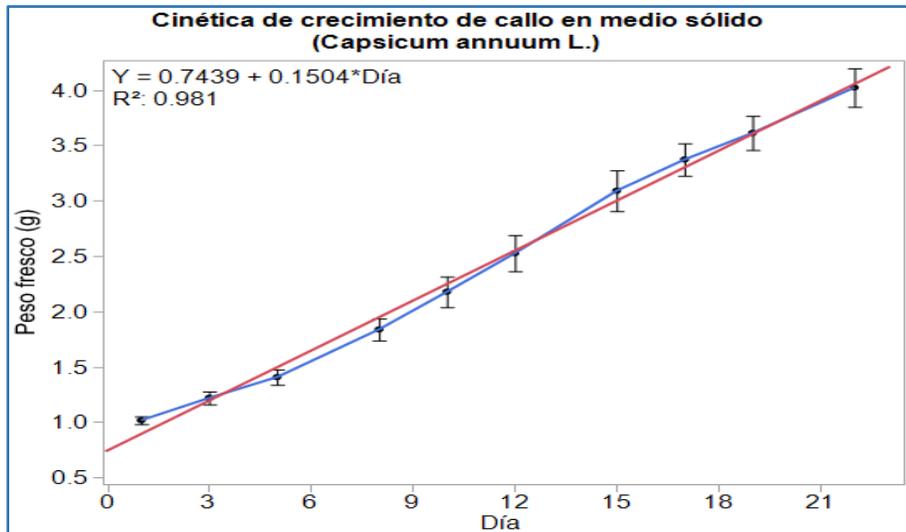
Barclay (2001) menciona que la hoja verdadera es un explante que tiene en su estructura células especializadas como las células de la epidermis, las células del mesofilo empalizado, células de mesofilo esponjoso, células pertenecientes al xilema y floema entre otras, las cuales llevan a cabo diferentes funciones especializadas. A partir de este órgano sería difícil obtener células indiferenciadas de este órgano.

### **Proliferación de callo, cinética de crecimiento y cinética de resistencia a Basta® en medio sólido.**

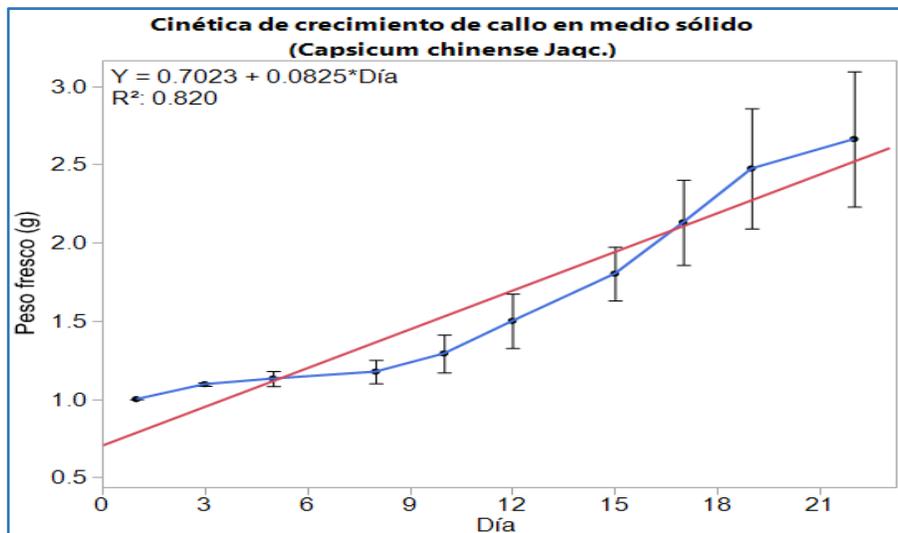
La selección de explante para producir callo y la medición de su crecimiento es de importancia en biotecnología vegetal. El callo es un sistema en el cual se pueden medir efectos de diferentes medios de cultivo, reguladores de crecimiento o efecto de herbicidas. Las cinéticas de crecimiento de callo se realizan por medio del monitoreo del peso fresco, para el caso de las células en suspensión se monitorea tanto el peso fresco como el peso seco (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2012).

En el caso de ambas especies de *Capsicum* se llevó a cabo la caracterización del crecimiento de callo durante un periodo de 21 días.

La grafica 7 muestra la cinética de crecimiento del callo de *Capsicum annum* L. durante 21 días, en donde se observa las medias de las repeticiones y su respectivas desviaciones estándar. Se observa a partir de un gramo de callo, se obtiene al final del experimento un aumento de peso de aproximadamente de 3 gramos. El crecimiento del callo se ajusta al modelo de regresión lineal simple, mostrándose en la gráfica su respectivo ajuste y ecuación. En la gráfica se puede observar las fases de crecimiento celular; el periodo del inicio hasta el día 8 se consideran como la fase lag, posterior al día 8 hasta el día 15 se considera la fase de crecimiento exponencial donde se muestra una pendiente más pronunciada, posterior al día 15 se considera la fase de desaceleración del crecimiento del callo.



**Grafica 7.** Caracterización del crecimiento de callo de *Capsicum annuum* L. en medio sólido por medio de una cinética de crecimiento y regresión lineal de las medias.



**Grafica 8.** Caracterización del crecimiento de callo de *Capsicum chinense* Jaqc. en medio sólido por medio de una cinética de crecimiento y regresión lineal de las medias.

La grafica 8 muestra la cinética de crecimiento del callo de *Capsicum chinense* Jaqc. donde se muestra las medias de las repeticiones y sus respectivas desviaciones estándar. La gráfica de cinética de callo también se ajusta al modelo de regresión lineal, se muestra la ecuación y el ajuste. También se pueden observar las diferentes fases del crecimiento celular. La gráfica muestra que el periodo que comprende del inicio al día 10 se considera como la fase lag, posterior al día 10 hasta el día 19 se considera como la fase de crecimiento exponencial, después del día 19 se considera como la fase de desaceleración.

Las gráficas de cinética de crecimiento de ambas especies de *Capsicum* nos brindan información, en primera instancia para conocer las diferentes fases de crecimiento. Con la

elaboración de cinéticas de crecimiento podemos obtener información para saber cuándo llevar a cabo los subcultivos y así mantener en constante multiplicación el callo.

Conocer cuando se da la fase de crecimiento exponencial es de importancia para llevar a cabo procesos en biotecnología vegetal, tal como la transformación genética por medio de biobalística. En la fase de crecimiento exponencial está relacionado con el aumento de la síntesis de DNA y maquinaria celular para su división, ya que los cromosomas contenidos en el núcleo de las células se encuentran condensados (Morton Bradbury, 1992). Por lo que se elige la fase crecimiento exponencial para llevar a cabo la biobalística, para así tener una mayor probabilidad de transformación genética de células.

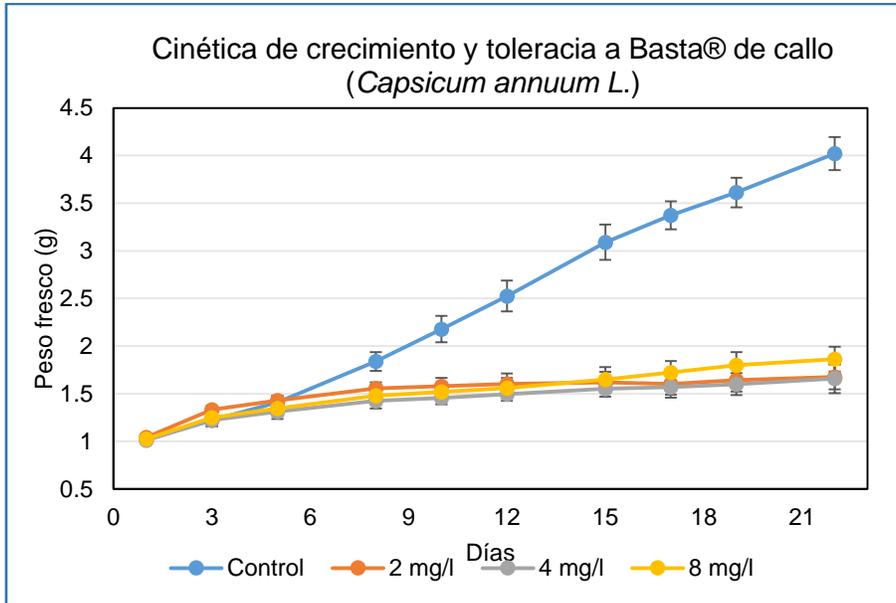
Los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento para ambas especies determinan que los subcultivos deben de llevarse a cabo cada tres semanas, mientras que la transformación genética para *Capsicum annuum* L. se debe de llevar a cabo 8 días después haber llevado el subcultivo y para *Capsicum chinense* Jacq. se debe de llevar a cabo a partir del día 12 después del subcultivo.

#### **Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de callo.**

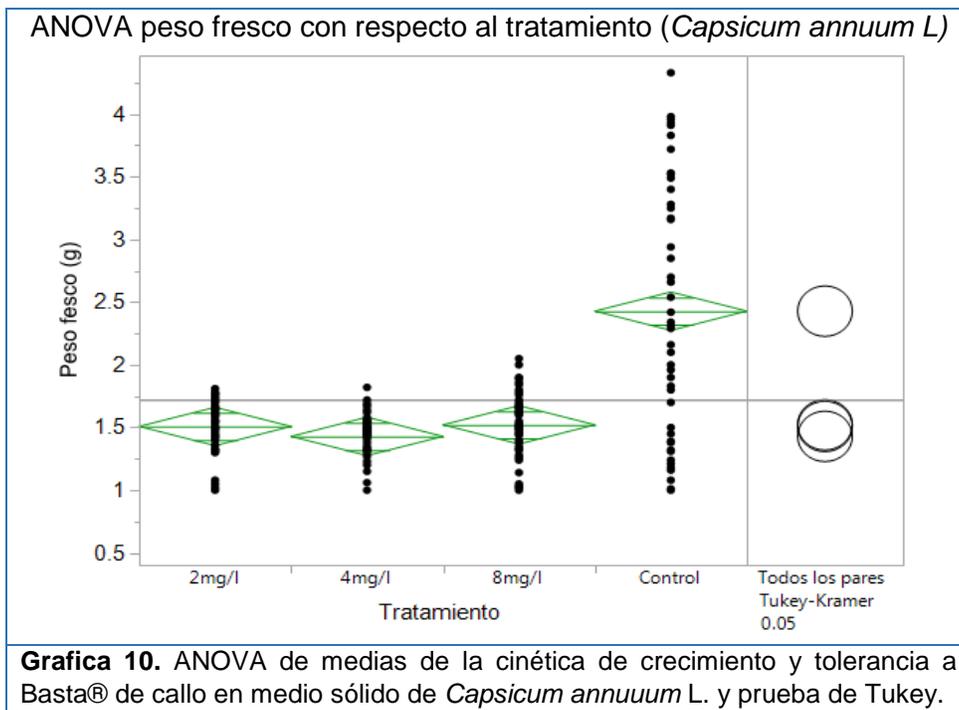
Es necesario llevar a cabo el monitoreo de agentes selectivos para células silvestres, por lo que se hace por medio de cinéticas de tolerancia. El Basta® es un herbicida de contacto que inhibe enzimas esenciales del metabolismo del nitrógeno en las plantas y es causante de muerte celular y por lo que es usado como agente selectivo (Hoerlein, 1994).

La gráfica 9 muestra la cinética de tolerancia a Basta® en medio solido de *Capsicum annuum* L. El control muestra que aumentó tres veces su peso inicial y los tratamientos con Basta® no aumentaron su peso durante 21 días. La gráfica muestra que el crecimiento del callo es inhibido a partir de 2 mg/l de Basta®.

Para observar si había una diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó una prueba de ANOVA (gráfica 10), los resultados muestran una  $p$  diferente a cero, lo que indica que al menos un tratamiento es diferente, por lo que se procedió a realizar una prueba de Tukey. La prueba de Tukey muestra que los tratamientos con Basta® no presentan diferencia significativa entre ellos (Ver anexo IV).

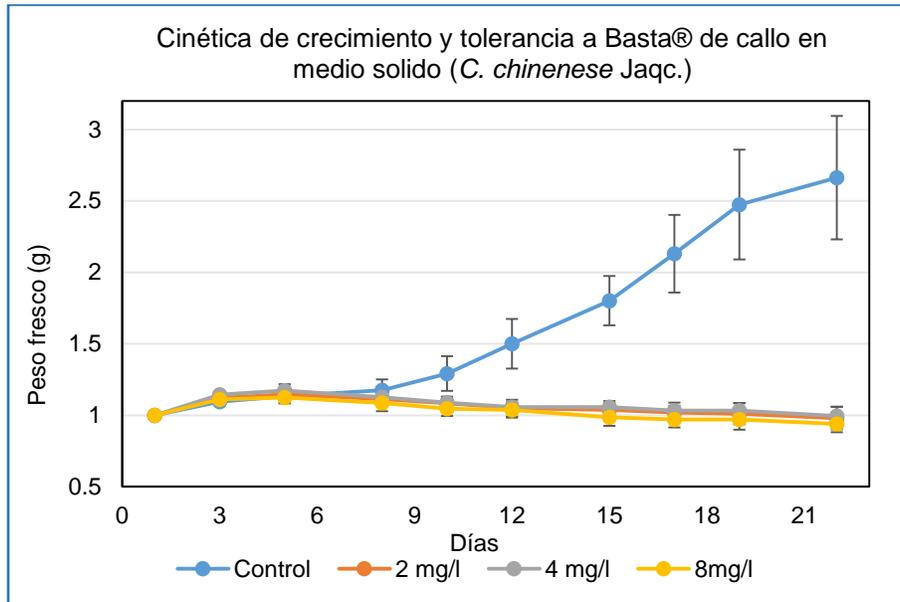


**Grafica 9.** Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de callo en medio sólido de *Capsicum annuum* L.



**Grafica 10.** ANOVA de medias de la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de callo en medio sólido de *Capsicum annuum* L. y prueba de Tukey.

La gráfica 11 muestra la cinética de tolerancia a Basta® de *Capsicum chinense* Jacq. Se observa que el control aumenta 1.5 veces su peso inicial durante 22 días, en tanto los tratamientos con Basta® muestran que el crecimiento de callo se ve inhibido por lo que el peso es constante durante el experimento.

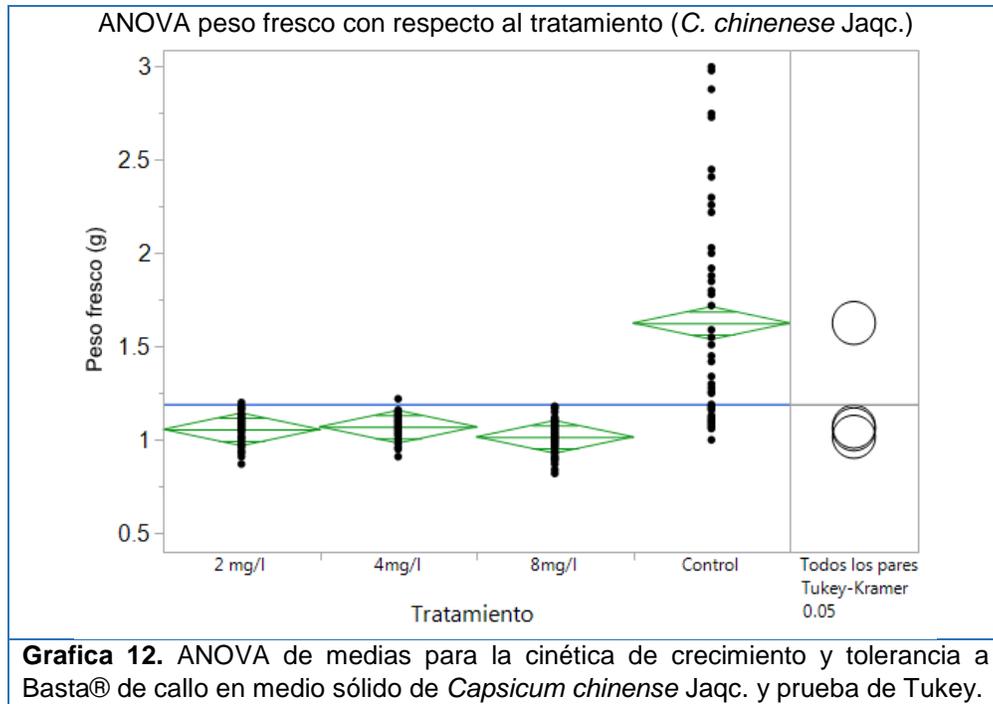


**Grafica 11.** Caracterización del crecimiento de callo de *Capsicum chinense* Jaqc. en medio sólido por medio de una cinética de crecimiento.

Para observar si había diferencia entre tratamientos se procedió a realizar una prueba de ANOVA (Grafica 12), dando como resultado una  $p$  diferente de 0, por lo que indica que al menos un valor es diferente.

La prueba de ANOVA al mostrar un valor diferente se procedió a elaborar una prueba de Tukey, la cual dio como resultado que no hay diferencias entre los tratamientos de Basta®, pero si hay diferencia respecto con el control (Ver anexo IV).

Los resultados obtenidos a partir de las cinéticas de tolerancia a Basta® de ambas especies muestran que el crecimiento del callo es inhibido desde el uso de 2 mg/l.



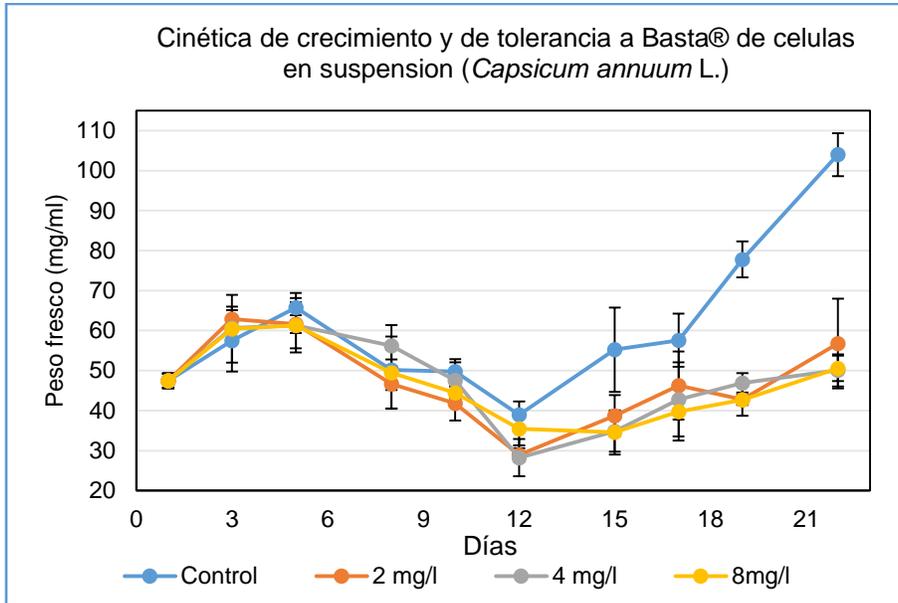
**Grafica 12.** ANOVA de medias para la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de callo en medio sólido de *Capsicum chinense* Jaqc. y prueba de Tukey.

### Cinética de crecimiento y de tolerancia a Basta® de células en suspensión.

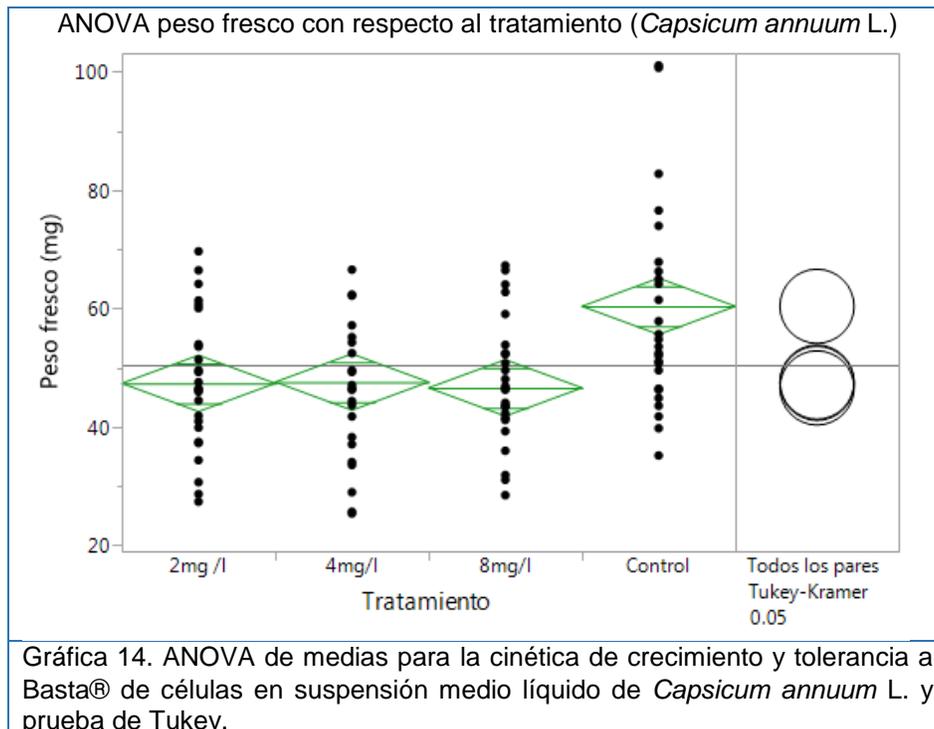
La grafica 13 muestra la cinética de crecimiento de células en suspensión y tolerancia a Basta® de *Capsicum annuum* L. La gráfica muestra que el control aumento su peso hasta el día 5 el cual es de 65.7 mg/ml y los siguientes días su crecimiento se ve disminuido hasta el día 12, después de este día el peso de las células en suspensión nuevamente aumenta y en el día 22 el peso fresco de las células en suspensión se duplica respecto al peso fresco inicial.

En la gráfica 13 muestra que los tratamientos con diferentes concentraciones de Basta® de las células en suspensión el crecimiento se inhibió. Los diferentes tratamientos con Basta® alcanzan un máximo crecimiento entre los días tres y cinco, posterior a estos días, el crecimiento de las células en suspensión se disminuye, después del día 12 el crecimiento de las células en suspensión comienza nuevamente a crecer y al día 22 se mantiene aproximadamente igual al peso inicial.

Se realizaron pruebas de ANOVA (Grafica 14) para saber si había diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, dando como resultado un valor de  $p \neq 0$ , por lo que indica que al menos un tratamiento es diferente. La prueba de Tukey muestra que el control es el tratamiento significativamente diferente, en tanto los tratamientos de Basta® no hay diferencia significativa entre ellos.



**Gráfica 13.** Cinética de crecimiento de células en suspensión y tolerancia a Basta® de *Capsicum annuum* L. en medio líquido.

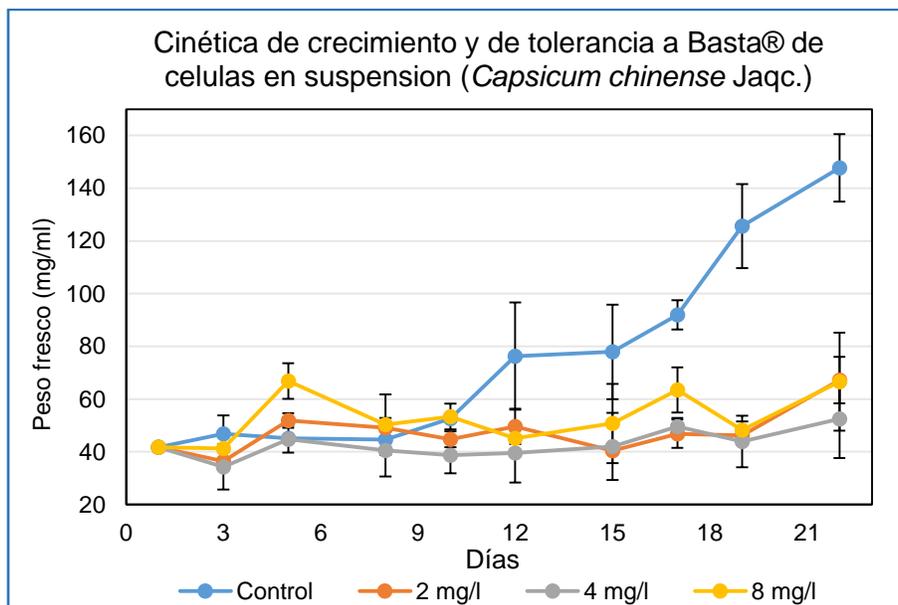


**Gráfica 14.** ANOVA de medias para la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión medio líquido de *Capsicum annuum* L. y prueba de Tukey.

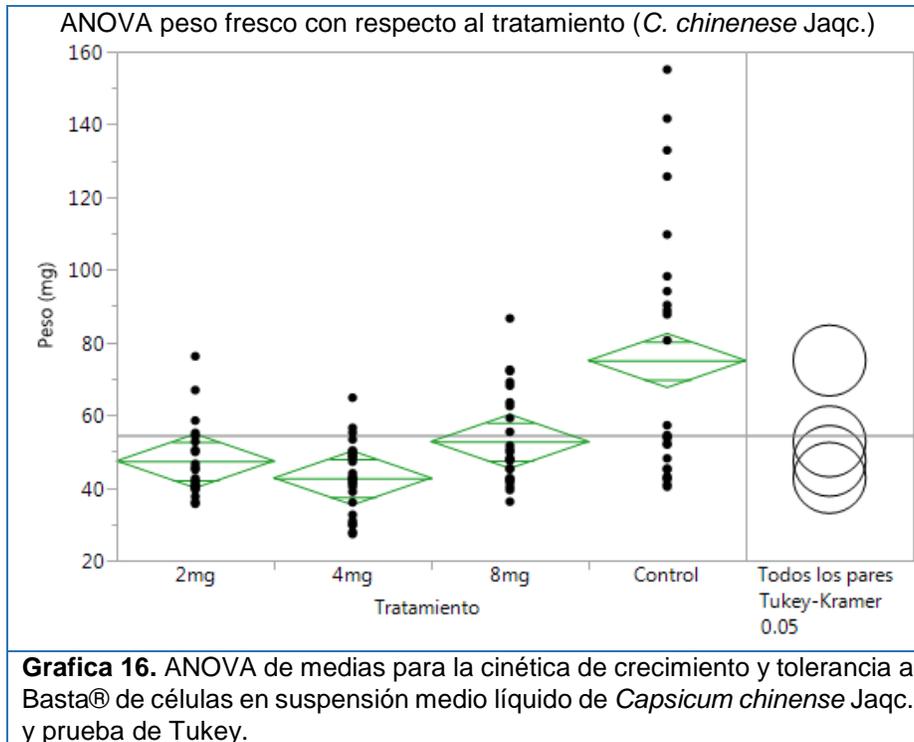
La gráfica 15 se muestra la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión de *Capsicum chinense* Jaqc. El control comienza con un peso de 40 mg/ml de células en suspensión y al transcurrir 22 días el peso se aumenta aproximadamente de 3.5 veces el peso inicial.

En la gráfica 15 muestra los diferentes tratamientos de células en suspensión con Basta®. Se observa que en los diferentes tratamientos el peso de las células en suspensión se mantiene constante respecto al peso inicial. Al término de los experimento, los tratamientos con Basta® sólo alcanzaron un crecimiento aproximado de 0.5 veces del peso inicial. La grafica muestra que el crecimiento de las células en suspensión es inhibido de igual forma, para saber si hay diferencia entre los tratamientos se realizó prueba de ANOVA.

Los resultados de ANOVA (Gráfica 16) muestra una  $p \neq 0$ , por lo que nos indica que al menos un tratamiento es diferente. Posteriormente se realizó una prueba de Tukey para saber cuál tratamiento tenía diferencias significativas, el control es el que mostro la diferencia, en tanto los tratamientos con las diferentes concentraciones de Basta® no hay diferencia significativa (ver anexo IV).



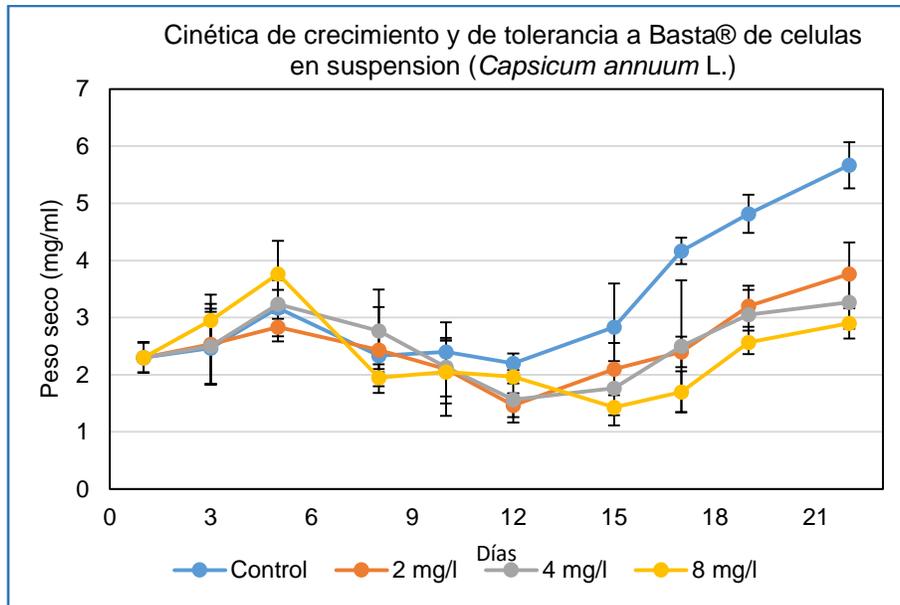
**Gráfica 15.** Cinética de crecimiento de células en suspensión y tolerancia a Basta® de *Capsicum chinense* Jaqc, en medio líquido.



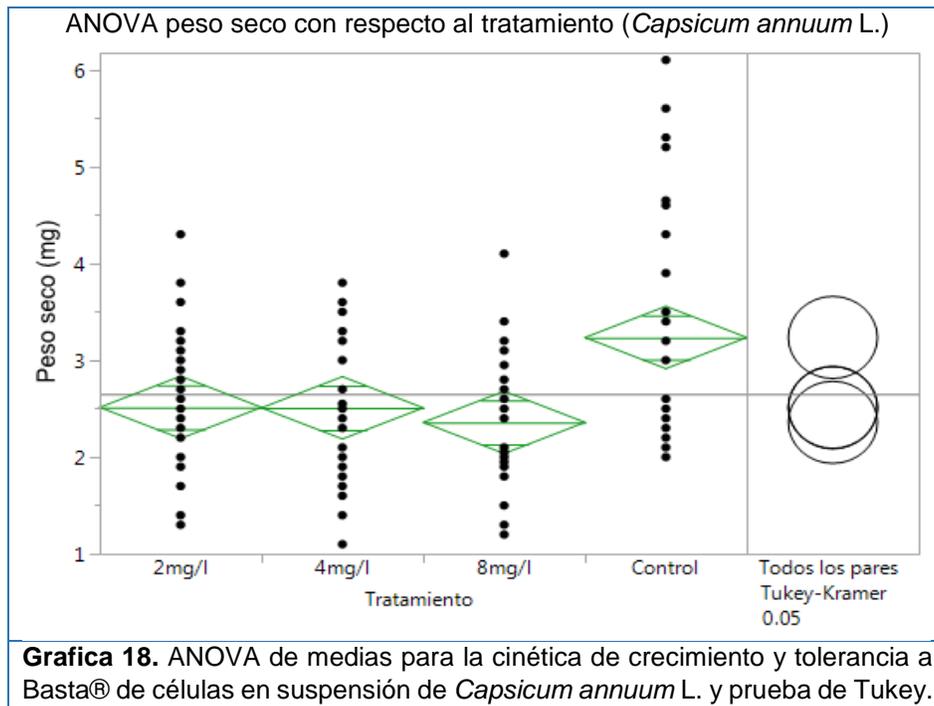
### Cinética de crecimiento en medio líquido.

En la gráfica 17 se muestra la cinética de crecimiento de células en suspensión (peso seco) de *Capsicum annum* L., como se puede observar tiene un comportamiento parecido a la cinética de crecimiento del peso fresco. La grafica muestra que el control al transcurrir los 22 días aproximadamente se alcanza a triplicar la masa inicial. En tanto los tratamientos con Basta® sólo aumentan de 0.3 a 0.5 veces su peso inicial.

Para observar las diferencias entre los tratamientos se procedió a elaborar prueba de ANOVA (Grafica 18), la prueba resulto un valor de  $p \neq 0$ , por lo que al menos un tratamiento es diferente. La prueba de Tukey dio como resultado que hay diferencias entre el control y los tratamientos con Basta®, en tanto entre los tratamientos no hay diferencia significativa.



**Grafica 17.** Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión de *Capsicum annum* L. en medio líquido.

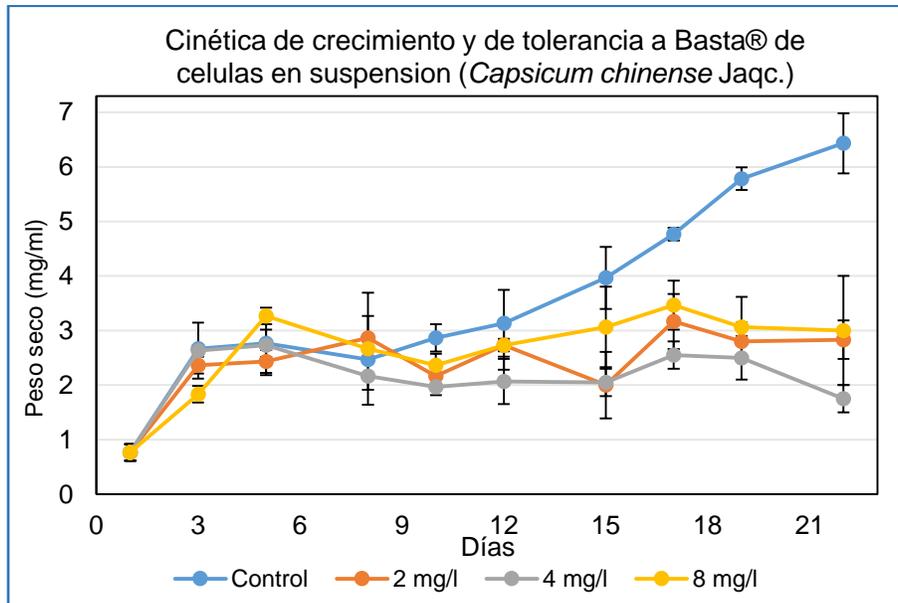


**Grafica 18.** ANOVA de medias para la cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión de *Capsicum annum* L. y prueba de Tukey.

La grafica 19 muestra la cinética de crecimiento (peso seco) y tolerancia a Basta® de *Capsicum chinense* Jaqc. se muestra de igual forma que tiene un comportamiento parecido a la cinética de crecimiento de células en suspensión de peso fresco. El control muestra que aumenta 8.5 veces su peso inicial, en tanto los tratamientos sólo aumentaron

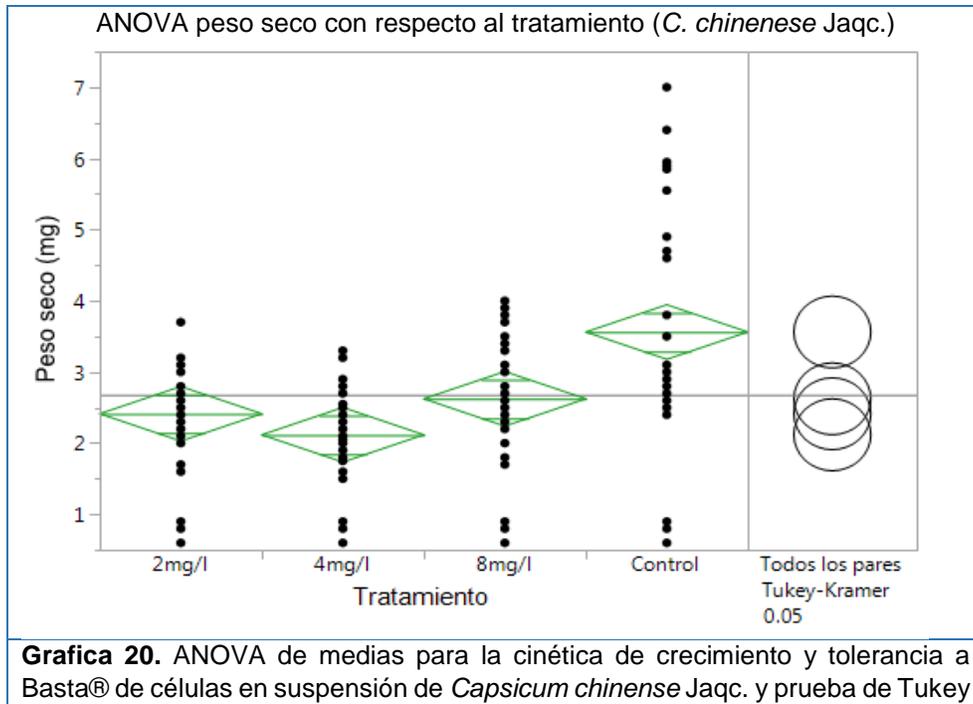
aproximadamente su peso entre 2.5 y 4 veces su peso inicial, por lo que se muestra que el crecimiento se inhibió con Basta®.

También se realizó prueba de ANOVA (Gráfica 20) para observar si había diferencias significativas entre los tratamientos, dando como resultado un valor de  $p \neq 0$ , por lo que indica que al menos un tratamiento es diferente. La elaboración de prueba de Tukey muestra que hay diferencias significativas entre el control y los tratamientos con Basta®, pero no hay diferencia significativa entre tratamientos con Basta® (ver anexo IV).



**Gráfica 19.** Cinética de crecimiento y tolerancia a Basta® de células en suspensión de *Capsicum chinense* Jaqc.

Los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de ambas especies de *Capsicum* muestran que la inhibición del crecimiento de callo se contrarresta a concentración de 2 mg/l de Basta®, esta concentración es menor a la utilizada por Khuong *et al.*, 2013, en su trabajo se seleccionaron semillas transformadas genéticamente de *Solanum lycopersicon* con una concentración de Basta® de 10 mg/l, de igual forma Subramanyam *et al.*, 2013 utilizó Basta® a concentración de 5 mg/l para seleccionar semillas transformadas de *Solanum melongena* L., ambas especies fueron transformadas genéticamente mediante *Agrobacterium tumefaciens*.



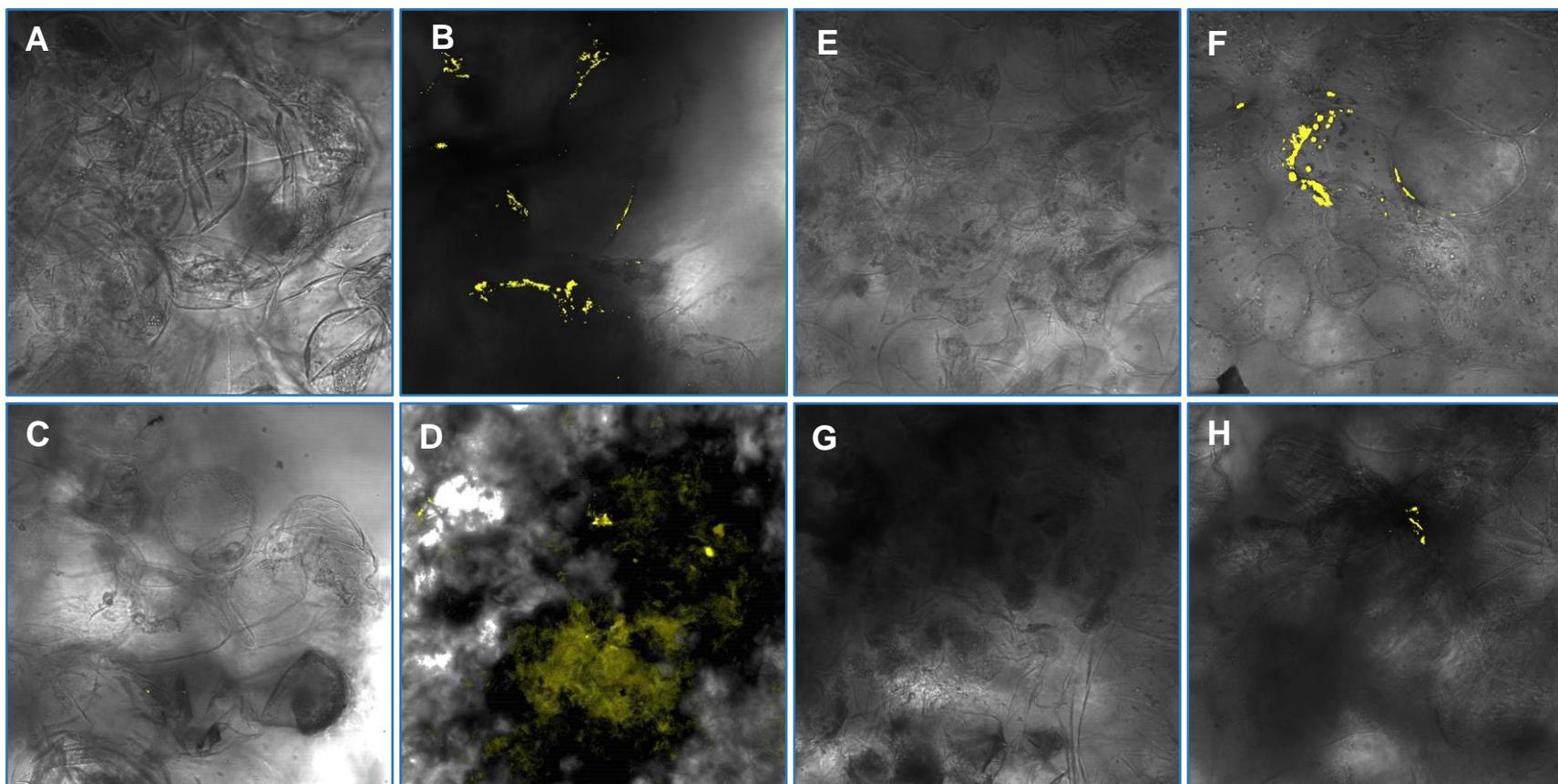
### Transformación genética por medio de Biobalística.

La mayoría de los reportes que se tienen para transformación genética del género *Capsicum* se realiza mediante *Agrobacterium tumefaciens*, además los vectores que se insertan tienen en su construcción genes reporteros que expresan el gen GUS. Solís-Ramos *et al.* (2009) y Arcos-Ortega *et al.* (2010) reportan la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* en donde insertan el plásmido con genes reporteros que sintetizan proteínas fluorescentes de color rojo y verde respectivamente.

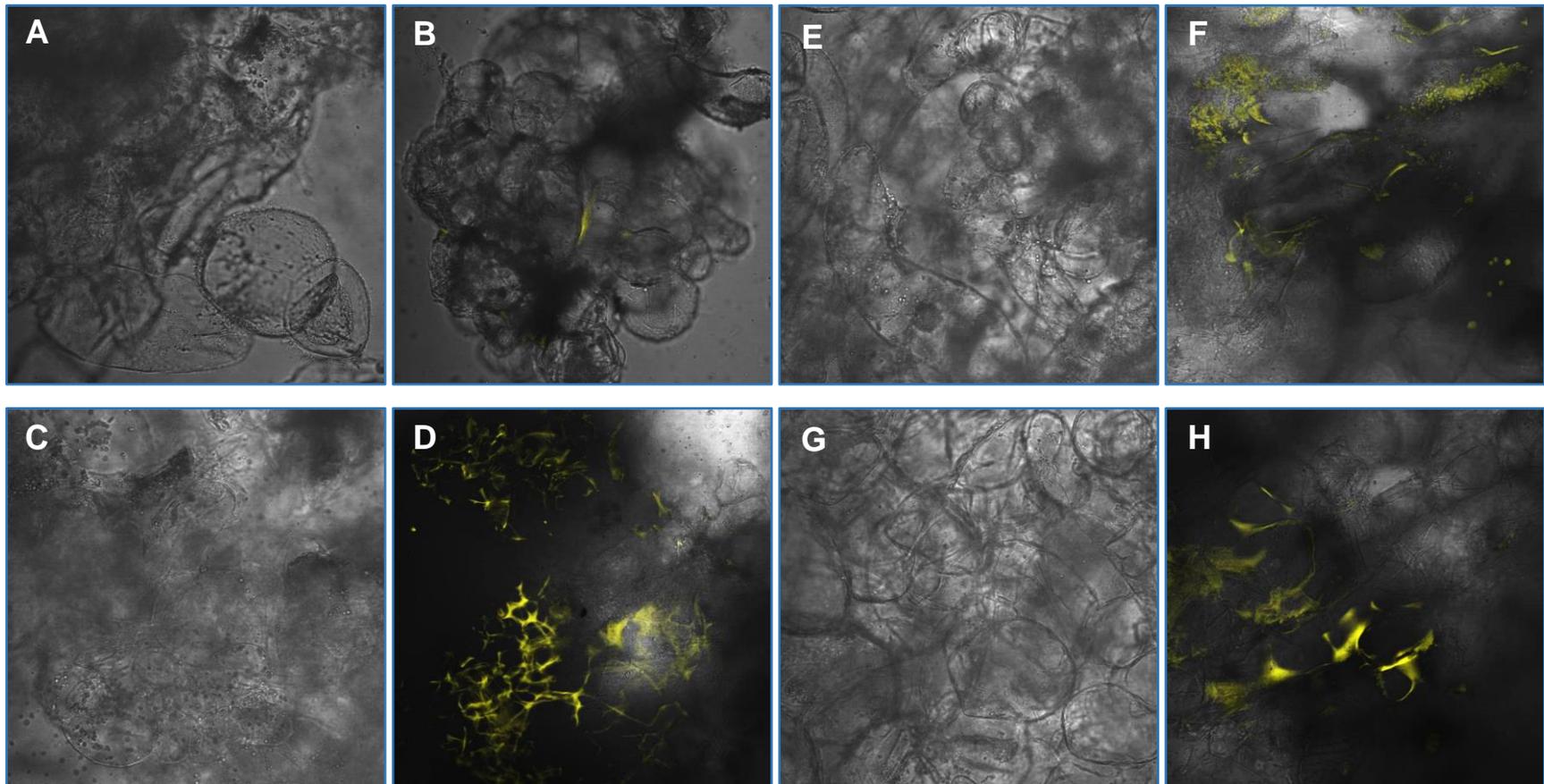
La transformación genética por medio de biobalística se evaluó de forma cualitativa y por medio de la observación de las células bajo microscopía confocal se pudo evaluar el tratamiento que mejor dio resultado.

En la figura 10 se muestra las imágenes de los tratamientos realizados con la adición del plásmido a los microproyectiles y su respectivo control, para así transformar callo de *Capsicum annuum* L., el mejor tratamiento abstenido fue T2, en donde se hizo uso de microproyectiles de 0.5  $\mu\text{m}$  y dos disparos sobre el tejido, ya que se puede observar fluorescencia sobre el tejido de interés.

En la figura 6 se muestra las imágenes de los tratamientos realizados para transformar callos de *Capsicum chinense* Jaqc., los tratamientos que resultaron positivos fueron los tratamientos T2 y T4, ya que se observan fluorescencia en las células.



**Figura 10.** Células de *Capsicum annuum* L. vistas a microscopio confocal (40X). (A) Células sometidas al tratamiento T1 (control negativo), (B) Células sometidas al tratamiento T1 + el plásmido de interés (35S-AtPPa4-YFP), en las células se observa fluorescencia amarilla. (C) Células sometidas al tratamiento T2 (control negativo). (D) Células sometidas al tratamiento T2 + plásmido de interés (35S-AtPPa4-YFP), en las células se observa fluorescencia amarilla. (E) Células sometidas al tratamiento T3 (control negativo), (F) Células sometidas al tratamiento T3 + el plásmido de interés (35S-AtPPa4-YFP), en las células se observa fluorescencia amarilla. (G) Células sometidas al tratamiento T4 (control negativo). (H) Células sometidas al tratamiento T2 + plásmido de interés (35S-AtPPa4-YFP), en las células se observa fluorescencia amarilla.



**Figura 11.** Células de *Capsicum chinense* Jaqc. vista a microscopio confocal (40X). (A) Células sometidas al tratamiento T1 (control negativo), (B) Células sometidas al tratamiento T1 + el plásmido de interés (35S-AtPPa4-YFP), en las células se observa fluorescencia amarilla. (C) Células sometidas al tratamiento T2 (control negativo). (D) Células sometidas al tratamiento T2 + plásmido de interés (35S-AtPPa4-YFP), en las células se observa fluorescencia amarilla. (E) Células sometidas al tratamiento T3 (control negativo), (F) Células sometidas al tratamiento T3 + el plásmido de interés (35S-AtPPa4-YFP), en las células se observa fluorescencia amarilla. (G) Células sometidas al tratamiento T4 (control negativo). (H) Células sometidas al tratamiento T2 + plásmido de interés (35S-AtPPa4-YFP), en las células se observa fluorescencia amarilla.

## VI. Conclusiones.

La investigación realizada se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- El método de desinfección resultó favorable para el establecimiento de semillas en condiciones asépticas, ya que no se presentó contaminación por hongo o por bacteria.
- La germinación de las semillas resultó favorable con remojo de 24 horas, ya que para *Capsicum annuum* L., se logró obtener 90% de germinación en comparación con el control.
- En el caso de *Capsicum chinense* Jacq. la germinación de semillas aun con remojo de semillas durante 24 horas, sólo se logró un 37% a los 25 días, por lo cual se debe emplear otro método para favorecer la germinación.
- Para las dos especies de chile la inducción y proliferación de callos tuvieron lugar en los cuatro explantes probados (hipocótilo, cotiledón, ápice y hoja primaria), sin embargo los callos provenientes del hipocótilo presentaron mayor crecimiento por lo cual en el protocolo sugerido se recomienda la utilización del mismo.
- Los callos obtenidos a partir de hipocótilo crecieron exponencialmente en el medio de cultivo MS + vitaminas B5 (MSB5).
- Para las dos especies, se logró la caracterización del crecimiento a través de las cinéticas de crecimiento tanto de callo como de células en suspensión, identificándose cada etapa (lag, exponencial, desaceleración y estacionaria) tanto de callos como de células en suspensión.
- La cinética de crecimiento de callo de *Capsicum annuum* L. muestra que la fase crecimiento exponencial comprende del día 8 hasta el día 15, momento en el que se debe realizar la transformación genética por medio de biobalística.
- En el caso de la cinética de crecimiento de callo de *Capsicum chinense* Jacq. muestra que la fase de crecimiento exponencial tiene lugar del día 10 al 19, en este periodo se debe realizar la transformación genética por medio de biobalística.
- En cuanto al agente selectivo, las cinéticas de tolerancia a Basta® de ambas especies (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.), demostró que el crecimiento del callo se inhibe a partir de los 2 mg/l, tanto en medio sólido como en medio líquido ya que no hay crecimiento ni en callos ni en células en suspensión.
- Se logró exitosamente la transformación genética en *Capsicum annuum* L. en todos los parámetros probados, sin embargo se hace más evidente esta transformación en el tratamiento T2.
- La transformación genética en *Capsicum chinense* Jacq. resultó presentó un número mayor de células transformadas en los tratamientos T2 y T4.

**VII. Anexos.**  
**Anexo I: Medio de cultivo MS (Murashigue & Skoog, 1962)**

Nombre del compuesto	Fórmula	P.M. (g)	Cantidades para un litro (1X)	
			Masa (mg)	Moles (mM)
<b>Compuestos inorgánicos</b>				
<b>Macronutrientes</b>				
Nitrato de Potasio	KNO <sub>3</sub>	101.108	1900	18.791
Nitrato de Amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80.04	1650	20.614
Cloruro de Calcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	147.02	440	2.993
	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	128.99	385.93	2.993
	CaCl <sub>2</sub>	110.99	332.08	2.993
Sulfato de Magnesio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246.498	370	1.501
Fosfato de Potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	154.086	192.48	1.249
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	170	1.249
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174.2	217.6	1.249
<b>Micronutrientes</b>				
Sulfato de Manganeso	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	223.0618	22.3	0.099
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	169.01	16.7	0.099
Sulfato de Zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	287.54	8.6	0.0299
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.86	6.2	0.1002
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.83	4.99x10 <sup>-3</sup>
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	249.68	0.025	0.1 μM
Molibdato de Sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	241.95	0.25	1.03 μM
Cloruro de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	237.93	0.025	0.105 μM
Sulfato Ferroso	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	278.028	27.8	0.1
Na <sub>2</sub> EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub>	336.2	33.28	0.099
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	372.3	37.3	0.099

### Vitaminas del medio MS.

Nombre del compuesto	Fórmula	P.M. (g)	Cantidades para un litro (1X)	
			Masa (mg)	Moles (mM)
<b>Compuestos orgánicos</b>				
<b>Aminoácidos</b>				
Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75.07	2	0.0266
<b>Vitaminas</b>				
Myo-Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180.2	100	0.555
Tiamina-HCl	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S.HCl	337.3	0.1	2.964x10 <sup>-4</sup>
Ácido Nicotínico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	123.1	0.5	4.062x10 <sup>-3</sup>
Piridoxina-HCl	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .HCl	205.6	0.5	2.432x10 <sup>-3</sup>

### Vitaminas B5

Nombre del compuesto	Fórmula	P.M. (g)	Cantidades para un litro (1X)	
			Masa (mg)	Moles (M)
<b>Compuestos orgánicos</b>				
<b>Vitaminas</b>				
Myo-Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180.2	100	0.555
Tiamina-HCl	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S.HCl	337.3	10	2.964x10 <sup>-4</sup>
Ácido Nicotínico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	123.1	1	4.062x10 <sup>-3</sup>
Piridoxina-HCl	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .HCl	205.6	1	2.432x10 <sup>-3</sup>

## Anexo II.

Plásmido utilizado para la transformación genética por medio de biobalística.

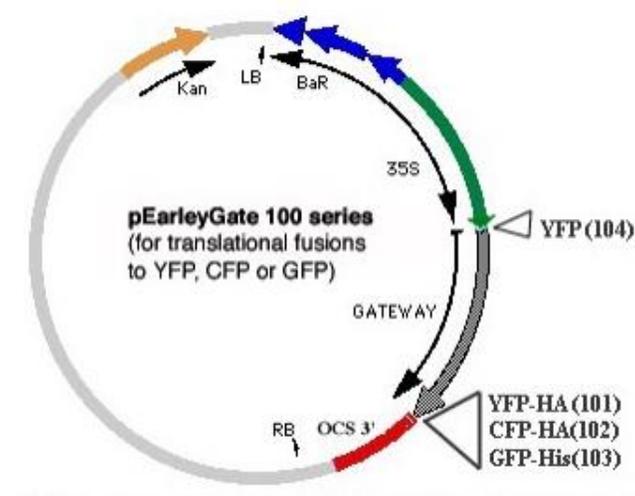


Figura 7. Mapa general de vector de expresión en tejidos vegetales pEarly Gate serie 100.

## Anexo III. Preparación del DNA.

1. En un tubo Eppendorf se colocan 50  $\mu\text{L}$  de macropartículas de tungsteno, posteriormente se colocan los siguientes reactivos uno a uno.
2. 5  $\mu\text{L}$  de DNA de interés (1  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}$ ), colocarlo en la pared del tubo Eppendorf. NOTA: evitar que el DNA se mezcle con las macropartículas de tungsteno.
3. 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M.
4. 20  $\mu\text{L}$  de espermidina 0.1 M. Con esta última mezcla se acarrea el DNA y el  $\text{CaCl}_2$  para mezclarlos y se resuspende con las macropartículas.
5. La mezcla se agita con ayuda del vortex durante 1 minuto.
6. La mezcla se deja incubar durante 5 minutos.
7. Se centrifuga por 1 minuto y se le retira el sobrenadante.
8. Añadir 140  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% (grado HPLC).
9. La mezcla se agita con el vortex durante 1 minuto.
10. Centrifugar por 1 minuto y retirar el sobrenadante.
11. Añadir 140  $\mu\text{L}$  de etanol al 100% (grado HPLC).
12. La mezcla se agita en el vortex durante 1 minuto.
13. Centrifugar por 1 minuto y retirar el sobrenadante.
14. Finalmente se añaden 48  $\mu\text{L}$  de etanol al 100% (grado HPLC).
15. Resuspender suavemente varias veces.
16. Colocar en los macro acarreadores 8  $\mu\text{L}$  de la mezcla. Se deja que el etanol se volatilice para hacer uso de las muestras.

## Anexo IV: Análisis de datos.

ANOVA de un factor para *Capsicum annuum* L. en medio sólido.

ANOVA de un factor					
<b>Resumen del ajuste</b>					
R cuadrado		0.361577			
R cuadrado ajustado		0.351805			
Raíz del error cuadrático medio		0.549546			
Media de respuesta		1.7219			
Observaciones (o suma de pesos)		200			
<b>Análisis de varianza</b>					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Tratamiento	3	33.524050	11.1747	37.0021	<.0001*
Error	196	59.192228	0.3020		
C. Total	199	92.716278			
<b>Medias para ANOVA de un factor</b>					
Nivel	Número	Media	Error estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
2mg/l	50	1.50840	0.07772	1.3551	1.6617
4mg/l	50	1.42940	0.07772	1.2761	1.5827
8mg/l	50	1.52140	0.07772	1.3681	1.6747
Control	50	2.42840	0.07772	2.2751	2.5817

Prueba de Tukey para *Capsicum annuum* L. en medio sólido.

Cuantil de confianza				
q*	Alpha			
2.59122	0.05			
Matriz del umbral de HSD				
Abs. (Dif.) - HSD				
	Control	8mg/l	2mg/l	4mg/l
Control	-0.28480	0.62220	0.63520	0.71420
8mg/l	0.62220	-0.28480	-0.27180	-0.19280
2mg/l	0.63520	-0.27180	-0.28480	-0.20580
4mg/l	0.71420	-0.19280	-0.20580	-0.28480
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.				
Informe de letras de unión				
Nivel	Media			
Control A	2.4284000			
8mg/l B	1.5214000			
2mg/l B	1.5084000			
4mg/l B	1.4294000			
Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.				

ANOVA de un factor para *Capsicum chinense* Jaqc. en medio sólido.

ANOVA de un factor					
<b>Resumen del ajuste</b>					
R cuadrado		0.394039			
R cuadrado ajustado		0.384764			
Raíz del error cuadrático medio		0.314877			
Media de respuesta		1.1924			
Observaciones (o suma de pesos)		200			
<b>Análisis de varianza</b>					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Tratamiento	3	12.636684	4.21223	42.4843	<.0001*
Error	196	19.432964	0.09915		
C. Total	199	32.069648			
<b>Medias para ANOVA de un factor</b>					
Nivel	Número	Media	Error estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
2 mg/l	50	1.05640	0.04453	0.9686	1.1442
4mg/l	50	1.07060	0.04453	0.9828	1.1584
8mg/l	50	1.01620	0.04453	0.9284	1.1040
Control	50	1.62640	0.04453	1.5386	1.7142
El error estándar utiliza una estimación combinada de la varianza del error					

Prueba de Tukey para *Capsicum chinense* Jaqc. en medio sólido.

Cuantil de confianza				
q*	Alpha			
2.59122	0.05			
Matriz del umbral de HSD				
Abs. (Dif.) - HSD				
	Control	4mg/l	2 mg/l	8mg/l
Control	-0.16318	0.39262	0.40682	0.44702
4mg/l	0.39262	-0.16318	-0.14898	-0.10878
2 mg/l	0.40682	-0.14898	-0.16318	-0.12298
8mg/l	0.44702	-0.10878	-0.12298	-0.16318
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.				
Informe de letras de unión				
Nivel	Media			
Control A	1.6264000			
4mg/l B	1.0706000			
2 mg/l B	1.0564000			
8mg/l B	1.0162000			
Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.				

ANOVA de un factor para células en suspensión (peso fresco) de *Capsicum annuum* L.

ANOVA de un factor					
<b>Resumen del ajuste</b>					
R cuadrado		0.163958			
R cuadrado ajustado		0.142336			
Raíz del error cuadrático medio		13.16322			
Media de respuesta		50.51			
Observaciones (o suma de pesos)		120			
<b>Análisis de varianza</b>					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Tratamiento	3	3941.735	1313.91	7.5830	0.0001*
Error	116	20099.373	173.27		
C. Total	119	24041.108			
<b>Medias para ANOVA de un factor</b>					
Nivel	Número	Media	Error estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
2mg /l	30	47.3933	2.4033	42.633	52.153
4mg/l	30	47.6067	2.4033	42.847	52.367
8mg/l	30	46.6233	2.4033	41.863	51.383
Control	30	60.4167	2.4033	55.657	65.177
El error estándar utiliza una estimación combinada de la varianza del error					

Prueba de Tukey para para células en suspensión (peso fresco) de *Capsicum annuum* L.

Cuantil de confianza				
q*	Alpha			
2.60667	0.05			
Matriz del umbral de HSD				
Abs. (Dif.) - HSD				
	Control	4mg/l	2mg /l	8mg/l
Control	-8.8594	3.9506	4.1640	4.9340
4mg/l	3.9506	-8.8594	-8.6460	-7.8760
2mg /l	4.1640	-8.6460	-8.8594	-8.0894
8mg/l	4.9340	-7.8760	-8.0894	-8.8594
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.				
Informe de letras de unión				
Nivel	Media			
Control A	60.416667			
4mg/l B	47.606667			
2mg /l B	47.393333			
8mg/l B	46.623333			
Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.				

ANOVA de un factor para células en suspensión (peso fresco) de *Capsicum chinense* Jaqc.

ANOVA de un factor					
<b>Resumen del ajuste</b>					
R cuadrado		0.274202			
R cuadrado ajustado		0.255431			
Raíz del error cuadrático medio		20.49393			
Media de respuesta		54.48458			
Observaciones (o suma de pesos)		120			
<b>Análisis de varianza</b>					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Tratamiento	3	18406.140	6135.38	14.6080	<.0001*
Error	116	48720.134	420.00		
C. Total	119	67126.274			
<b>Medias para ANOVA de un factor</b>					
Nivel	Número	Media	Error estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
2mg	30	47.4067	3.7417	39.996	54.818
4mg	30	42.7300	3.7417	35.319	50.141
8mg	30	52.7667	3.7417	45.356	60.178
Control	30	75.0350	3.7417	67.624	82.446
El error estándar utiliza una estimación combinada de la varianza del error					

Prueba de Tukey para para células en suspensión (peso fresco) de *Capsicum chinense* Jaqc.

Cuantil de confianza				
q*	Alpha			
2.60667	0.05			
Matriz del umbral de HSD				
Abs. (Dif.) - HSD				
	Control	8mg	2mg	4mg
Control	-13.793	8.475	13.835	18.512
8mg	8.475	-13.793	-8.433	-3.757
2mg	13.835	-8.433	-13.793	-9.117
4mg	18.512	-3.757	-9.117	-13.793
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.				
Informe de letras de unión				
Nivel	Media			
Control A	75.035000			
8mg B	52.766667			
2mg B	47.406667			
4mg B	42.730000			
Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.				

ANOVA de un factor para células en suspensión (peso seco) de *Capsicum annuum* L.

ANOVA de un factor					
Resumen del ajuste					
R cuadrado			0.131888		
R cuadrado ajustado			0.109437		
Raíz del error cuadrático medio			0.890642		
Media de respuesta			2.65375		
Observaciones (o suma de pesos)			120		
Análisis de varianza					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Tratamiento	3	13.97956	4.65985	5.8744	0.0009*
Error	116	92.01625	0.79324		
C. Total	119	105.99581			
Medias para ANOVA de un factor					
Nivel	Número	Media	Error estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
2mg/l	30	2.51333	0.16261	2.1913	2.8354
4mg/l	30	2.50833	0.16261	2.1863	2.8304
8mg/l	30	2.35833	0.16261	2.0363	2.6804
Control	30	3.23500	0.16261	2.9129	3.5571

El error estándar utiliza una estimación combinada de la varianza del error

Prueba de Tukey para para células en suspensión (peso seco) de *Capsicum annuum* L.

Cuantil de confianza				
q*	Alpha			
2.60667	0.05			
Matriz del umbral de HSD				
Abs. (Dif.) - HSD				
	Control	2mg/l	4mg/l	8mg/l
Control	-0.59944	0.12223	0.12723	0.27723
2mg/l	0.12223	-0.59944	-0.59444	-0.44444
4mg/l	0.12723	-0.59444	-0.59944	-0.44944
8mg/l	0.27723	-0.44444	-0.44944	-0.59944

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión	
Nivel	Media
Control	A 3.2350000
2mg/l	B 2.5133333
4mg/l	B 2.5083333
8mg/l	B 2.3583333

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

ANOVA de un factor para células en suspensión (peso seco) de *Capsicum chinense* Jaqc.

ANOVA de un factor					
<b>Resumen del ajuste</b>					
R cuadrado			0.211509		
R cuadrado ajustado			0.191117		
Raíz del error cuadrático medio			1.060779		
Media de respuesta			2.679167		
Observaciones (o suma de pesos)			120		
<b>Análisis de varianza</b>					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Tratamiento	3	35.01375	11.6713	10.3721	<.0001*
Error	116	130.52917	1.1253		
C. Total	119	165.54292			
<b>Medias para ANOVA de un factor</b>					
Nivel	Número	Media	Error estándar	Extremo inferior del IC al 95%	Extremo superior del IC al 95%
2mg/l	30	2.41333	0.19367	2.0297	2.7969
4mg/l	30	2.11833	0.19367	1.7347	2.5019
8mg/l	30	2.62333	0.19367	2.2397	3.0069
Control	30	3.56167	0.19367	3.1781	3.9453
El error estándar utiliza una estimación combinada de la varianza del error					

Prueba de Tukey para para células en suspensión (peso seco) de *Capsicum chinense* Jaqc.

Cuantil de confianza				
q*	Alpha			
2.60667	0.05			
Matriz del umbral de HSD				
Abs. (Dif.) - HSD				
	Control	8mg/l	2mg/l	4mg/l
Control	-0.71395	0.22439	0.43439	0.72939
8mg/l	0.22439	-0.71395	-0.50395	-0.20895
2mg/l	0.43439	-0.50395	-0.71395	-0.41895
4mg/l	0.72939	-0.20895	-0.41895	-0.71395
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.				
Informe de letras de unión				
Nivel	Media			
Control	A 3.5616667			
8mg/l	B 2.6233333			
2mg/l	B 2.4133333			
4mg/l	B 2.1183333			
Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.				

## VIII. Bibliografía.

- Agarwal, S., & Chandra, N. (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var Mathania. *Current Science (India)*.
- Agramonte, D., Pérez, J., Pérez, M., & Pérez, A. (1993). Empleo de hipoclorito de sodio (NaOCl) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos. Centro Agrícola. *Centro Agrícola*.
- Agrawal, S., Chandra, N., & Kothari, S. L. (1989). Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. mathania). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*, 16(1), 47–55.
- Andrews, J. (1995). Peppers: the domesticated Capsicums. *Capsicums. University of Texas Press*.
- Anson, D. (2007). *Reporter genes: a practical guide. Methods in cell biology* (Vol. 411). Springer Science & Business Media.
- Arcos-Ortega, G. F., Chan-Kuuk, R. A., González-Kantún, W. A., Souza-Perera, R., Nakazawa-Ueji, Y. E., Avilés-Berzunza, E., ... Aguilar, J. J. Z. (2010). Agrobacterium tumefaciens-transient genetic transformation of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) leaf explants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(4).
- Arous, S., Boussaïd, M., & Marrakchi, M. (2001). Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chili (*Capsicum annuum* L.). *J Appl Hortic*, 3(1), 17–22.
- Arroyo, R., & Revilla, M. A. (1991). In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Reports*, 10(8), 414–416.
- Bahadur, B., Rajam, V., Manchikatla, S., & Leela, K. (Ed.). (2015). *Plant Biology and Biotechnology: Plant Genomics and Biotechnology* (Vol. II). Springer India.
- Barclay, G. F. (2001). Anatomy and Morphology of Seed Plants. *eLS*.
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. India: Springer.
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S., & Sankhla, D. (n.d.). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 15(7), 536-540, 333–336.
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S., & Sankhla, D. (n.d.). In vitro regeneration in chile pepper (*Capsicum annuum* L.) from “half-seed explants.” *Plant Growth Regulation*, 20(3), 287–293.
- Buyukalaca, S., & Mavituna, F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(3), 227–235.
- Carbonari, C. A., Latorre, D. O., Gomes, G. L. G. C., Velini, E. D., Owens, D. K., Pan, Z., & Dayan, F. E. (2016). Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink® and WideStrike® cotton. *Planta*, 243(4), 925–933.
- Cassells, A. C., & Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64((2-3)), 145–157.
- Christopher, T., & Rajam, M. V. (1994). In vitro clonal propagation of *Capsicum* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38(1), 25–29.
- Cornish, E. C., Pettitt, J. M., Bonig, I., & Clarke, A. E. (1987). Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, 326(6108), 99–102.
- Crouzet, P., & Hohn, B. (2002). Transgenic Plants. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Dabauza, M., & Pena, L. (2001). High efficiency organogenesis in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) Tissues from different seedling explants. *Plant Growth Regulation*, 33(3), 221–229.

- Dafadar, A., Das, A., Bandyopadhyay, S., & Jha, T. B. (2012). In vitro propagation and molecular evaluation of a *Capsicum annuum* L. cultivar with a high chromosome number ( $2n=48$ ). *Scientia Horticulturae*, *140*, 119–124.
- do Rêgo, E. R., do Rêgo, M. M., & Finger, F. L. (2016). *Production and Breeding of Chilli Peppers (Capsicum spp.)*. Springer.
- Dröge, W., Broer, I., & Pühler, A. (1992). Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide l-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta*, *187*(1), 142–151. <http://doi.org/10.1007/BF00201636>
- Ebida, A. I., & Hu, C. Y. (1993). In vitro morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports*, *13*(2), 107–110.
- Elmore, H. W., Samples, B., Sharma, S., & Harrison, M. (1990). (1990). Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbate stability in plant tissue culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *20*(2), 131–135.
- Engler, D. E., Guri, A. Z., Lauritis, J. A., & Schloemer, L. M. (1993). Genetically transformed pepper plants and method for their production. U.S. Patent No. 5,262,316. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Ezura, H., Nishimiya, S., & Kasumi, M. (1993). Efficient regeneration of plants independent of exogeneous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Reports*, *12*(12), 676–680.
- Franck-Duchenne, M., Wang, Y., Tahar, S. Ben, & Beachy, R. N. (1998). In vitro stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *53*(2), 79–84.
- García-Contreras, R., & Romero, I. (2003). Las Pirofosfatasas. Avances recientes. *Revista de Educacion Bioquimica*, *22*(4), 183–190.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (Ed.). (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Gogoi, S., Acharjee, S., & Devi, J. (2014). In vitro plantlet regeneration of *Capsicum chinense* Jacq. cv. “Bhut jalakia”: Hottest chili of northeastern India. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *50*(2), 235–241.
- Golegaonkar, P. G., & Kantharajah, a. S. (2006). High-frequency adventitious shoot bud induction and shoot elongation of Chile pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *42*(4), 341–344.
- Gunay, A. L., & Rao, P. S. (1978). In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Science Letters*, *11*(3), 365–372.
- Gupta, S. D., & Datta, S. (2003). Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biologia Plantarum*, *47*(2), 179–183.
- Harini, I., & Lakshmi Sita, G. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, *89*(1), 107–112.
- Harpster, M. H., Brummell, D. A., & Dunsmuir, P. (2002). Suppression of a ripening-related endo-1, 4-β-glucanase in transgenic pepper fruit does not prevent depolymerization of cell wall polysaccharides during ripening. *Plant Molecular Biology*, *50*(3), 345–355.
- Heidmann, I., De Lange, B., Lambalk, J., Angenent, G. C., & Boutilier, K. (2011). Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. *Plant Cell Reports*, *30*(6), 1107–1115.
- Hernández-Verdugo, S., Aranda-Dávila, P., & Oyama, K. (1999). Síntesis del conocimiento taxonómico, origen

- y domesticación del género *Capsicum*. Review of taxonomy, origin and domestication of the genus *Capsicum*. *Boletín de La Sociedad Botánica de México.*, 65, 65–84.
- Hoerlein, G. (1994). Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 138, pp. 73–145). Springer New York.
- Hull, R., Tzotzos, G. T., & Head, G. (2009). *Genetically modified plants: assessing safety and managing risk*. Academic Press.
- Husain, S., Jain, A., & Kothari, S. L. (1999). Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Reports*, 19(1), 64–68.
- Hyde, C. L., & Phillips, G. C. (1996). Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. *In Vitro-Plant*, 32(2), 72–80.
- Jayashankar, S., Bagga, S., & Phillips, G. C. (1997). Sweet pepper (*Capsicum annuum*) transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *HortScience*, 32(2), 454–455.
- Johnson, T. S., Ravishankar, G. A., & Venkataraman, L. V. (1990). In vitro capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. *Plant Science*, 70(2), 223–229.
- 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, Tissue and Organ Culture*, 88(2), 127–133.
- Kaparakis, G., & Alderson, P. G. (2008). Role for cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.)? *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(2), 110–114.
- Kehie, M., Kumaria, S., & Tandon, P. (2012). In vitro plantlet regeneration from nodal segments and shoot tips of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili. *3 Biotech*, 2(1), 31–35.
- Khan, H., Siddique, I., Anis, M., & Khan, P. R. (2011). In vitro organogenesis from internode derived callus cultures of *Capsicum annuum* L. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 20(1), 84–89.
- Khuong, T. T. H., Crété, P., Robaglia, C., & Caffarri, S. (2013). Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate/Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number. *Plant Cell Reports*, 32(9), 1441–1454.
- Kikkert, J. R. (2001). Microprojectile Bombardment. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Kim, S., Kim, S., An, C. S., Hong, Y., & Lee, K. (2001). Constitutive expression of rice MADS box gene using seed explants in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) Constitutive Expression of Rice MADS Box Gene Using Seed. *Molecules and Cells*, 12(2), 221–226.
- Kintzios, S., Drossopoulos, J. B., & Lympelopoulos, C. (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(1), 55–62.
- Kintzios, S., Drossopoulos, J. B., Shortsiianitis, E., & Peppes, D. (2000). Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): Effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturae*, 85(1–2), 137–144.
- Klein, T. M., & Fitzpatrick-McCelligott, S. (1993). Particle bombardment: A universal approach for gene transfer to cells and tissues. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(5), 583–590.
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli peppers - A review on tissue culture

- and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28(1), 35–48.
- Kumar, V., Gururaj, H. B., Prasad, B. C. N., Giridhar, P., & Ravishankar, G. a. (2005). Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. *Scientia Horticulturae*, 106(2), 237–246.
- Lee, S. J., Paik, K. H., & Kim, B. D. (1993). In vitro plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation from cotyledon explants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv Golden Tower). *Korean Journal of Plant Tissue Culture (Korea Republic)*.
- Lee, Y. H., Jung, M., Shin, S. H., Lee, J. H., Choi, S. H., Her, N. H., Lee, J. H., Ryu, K. H., Paek, K. Y., & Harn, C. H. (2009). Transgenic peppers that are highly tolerant to a new CMV pathotype. *Plant Cell Reports*, 28(2), 223–232.
- Lee, Y. H., Kim, H. S., Kim, J. Y., Jung, M., Park, Y. S., Lee, J. S., Choi, S. H., Her, N. H., Lee, J. H., Hyung, N. I., Lee, C. H., Yang, S. G., H. C. H. (2004). A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. *Plant Cell Reports*, 23(1–2), 50–58.
- Li, D., Zhao, K., Xie, B., Zhang, B., & Luo, K. (2003). Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell reports.2*, 21(8), 785–788.
- Lim, T. K. (2013). *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. Volume 6, Fruits*. Springer Netherlands.
- Liu, W., Parrott, W. A., Hildebrand, D. F., Collins, G. B., & Williams, E. G. (1990). Agrobacterium induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports*, 9(7), 360–364.
- López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barredo-Pool, F., Zapata-Castillo, P., Montalvo-Peniche, M., Barahona-Pérez, F., & Santana-Buzzy, N. (2006). Direct somatic embryogenesis: A highly efficient protocol for in vitro regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 41(7), 1645–1650.
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (Ed.). (2012). *Plant cell culture protocols* (Third Edit). New Jersey: Humana Press.
- Loyola-Vargas, V. M., & Vázquez-Flota, F. (Ed.). (2006). *Plant cell culture protocols* (Vol.318). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Madhuri, V., & Rajam, M. V. (1993). Apical shoot meristem culture in red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2(1), 67–68.
- Maliga, P. (Ed.). (2014). *Chloroplast biotechnology: methods and protocols*. (Humana).
- Mandoli, D. F., & Olmstead, R. (2000). The importance of emerging model systems in plant biology. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(3), 249–252.
- Manoharan, M., Vidya, C. S., & Sita, G. L. (1998). A grobacterium-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. Pusa jwala). *Plant Science*, 131(1), 77–83.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y. & Levy, A. (1997). A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal*, 12(6), 1465–1472.
- Meyerowitz, E. M. (2001). Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant Physiology*, 125(1), 15–19.
- Mezghani, N., Jemmali, A., Elloumi, N., Gargouri-Bouزيد, R., & Kintzios, S. (2007). Morpho-histological study on shoot bud regeneration in cotyledon cultures of pepper (*Capsicum annuum*). *Biologia*, 62(6), 704–710.
- Morton Bradbury, E. (1992). Reversible histone modification and the chromosome cell cycle. *Bioessays*, 14(1), 9–16.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Nienhaus, K., & Nienhaus, G. U. (2014). Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution. *Chemical Society Reviews*, 43(4), 1088–1106.
- Nonogaki, H. (2008). Seed Germination and Reserve Mobilization. *eLS*.
- Ochoa-Alejo, N., & Ramirez-Malagon, R. (2001). Invited Review : in Vitro Chili Pepper Biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36(7), 701–729.
- Ortiz, R., de la Flor, F. D., Alvarado, G., & Crossa, J. (2010). Classifying vegetable genetic resources-A case study with domesticated Capsicum spp. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 186–191.
- Osuga, K., Masuda, H., & Komamine, A. (1999). Synchronization of somatic embryogenesis at high frequency using carrot suspension cultures : model systems and application in plant development. *Methods in Cell Science*, 21(2–3), 129–140.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Dolores, R., ... Zeidler, J. A. (2007). All use subject to JSTOR Terms and Conditions Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers ( Capsicum spp . L ) in the Americas. *Science*, 315(5814), 986–988.
- Phillips, G. C., & Hubstenberger, J. F. (1985). Organogenesis in pepper tissue cultures. Plant cell, tissue and organ culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4(3), 261–269.
- Pierik, R. L. . (1997). *In vitro culture of higher plants*. Springer Science & Business Media.
- Pua, E. C., & Davey, M. R. (Ed.). (2007). *Transgenic Crops IV. Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Vol. 59). Springer Science & Business Media.
- Ramírez-Malagón, R., & Ochoa-Alejo, N. (1996). An Improved and Reliable Chille Pepper (Capsicum annum L.) Plant Regeneration Method. *Plant Cell Reports*, 16, 226–231.
- Ramos-Rodriguez, T. M. (2006). *Regeneracion de melon (Cucumis melo L.) bajo condiciones in vitro como modelo biologico. Tesis de Licenciatura (Biología)*. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Rao, N. S., Shivashankara, K. S., & Laxman, R. H. (2016). *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*. Springer.
- Rea, P. A., Kim, Y., Sarafian, V., Poole, R. J., Davies, J. M., & Sanders, D. (1992). Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(9), 348–353.
- Sahoo, H. (2012). Fluorescent labeling techniques in biomolecules: a flashback. *RSC Advances*, 2(18), 7017–7029.
- Sample, V., Newman, R. H., & Zhang, J. (2009). The structure and function of fluorescent proteins. *Chem. Soc. Rev.*, 38(10), 2852–2864.
- Sanford, J. (1988). The biolistic process. *Trends in Biotechnology*, 6(12), 299–302.
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Barahona-Pérez, F., Montalvo-Peniche, M. D. C., Zapata-Castillo, P. Y., Solís-Ruiz, A., ... Miranda-Ham, M. D. L. (2005). Regeneration of habanero pepper (Capsicum chinense Jacq.) via organogenesis. *HortScience*, 40(6), 1829–1831.
- Schulze, S., Mant, A., Kossmann, J., & Lloyd, J. R. (2004). Identification of an Arabidopsis inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplasts. *FEBS Letters*, 565(1), 101–105.
- Serino, G., & Gusmaroli, G. (2011). Arabidopsis thaliana as an Experimental Organism. *eLS*, 1–10.
- Shin, R., Han, J. H., Lee, G. J., & Peak, K. H. (2002). The potential use of a viral coat protein gene as a transgene

- screening marker and multiple virus resistance of pepper plants coexpressing coat proteins of cucumber mosaic virus and tomato mosaic virus. *Transgenic Research*, 11(2), 215–219.
- Shin, R., Park, J. M., An, J. M., & Paek, K. H. (2002). Ectopic expression of Tsi1 in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(10), 983–989.
- Smith, R. H. (2001). Plant Cell Culture. In: *eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester*.
- Solís-Ramos, L. Y., González-Estrada, T., Nahuath-Dzib, S., Zapata-Rodríguez, L. C., & Castano, E. (2009). Overexpression of WUSCHEL in *C. chinense* causes ectopic morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 96(279–287).
- Solís-Ramos, L. Y., Nahuath-Dzib, S., Andrade-Torres, A., Barredo-Pool, F., González-Estrada, T., & Serna, E. C. (2010). Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis in *Capsicum chinense*. *Biologia*, 65(3), 504–511.
- Southgate, E. M., Davey, M. R., Power, J. B., & Marchant, R. (1995). Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnology Advances*, 13(4), 631–651.
- Steinitz, B., Küsek, M., Tabib, Y., Paran, I., & Zelcer, A. (2003). Pepper (*capsicum annum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39(3), 296–303.
- Subramanyam, K., Rajesh, M., Jaganath, B., Vasuki, A., Thebora, J., Elayaraja, D., ... Ganapathi, A. (2013). Assessment of factors influencing the Agrobacterium-mediated in planta seed transformation of brinjal (*Solanum melongena* L.). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2), 450–468.
- Tan, S., Evans, R., & Singh, B. (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*, 30(2), 195–204.
- Thorpe, T. A. (Ed.). (2012). *In vitro embryogenesis in plants. Springer Science & Business Media*. (Vol. 20).
- Valadez-Bustos, M. G., Aguado-Santacruz, G. A., Carrillo-Castañeda, G., Aguilar-Rincón, V. H., Espitia-Rangel, E., Montes-Hernández, S., & Robledo-Paz, A. (2009). In vitro propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper (*Capsicum* spp.) plants from commercially important genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(6), 650–658.
- Valera-Montero, L. L., & Ochoa-Alejo, N. (1992). A novel approach for chili pepper (*Capsicum annum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. *Plant Science*, 84(2), 215–219.
- Venkataiah, P., Christopher, T., & Subhash, K. (2003). Thidiazuron-induced adventitious shoot bud formation and plant regeneration in *Capsicum annum* L. *JOURNAL OF PLANT BIOTECHNOLOGY-DAEJEON*, 5(4), 245–250.
- Zapata-Castillo, P. Y., Flick, A. C., López-Puc, G., Solís-Ruiz, A., Barahona-Pérez, F., Santana-Buzzy, N., & Iglesias-Andreu, L. (2007). Somatic embryogenesis in Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspensions. *HortScience*, 42(2), 329–333.
- Zhu, Y. X., Ou-Yang, W. J., Zhang, Y. F., & Chen, Z. L. (1996). Transgenic sweet pepper plants from Agrobacterium mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 16(1–2), 71–75.

FAOSTAT 2013: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>

<http://www.cientificasenna.com/index.php?modulo=catalogo&accion=articulo&id=>