

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**



***Callogénesis in vitro de Capsicum annum var. glabriusculum***

Por:

**ARACELI RIVERA MARTÍNEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERIA

Callogénesis in vitro de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*

**ARACELI RIVERA MARTÍNEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por el comité de Asesoría:



Dr. Miguel Angel Pérez Rodríguez  
Director principal



Dra. Lihua Wei  
Director externo



Dr. Robledo Torres Valentín  
Co-Asesor



Dra. Iveth Dalila Antonio Carmona  
Co-Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Noviembre 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERIA

Callogénesis in vitro de *Capsicum annum* var. *glabriusculum*

Por:

**ARACELI RIVERA MARTÍNEZ**

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por:



---

Dr. Pedro Pérez Rodríguez  
Presidente



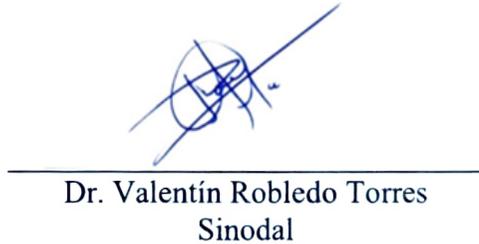
---

Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez  
Secretario



---

Dra. Iveth Dalila Antonio Carmona  
Sinodal



---

Dr. Valentín Robledo Torres  
Sinodal



---

M.C. Sergio Sánchez Martínez  
Coordinador de la división de ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Noviembre 2023

## **Derechos de autor y declaración de no plagio**

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



---

Araceli Rivera Martínez

Autor principal

## AGRADECIMIENTOS

**A mi asesor. Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez,** cuya orientación experta y dedicación fueron fundamentales para el desarrollo y finalización exitosa de este proyecto. Agradezco profundamente los momentos compartidos en el laboratorio como fuera de él, pero, sobre todo, por su amistad, consejos, por brindarme la paciencia y confianza necesaria para alcanzar mis metas. Estas experiencias y conocimientos perdurarán indelebles en mi memoria a medida que avance en mi carrera profesional y personal. Gracias infinitas, Dr.

**A la Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes.** Por tu dedicación excepcional, orientación, y apoyo constante a lo largo de este emocionante trayecto de investigación. Agradezco cada valioso consejo y comentario, a sobrellevar los momentos de estrés, por recordarme que cometer errores es parte del aprendizaje y que no hay nada negativo en ello. Tu aliento ha sido fundamental para mantener mi enfoque en una perspectiva positiva. Tu amistad significa mucho para mí y te agradezco enormemente por ello.

**A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.** Por el financiamiento para la realización del presente trabajo a través del proyecto Institucional de Investigación No. 2167, denominado “Micropropagación del chile piquín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum/aviculare*”. Mi querida Alma Mater, como mi hogar lejos de casa, merece mi profundo reconocimiento. Su inquebrantable respaldo ha sido esencial para llevar a cabo con éxito esta significativa fase de mi vida. Las oportunidades que me ha brindado son verdaderamente inigualables. Con gratitud eterna, ¡Buitres por siempre!

**A mis compañeros de laboratorio.** Sofia, Isabel, Diego, Ulises, Francisco, Valeriano, Saúl. Su contribución ha sido invaluable, estoy agradecida por su amistad y la oportunidad de haber compartido este viaje de investigación con cada uno de ustedes.

## DEDICATORIAS

**A Dios.** Por iluminarme, guiarme y cuidarme cada día. Tu amor es incomparable, gracias por nunca abandonarme.

**A mis padres, Araceli Martínez Hernández y Agustín Rivera Martínez.** El amor, apoyo inquebrantable y aliento que me han brindado son elementos esenciales que me han servido a superar desafíos a lo largo de mi vida. Gracias, papás, por ser mis mayores defensores, por animarme a creer en mí misma, por mostrarme el valor del esfuerzo y dedicación. Agradezco el apoyo de tenderme sus manos amorosas por cada ocasión que tropecé y caí en este camino de la vida, me recordaron que siempre hay esperanza y que cada día es una oportunidad para levantarme con más fuerza y resiliencia. Los amo.

**A mis hermanos, José Agustín y Ángel de Jesús.** Alegran siempre mi vida, me cuidan y consienten con cariño. Valoro profundamente todos los consejos que me han brindado. Me siento tan feliz porque celebren mis logros, y este es tan suyo como mío. Siempre han confiado en mí incluso más de lo que yo misma hice. José, gracias infinitamente por tu apoyo incondicional en estos meses. “Somos hermanitos”, los amo.

**A mis abuelos, Juana Hernández Cerecedo y Dionicio Martínez Catarina.** La fuente inagotable de su sabiduría ha dejado una huella profunda en mi trayecto de vida. Sus historias compartidas, han iluminado mi comprensión del mundo. Su amor es un regalo que atesoro cada día, los amo inmensamente.

**A mis dos ángeles, Leonila Martínez Reyes y Martín Rivera Cruz.** Les dedico este logro con profundo amor y gratitud, recordando con cariño los momentos llenos de alegría que compartimos. Su presencia sigue viva en mi memoria y corazón. Los amo.

**A mis amigas. Anel Hernández Lara, Silvana García Solís y Alma Zeferino.** Las amo demasiado, gracias por existir y compartir momentos especiales de nuestras vidas.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	2
DEDICATORIAS .....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
1 RESUMEN .....	10
2 INTRODUCCIÓN.....	11
3 JUSTIFICACIÓN .....	13
3.1 Objetivo General .....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4 REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
4.1 Antecedentes .....	14
4.1.1 Nombres comunes y sinonimia.....	14
4.1.2 Clasificación taxonómica.....	15
4.1.3 Descripción morfológica .....	16
4.1.4 Distribución geográfica.....	17
4.1.5 Importancia económica.....	18
4.1.6 Importancia ecológica.....	20
4.1.7 Problemática en la conservación del chile piquín.....	21
4.2 Cultivo de tejidos vegetales.....	22
4.2.1 Ventajas que ofrece el cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	27
4.2.2 Medios de cultivo.....	27
4.2.3 Componentes de un medio de cultivo.....	28
4.3 Condiciones de cultivo .....	31
4.3.1 pH del medio de cultivo.....	32
4.3.2 Fotoperiodo .....	32
4.4 Reguladores del crecimiento .....	33
4.4.1 Auxinas .....	34

4.4.2	Citoquininas .....	36
4.5	Callos en plantas.....	38
4.5.1	Relación auxina-citoquinina y la inducción de callos.....	40
4.5.2	Inducción de callos en el género Capsicum .....	41
4.5.3	Inducción de callos en chile piquín.....	41
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
5.1	Semillas de chile piquín .....	42
5.2	Desinfección de semillas.....	42
5.3	Germinación.....	43
5.4	Obtención de explantes e inducción de callos.....	43
5.5	Variables evaluadas.....	44
5.5.1	Días a formación de callos .....	44
5.5.2	Porcentaje de explantes que formaron callos a los 20 días.....	44
5.5.3	Porcentaje de explantes con oxidación a los 20 días .....	45
5.5.4	Porcentaje de explantes que presentan raíces .....	45
5.6	Análisis de varianza .....	45
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
6.1	Germinación de semillas .....	47
6.2	Días a formación de callos .....	49
6.3	Porcentaje de explantes con callos a los 20 días .....	52
6.4	Porcentaje de explantes que presentaron oxidación a los 20 días .....	54
6.5	Porcentaje de explantes que presentaron raíces a los 20 días .....	57
7	CONCLUSIONES.....	62
8	LITERATURA CITADA.....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> .....	15
<b>Tabla 2.</b> Evolución de las técnicas del cultivo de células vegetales.....	23
<b>Tabla 3.</b> Concentración de reguladores de crecimiento .....	44
<b>Tabla 4.</b> Medias y análisis de varianza de dos vías. ....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> .....	17
Figura 2. Mapa de América con los sitios de origen y domesticación del género <i>Capsicum</i> .....	19
Figura 3. Estructura química del ácido indol acético (AIA) y ácido naftaleno acético .....	35
Figura 4. Estructura química de la quinetina y 6-bencilaminopurina .....	36
Figura 5. Clasificación de callos respecto a sus características macroscópicas .....	39
Figura 6. Siembra de semillas de chile piquín para germinación <i>in vitro</i> .....	48
Figura 7. Semillas y plántula de chile piquín .....	48
Figura 8. Explantes iniciales establecidos en tratamiento .....	49
Figura 9. Callos y raíces derivados de hipocótilos y cotiledones .....	50
Figura 10. Comparación del inicio de raíces (en días) de los distintos tratamientos por tipo de explante .....	56
Figura 11. Presencia de raíces en hipocótilos .....	60
Figura 12. Comparación del inicio de oxidación (en días) de los distintos tratamientos por tipo de explante .....	61

## 1 RESUMEN

En la región norte de México, el chile piquín silvestre (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) es altamente solicitado en el mercado debido a su sabor excepcional, capacidad de no causar una irritación significativa en el tracto intestinal al ser consumido. Sin embargo, su utilización en cultivos intensivos se ve limitada por los desafíos en su proceso de germinación. Esta dificultad, combinada con el método de recolección silvestre que implica arrancar la planta completa para obtener los frutos, ha resultado en la disminución de las poblaciones naturales, una recuperación insuficiente de las mismas y, en última instancia, la posibilidad de extinción (Araiza Lizarde et al., 2011).

En este estudio, se investigó el impacto de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, como la bencilaminopurina (BAP), el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido indolacético (IAA), en el proceso de callogénesis del chile piquín tanto en hipocótilos y cotiledones obtenidos de plántulas de *Capsicum annum* var. *glabriusculum*. Los mayores porcentajes de explantes con oxidación se presentaron en hipocótilos del T6 y cotiledones de T7. El resultado obtenido en el tratamiento T6 mostró el porcentaje más elevado de explantes (hipocótilos) con desarrollo de raíces. Los mayores porcentajes de presencia de callos comparados con los demás tratamientos resultaron los T4 y T5, mismos que incluyen a los tres reguladores de crecimiento. Los hallazgos sugieren la existencia de una potencial interacción entre el tipo de tejido vegetal empleado como explante y los reguladores utilizados.

**Palabras clave:** chile piquín, *in vitro*, callo, micropropagación, cultivo de tejidos vegetales, BAP, AIA, NAA.

## 2 INTRODUCCIÓN

México cuenta con una ubicación geográfica sorprendente, esto ha sido uno de los factores por los cuales existen diversas especies de frutos con un fuerte impacto económico, entre ellas está el chile piquín (Pickersgill, 1997).

El chile piquín ((*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) Heiser & Pickersgill), se considera un importante fruto silvestre con un gran uso antropogénico (Cruces Carvajal, 2006). Cuenta con una amplia distribución en México y alta demanda en diversos países, es decir, comprende también parte del territorio sur de EE.UA, Centro y Sudamérica (Ramírez Novoa et al., 2018).

Tiene gran reconocimiento por su enorme diversidad respecto a los caracteres agronómicos y atributos que aporta el fruto por su calidad en el ámbito de la industria para poder satisfacer las demandas de consumo (Medina Martínez et al., 2010), esto se debe a su forma, tamaño y sabor. Así también, en la mayoría de los casos este suele ser aprovechado en su presentación fresca y seca. Es un producto con un gran uso en nuestro país, dicho de otra manera, conforma la dieta diaria de gran parte de la población (Ramírez Ojeda, 2017).

Es uno de los ancestros silvestres más cercanos a las plantas cultivadas (*Capsicum annuum*) debido a que son un gran recurso genético importante que implica un conjunto de genes primarios. La relevancia de estos está en que pueden coadyuvar a la resolución de problemas del ámbito agrícola, entre ellos tolerancia o resistencia a plagas, así como enfermedades, adicionalmente aumentar calidad y cantidad respecto a la producción (Hernández Verdugo et al., 1998).

Distintos explantes han sido empleados para la regeneración de plantas y así lograr inducir la embriogénesis somática (Izquierdo Oviedo et al., 2017).

El cultivo de callos juega un gran papel en la actualidad ya que este puede ser empleado en diversos propósitos, entre ellos destacan la micropropagación y el mejoramiento vegetal. Para poder llevar a cabo la producción de callos se requiere de un explante inicial, ya sea que tengan una alta diferenciación de sus tejidos, como un trozo de la raíz, tallo u hoja, o el empleo de tejidos menos diferenciados, los hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas, por mencionar algunos (Rodríguez Beraud et al., 2014).

La inducción de callos depende de factores que causan efectos diversos a lo largo del proceso, entre ellos destacan los explantes a usar, medio de cultivo, las diferentes concentraciones de hormonas de crecimiento ya sea solas y/o combinadas, humedad, entre otros (Rashmi & Trivedi, 2014).

Son muy escasos los protocolos de regeneración de *C. annuum*, principalmente por embriogénesis somática, hasta la fecha. Esto se debe a varios conflictos, uno de ellos es la baja germinación y eficiencia de los sistemas de regeneración (Marín Collí, 2012).

### 3 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de esta investigación comprende el uso de diferentes tratamientos los cuales están formulados de algunos reguladores de crecimiento a diversas concentraciones, de esta manera establecer un protocolo para la inducción de callos mediante el uso de explantes (hipocótilos y cotiledones) de plantas de chile piquín recién germinadas en cultivo *in vitro*.

Debido a la importancia que radica en esta especie ya que es base económica de familias, alimento para algunas aves y un recurso genético al ser considerado un ancestro de las variedades de chile, por mencionar algunas, es sustancial generar información que aporte conocimiento de esta especie y ayudar a nuevas investigaciones e incluso una producción de este recurso.

#### 3.1 Objetivo General

- Crear un protocolo que permita la inducción de callogénesis de chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar el explante más viable para la inducción de callos de chile piquín.
- Determinar el mejor tratamiento (formulado con reguladores de crecimiento) para la obtención de callos.
- Identificar la combinación idónea de promotores del crecimiento vegetal para la inducción de callogénesis.

## 4 REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Antecedentes

El género *Capsicum*, pertenece a la familia Solanaceae, está conformado por 27 especies (Valenzuela Apodaca, 2019). Este género es de suma importancia en el territorio mexicano (Vásquez Dávila et al., 2018), los frutos de esta planta destacan por ser uno de los saborizantes con gran potencial en la cocina a nivel mundial, además de su utilización con propósitos medicinales (Aguilar Rincón et al., 2010). México es uno de los principales centros origen y domesticación del chile principalmente de la especie *annuum* (Sandoval Rangel, 2011).

El chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) es una especie silvestre, con una distribución extensa, se encuentra en diversas regiones del territorio mexicano (CONAFOR, 2010) abarcando también el suroeste de los Estados Unidos, Centroamérica y noroeste de Sudamérica (López Valdez, 2018).

El nombre de este arbusto es de origen náhuatl, significando “pulga” (Ramírez Ojeda, 2017), se caracteriza por ser perenne, ramificado y de tallos delgados, regularmente trepa por otros arbustos, producen y acumulan compuestos capsaicinoides que aportan este sabor picante característico a el fruto (Hayano-Kanashiro et al., 2016).

#### 4.1.1 Nombres comunes y sinonimia

El chile piquín ha presentado dificultades respecto a su nombramiento taxonómico, en la actualidad los términos *glabriusculum* y *aviculare* se emplean casi indistintamente, como sinónimos, encontrando literatura en igual proporción (Martínez Torres, 2007). De igual manera

existen algunos otros nombres con los cuales podemos identificar: *Capsicum annuum* var. *aviculare*, *Capsicum annuum* var. *minimum*, *Capsicum hispidum* var. *glabriusculum*, *Capsicum microphyllum*.

El nombre de “chile piquín” es propio de algunas regiones del país. Además de los ya mencionados existen otros nombres (Gutiérrez Hernández, 2011), algunos de ellos son: chiltepín del monte, quipín, chiltecpín, chiltepiquín, chilpaya, tilchile, chile de pájaro, pico de pájaro, diente de tlacuache, mosquito, silvestre, pulga, amash, timpinchile, enano, tichusni, chiltepe, entre otros (Guillen Castillo, 2017).

#### 4.1.2 Clasificación taxonómica

*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, mayormente conocido como chile piquín, presenta la siguiente clasificación taxonómica (tabla 2):

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
Subreino	Traqueobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	Capsicum
Especie	Annuum

Fuente: (Gutiérrez Hernández, 2011.)

#### **4.1.3 Descripción morfológica**

El chile piquín es una planta herbácea, trepadora o arbustiva, anual o perenne (Ramírez Novoa et al., 2018). A menudo se presentan como arbustos pequeños, generalmente miden de 0.5 m a 2 m de altura e inclusive pueden llegar hasta los 4 m con un solo tallo y muchas ramas (Martínez Torres, 2007; Nee, 1986).

Además, se caracteriza notablemente por las protuberancias o surcos que recorren los tallos verdes de estas plantas, presentan pelos curvados que miden 0.4 mm de longitud. Sus hojas pueden ser solitarias o en pares, y tienen una forma lanceolada u ovalada, con dimensiones que varían entre 2-8 cm de largo y entre 1-3 cm de ancho, presentando una pubescencia dispersa, el ápice de las hojas es puntiagudo, mientras que la base es cuneada y acuminada en el peciolo, el cual tiene una longitud de 5-20 mm de largo (Nee, 1986).

Las flores son solitarias, con un cáliz de 1.5 a 2 mm de largo, corola blanca, de 6 a 9 mm de diámetro (CONAFOR, 2010). Pedicelo erecto, curvado en el ápice y nutante en floración, rígido-erecto en el fruto, de 1-2 cm de largo, 0.5 mm de diámetro, dilatado en el ápice, esparcidamente pubescente, la floración en condiciones naturales ocurre del mes de julio a septiembre (CONAFOR, 2010; Nee, 1986).

El fruto se caracteriza por ser una baya de color verde o purpura oscura a negra cuando están inmaduros, que torna a rojo-anaranjado al madurar; de una forma globosa, ovoide o elipsoidal, de 8 a 10 mm de largo y 5 a 8 mm de ancho. Sus semillas de color pardo amarillentas, comprimidas, de 2.5 mm de largo (figura 1) (CONAFOR, 2010; Nee, 1986; Ramírez Ojeda, 2017).



**Figura 1.** *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. a, rama con hojas, flores y frutos; b, hojas; c, flor; d, corola abierta mostrando los estambres; e, pistilo sobre el pedicelo; f, anteras; g, fruto; h, corte transversal del fruto; i, semilla (Nee, 1986).

#### 4.1.4 Distribución geográfica

La zona comprendida entre Argentina, Bolivia y Brasil es considerada como el área de origen del género *Capsicum* (McLeod et al., 1982), mientras que el resto de Norteamérica, Centroamérica, Antillas y Sudamérica son cuna de diversidad para este género (figura 2).

*Capsicum annuum* var. *glabriusculum* es de una amplia distribución geográfica, englobando gran parte del sur de los Estados Unidos, la República Mexicana, Centroamérica, Antillas inclusive en algunas regiones de la parte norte de Sudamérica (Márquez-Quiroz et al., 2013; Nee, 1986). En el territorio mexicano, este recurso se ubica en diversas entidades del país,

en toda la zona costera desde Sonora a Chiapas por el pacífico y de Tamaulipas a la península de Yucatán, incluyendo Quintana Roo, por el Golfo de México (Bañuelos et al., 2008; Puebla Gutiérrez, 2013)

La distribución geográfica se encuentra también relacionada con las aves y el consumo de este fruto, pasando las semillas por su tracto digestivo para posteriormente ser esparcidas en diversas áreas mediante la defecación que en su mayoría es llevada a cabo bajo árboles, siendo un modo para contribuir de igual manera a la germinación (Alcalá Rico, 2019; Lizarde Araiza et al., 2011).

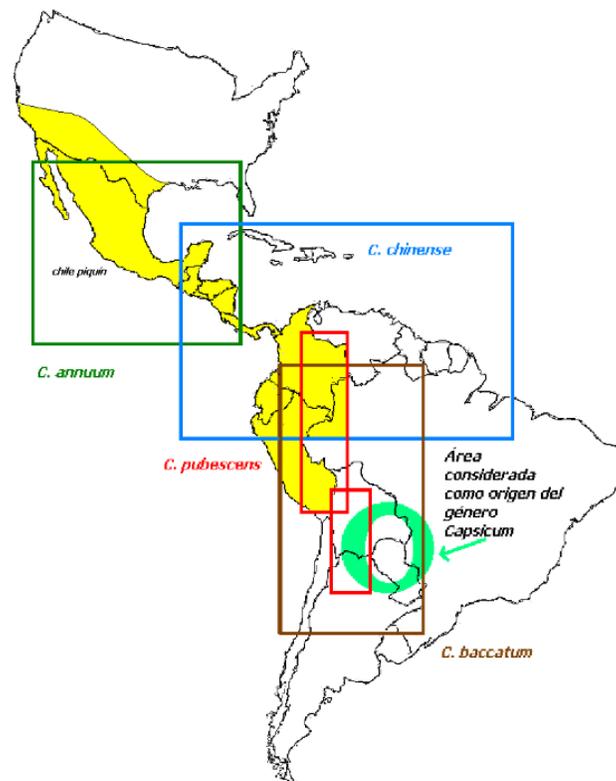
#### ***4.1.5 Importancia económica***

(Gutiérrez Hernández, 2011) debido a diversas características organolépticas el chile se ha posicionado en uno de los condimentos más populares en diferentes partes del mundo (Marín Collí, 2012), estos son económicamente importantes en el área de alimentos o medicinas, cultivados con éxito en muchos países (Martínez Torres, 2007).

La recolección o cosecha del chile piquín es una de las actividades de pequeñas zonas rurales desde hace cientos de años, pero no fue hasta en la década de los ochenta que se convirtió en una actividad económica de relevancia (Bañuelos et al., 2008). Los consumidores tienen preferencia de esta especie silvestre en comparación con la de otros chiles como el serrano y jalapeño a pesar de tener características similares (Paredes-Jácome et al., 2019).

Desde el punto de vista social, se estima que un 15% de la población rural perteneciente al noreste del territorio mexicano está enfocada en la recolección del chile piquín esto durante ciertos periodos de tiempo que van desde los meses de septiembre a diciembre, en el transcurso de este

lapso, el 60% de los ingresos obtenidos por las comunidades es mediante la recolección y venta de este producto mientras que el 40 % restante de los ingresos se da por otras actividades agrícolas (Villalon-Mendoza et al., 2014).



**Figura 2.** Mapa de América con los sitios de origen y domesticación del género Capsicum

Fuente: (Martínez Torres, 2007)

El chile piquín es un cultivo de gran importancia en la parte económica, debido a su amplio uso en la gastronomía, es un ingrediente clave en diversos platillos tradicionales como salsas, adobos, moles, además se utilizan también en dulces, condimentos y especias, lo que hace que este producto sea muy demandado en el mercado local e internacional. En los mercados

estadounidenses principalmente California y Arizona se venden estos productos en presentación madura (secos y rojos) (Alcalá Rico, 2019).

La demanda del mercado tiene un impacto en el costo del producto. La producción y las ventas del chile piquín que se encuentra en su mayoría en el noreste de México están fuertemente influenciadas por las condiciones climáticas, en particular, la cantidad de lluvia y la temperatura que no debe superar los 35°C y no ser inferior a 15°C para permitir procesos fisiológicos normales. Durante el periodo de 1998 a 2006, se registró un precio promedio de \$70 pesos mexicanos por kilogramo de producto verde fresco. En enero de 1990, el precio en el mercado regional fue de \$60 MXN, sin embargo, entre enero de 2005 y junio de 2006 se observó una disminución en la cantidad recolectada debido a la disminución de la lluvia y las altas temperaturas de hasta 42°C (región noreste de México) (Villalon-Mendoza et al., 2014) . Actualmente el fruto del chile piquín puede ser hasta 40 veces superior el valor de los chiles Serranos y Jalapeños (Díaz Sánchez, 2019), contemplando que el precio de estos (frescos) en promedio de acuerdo a datos del (SNIIM, 2023) es de; \$29.91 y \$24.23 MXN el kilogramo respectivamente. La fluctuación del precio del producto está determinada por factores como: ubicación geográfica, temporada de cosecha, calidad y presentación (fresco, seco, polvo) (Mena García, 2004).

#### ***4.1.6 Importancia ecológica***

Aunado a formar parte de la vegetación, en el ecosistema, el chile piquín tiene funciones ecológicas importantes, esto se debe a que sus frutos fungen como fuente de alimento, debido a su color verde o rojo brillante, forma ovalada y tamaño pequeño resulta ser atractivo y consumido

por diversas aves como el huitlacoche, cardenal y cenizote lo que contribuye a la dispersión de sus semillas y a una regeneración de flora local (López Valdez, 2018).

En el ámbito ecológico y ambiental, es relevante destacar que el chile piquín es un recurso genético valioso al ser considerado como el ancestro de todos los tipos y variedades de chiles de la especie *Capsicum annuum*. Por lo tanto, es importante implementar acciones que cumplan con la normatividad existente para su conservación y aprovechamiento en poblaciones silvestres, esto asegurará la persistencia de la especie y otras de flora y fauna que coexisten en su hábitat natural y mantienen la estabilidad del ecosistema a través de sus interacciones (López-Serrano et al., 2017).

#### **4.1.7 Problemática en la conservación del chile piquín**

Actualmente, el chile piquín está experimentando una presión significativa causada por la actividad antropogénica, ya que su extracción se ha realizado de manera inadecuada. Además, existe una presión adicional para eliminar grandes áreas de matorral a través de la práctica de la matarrasa, con el fin de permitir actividades adicionales, como la agricultura y la cría de animales (Lizarde Araiza et al., 2011).

Por lo tanto, se pone en riesgo la conservación *in situ* de este recurso, a pesar de su importancia, los cultivos comerciales de *Capsicum annuum* var. *Glabriusculum* son escasos debido principalmente a la dificultad para germinar las semillas y a la falta de variedades comerciales genéticamente mejoradas (Díaz-Sánchez et al., 2021).

Los chiles silvestres son una importante fuente de recursos genéticos para futuros programas de mejoramiento genético. Sin embargo, paradójicamente, existen incertidumbres acerca de su supervivencia en el tiempo y en diferentes lugares geográficos (Jiménez Leyva, 2013).

Las poblaciones de *Capsicum annum* var. *Glabriusculum* son una importante reserva de germoplasma para preservar la especie y una fuente genética valiosa para los fitomejoradores. La promoción de la conservación *in situ* de estas poblaciones reduce los costos elevados de la conservación *ex situ* en bancos de germoplasma. Además, evita la apropiación de los recursos genéticos locales por grandes empresas transnacionales y permite la evolución natural de la especie (Bran et al., 2007).

## **4.2 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales, también conocido como cultivo celular, *in vitro*, axénico o estéril, consisten en el aislamiento de células, tejidos u órganos vegetales y su cultivo (*in vitro*) aséptico en medios nutritivos y ambientes controlados (Sivanesan & Park, 2014; Thorpe, 2007). El cultivo se beneficia de un ambiente favorable para su desarrollo y propagación cuando se establecen condiciones controladas, estas comprenden el suministro adecuado de nutrientes, un pH medio, temperatura apropiada, un ambiente gaseoso y líquido adecuado (Hussain et al., 2012).

La ciencia del cultivo de tejidos vegetales tiene sus raíces a partir del hallazgo de la célula y la posterior formulación de la teoría celular, en 1838, Schleiden y Schwann propusieron que la célula es la unidad básica de todos los organismos vivos y reconocieron su capacidad de autonomía, por lo tanto, sugirieron que, si se proporciona un ambiente adecuado, cada célula podría regenerarse y desarrollarse en una planta completa (Hussain et al., 2012). Basándose en

esta premisa, Gottlieb Haberlandt propuso la base teórica que fundamenta el cultivo de tejidos vegetales en su discurso ante la Academia Alemana de Ciencias en 1902 sobre sus experimentos en el cultivo de células individuales (Thorpe, 2007). Posteriormente se presentaron algunos de los sucesos más relevantes durante la evolución de las técnicas de cultivo de células vegetales (tabla 3).

**Tabla 2.** Evolución de las técnicas del cultivo de células vegetales

<b>Año</b>	<b>Autor</b>	<b>Suceso</b>
1902	Haberlandt	Propone el concepto de cultivo celular <i>in vitro</i>
1926	Went	Descubrió la primera hormona de crecimiento vegetal: el ácido indol acético
1934	White	Introdujo la vitamina B como suplemento de crecimiento en medios de cultivo de tejidos para la punta de la raíz del tomate
1939	Gautheret, White y Nobecourt	Establecieron la proliferación sin fin de cultivos de callos
1954	Muir	Fue el primero en dividir los tejidos de callo en células individuales
1955	Skoog y Miller	Descubrieron la kinetina como hormona de división celular
1959	Reinert y Steward	Regeneran embriones a partir de callos y suspensiones celulares de zanahoria ( <i>Daucus carota</i> )
1962	Murashige y Skoog	Desarrollan el medio MS con mayor concentración de sal
1964	Guha y Maheshwari	Produjeron las primeras plantas haploides a partir de granos de polen de <i>Datura</i> (cultivo de anteras)
1966	Steward	Demostró la totipotencia regenerando plantas de zanahoria a partir de células individuales de tomate
1970	Power <i>et al.</i>	Logran con éxito la fusión de protoplastos

---

1971	Takebe <i>et al.</i>	Regeneran las primeras plantas a partir de protoplastos
1972	Carlson	Produce el primer híbrido interespecífico de <i>Nicotiana tabacum</i> por fusión de protoplastos
1974	Reinhard	Introduce la biotransformación en cultivos de tejidos vegetales
1977	Chilton <i>et al.</i>	Integraron con éxito el ADN del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en plantas
1983	Pelletier <i>et al.</i>	Realizaron hibridación citoplasmática intergenérica en Rábano y Uva
1984	Horsh <i>et al.</i>	Desarrollaron tabaco transgénico por transformación con <i>Agrobacterium</i>

---

Fuente: (Hussain et al., 2012).

El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos se fundamenta en dos propiedades de las células vegetales, una de ellas es la totipotencialidad celular la cual consiste en la capacidad conservada que poseen todas las células vegetales (independientemente de su función o posición en la planta) de originar una nueva célula genéticamente idéntica y, tras los procesos de división y diferenciación celular, ser capaces de formar tejidos, órganos, sistemas e individuos completos es decir, regenerar una nueva planta completa (Calva Calva & Pérez Vargas, 2005; García-González et al., 2010). La otra propiedad se trata de la plasticidad celular, es la característica que denota una diferencia entre las células vegetales y animales en su capacidad de multiplicación, división, diferenciación y formación de un nuevo individuo (García-González et al., 2010).

Generalmente se dice que el CTV (cultivo de tejidos vegetales) está conformado por cuatro etapas, pero esto limita el empleo de esta técnica a la multiplicación masiva, actualmente se sabe que el CTV es una tecnología de mayor alcance por ello, se considera la micropropagación de plantas mediante cultivo *in vitro*, la cual consta de 5 etapas fundamentales (García-González et al., 2010):

- **Etapa 0. Preparación de la etapa donante:** Selección de la especie de interés.

Para ello se establece que el éxito en la introducción y establecimiento *in vitro* está relacionado a las cualidades fisiológicas y fitosanitarias de la planta madre y que en gran parte estas se ven determinadas por las condiciones ambientales en las que se cultiva. Deben estar libres de cualquier enfermedad, se recomienda que durante esta fase las plantas utilizadas como donantes de explantes sean cultivadas en óptimas condiciones, controlando el riego, nutrición y temperatura.

- **Etapa I. Introducción y establecimiento:** La introducción de tejidos vegetales en un cultivo *in vitro* es llevada a cabo mediante una desinfección superficial esto dependiendo del tipo de explante, algunos de los desinfectantes más utilizados es el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio y etanol. En esta etapa también es importante controlar las emisiones de compuestos fenólicos por los tejidos y su estrés oxidativo, se puede hacer uso de compuestos antioxidantes (carbón activado, ácido cítrico, ácido nicotínico, L-cisteína) adicionándolos al medio de cultivo. Otro aspecto a tratar es la hiperhidricidad, la adición de agentes comerciales (EM2), pectina o extracto de polisacáridos al medio de cultivo pueden evitar la inducción de brotes con estas características.

- **Etapa II. Propagación de plantas:** Se tiene como objetivo incrementar el número de unidades en el sistema de cultivo de tejidos. La elección de las técnicas de propagación es una consideración importante porque éstas dependen de las especies o genotipos. Así mismo, para mejorar las respuestas morfogénicas de cualquier explante cultivado de manera *in vitro*, es indispensable estudiar y establecer el efecto de reguladores del crecimiento vegetal (fitohormonas). La mejora de la respuesta morfogénica puede verse favorecida por la manipulación del explante y su posición en el medio del cultivo.

- **Etapa III. Enraizamiento y preparación de explantes para las condiciones *ex vitro*:** En esta fase se ve en la necesidad de realizar cambios del medio de cultivo (se llegan a presentar excepciones) incluyendo así la modificación nutricional y composición de los reguladores del crecimiento para inducir el enraizamiento y un buen desarrollo del mismo. De igual forma en esta fase, es importante realizar ajustes en la composición del medio y el intercambio de gases en los recipientes de cultivo para preparar las plantas a la fase *ex vitro*. La efectividad del enraizamiento puede depender de diversos factores, como los índices de auxina-citoquininas, el tipo de explante utilizado, el número de veces que se ha subcultivado, el pH del medio de cultivo y la cantidad de sacarosa presente en el medio.

- **Etapa IV. Adaptación *ex vitro* o aclimatación de las plantas:** Es de suma importancia que las plantas cultivadas *in vitro* se aclimaten al ambiente externo fuera del laboratorio. Es fundamental controlar factores como la intensidad lumínica, humedad del sustrato y la temperatura tanto a nivel foliar como radicular, ya que estos pueden influir en la supervivencia de las plantas durante esta etapa. Al inicio de la adaptación, es recomendable mantener una alta humedad relativa constante para facilitar la formación de raíces activas y reducir la pérdida de agua por la transpiración. Sin embargo, a medida que las plantas se van adaptando, se aconseja disminuir la humedad para lograr una mejor aclimatación a las condiciones ambientales del campo. Las características del sustrato también juegan un papel relevante, ya que pueden afectar las características fisiológicas generales de la planta.

El propósito principal de todo el proceso de micropropagación consiste en lograr la obtención de un gran número de plantas de alta calidad que sean capaces de adaptarse a las condiciones ambientales normales (Elías & Padrón, 2020).

#### **4.2.1 Ventajas que ofrece el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales**

El cultivo *in vitro* de explantes vegetales se ha desarrollado gracias a la innovación, la observación y la experimentación, lo que ha permitido la acumulación de conocimientos cada vez más detallados. Esta técnica se ha convertido en una fuente de progreso valioso para la investigación (Aguirre Villaroel et al., 2010). Ofrece distintas ventajas a comparación de otros métodos tradicionales de propagación de plantas, por mencionar algunas:

- Da oportunidad a multiplicar una variedad que cuenta con poca cantidad de tejido vegetal en un corto periodo de tiempo, iniciando de pequeños explantes (Aguirre Villaroel et al., 2010).
- Mayor manejo y supervisión respecto a la sanidad del material vegetal que se está propagando, obteniendo plantas libres de un contaminante en específico (Aguirre Villaroel et al., 2010; George et al., 2007).
- Posibilidad de conservar germoplasma a mediano y largo plazo (Aguirre Villaroel et al., 2010).
- Permite la producción masiva de plantas homogéneas en una superficie, tiempo, costes reducidos y la producción podría realizarse durante todo el año independientemente de los cambios estacionales (Aguirre Villaroel et al., 2010; George et al., 2007).

#### **4.2.2 Medios de cultivo**

(Suárez Padrón, 2020) Previamente se describió que los medios de cultivo se caracterizan por ser un conjunto de componentes y que estos a su vez se irán adecuando proporcionalmente a

las necesidades del tejido a trabajar ya sea callo, hojas tallos, etc., (Suárez Padrón, 2020), y al proceso morfogénético como cultivo de meristemas, organogénesis, embriogénesis somática, etc. Es decir, los componentes y la concentración de estos está ligada al objetivo perseguido (Aguirre Villaroel et al., 2010).

En el transcurso de varios años hasta la actualidad, el medio Murashige y Skoog (MS) y su idoneidad apta para el desarrollo de diversas especies hace que se considere como el más empleado en regeneración de plantas (Aguirre Villaroel et al., 2010). No obstante, podemos destacar también a los medios Linsmaier Skoog (LS), Gamborg (B5) y Nitsch y Nitsch (NN) (I.M. & M., 2012), obteniéndolos en distintas versiones comerciales (polvo) o mezclando soluciones madre de distintos ingredientes químicos (Kumar & Loh, 2011).

#### ***4.2.3 Componentes de un medio de cultivo***

Los medios de cultivo pueden ser líquidos o tener un soporte semisólido (Aguirre Villaroel et al., 2010). Estos se componen de sales minerales que aportan elementos esenciales macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo y Co), vitaminas, aminoácidos o suplementos de nitrógeno, fuente (s) de carbono, reguladores del crecimiento, agentes solidificantes y agua (CITEagroindustrial, 2020; I.M. & M., 2012).

**Agua.** Constituye gran parte de la composición del medio pues es el solvente de los solutos que componen al medio. De alto grado de pureza es la que se requiere, para ello se aplican ciertos mecanismos tale como la destilación, la deionización y la osmosis inversa (Suárez Padrón, 2020)

**Elementos inorgánicos minerales.** El medio de cultivo empleado tiene una gran relación significativa con la eficacia del cultivo de tejidos vegetales. Las plantas necesitan absorber del

suelo ciertos nutrientes para tener un buen crecimiento: iones de nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S), mejor conocidos como macronutrientes los cuales, intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas (Aguirre Villaroel et al., 2010; George et al., 2007). De acuerdo con (I.M. & M., 2012), para obtener un crecimiento satisfactorio de las células vegetales los medios de cultivo deben al menos contener 25-60 mM de nitrógeno inorgánico.

Además de estos, están los nutrientes vegetales menores: hierro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo) (George et al. et al., 2007), estos micronutrientes actúan como cofactores enzimáticos y algunos de ellos en sistemas de transporte de electrones (Zapata Castillo, 2005).

**Compuestos orgánicos.** Con pequeñas cantidades pueden ayudar a mejorar el crecimiento y morfogénesis de los cultivos de tejidos vegetales, tratándose principalmente de las vitaminas, aminoácidos y algunos suplementos, realmente la cantidad de estos compuestos varían respecto a la especie y capacidad sintética de la especie.

Las vitaminas mayormente empleadas en los medios de cultivo de células y tejidos incluyen: tiamina (B1), ácido nicotínico (B3) y piridoxina, dentro de este grupo se puede considerar también al myo-inositol, aunque este se ha clasificado como vitamina vegetal, diversos autores consideran que debería categorizarse como un hidrato de carbono suplementario a pesar de no contribuir como fuente de energía.

La mezcla de aminoácidos como el hidrolizado de caseína, L-glutamina, L-asparagina y adenina son utilizados frecuentemente como fuentes de nitrógeno orgánico en los medios de cultivo (George et al., 2007; I.M. & M., 2012).

**Carbohidratos o fuentes energéticas.** Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* cuentan con una baja o nula capacidad fotosintética, es por ello que se les provee de una fuente de carbono y así realizar ciertas capacidades metabólicas (Zapata Castillo, 2005). Una de las fuentes más empleadas en los medios de cultivo de tejidos vegetales es la sacarosa bajo una concentración correspondiente al 2-5%, además de esta se encuentra la lactosa, galactosa, maltosa y el almidón, sin embargo, se catalogan de bajo rendimiento en comparación con la sacarosa o glucosa. En reiteradas ocasiones de manera sistemática se ha demostrado que la sacarosa esterilizada en autoclave tiene mejor eficacia para el crecimiento que la sacarosa esterilizada por filtro, esto debido a que la sacarosa se hidroliza en fructosa durante la esterilización en autoclave. De acuerdo a un estudio, se informó que la sacarosa actúa como un desencadenante morfogénico para el desarrollo de yemas axilares y ramificación de raíces adventicias (I.M. & M., 2012).

**Mecanismo de soporte.** Cuando se trabaja con medios semisólidos, se debe añadir un gelificante para obtener la consistencia adecuada, esa firmeza incide en el crecimiento de los tejidos cultivados, los más utilizados son el agar (0.5-1%), agarosa y algunas marcas comerciales como Phytigel o Gelrite en concentraciones de 0.2 a 0.3 % (I.M. & M., 2012; Zapata Castillo, 2005).

El polisacárido obtenido mediante algas marinas rojas conocido como agar, es utilizado de manera universal como agente gelificante para preparar medios de cultivo de tejidos vegetales semisólidos. Tiene ventajas sobre otros agentes gelificantes; se mezcla con agua, puede fundirse fácilmente a temperaturas de 60-100°C y se solidifica a unos 45°C aproximadamente (I.M. & M., 2012). Es importante considerar las concentraciones a utilizar de agar ya que pueden llegar a ser inadecuadas al no soportar a los explantes o provocar hiperhidricidad, a medida que se incrementa

la concentración de agar, disminuye el exceso de hidratación, sin embargo, se puede presentar una reducción concomitante con la tasa de crecimiento (George et al., 2008).

La agarosa, un agente gelificante formado por cadenas poliméricas de  $\beta$ -D (1 $\rightarrow$ 3) galactopiranososa y 3,6-anhidro- $\alpha$ -L (1 $\rightarrow$ 4) galactopiranos. En términos económicos, la agarosa es de mayor precio que el agar por lo cual en la mayoría de las ocasiones solo se usa para ciertos cultivos como el de protoplastos y anteras, la concentración empleada es de 0.4-1.0% y se funden a una temperatura de 30°C (George et al., 2008).

Goma Gellan, es un polisacárido secretado por el microorganismo *Sphingomonas elodea* anteriormente conocido como *Pseudomonas elodea* (Sworn, 2009), destaca por sus características funcionales: gran dureza y transparencia, baja permeabilidad al vapor de agua y superficies lisas (Alvarado-González et al., 2012).

Dentro de las marcas comerciales, encontramos a Kelcogel, Gelrite, Gel-Gro y Phytigel (ICF, 2006), este último gelificante cuenta con una característica en particular, tiene un menor porcentaje de impurezas, textura fina y calidad consistente mayor a la de otros agares y su apariencia cristalina proporciona una facilidad de detección de agentes contaminantes (Aguirre Villaroel et al., 2010).

### **4.3 Condiciones de cultivo**

Es recomendable que los cultivos vegetales se coloquen en ambientes controlados para asegurar condiciones ideales, especialmente en lo que respecta a la luz, temperatura. Estas condiciones están específicamente diseñadas para fomentar un crecimiento y desarrollo óptimo de

las plantas, tanto la temperatura de incubación como la calidad, intensidad, duración de la luz, pH del medio pueden afectar las respuestas morfogénicas de las plantas (Roca & Mroginski, 1991).

#### **4.3.1 pH del medio de cultivo**

El pH es un factor determinante en el crecimiento y desarrollo de los explantes (Aguirre Villaroel et al., 2010), esto a la relación con el medio y la solubilidad de sales, asimilación de los reguladores de crecimiento y dureza del mismo. Tanto la medición como ajuste de pH debe efectuarse previamente a la esterilización del medio, se regula adicionando HCL o KOH ya sea para disminuir o aumentar su valor, respectivamente (Suárez Padrón, 2020), el pH óptimo se ajusta a un valor de 5.8 (Kumar & Loh, 2011).

Posterior a la esterilización del medio, el pH suele disminuir entre 0.3-0.5 unidades y sigue presentando cambios en el lapso de incubación del cultivo como consecuencia de la oxidación, absorción y secreción diferencial de sustancias por parte del tejido cultivado. Si el pH disminuye a un valor igual o menor que 5.0 no permitirá la gelificación del agar y el medio será líquido, por el contrario, si el valor es mayor a 6.0 da paso a un medio con consistencia dura, lo cual provoca interferencia con la absorción de nutrientes (Bhatia, 2015).

#### **4.3.2 Fotoperiodo**

Debido a que el cultivo *in vitro* es un sistema cerrado, hay factores externos que impactan en el desarrollo de cultivo de tejidos vegetales, la luz es un ejemplo de estos factores, ya que actúa como una señal que los fotorreceptores utilizan para regular el crecimiento, desarrollo,

diferenciación y metabolismo de las plantas. La respuesta a la luz está influenciada por mecanismos moleculares que involucran factores de transcripción, fitocromos y fotoreceptores.

La intensidad como la calidad espectral de la luz afectan el crecimiento de los callos en el cultivo *in vitro*. En este sentido las fuentes de luz LED son recomendadas para regular el ambiente lumínico en el cultivo de plantas en entornos controlados. Esto se debe a que ofrecen una integración espectral óptima, lo que contribuye a un mejor control de las respuestas de las plantas a la luz (Ruíz-Rivas et al., 2022). Generalmente se emplea un ciclo de 16 horas luz seguidas de 8 horas de oscuridad (Roca & Mroginski, 1991), este fotoperiodo ha sido utilizado en la germinación *in vitro* como el repollo. Además, la inducción de callos *in vitro* se llevó a cabo en una cámara bioclimática, manteniendo condiciones de total oscuridad a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 30 % (Neri Cacho, 2022).

#### **4.4 Reguladores del crecimiento**

Para que las plantas puedan llevar un buen crecimiento, desarrollo y reproducción, necesitan de nutrientes, condiciones físicas, sumado a ello sustancias muy activas llamadas (Laguna-Ibarra et al., 2019) hormonas vegetales, fitohormonas o también conocidas como reguladores de crecimiento vegetal (exógenos), que a muy bajas concentraciones influyen en los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales (Zapata Castillo, 2005), algunos de estos son naturales y otros sintéticos (Suárez Padrón, 2020), es decir, algunos son sintetizados por la misma planta (endógenas) y otros a nivel laboratorio (exógenas) (Aguirre Villaroel et al., 2010). (EL Sabagh et al., 2022) las define como “moléculas de señalización celular que actúan como mensajeros químicos en las plantas a bajas concentraciones, y tienen funciones primordiales en la regulación de las respuestas que la planta muestra”, además del crecimiento y desarrollo vegetal

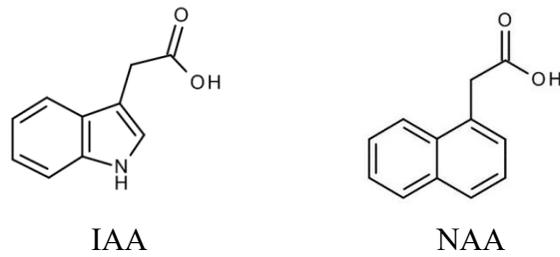
están relacionadas también con regular de manera específica procesos como la producción de metabolitos, inducción de maduración de frutos, disminución de concentración de agentes patógenos, (Alcantara Cortes et al., 2019), distribución de solutos, etc., (Laguna-Ibarra et al., 2019).

En general, los tejidos *in vitro* no suelen producir la cantidad adecuada de hormonas vegetales para poder cubrir sus necesidades metabólicas, es por ello, que se necesita complementar su suministro mediante estas fuentes de manera exógena (Suárez Padrón, 2020).

Existen diversas formas de categorizar los reguladores de crecimiento, tales como, su estructura molecular, actividad a nivel vegetal, efectos inhibitorios o estimulantes (Alcantara Cortes et al., 2019). Actualmente, se han reconocido nueve tipos de fitohormonas, abarcando desde las auxinas, la primera fitohormona descubierta, giberelinas (GA), citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), etileno (ET), salicilatos (SA), brasinoesteroides (BR), jasmonatos (JA), y los estrigolactonas (SL) (EL Sabagh et al., 2022), siendo las 5 primeras las más estudiadas (Mukherjee et al., 2022).

#### **4.4.1 Auxinas**

Este grupo de hormonas han sido detectadas en todas las plantas terrestres (Bhatla, 2018). En los medios de cultivo las auxinas más comunes son: indol-3-ácetico (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftaleno-acético (NAA) (I.M. & M., 2012). Y generalmente son utilizadas en el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales para estimular la producción de callo y crecimiento celular, iniciar brotes y enraizamiento, inducir la embriogénesis somática, propiciar el crecimiento de ápices de brotes y el cultivo de tallos de brotes (Andújar et al., 2019; I.M. & M., 2012).



**Figura 3.** Estructura química del ácido indol acético (AIA) y ácido naftaleno acético.

Fuente: (Merck Millipore, s/f)

Regulan procesos fundamentales tales como el inicio de la división celular, lo que a su vez contribuye a la formación de meristemos que propician tejidos no organizados u órganos definidos (George et al., 2008).

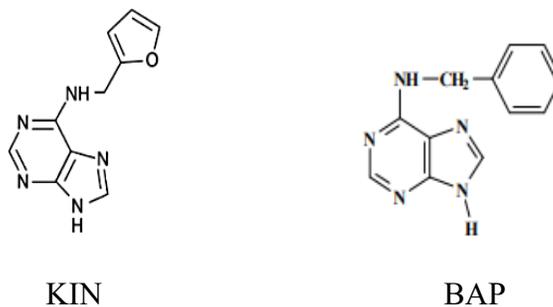
Los tejidos de las plantas tienen la capacidad de sintetizar auxinas, generalmente la mayoría de ellas se producen en las regiones meristemáticas, en órganos más jóvenes y en desarrollo, tales como el ápice de los tallos, hojas jóvenes, órganos florales y puntas de las raíces (George et al., 2008; Ljung et al., 2001).

El Ácido Indol Acético (AIA) es la principal auxina natural (Dilworth et al., 2017), participa prácticamente en todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Srivastava, 2002). Mientras que el Ácido Naftaleno Acético (ANA) es conocido por su uso en la agricultura como productor y regulador de las fases reproductivas (Amado & Fischer, 2006), son más activos y estables que el AIA en la inducción del enraizamiento (Srivastava, 2002) como en la elongación de células, dominancia apical, fotoperíodo y geotropismo (Nafea & Abdulfatah, 2014).

Los cambios en las concentraciones de auxinas pueden interferir en el desarrollo de cultivo de tejidos, en función de otras hormonas presentes en el medio. Por ejemplo, pasar de estimular la formación de raíces a la inducción de callos. Cada sistema de cultivo de tejidos difiere de los demás, según la especie, tipo de explante y condiciones de cultivo por lo que es necesario examinar los efectos de las distintas concentraciones de auxina y otras hormonas para cada caso por separado y sólo hasta cierto punto pueden aplicarse los resultados a otros cultivos (George et al., 2008).

#### 4.4.2 Citoquininas

Las citoquininas estimulan la maduración de cloroplastos, crecimiento de brotes, antagonismo de la senescencia y una influencia significativa en el desarrollo floral (Flórez & D. Aleixo Pereira, 2008). Su gran impacto es especialmente notable en los cultivos de tejidos, se emplean frecuentemente en combinación de las auxinas para estimular la división celular y regular la formación de estructuras morfológicas, cuando se añade a los medios de cultivo, tienen la capacidad de contrarrestar la dominancia apical y promover la activación de yemas laterales que se encontraban en estado de reposo (George et al., 2008).



**Figura 4.** Estructura química de la quinetina y 6-bencilaminopurina.

Fuente: (Basantes Mantilla, 2011; Gray & Trigiano, 2016)

La síntesis principal de citoquininas ocurre en su mayoría en las regiones meristemáticas de las raíces y los órganos aéreos de las plantas (Gordillo Calatrava, 2019). La enzima clave en este proceso es la isopentenil transferasa (IPT) (George et al., 2008).

La bencilaminopurina (BAP), es una de las citoquininas sintéticas, más utilizadas en los trabajos de micropropagación (George et al., 2008). Estimula el desarrollo, la reproducción y el alargamiento celular, favorece la germinación y regula el crecimiento de las raíces y retrasa el envejecimiento de las hojas (Campos et al., 2019). Se ha empleado para compensar carencias hormonales potenciales al influir en el proceso metabólico de las plantas (Villegas Panduro et al., 2021).

La influencia de la luz es un factor determinante en la función de las citoquininas. La proliferación de brotes está altamente condicionada por la cantidad de fotones en luz azul, roja y blanca (George et al., 2008).

Las citoquininas juegan un papel relevante en la eficiencia y manifestación del proceso de “totipotencia celular” en plantas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Son hormonas cruciales para estimular la formación de nuevos brotes en diferentes tipos de explantes, como hojas, raíces, médula y cotiledones (Jordán & Casaretto, 2006).

La ausencia de las citoquininas puede prolongar significativamente la metafase, lo que sugiere que estas hormonas podrían ser necesarias para regular la síntesis de proteínas que intervienen en la formación de uso mitótico. El impacto de las citoquininas en los cultivos de tejidos u órganos puede diferir dependiendo del compuesto específico utilizado, del tipo de cultivo de la variedad de planta de la cual se toman los explantes, y si los tejidos son jóvenes o maduros (George et al., 2008).

Estas hormonas son una herramienta importante para la manipulación de la regeneración y el crecimiento en el cultivo de tejidos vegetales. Es crucial mantener un equilibrio adecuado entre estos dos compuestos, ya que una relación alta de auxina-citoquinina estimula el crecimiento de raíces, mientras que una baja relación auxina-citoquinina favorece la proliferación de tallos (Basantes Mantilla, 2011).

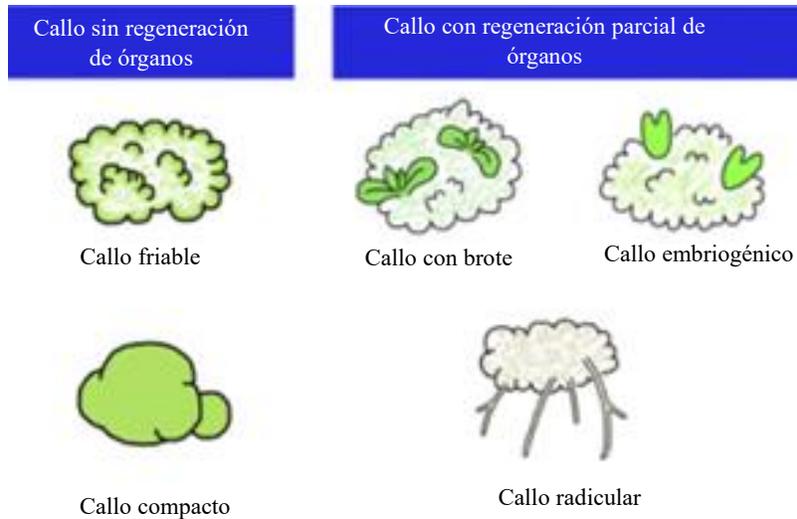
#### **4.5 Callos en plantas**

La raíz etimológica del término “callo” proviene del latín “callum”, que denota algo que es duro (Ikeuchi et al., 2013). El callo es un tejido formado a partir de órganos o tejidos que experimentan una dediferenciación celular y una proliferación celular continua, acelerada y aparentemente desorganizada, resultando en una masa amorfa de células. La inducción del callo ocurre cuando el inoculo ya estéril entra en contacto con un medio de cultivo que promueve y mantiene su crecimiento y división celular constante. Los reguladores de crecimiento más comúnmente utilizados para la iniciación y el mantenimiento del cultivo de callos son el ácido indol-3-acético y el ácido naftaleno acético en concentraciones que generalmente varían de 0.1 a 10.0 mg/L. (Cardenas Ávila, 2001).

La multiplicación de tejido indiferenciado, también conocido como callo, tiene una gran utilidad práctica en diversos campos, como en la investigación básica, para el establecimiento de suspensiones celulares, o para la producción y transformación de compuestos de interés (Roca & Mroginski, 1991). Este tejido, está influenciado tanto por el tipo de tejido utilizado como explante, así como por el tratamiento hormonal aplicado (Rodríguez Beraud et al., 2014).

La masa de células puede exhibir diversos tipos morfológicos que difieren en su apariencia externa, textura y composición celular, y su coloración puede variar significativamente incluso si provienen de la misma especie, debido a factores nutricionales y ambientales que influyen en el tipo y grado de pigmentación, como la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, entre otros (Cardenas Ávila, 2001).

Los callos exhiben una amplia gama de características macroscópicas que les permiten ser clasificados en diferentes subgrupos (Ikeuchi et al., 2013). Aquellos que no muestran evidencia de regeneración de órganos suelen ser conocidos como callos “friables” o “compactos” (figura 5), por otro lado, los que fomentan cierto grado de regeneración de órganos se pueden clasificar como callos “embrionarios”, “rooty”, “shooty” según el tipo de órganos que produzcan (Sharan et al., 2014).



**Figura 5.** Clasificación de callos respecto a sus características macroscópicas.

Fuente: (Ikeuchi et al., 2013)

#### **4.5.1 Relación auxina-citoquinina y la inducción de callos**

La relación entre la auxina y la citoquinina es fundamental en diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. La interacción entre estas hormonas juega un papel crucial en el control de procesos de desarrollo como la formación y preservación de los meristemas, que son fundamentales para la estructuración de todo el organismo vegetal (Su et al., 2011).

Es posible crear callos *in vitro* mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales, y el estado de diferenciación y dediferenciación de estos está determinado por el equilibrio entre dos hormonas vegetales: la auxina y la citoquinina. En términos generales, una proporción equilibrada de ambas hormonas favorece la inducción de callos, mientras que una proporción alta de auxina en comparación con la citoquinina o viceversa, puede inducir la regeneración de raíces o brotes, respectivamente (Ikeuchi et al., 2013).

Para obtener este equilibrio entre las concentraciones de las hormonas, es necesario utilizar un medio de cultivo enriquecido, como el medio Murashige y Skoog (MS), que generalmente es semisólido y contiene una proporción alta de auxinas, como el 2,4-D, AIA o ANA (Ruscitti et al., 2011). En el caso de los tejidos de monocotiledóneas, es posible estimular la formación de callos al cultivarlos en niveles elevados únicamente de auxinas, mientras que las citoquininas pueden no ser necesarias o tener poca relevancia (George et al., 2008).

La inclusión y concentración de auxinas en el medio de cultivo influye en la inducción de callos, variando según la especie o genotipo utilizados. Sin embargo, la acción de las auxinas está estrechamente relacionada con la presencia de compuestos específicos en el medio de cultivo, los cuales tienen una mayor influencia en el desarrollo y la diferenciación celular. Esto se debe a que, en el entorno de cultivo *in vitro*, estos compuestos endógenos experimentan cambios significativos

en el ambiente celular, lo que genera un estrés que puede dar lugar a una reorganización celular y la formación de una masa de células indiferenciadas (Hernández Amasifuen et al., 2021).

#### **4.5.2 Inducción de callos en el género *Capsicum***

Se ha logrado un progreso significativo en la investigación, especialmente en ciertas familias de plantas como las solanáceas, que son ampliamente estudiadas. Sin embargo, algunos miembros dentro de esta familia, como el *Capsicum*, aún no han sido suficientemente exploradas *in vitro* a pesar de su alto valor económico. Los estudios *in vitro* realizados en especies de *Capsicum* se han centrado en los efectos de las citoquininas y auxinas, algunas de las cuales han demostrado ser eficaces en la producción de callos en este género es un objetivo importante debido al interés industrial en ciertos metabolitos secundarios, especialmente la capsaicina (Rubluo & Barroso, 1992).

Como resultado de lo mencionado, el género *Capsicum* se ha identificado como un caso recalcitrante (Valle Gouch, 2015).

#### **4.5.3 Inducción de callos en *chile piquín***

Actualmente, existe una falta de información específica sobre el tema de los callos en *chile piquín* en el contexto del cultivo de tejidos vegetales. Debido a que la investigación en CTV es un campo amplio y abarca diversidad de temas, es posible que la atención se haya centrado a otras especies o aspectos de la biotecnología vegetal.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Semillas de chile piquín

Se recolectaron frutos maduros de chile piquín en la zona agrícola del municipio de Arteaga, Coahuila. Estos frutos fueron secados a temperatura ambiente, la extracción de las semillas se realizó manualmente mediante la maceración del fruto, seguido de la separación individual de las semillas utilizando un pincel, las semillas se dejaron secar a temperatura ambiente durante tres semanas.

### 5.2 Desinfección de semillas

Para llevar a cabo la desinfección de las semillas, se utilizó una solución conformada por 1/3 de cloro (NaClO) por 2/3 de agua), a la cual se añadieron gotas de Tween 20. Además, una solución de etanol al 70 % y agua destilada estéril.

El procedimiento de desinfección de las semillas se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, sumergiéndolas en una solución de etanol al 70 % durante 3 minutos, mientras se agitaban suavemente. A continuación, las semillas se sumergieron en la solución de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 25 minutos.

Posteriormente, se realizaron tres enjuagues utilizando agua destilada estéril, manteniendo las semillas en constante agitación para eliminar cualquier residuo de Tween 20. Finalmente, las semillas desinfectadas se colocaron sobre papel secante estéril durante 40 minutos dentro de la campana de flujo laminar.

### **5.3 Germinación**

En esta etapa, se sembraron un total de 630 semillas de chile (en campana de flujo laminar), distribuidas en tres lotes conformados por 210 semillas cada uno. Cada lote consistía en frascos individuales, donde se colocaron 15 semillas en cada uno. Estos contenían siete 7 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) sin reguladores de crecimiento, y se ajustó el pH a 5.7-5.8 mediante el uso de hidróxido de sodio (NaOH) 1M. Durante este proceso, se llevaron a cabo observaciones para evaluar la germinación y detectar cualquier posible contaminación presente.

### **5.4 Obtención de explantes e inducción de callos**

Transcurridos 10 días desde la germinación, se procedió a realizar la extracción de los hipocótilos y cotiledones de las plántulas resultantes. Posteriormente, los explantes obtenidos fueron levemente lesionados con ayuda de un bisturí y cultivados en cajas Petri. Cada una de estas cajas contenía 20 mL de medio de cultivo MS, el cual estaba provisto de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal: 6-bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (NAA), ácido, indolacético (IAA) y un grupo de control (Tabla 4). En cada caja Petri se colocaron 20 explantes de material vegetal recolectado en dos repeticiones. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando un bisturí completamente estéril dentro de una campana de flujo laminar, para evitar cualquier tipo de contaminación. Todos los tratamientos fueron colocados en una sala de incubación con un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad.

**Tabla 3.** Concentración de reguladores de crecimiento

TRATAMIENTOS	REGULADORES DE CRECIMIENTO		
	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	IAA (mg/L)
T1	0	2	0
T2	5	2	0
T3	2	2	0
T4	5	2	5
T5	2	2	5
T6	0	0	5
T7 (CONTROL)	0	0	0

## 5.5 Variables evaluadas

### 5.5.1 *Días a formación de callos*

Implica una relación con el seguimiento de los callos que se desarrollaron en los explantes a lo largo de un tiempo indeterminado. Para llevar a cabo este proceso, las cajas Petri con los explantes fueron observadas detalladamente, prestando especial atención en aspectos como la proliferación celular, es decir, se examinó si había indicios de división celular, como la aparición de pequeñas masas celulares. Estas observaciones se realizaron desde el día 1 posterior a la siembra hasta el día 14.

### 5.5.2 *Porcentaje de explantes que formaron callos a los 20 días*

Este valor fue obtenido en función de la proporción de explantes que mostraban la formación de callos al finalizar un periodo de cultivo de 20 días, con relación al total de explantes

por cada tratamiento. Por medio de inspección visual de los explantes se realizó el conteo de aquellos que formaron callos. El análisis se realizó de forma individual para cada caja Petri, lo que permitió una observación y cuantificación precisa.

### ***5.5.3 Porcentaje de explantes con oxidación a los 20 días***

Este valor fue obtenido en función de la proporción de explantes que mostraban oxidación a los 20 días de haber establecidos los tratamientos con reguladores del desarrollo vegetal. La determinación se realizó por medio de inspección visual de las áreas con marrones, los valores obtenidos fueron relacionados al total de explantes en cada tratamiento y así evaluar la respuesta de los tejidos frente al estrés oxidativo. Adicionalmente se capturaron imágenes de las secciones observadas de explantes.

### ***5.5.4 Porcentaje de explantes que presentan raíces***

Durante el periodo de estudio de 20 días, se realizaron observaciones regulares con el fin de identificar la formación de raíces en los explantes. Estas observaciones se realizaron en un espacio adecuado y libre de interferencias, se abarcó la totalidad de los explantes en cada uno de los tratamientos. Los valores obtenidos fueron relacionados con el número total de explantes presentes en cada tratamiento.

## **5.6 Análisis de varianza**

Se realizó un análisis de varianza de dos vías (factores: Tratamientos\*tipo de explantes, y la interacción entre los factores,  $p \leq 0.05$ ). Lo anterior para determinar si hubo diferencias entre los días a formación de callos, y diferencias entre los porcentajes de explantes que a los 20 días presentaron: callos (%callos), oxidación (%oxidación), raíces (%raíces); utilizando el software R-estudio 4.1.2.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

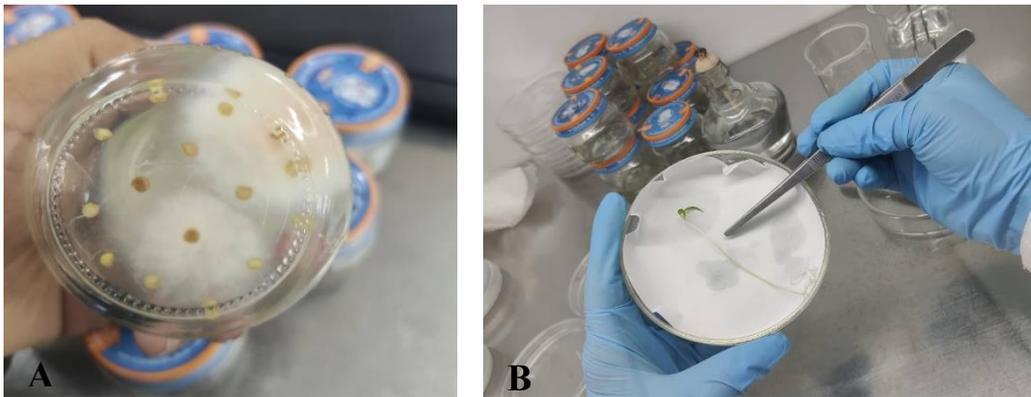
### 6.1 Germinación de semillas

El tratamiento empleado para la desinfección de semillas destacó por tener un porcentaje bajo de contaminación presente en el medio de germinación (Figura 7 A), correspondiente al 9.52% pese a ello, la tasa de germinación no es demasiado satisfactoria puesto que lo máximo que se obtuvo fue de 20%. De acuerdo a autores como (Beltrán Burboa et al., 2020), se sugiere el uso de la giberelina AG<sub>3</sub> como una medida para mejorar la baja tasa de germinación del chile piquín, la cual se atribuye a la latencia de las semillas, consta de sumergir las semillas por 30 minutos en 5.7 µM de AG<sub>3</sub> y establecidas en el medio de cultivo bajo la misma concentración. Las giberelinas inducen la síntesis de enzimas como las amilasas y glucanasas, estas tienen la capacidad de hidrolizar el almidón en azúcares simples, que es una reserva de energía presente en las semillas, los azúcares simples resultantes de esta hidrólisis son esenciales para proporcionar la energía necesaria para el crecimiento y desarrollo del embrión de la planta durante la germinación (Seguí Simarro, 2010).

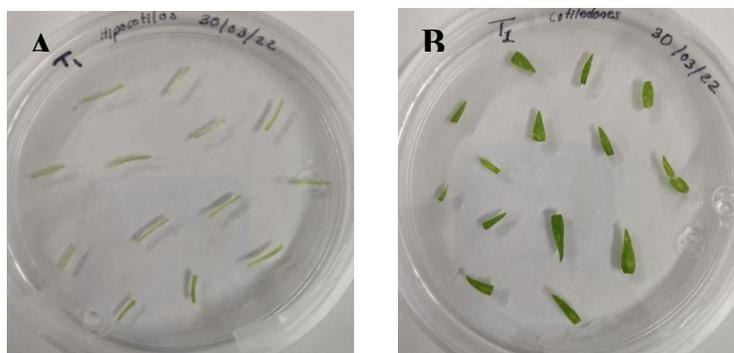
Además, según lo señalado por (Castillo Zavala et al., 2022), diversos estudios indican que el éxito en la germinación, de las semillas está estrechamente ligado a las condiciones ambientales, la variabilidad de las semillas y el genotipo de los progenitores.



**Figura 6.** Siembra de semillas de chile piquín para germinación *in vitro*



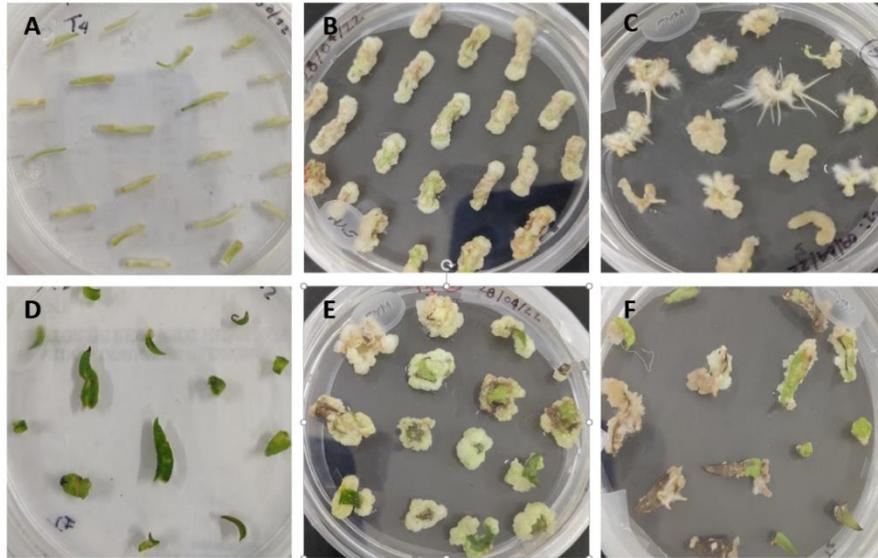
**Figura 7.** Semillas y plántula de chile piquín. A) Contaminación presente en el medio de germinación. B) Plántula de chile piquín.



**Figura 8.** Explantes iniciales establecidos en tratamiento T1. A) Hipocótilos, B) Cotiledones

## 6.2 Días a formación de callos

Después de realizar la siembra de los diferentes explantes (Figura 8), se realizó el conteo de días necesarios para la formación de callos en los diferentes tratamientos. Según el ANOVA, los hipocótilos presentaron diferencias significativas en el tiempo necesario para la formación de callos en los diferentes tratamientos (Figura 9 A y D), siendo menor en los explantes de T5 y mayor en los explantes de T3 (5 y 12 días, respectivamente), cabe mencionar que en el tratamiento negativo (T7) no se detectó la presencia de callos. Para el caso de cotiledones también se observaron diferencias significativas en el tiempo necesario para la formación de callos en los diferentes tratamientos, siendo menor en los explantes de T1, T4 Y T5 (7 días en los tres casos), y mayor en los explantes de T3 y T6 (12 y 14 días, respectivamente). Entre los diferentes explantes también se presentaron diferencias significativas en cuanto al tiempo necesario para la formación de callos, siendo menor en los hipocótilos (7.44 días). El ANOVA también evidenció que para los días requeridos para formación de callos hay una interacción entre el tipo de explante y el tratamiento utilizado.



**Figura 9.** Callos y raíces derivadas de hipocótilos y cotiledones. A, B y C muestran hipocótilos, callos derivados de hipocótilos y raíces derivadas de hipocótilos respectivamente. D, E y F muestran cotiledones, callos derivados de cotiledones y raíces derivadas de cotiledones respectivamente.

(Cardenas Ávila, 2001) reporta que los reguladores de crecimiento comúnmente empleados para iniciar y mantener el cultivo de callos son el NAA e IAA, siendo las concentraciones de uso de 0.1 a 10 mg/L. En este estudio, las concentraciones utilizadas fueron de 2 mg/L y 5 mg/L para estas hormonas vegetales (Tabla 3), manteniendo también una correlación con una citoquinina (BAP) en los tratamientos T2, T3, T4 y T5, esta elección cumple con lo reportado por (Cardenas Ávila, 2001) respecto al rango de concentraciones y en la necesidad de establecer una relación específica para promover el desarrollo de callos.

Tal como lo afirma (Smith, 2013), los callos se originan en la región de corte de los explantes debido a su proximidad al medio que contiene reguladores de crecimiento, mismos que influyen en la acumulación de auxinas, promoviendo una división mitótica constante que conduce

a la gradual formación de tejido calloso. Este proceso continúa hasta que el explante está cubierto en gran medida o completamente por tejido calloso (Hernández Amasifuen et al., 2021). De acuerdo con los autores (Castillo Zavala et al., 2022), proponen la exclusión de las áreas cercanas del extremo basal y al extremo apical de los cotiledones y además sugieren dividirlos en segmentos de longitud uniforme, asegurándose de que cada segmento conserve su tejido vascular central.

Por otra parte (Aneela et al., 2022) reportan la inducción de formación de callo utilizando distintas concentraciones de ácido indol acético (IAA), ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) y ácido naftaleno acético (NAA), en combinación con 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), de acuerdo con los hallazgos obtenidos en este estudio, se observó que la formación callo se inició en etapas tempranas, aproximadamente a los 14.67 días de cultivo, en los medios de cultivo que fueron fortificados con una combinación específica de 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de 2.0 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Contrariamente, en nuestro estudio sobre el chile piquín, se observaron diferencias significativas en el tiempo requerido para la formación de callos en los hipocótilos. Se destacó un menor tiempo en días para el tratamiento T5 (5 días) y T3 (12 días), formulados con concentraciones de 2 mg/L<sup>-1</sup> BAP, 2 mg/L<sup>-1</sup> NAA, 5 mg/L<sup>-1</sup> IAA y 2 mg/L<sup>-1</sup> BAP, 2 mg/L<sup>-1</sup> NAA respectivamente.

De acuerdo con las investigaciones de (Harahap et al., 2019), empleó una estrategia de tratamiento basada en el uso de medio de cultivo MS suplementado con ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y bencilaminopurina (BAP) para inducir la formación de callo. Sus resultados revelaron que la interacción específica entre 2,4-D y BAP tiene un impacto notable en el tiempo de formación de callos, de los cuales se hicieron notar presentes en el explante a los 10 días posteriores a la inducción de cultivo.

En un estudio realizado en *Capsicum annuum L.*, el medio de cultivo utilizado, basado en la composición de Murashige y Skoog (MS), fue enriquecido con fitohormonas clave, incluyendo 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) y kinetina, con concentraciones específicas de 3 mg/L y 0.005 mg/L, respectivamente. Tras la siembra de los explantes en este medio se observó un cambio notable en la coloración de los bordes de los explantes hacia un tono blanquecino al llegar a la segunda semana, indicando esto la iniciación de la callogénesis (Castillo Zavala et al., 2022).

Además de las investigaciones previamente mencionadas, se han documentado otros estudios que también emplean el 2,4-D. En el marco de este estudio, se examinó la reacción ante la inducción de callogénesis a través de la aplicación de cinco diferentes tratamientos, cada uno caracterizado por concentraciones variadas de 2,4-D (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg L<sup>-1</sup>). Los medios de cultivo enriquecidos con 0.75 mg L<sup>-1</sup> y 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D demostraron ser particularmente eficaces logrando alcanzar un 100 % de inducción de callos, así mismo, estos tratamientos dieron con un notable porcentaje de formación de callo, registrando un 81% y 86 % respectivamente (Hernández Amasifuen et al., 2021), es decir, que actuando de manera individual las auxinas tienen un efecto en la formación de callo.

Los resultados mencionados indican una respuesta altamente positiva en los términos de inducción y formación de callos en diversos tejidos (*Capsicum annuum L.*, *Capsicum pubescens Ruiz & Pav.*, etc.), destacando la influencia significativa de la concentración de 2,4-D en este fenómeno de callogénesis.

### **6.3 Porcentaje de explantes con callos a los 20 días**

En ANOVA mostró diferencias significativas entre el porcentaje de hipocótilos que presentaron callos en cada tratamiento. Los mayores porcentajes se registraron en los hipocótilos expuestos a T4 (99%), T3 y T5, con 91.3% cada uno; y el menor porcentaje se registró en los hipocótilos expuestos a T6 (75%). Cabe mencionar que los hipocótilos expuestos al control negativo (T7) no presentaron desarrollo de callos.

En cuanto al desarrollo de callos en los cotiledones (Figura 9 E y F), se encontraron también diferencias altamente significativas entre los tratamientos. Los cotiledones que presentaron mayor porcentaje de callos promedio fueron los expuestos al T5, resaltando también que los expuestos a T3 y T4, alcanzaron porcentajes mayores al 90%. En contraste, solo el 13.6% de los cotiledones expuestos T6 desarrollaron callos a los 20 días, esto podría atribuirse a que este tratamiento solo consta de IAA, aunque se ha constatado previamente que este promotor es capaz por sí solo de estimular e inducir la producción de callos y crecimiento celular, así como iniciar el proceso de brotes y enraizamiento (I.M. & M., 2012) e impactos beneficiosos en el alargamiento de las raíces (Díez J. L. et al., 1971). Cabe mencionar que los cotiledones expuestos al control negativo (T7) no presentaron desarrollo de callos.

El ANOVA de dos vías evidenció diferencias significativas entre los explantes utilizados, mostrando los hipocótilos el mejor desempeño, es importante destacar que en investigaciones anteriores se ha registrado el impacto del tipo de explante en la capacidad de generar callos en el cultivo *in vitro* de chile según (Batista et al., 2017). No obstante, se admite que este proceso es susceptible a la influencia de otras variables, como el intercambio de gases, la concentración de etileno y la propia composición genética de la planta.

En términos generales, se observó que los hipocótilos y cotiledones que exhibieron el mayor porcentaje de explantes con callos correspondieron a los sometidos a los tratamientos T4 y

T5, respectivamente, logrando en ambos casos un éxito del casi 100 % (Tabla 4). Es relevante resaltar que estos tratamientos, incorporaron los tres tipos de reguladores de crecimiento empleados en esta investigación. Anteriormente, se ha establecido que la presencia en conjunta de auxinas (IAA o NAA) junto con citoquinina promueve la inducción de callos, y resulta esencial mantener una proporción equilibrada entre estos dos componentes (Ikeuchi et al., 2013).

(Rodríguez Beraud et al., 2014) reportan que los niveles más altos de formación de callos se obtuvieron al emplear cotiledones en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) enriquecido con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA). Así mismo, se observaron altas tasas de callogénesis en explantes de hipocótilos tratados con 1.0 y 5.0 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

De acuerdo con (Castillo Zavala et al., 2022), el desarrollo continuo del callo, una estructura formada por células en proceso de división y crecimiento, está altamente influenciado por la aplicación adecuada de auxinas y citocininas manteniendo una interacción y equilibrio entre estas dos hormonas.

#### **6.4 Porcentaje de explantes que presentaron oxidación a los 20 días**

Se observaron diferencias altamente significativas en cuantos a los hipocótilos que presentaron oxidación. Esta característica alcanzó mayores porcentajes en los hipocótilos expuestos al T6. Es esencial tener en cuenta que los sistemas de cultivo *in vitro* no logran replicar de manera precisa las condiciones naturales de crecimiento de las plantas, lo que puede potencialmente desencadenar respuestas no deseadas como lo es la oxidación. No obstante, los hipocótilos expuestos a tres tratamientos no presentaron oxidación en los explantes (T1, T3 y T4).

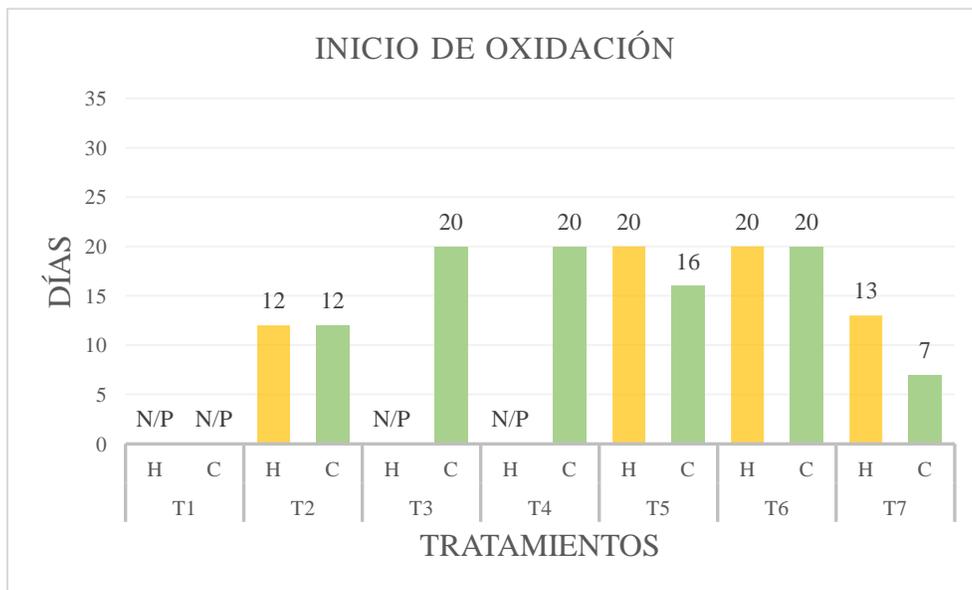
Es destacable también que los hipocótilos expuestos al tratamiento nulo (T7) presentaron un porcentaje de oxidación considerable (13.2%).

Para el caso de cotiledones con oxidación, se alcanzaron mayores proporciones en aquellos expuestos a T5 (15.5%), sin embargo, se presentaron proporciones de cotiledones con oxidación aún mayores en los expuestos al T7 (24.5%); solamente los cotiledones expuestos al T1 estuvieron totalmente libres de oxidación a los 20 días. En términos generales, los cotiledones presentaron mayor porcentaje de explantes con oxidación en promedio. Existen diversos factores ambientales, como la intensidad de la luz, cortes en el explante, el proceso de senescencia, la composición del medio de cultivo, así como el volumen y la calidad del frasco utilizado en el cultivo que pueden desencadenar estrés oxidativo y nitrosativo (Azofeifa, 2009). Además, el oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro* puede resultar de la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) produciendo quinonas, estas especies químicas altamente reactivas pueden provocar daños e incluso la muerte celular (Amiot et al., 1996; Bray et al., 2000).

En su investigación, (Azofeifa, 2009), presenta diversas estrategias que contribuyen a evitar o reducir los procesos de oxidación, entre ellas se incluyen: cultivo del explante a baja luminosidad o en oscuridad, cultivo a baja temperatura ligeramente menor a la normalmente empleada, subcultivos frecuentes, cultivos en medio líquido, agregar adsorbentes como el carbón activado al medio de cultivo, el uso de polivinil pirridolina e incluso cambiar el agente desinfectante.

Previamente se ha reportado que se puede llevar a cabo la eliminación de porciones necróticas en callos de *Phyllostachis nigra*, este procedimiento fue realizado con el propósito de fomentar la recuperación y el crecimiento de los explantes (Ogita, 2005).

Dentro del grupo de citoquininas se ha reportado que 6-bencilaminopurina (BAP) es uno de los reguladores que cuenta con una cantidad significativa de referencias que lo vinculan con el problema del oscurecimiento, varios autores de acuerdo con (Azofeifa, 2009), han indicado que a medida que se incrementan los niveles de auxinas en el medio de cultivo, también aumentan los problemas de oxidación en los explantes, destacando que el fenómeno de oxidación no se manifiesta de manera significativa cuando se utiliza ácido naftalenoacético (NAA) en el medio, ni tampoco con el ácido indol-3-acético (IAA). No obstante, en este estudio se observó que esa relación no es completamente precisa, puesto que para hipocótilos dos de los tres tratamientos que no presentaron oxidación (Figura 10), contenían BAP en su formulación, a concentraciones de 2 y 5 mg/L. Esto sugiere que hay una relación entre el tipo de explante y el tratamiento en términos de presencia de oxidación.



**Figura 10.** Comparación del inicio de oxidación (en días) de los distintos tratamientos por tipo de explante. (H: hipocótilos, C: cotiledones) (N/P: no presentaron oxidación).

Conforme al análisis realizado por (López Gómez et al., 2010), a los 30 días posteriores al establecimiento *in vitro* de los explantes, se identificaron problemas relacionados con la oxidación. Para abordar esta cuestión, se implementó un tratamiento de desinfección específico que consistió en sumergir los explantes en una solución con concentraciones óptimas de 1% a 3% de NaClO y de 3.5% a 7% de Ca(ClO)<sub>2</sub>, seguido de un enjuague con agua esterilizada, los explantes fueron sumergidos en una solución antioxidante (30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de ácido ascórbico, 150 mg/L de ácido cítrico y 1 g/L de Amistar®) durante la fase de disecación, logrando así reducir los niveles de oxidación de manera significativa.

En comparación con los hallazgos observados en este estudio del chile piquín, se detectó oxidación desde el séptimo día posterior al establecimiento *in vitro* de explantes en los cotiledones del tratamiento T7. Esta discrepancia resalta una marcada diferencia entre los resultados obtenidos en ambos estudios, lo que sugiere la necesidad de considerar un enfoque distinto para el proceso de desinfección. Este aspecto se convierte en un punto clave para futuras investigaciones y aplicaciones en el cultivo *in vitro* de plantas.

De acuerdo con algunas investigaciones realizadas por (Orantes Ramos & López Ventura, 2019), al exponer células y tejidos vegetales a un ambiente sin luz, se disminuye de manera significativa el proceso de oxidación. Este efecto se debe a la inactivación de varias enzimas encargadas en este proceso. Se recomienda añadir carbón activado y galactosa a los medios de cultivo, es posible observar una reducción en la oxidación de los explantes.

## **6.5 Porcentaje de explantes que presentaron raíces a los 20 días**

Otra característica que se cuantificó en este estudio fue el desarrollo de raíces en los explantes (Figura 11). Se observaron diferencias altamente significativas entre los porcentajes de

explantes que desarrollaron raíces que expuestos a los tratamientos (Tabla 4). En el caso de los hipocótilos, fue notorio que los expuestos al T6 y T1, presentaron un porcentaje de explantes de 68% y 42% respectivamente. Por otro lado, los hipocótilos expuestos a T2, T4 y T5 no presentaron desarrollo de raíces (Figura 12), este hallazgo concuerda con la investigación de (Gordillo Calatrava, 2019), quien señaló que la citoquinina actúa como un inhibidor del crecimiento de las raíces, misma que está presente en los tres tratamientos mencionados a concentraciones de 5, 5 y 2 mg/L respectivamente, de cierto modo podemos decir que la citoquinina a determinadas concentraciones frena o retarda el desarrollo de raíces.

En el caso de los cotiledones, resalta que 22% de los expuestos al T1 desarrollaron raíces, mientras los expuestos al T3, T5 y al T7 (control negativo) no presentaron raíces. En términos generales, los hipocótilos alcanzaron mayor proporción de explantes que desarrollaron raíces, lo cual evidencia una interacción entre el tipo de explante y el tratamiento para el desarrollo de raíces, es decir, las hormonas de crecimiento vegetal desempeñan un papel complejo e interactúan de manera específica en diversas regiones de la planta, orquestando la formación de raíces y otros aspectos del desarrollo. Las variaciones en su modo de acción en cotiledones e hipocótilos pueden atribuirse a sus funciones distintivas en el proceso de crecimiento, así como a la capacidad de adaptación de la planta en su entorno. Además, los niveles hormonales y la receptividad celular a estas hormonas se ven influenciadas por las condiciones del entorno, lo que resulta en modificaciones en los patrones de desarrollo de la planta (Gordillo Calatrava, 2019).

(Basantes Mantilla, 2011) menciona que una relación alta en auxinas y citoquininas estimula el crecimiento de raíces, este fenómeno se observó en los tratamientos T6 y T1, ya que, como se mencionó anteriormente, presentaron un mayor porcentaje de explantes con raíces. Estos tratamientos estaban formulados únicamente con auxinas, IAA y NAA, respectivamente.

Comúnmente se recurre al uso de las auxinas para promover la formación de raíces. No obstante, según investigaciones realizadas por (Laguna-Ibarra et al., 2019), se observó que la aplicación de ANA en diferentes concentraciones (1.0; 1.5; 2.0 y 2.5 mg\*L<sup>-1</sup>) sin ningún otro regulador de crecimiento, resultó en la formación completa de callos, mientras que simultáneamente suprimió la generación de raíces. Contrariamente a los resultados del tratamiento T1 en los explantes de chile piquín, donde solo se empleó ANA en una concentración de 2 mg/L, se observó que el 86% de los hipocótilos desarrollaron callos y simultáneamente la formación de raíces en un 42%.

**Tabla 4.** Medias y análisis de varianza de dos vías.

	Tratamiento	Ns	Días a callos	Ns	Porcentaje de explantes que a los 20 días presentaron:				
					Callos	Ns	Oxidación	Ns	Raíces
Hipocótilos	T1	**	6.6	**	86.5	**	0	**	42.7
	T2		7		88.6		6.7		0
	T3		12		91.3		0		2.2
	T4		7		99		0		0
	T5		5		91.3		11.7		0
	T6		7		75		18.3		68.3
	T7		-		0		13.2		12.3
Cotiledones	T1	**	7	**	76.9	**	0	**	22.2
	T2		7.3		78.2		10		5.3
	T3		12		97.7		8.9		0
	T4		7		92.3		9.3		1.3
	T5		7		100		15.5		0
	T6		14		13.6		10		13.1
	T7		-		0		24.5		0
Tipo de explante	Hipocótilos	**	7.4	**	75.9	**	7.1	**	17.9
	Cotiledones		9.0		65.5		11.1		5.9

---

---

Interacción

---

---

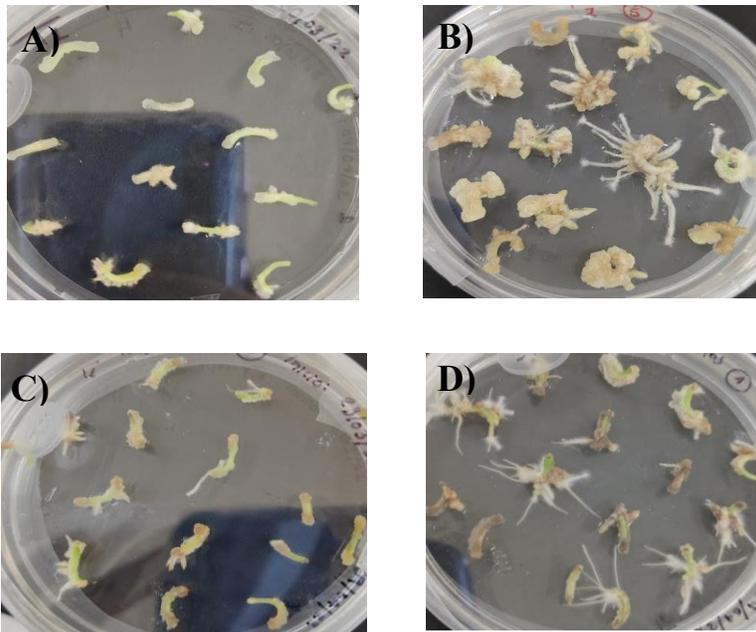
\*

\*

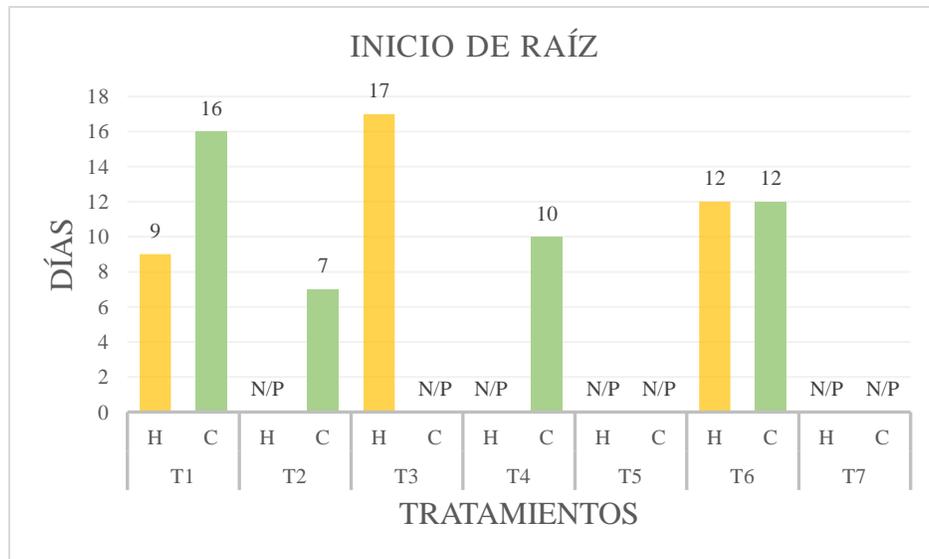
\*

\*

Nota: Medias de las variables días a callos, porcentaje de explante que a los 20 días presentaron callos, oxidación y raíces, por tipo de explante por tratamiento. Medias según el tipo de explante y significancia de la interacción entre los factores tipo de explantes y los tratamientos. Ns: nivel de significancia ( $p > 0.05$ ), \*\*: altamente significativo, \* significativo.



**Figura 11.** Presencia de raíces en hipocótilos. A y B desarrollo de raíces del tratamiento T1. C y D desarrollo de raíces del tratamiento T6, la última con gran presencia de oxidación.



**Figura 12.** Comparación del inicio de raíces (en días) de los distintos tratamientos por tipo de explante (H: hipocótilos, C: cotiledones) (N/P: no presentaron raíces).

## 7 CONCLUSIONES

El estudio destaca la importancia de los reguladores de crecimiento en la formación de callos, enraizamiento en cultivos *in vitro* de chile, así como la influencia del tipo de explante y otros factores en estos procesos.

El tratamiento de desinfección de semillas mostró bajos niveles de contaminación en el medio de germinación, con solo un 9.52%. Pese a ello la tasa de germinación fue insatisfactoria, alcanzando solo un máximo del 20%. Se sugiere mejorar la germinación utilizando giberelina AG3.

Respecto al tiempo en días de formación de callos, los hipocótilos resultaron ser más rápidos (7.44 días) respecto a los cotiledones (9.0 días). Los porcentajes más altos de presencia de callos resultaron en los tratamientos T4 y T5 mismos que están formulados bajo concentraciones que incluyen a tres reguladores del crecimiento: 5mg/L<sup>-1</sup> BAP, 2 mg/L<sup>-1</sup> NAA, 5 mg/L<sup>-1</sup> IAA y 2 mg/L<sup>-1</sup> BAP, 2 mg/L<sup>-1</sup> NAA, 5 mg/L<sup>-1</sup> IAA respectivamente, siendo los hipocótilos quienes dieron mejores resultados. La combinación de estos tres reguladores de crecimiento, ya sea en parejas o en grupos, exhibe una gran capacidad para estimular la proliferación de callos respetando a altas concentraciones de auxinas y bajas de citoquininas.

Algunos tratamientos, como el T6 y T7, exhibieron un mayor porcentaje de explantes con oxidación en hipocótilos y cotiledones, respectivamente. Es importante destacar que en general los hipocótilos mostraron una respuesta de oxidación comparativamente menor en relación a los cotiledones.

De acuerdo a la evaluación del desarrollo de raíces en los explantes para hipocótilos, se destacó que el tratamiento T6 mostró el mayor porcentaje con desarrollo de raíces, alcanzando un 68%, seguido del T1 con un 42%. En contraste, los hipocótilos expuestos a T2, T4 y T5 no

presentaron desarrollo de raíces. En el caso de cotiledones, se observó que el T1 tuvo un porcentaje del 22% de explantes con desarrollo de raíces, mientras que para T3, T5 y T7 (control negativo), no se observó desarrollo de raíces. En términos generales, los hipocótilos mostraron una proporción mayor de explantes con desarrollo radicular en comparación con los cotiledones, evidenciando una interacción significativa entre el tipo de explante y el tratamiento en el desarrollo de raíces.

## 8 LITERATURA CITADA

Aguilar Rincón, V. H., Corona Torres, T., López López, P., Latournerie Moreno, L., Ramírez Meraz, M., Villalón Mendoza, H., & Aguilar Castillo, J. A. (2010). Los chiles de México y su distribución. Recuperado el 26 de mayo de 2023 de [https://www.researchgate.net/publication/235657255\\_Los\\_chiles\\_de\\_Mexico\\_y\\_su\\_distribucion](https://www.researchgate.net/publication/235657255_Los_chiles_de_Mexico_y_su_distribucion)

Aguirre Villaroel, G., Baudoin, J. P., & Leigue Arnéz, L. (2010). Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Recuperado el 12 de julio de 2023, de <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>

Alcalá Rico, J. S. G. J. (2019). Potencial fisiológico de la semilla y diversidad de fruto del chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Alcantara Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17 (32), 109–129.

Alvarado-González, J. S., Chanona-Pérez, J. J., Welti-Chanes, J. S., Calderón-Domínguez, G., Arzate-Vázquez, I., Pacheco-Alcalá, S. U., Garibay-Febles, V., & Gutiérrez-López, G. F. (2012). Optical, microstructural, functional and nanomechanical properties of *Aloe vera* gel/gellan gum edible films. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(2), 193–2010.

Amado, M.A., Fischer, G. (2006). El ácido alfa-naftalenacético (ANA) y el ácido giberélico (GA3) influyen en la producción y calidad del fruto del durazno 'Melocotón Amarillo' (*Prunus persica*L.). Revista Comalfi. Recuperado el 25 de abril de 2023, de [https://www.researchgate.net/publication/256575939\\_El\\_acido\\_alfa-naftalenacetico\\_ANA\\_y\\_el\\_acido\\_giberelico\\_GA3\\_influyen\\_en\\_la\\_produccion\\_y\\_calidad\\_del\\_fruto\\_del\\_durazno\\_'Melocoton\\_Amarillo'\\_Prunus\\_persica\\_L](https://www.researchgate.net/publication/256575939_El_acido_alfa-naftalenacetico_ANA_y_el_acido_giberelico_GA3_influyen_en_la_produccion_y_calidad_del_fruto_del_durazno_'Melocoton_Amarillo'_Prunus_persica_L)

Amiot, M., Forget, F., & Goupy, P. (1996). Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba-Polonica*, 4, 237–247.

Andújar, I., Gómez, D., Pérez, L., Vicente, O., & Lorenzo, J. C. (2019). Auxins, auxin transport inhibitors, and competitors for auxin receptors do not show statistically significant differences in 212 molecular descriptors. *Rom Biotechnol Lett*, 24(3), 407–411.

Aneela, S. B., Khattak, M. A., Basit, A., Alam, M., Tanveer Shah, S., Ahmad, N., Qadir Gilani, A. S., Ullah, I., Anwar, S., & Mohamed, H. I. (2022). Callus induction, proliferation, enhanced secondary metabolites production and antioxidants activity of *Salvia moorcroftiana* L. as influenced by combinations of auxin, cytokinin and melatonin. *Brazilian archives of biology and technology*, 65. Recuperado el 18 de septiembre de 2023, de <https://www.scielo.br/j/babt/a/t8NzrwyqjcvrXpZHYT49nGy/?lang=en#ModalHowcite>

Araiza Lizarde, N., Araiza Lizarde, E., & Martínez Martínez, J. G. (2011). Evaluation of germination and seedling Growth of Chiltepín (*Capsicum annuum* L. variedad *glabriusculum*) greenhouse. En *Rev. Colomb. Biotecnol*: Vol. XIII (2), 170-175.

Azcon Bieto, J., & Talón Manuel. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Recuperado el 2 de febrero de 2023 de

<https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetal2008Azcon.pdf>

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

Bañuelos, N., Salido, P. L., & Gardea, A. (2008). Etnobotánica del chiltepín. Pequeño gran señor en la cultura de los sonorenses. *Estudios sociales. Revista de alimentación contemporánea* 16(32), 178-205.

Basantes Mantilla, J. M. (2011). Evaluación del efecto de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA3) en las fases de inducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro* a partir de yemas apicales de *Valeriana scandens*. Tesis de licenciatura. Escuela Politécnica del Ejército.

Batista, D. S., Dias, L. L. C., Rêgo, M. M. C. S. W., & Otoni, W. C. (2017). Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. *Ciencia Rural*, 47(3). Recuperado el 4 de marzo de 2023, de <https://www.scielo.br/j/cr/a/Lx59ch6T8KrdXkDTzRrB4fq/?lang=en>

Beltrán Burboa, J. N., López Peralta, M. C. G., Hernández Meneses, E., & Cruz Huerta, N. (2020). Germinación *in vitro* de chile chiltepín (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*) y regeneración por organogénesis. *Agrociencia*, 53(2), 195–208.

Bermúdez Carabaloso, I., Rodríguez Urquiza, M., Reyes Vega, M., & Jiménez Padrón, A. (2019). Efecto del uso combinado de dos citoquininas en la multiplicación y regeneración de yemas adventicias de banano cv. ‘Gros Michel’ (Musa AAA). *Biotechnología Vegetal*, 19(2), 141–146.

Bhatia, S. (2015). Cap. 2 Plant Tissue Culture. En Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences (pp. 31–107). Amsterdam, Netherlands. Academic Press.

Bhatla, S. C. (2018). Cap. 15 Auxins. En Plant Physiology, Development and Metabolism (pp. 569–601). Springer.

Bran, R. A. A., Moya, C., Ponce, P., Álvarez, M., & Valera, M. (2007). Diagnóstico participativo de las condiciones socioculturales asociadas a la conservación de los chiles silvestres (*Capsicum spp.*) en la depresión central de Chiapas, México. Cultivos Tropicales, 28(1), 69–73.

Bray, E., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. En B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), Biochemistry and molecular biology of plants. (pp. 1158–1203). Rockville, Md. American Society of Plant Physiologists.

Calva Calva, G., & Pérez Vargas, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria, 6(11), 2–16.

Campos, D., Chávez, C., López, S., Gil- Rivero, A., López -Zavaleta, A., & De La Cruz-Castillo, A. (2019). Effect of 6- benzylaminopurine and the culture medium ms (1962) on the *in vitro* establishment of *Prosopis pallida* (Willd.) Kunth. Rebiol, 39(2), 30–40.

Cardenas Ávila, M. L. (2001). Cultivo de callo *in vitro* como una alternativa para evaluar resistencia a salinidad y sequía en “frijol” *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Castillo Zavala, J., Mostacero-León, J., & De La Cruz-Castillo, A. (2022). Inducción *in vitro* de callos a partir de explantes de *Capsicum annum* L. Advances in science and innovation, 1(1), 66–76.

Centeno, M. L., Fernández, B., Feito, I., Rodríguez, A., & Rodrigo Uría, C. (1999). Uptake, distribution, and metabolism of 1-naphthaleneacetic acid and indole-3-acetic acid during callus initiation from *Actinidia deliciosa* Tissues. *Plant growth regulation*, 18, 81–88.

CITEagroindustrial. (2020, 18 de julio). Cultivo de tejidos vegetales. Boletín técnico. Recuperado el 18 de mayo de 2023 de [https://issuu.com/citeagroindustrialica/docs/bt-001-2020\\_cultivo\\_de\\_tejidos\\_vegetales](https://issuu.com/citeagroindustrialica/docs/bt-001-2020_cultivo_de_tejidos_vegetales)

CONAFOR. (2010). Técnicas para el establecimiento y producción de chiltepín silvestre, bajo un sistema agroforestal en Sonora, México. Comisión Nacional Forestal. Recuperado el 22 de abril de 2023 de <https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/Tecnicas-CHILTEPIN.pdf>

Cruces Carvajal, R. (2006,). Lo que México aportó al mundo. Recuperado el 22 de febrero del 2023, de <https://books.google.com.mx/books?id=dJLjgRUyONEC&pg=PA44&dq=chile+piquin&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwi5joPWokr9AhV3lmoFHYmFA0YQ6AF6BAgJEAI#v=onepage&q=chile%20piquin&f=false>

Díaz Sánchez, D. D. (2019). Determinación de la calidad pre y postcosecha enchile piquín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Tesis de doctorado. Colegio de postgraduados.

Díaz-Sánchez, D. D., López, P. A., López-Sánchez, H., Silva-Rojas, H. V., Gardea-Béjar, A. A., Cruz-Huerta, N., Ramírez-Ramírez, I., & González-Hernández, V. A. (2021). Pungency and fruit quality in Mexican landraces of piquín pepper (*Capsicum annuum* var.

*glabriusculum*) as affected by plant growth environment and postharvest handling. Chilean journal of agricultural research, 81(4), 546–556.

Díez J. L., C., de la T., & López Sáez, J. F. (1971). Auxin deficiency at the onset on root growth in *Allium cepa*. *Planta*, 97(4), 364-366.

Dilworth, L. L., Riley, C. K., & Stennett, D. K. (2017). Cap. 5 Plant constituents: carbohydrates, oils, resins, balsams, and plant hormones. En *Pharmacognosy: fundamentals, applications and strategy*. (pp. 61–80). Amsterdam, Netherlands. Elsevier.

EL Sabagh, A., Islam, M. S., Hossain, A., Iqbal, M. A., Mubeen, M., Waleed, M., Reginato, M., Battaglia, M., Ahmed, S., Rehman, A., Arif, M., Athar, H. U. R., Ratnasekera, D., Danish, S., Raza, M. A., Rajendran, K., Mushtaq, M., Skalicky, M., Brestic, M., ... Abdelhamid, M. T. (2022). Phytohormones as Growth Regulators During Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Frontiers in Agronomy*, 4.

Flórez, V. J., & D. Aleixo Pereira, M. de F. (2008). Las citoquininas están asociadas al desarrollo floral de plantas de *Solidago x luteus* en días cortos. *Agronomía Colombiana*, 26(2), 226–236.

García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria* 37(3), 5-30.

George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. de. (2008). Plant propagation by tissue culture. Recuperado el 3 de abril de 2023, de <https://investigacionfitopatologiaumar.files.wordpress.com/2016/06/plant-propagation.pdf>

Gordillo Calatrava, L. (2019). Análisis histológico de la acción de las auxinas y citoquininas en la elongación de la raíz. Discusión de la influencia de la mejora de la

composición y calidad de los productos derivados. Tesis de licenciatura. Universidad de Extremadura.

Gray, D. J., & Trigiano, R. N. (2016). Plant tissue culture, development, and biotechnology. Recuperado el 28 de abril de 2023, de [https://www.google.com.mx/books/edition/Plant\\_Tissue\\_Culture\\_Development\\_and\\_Bio/IOLOBQAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1&dq=Getting+Started+with+Tissue+Culture-Media+Preparation,+Sterile+Technique,+and+Laboratory+Equipment&pg=PR5&printsec=frontcover](https://www.google.com.mx/books/edition/Plant_Tissue_Culture_Development_and_Bio/IOLOBQAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1&dq=Getting+Started+with+Tissue+Culture-Media+Preparation,+Sterile+Technique,+and+Laboratory+Equipment&pg=PR5&printsec=frontcover)

Guillen Castillo, O. I. (2017). *Mejora de la germinación en chile piquín (Capsicum annuum var. glabriusculum/aviculare) mediante priming*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Gutiérrez Hernández, J. (2011). *Análisis de la problemática de la producción y comercialización del chile piquín (Capsicum Annuum var. Aviculare), caso: comunidad de San Francisco Yovego del municipio Santiago Camotlán, Oaxaca*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Harahap, F., Diningrat, D. S., Poerwanto, R., Nasution, N. E. A., & Hasibuan, R. F. M. (2019). *In vitro* callus induction of sipahutar pineapple (*Ananas comosus L.*) from North Sumatra Indonesia. *Pakistan journal of biological sciences*, 22(11), 518–526.

Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L. Á. (2016). Wild Pepper *Capsicum annuum L. var. glabriusculum*: Taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. *Crop Science*, 56(1), 1–11.

Hernández Amasifuen, A. D., Argüelles Curaca, A., Cortez Lázaro, A. A., & Díaz Pillasca, H. B. (2021). *In vitro* induction of callus from foliar explants in rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *La Granja: revista de ciencias de la vida*, 34(2), 131–140.

Hernández Verdugo, S., Guevara Gonzáles, R. G., Rivera Bustamante, R. F., Vázquez Yanes, C., & Oyama, K. (1998). Los parientes silvestres del chile (*Capsicum spp.*) como recursos genéticos. *El Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 62, 171–181.

Hu, W., Fagundez, S., Katin-Grazzini, L., Li, Y., Li, W., Chen, Y., Wang, X., Deng, Z., Xie, S., McAvoy, R. J., Li, Y., & Li, Y. (2017). Endogenous auxin and its manipulation influence *in vitro* shoot organogenesis of citrus epicotyl explants. *Horticulture Research*, 4(1).

Hussain, A., Ahmed Qarshi, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Cap. 1 Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. A. Leva & L. M. R. Rinaldi (Eds.), *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. (pp. 1-28). InTechOpen.

ICF. (2006). Gellan Gum. National Organic Program. Recuperado el 19 de abril de 2023, de <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Gellan%20Gum%20TR.pdf>

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25(9), 3159–3173.

I.M., A., & M., A. (2012). Cap. 2 Plant Tissue Culture Media. En *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (pp. 29–40). Winchester. In Tech.

Izquierdo Oviedo, H., Alcaraz Meléndez, L., & Rodríguez Álvarez, M. (2017). Micropropagation of chiltepín (*Capsicum annum* L. cv. 'glabriusculum) by applying a pectic oligosaccharide. *Acta Universitaria*, 27(5), 34–43.

Jenik, P. D., & Barton, M. K. (2005). Surge and destroy: The role of auxin in plant embryogenesis. *The Company of Biologists*. 132(16), 3577–3585.

Jiménez Leyva, J. A. (2013). Factores ambientales, fenología, e intercambio de gases en *Capsicum annum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pikckergill. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Cap. 15 Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. En F.A. Squeo & L. Cardemil (Eds.) En Fisiología Vegetal (pp. 2–28). La Serena, Chile, Ediciones Universidad de La Serena.

Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2011). Cap. 9 Plant tissue culture for biotechnology. En A. Altman, P. M. Hasegawa (Eds.). Plant Biotechnology and Agriculture. (pp. 131–138). Amsterdam, Netherlands. Academic Press.

Laguna-Ibarra, Y., Cueva-López, J., Tamariz-Angeles, C., & Olivera-Gonzales, P. (2019). Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *senecio calvus* (asteraceae), planta medicinal altoandina, endémica del Perú. *Journal of High Andean Research*, 21(2), 111–121.

Libbenga, K. R., & Mennes, A. M. (1995). Hormone binding and signal transduction. En Davies, P.J. (Ed.). *Plant Hormones*. (pp. 272–273). Dordrecht. Springer.

Ljung, K., Bhalerao, R. P., & Sandberg, G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal*, 28(4), 465–474.

López Gómez, P., Iracheta Donjuan, L., Castellanos Juárez, M., Méndez López, I., Sandoval Esquivéz, A., Aguirre Medina, J. F., Ojeda Zacarías, Ma. C., & Gutiérrez Díez, A. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Fitotec. Mex*, 33(3), 205–213.

López Valdez, A. P. (2018). Biología de la latencia en semillas de chile piquín *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill. El papel de las fitohormonas. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.

López-Serrano, P. M., Hernández-Ramos, A., Méndez-González, J., Martínez-Salvador, M., Aguirre-Calderón, O., Vargas-Larreta, B., & Corral-Rivas J.J. (2017). Mejores prácticas de manejo y ecuaciones alométricas de biomasa de *Capsicum annuum* L., en los estados de Nuevo León, Sonora y Tamaulipas. CONAFOR-CONACYT.

Marín Collí, E. E. (2012). Embriogénesis somática del género *capsicum*: validación de un protocolo de regeneración *in vitro* en *Capsicum annuum*. Tesis de licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Márquez-Quiroz, C., López-Espinosa, S. T., Cano-Ríos, P., & Moreno-Reséndez, A. (2013). Fertilización orgánica: Una alternativa para la producción de chile piquín bajo condiciones protegidas. Revista Chapingo, Serie: Horticultura, 19(3), 279–286.

Martínez Torres, H. L. (2007). Etnobotánica del chile quipín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) en la Sierra Gorda y Semidesierto de Querétaro. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados.

McLeod, M. J., Guttman, S. I., & Hardy Eshbaugh, W. (1982). Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). Econ Bot 36, 361-368.

Medina Martínez, T., Villalón Mendoza, H., Pérez Hernández, J. M., Sánchez Ramos, G., & Salinas Hernández, S. (2010). Avances y perspectivas de investigación del chile piquín en Tamaulipas, México. CienciaUAT, 4(4), 16–21.

Mena García, L. M. (2004). El Cultivo de chile piquín (*Capsicum annuum*, var. *aviculare* Dierb.). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Merck Millipore. (s/f). Merck Millipore | Ciencias de la Vida | Productos químicos industriales y de laboratorio | Tienda virtual. Recuperado el 8 de septiembre de 2023, de <https://www.merckmillipore.com/MX/es>

Motyka, V., & Kamfnek, M. (1990). Regulation of cytokinin catabolism in tobacco callus cultures. En Nijkamp, H.J.J., Van Der Plas, L.H.W., Van Aartrijk, J. (Eds.). Progress in plant cellular and molecular biology. Current plant science and biotechnology in agriculture. (492-493). Dordrecht. Springer.

Mukherjee, A., Gaurav, A. K., Singh, S., Yadav, S., Bhowmick, S., Abeysinghe, S., & Verma, J. P. (2022). The bioactive potential of phytohormones. Elsevier. 35.

Munguía Rodríguez, A. G., & Martínez Trujillo, M. (2018). Las auxinas: síntesis, transporte y señalización ácido abscísico ácido jasmónico ácido giberélico. Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, 20(1), 1–7.

Nafea, S. M., & Abdulfatah, H. K. (2014). Effect of Foliar application of GA3 and NAA for reducing alternate bearing of olive trees (*Olea europaea L. cv.Ashrasie*). IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 7(1), 8–12.

Nee, M. (1986). Flora de Veracruz. Recuperado el 22 de marzo de 2023, de [http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOVER/49-nee\\_I.pdf](http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOVER/49-nee_I.pdf)

Neri Cacho, U. (2022). Inducción y diferenciación de callos a partir de Hipocótilos y Cotiledones de Repollo (*Brassica oleracea* var. *Royale Vantage*) en cultivo *in vitro*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Nordic Baltic Genebanks Information System. (2023). Taxon: *Capsicum annuum L.* var. *glabriusculum (Dunal)* Heiser & Pickersgill. Nordic Baltic Genebanks Information

System. Recuperado el 2 de mayo de 2023, de <https://nordic-baltic-genebanks.org/gringlobal/accessiondetail?id=1766>

Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology*, 22(2), 119–125.

Orantes Ramos, H. Á., & López Ventura, Y. E. (2019). Evaluación de medios de inducción *in vitro* a callo vegetal en explantes foliares de *Annona diversifolia* Safford (*Magnoliales: Annonaceae*). *Minerva*, 2(1), 22–30.

Osorio Montalvo, P. M. (2015). Análisis de la expresión de los genes PIN1, PIN4 y PIN7 durante la embriogénesis de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Paredes-Jácome, J. R., Mendoza-Villarreal, R., Perez-Rodriguez, M. Á., Robledo-Torres, V., & Moreno-Limón, S. (2019). Agronomic behavior of piquin pepper ecotypes under photosensitive covers. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 11(1), 53-67.

Pérez Hernández, C. A. (2016). Análisis de la biosíntesis del ácido-3-indolacético en la embriogénesis somática de *Coffea canephora*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96(1), 129–133.

Puebla Gutiérrez, M. A. (2013). Intermediación en el mercado de chiltepín de la región río Sonora. Tesis de licenciatura. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

Ramírez Novoa, U. I., Cervantes Ortiz, F., Montes Hernández, S., Raya Pérez, J. C., Cibrián Jaramillo, A., & Andrio Enriquez, E. (2018). Diversidad morfológica del chile piquín

(*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) de Querétaro y Guanajuato, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9(6), 1159-1170.

Ramírez Ojeda, G. (2017). Diversidad morfológica, fisiológica y climática en colectas de chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) en México. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados.

Rashmi, R., & Trivedi, M. P. (2014). Effect of various growth hormone concentration and combination on callus induction, nature of callus and callogenic response of *Nerium odorum*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172(5), 2562–2570.

Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Recuperado el 3 de abril de 2023, de [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/biblioteca/Cultivo\\_de\\_tejidos\\_en\\_la\\_agricultura.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)

Rodriguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). *In vitro* induction of callogenesis and indirect organogenesis from explants of cotyledon, hypocotyl and leaf in *Ugni molinae*. Bosque, 35(1), 111-118

Rubluo, A., & Barroso, M. L. (1992). *In vitro* morphogenetic responses and cytokinin-auxin interaction for callus production in pepper. Anales del Instituto de Biología, 63(2), 195–201.

Ruíz-Rivas, M., Téllez-Valerio, C. E., Martínez-Núñez, M., Vera-Hernández, P. F., Martínez-Romero, E., & Rosas-Cárdenas, F. D. F. (2022). Influencia de la luz en la generación de callos y el cultivo *in vitro* de plantas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 27, 11–21.

Ruscitti, M., Beltrano, J., & Giménez, D. O. (2011). Cultivo de tejidos vegetales. Recuperado el 10 de mayo de 2023, de

[https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/104130/mod\\_resource/content/1/in%20vitro.pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/104130/mod_resource/content/1/in%20vitro.pdf)

SAGARPA. (2017). Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV): Implementación y puesta en marcha. Recuperado el 3 de abril del 2023, de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/264918/Reporte\\_de\\_Proyecto\\_1\\_Laboratorio.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/264918/Reporte_de_Proyecto_1_Laboratorio.pdf)

Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 431–449.

Sandoval Rangel, A. (2011). El cultivo del chile piquín y la influencia de los ácidos orgánicos en el crecimiento, productividad y calidad nutricional. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Seguí Simarro, J. M. (2010). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. Recuperado el 18 de septiembre de 2023, de <https://es.scribd.com/document/536135600/Biologia-y-Biotecnologia-Reproductiva-De-Plantas>

Sharan, A. K., Dubey, S. R., Singh, B. P., Kumar, G., & Kumari, S. (2014). Diversity in callus organisation in *Eclipta Alba Hassak*. *International Journal of Advanced Research*, 2(7), 465–473.

Sivanesan, I., & Park, S. W. (2014). The role of silicon in plant tissue culture. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-4.

Smith, R. H. (2013). *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. Recuperado el 20 de septiembre de 2023, de <https://www.sciencedirect.com/book/9780124159204/plant-tissue-culture>

SNIIM. (2023). Mercados Nacionales. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. Recuperado el 2 de mayo de 2023, de <http://www.economia-sniim.gob.mx/Nuevo/Home.aspx?opcion=Consultas/MercadosNacionales/PreciosDeMercado/Agricolas/ConsultaFrutasYHortalizas.aspx?SubOpcion=4%7C0>

Srivastava, L. M. (2002). Plant growth and development. Recuperado el 25 de abril de 2023, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780126605709501477?via%3DiHub>

Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4(4), 616–625.

Suárez Padrón, I. E. (2020). Cultivo de tejidos vegetales. Recuperado el 7 de abril del 2023, de <https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/2553/Libro%20Cultivo%20de%20Tejidos%20Vegetales%20Edici%3%b3n%2003-03-2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sworn, G. (2009). Cap. 6 Gellan gum. En O Philips G., Williams P. A. (Eds.). *Handbook of hydrocolloids*. (pp. 204–227).

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Recuperado el 28 de abril de 2023, de <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FisiologiaVegetalVolumenII%20espanhol.pdf>

Thorpe, T. A. (2007). History of Plant Tissue Culture. *Molecular biotechnology*, 37(2), 169–180.

Valenzuela Apodaca, E. A. (2019). Variación en la tolerancia al daño mecánico foliar y resistencia contra herbívoros en chiles domesticados y su pariente silvestre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

Valle Gouch, R. E. (2015). Análisis de la expresión de genes tipo *wox* en la embriogénesis de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Vásquez Dávila, M. A., Aguilar Meléndez, A., Katz, E., & Manzanero Medina, G. I. (2018). Chiles en México, historias, culturas y ambientes. Recuperado el 13 de marzo de 2023, de <https://libros.uv.mx/index.php/UV/catalog/download/FC316/1626/2585-1?inline=1>

Vibrans, H. (2009). *Solanaceae Capsicum annuum* L. Chile piquín. Malezas de México. Recuperado el 2 de mayo de 2023, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/capsicum-annuum/fichas/ficha.htm>

Vico, S. (2017). Factores abióticos que afectan la biosíntesis de ácido indolacético en bacterias endófitas de maíz. Tesis de licenciatura. Universidad de la República de Uruguay.

Villalon-Mendoza, H., Medina-Martinez, T., Ramirez-Meraz, M., Urbina, S. E. S., & Maiti, R. (2014). Factors influencing the price of Chile piquin wild chili (*Capsicum annuum* l. var. *glabriusculum*) of North-East Mexico. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*, 5(1), 128.

Villatoro Galdamez, E. D. (2014). Efecto de la citoquinina (cppu) sobre el cuaje y rendimiento de mini sandía (*Cytrullus lannatus*, *Cucurbitaceae*); *Estanzuela, Zacapa*. Tesis de licenciatura. Universidad Rafael Landívar.

Villegas Panduro, P. P., Alarcón Castillo, T., & Rodríguez Oré, M. E. (2021). Effect of different concentrations of benzylaminopurine on the micropropagation of two varieties of native chili (*Capsicum chinense Jacq.*) In pucallpa. *Folia Amazonica*, 30(1), 15–25.

Wampash Najamtai, G. B., Nieves Nieves, G. R., & Barriga Castillo, F. M. (2011). Implementación, adecuación y valoración de un sistema de climatizado, para el área de incubación del laboratorio de micropropagación del campus Juan Lunardi Cantón Caute, provincia del Azuay. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana.

Zapata Castillo, Y. P. (2005). Estudio sobre la morfogénesis *in vitro* del chile habanero (*Capsicum chinense Jacq.*). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.