

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

ESCUELA DE BIOLOGIA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INFLUENCIA DEL TIPO DE EXPLANTE EN
LA INDUCCION DE BROTES EN TEJIDOS
DE CHILE (Capsicum annum).
L. CULTIVADOS in vitro.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
ARTURO ZAVALA CONSTANTINI
GUADALAJARA, JALISCO 1987.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	5
ANTECEDENTES.....	6
MATERIALES Y METODOS.....	26
RESULTADOS.....	31
DISCUSION.....	41
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	47
APENDICE.....	52

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.-

Respuesta de 5 diferentes fuentes de explante incubados en medio de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de hormonas.....

Pág. 35

CUADRO 2.-

Respuesta del explante para cada una de las concentraciones de hormonas..

Pág. 36

INDICE DE TABLAS

- TABLA 1. *Constituyentes del medio básico de Murashige y Skoog (1962) (MS)..... Pág. 28*
- TABLA 2. *Distribución del experimento en un diseño de parcelas divididas..... Pág. 32*
- TABLA 3. *Análisis de varianza para parcelas divididas Pág. 34*

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.- Respuesta de segmento de hipocotilo de chile (C. annuum; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el medio 1 (1 mg/l AIA + 2 mg/l BA) a las 4 semanas de incubación..... Pág. 38
- FIGURA 2.- Respuesta de explante de cotiledón de chile (C. annuum; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el medio 1 (1 mg/l AIA + 2 mg/l BA) a las 4 semanas de incubación..... Pág. 38
- FIGURA 3.- Respuesta de explante de hoja de 40 días de edad germinada in vitro de chile (C. annuum; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el medio 5 (2.19 mg/l AIA + 10.16 mg/l 2iP) a las 4 semanas de incubación..... Pág. 39
- FIGURA 4.- Respuesta de explante de hoja de 40 días de edad germinada en invernadero de chile (C. annuum; tipo pasilla var. Salvatierra) en el medio 5 (2.19 mg/l AIA + 10.16 mg/l 2iP) a las 4 semanas de incubación..... Pág. 39
- FIGURA 5.- Respuesta de explante de hoja de 80 días de edad de chile (C. annuum; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el medio 1 (1mg/l AIA + 2 mg/l BA) a las 4 semanas de incubación..... Pág. 40
- FIGURA 6.- Explante de fruto de chile (C. annuum; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el que se observó la baja respuesta que presentaron los explantes al incubarse en los 6 diferentes medios durante 4 semanas..... Pág. 40

RESUMEN.

En el presente trabajo se estudió la respuesta de diferentes tejidos de plantas de Chile pasilla *C. annuum* variedad comercial Salvatierra en relación a la inducción de brotes adventicios, en 6 diferentes medios de cultivo conteniendo distintas combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas).

Los tipos de explante que se evaluaron fueron: cotiledón e hipocotilo de plántulas de 28 días de edad y hojas de plantas de 40 días obtenidas a partir de semillas germinadas en condiciones asépticas. También se utilizaron explantes de hoja de 40 días de edad y 80 días de edad mantenidos en invernadero, y explantes de fruto de 6, 12 y 25 cm de longitud.

La auxina utilizada fue el ácido indolacético (AIA) y las citocininas fueron: benziladenina (BA) y 2-isopenteniladenina (2iP) en las siguientes combinaciones:

Medio 1	1 mg/l de AIA + 2mg/l de BA
Medio 2	2.19 mg/l de AIA + 11.26 mg/l de BA
Medio 3	4.38 mg/l de AIA + 11.26 mg/l de BA
Medio 4	8.76 mg/l de AIA + 11.26 mg/l de BA
Medio 5	2.19 mg/l de AIA + 10.16 mg/l de 2iP
Medio 6	4.38 mg/l de AIA + 10.16 mg/l de 2iP

Los diferentes tipos de explante se inocularon en condiciones asépticas en estos medios de cultivo y se incubaron-

en un cuarto de crecimiento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, y luz continua durante 4 semanas.

El diseño experimental utilizado fue por parcelas divididas en el que la parcela grande fue el tipo de explante, la parcela chica el medio de cultivo y la variable analizada fue la inducción de brotes.

Los explantes de hoja de plantas de 40 días obtenidas - en condiciones asépticas fueron los que tuvieron mayor inducción de brotes.

Los explantes de cotiledón e hipocotilo tuvieron buena respuesta en general. En los explantes de hoja de 80 días la inducción fue pobre y en los de fruto en las tres tallas analizadas la respuesta fue nula.

El medio en que se tuvo el mayor índice de respuesta en los diferentes tejidos fue el que contenía 2.19 mg/l de AIA + 10.16 mg/l de 2iP.

INTRODUCCION.

Uno de los más importantes cultivos en México es el del chile (Capsicum sp), pues es el país en que tiene mayor consumo, ya sea como alimento directo o procesado como producto industrializado. Es evidente la importancia económica de este cultivo por la amplitud de distribución y usos que presenta. Después del descubrimiento de América, el género Capsicum se extendió rápidamente por África, Asia y Europa convirtiéndose en un cultivo de distribución e importancia mundial.

Existen diversos problemas que afectan de una seria manera al cultivo del chile, desde el punto de vista agronómico y en la tecnología de producción. Las variedades comerciales de chiles picantes son de bajo rendimiento y mala calidad debido a la gran mezcla de subtipos, variación morfológica y diversidad de frutos, lo cual disminuye la aceptación comercial e industrial del producto. Otro de los problemas que presenta este cultivo es la alta susceptibilidad a enfermedades importantes a nivel nacional como la marchitez del chile causada por Phytophthora capsici L, y las virosis que puede disminuir la cosecha hasta un 40%; existen también problemas causados por el ataque de plagas como el barrenillo del chile (Anthonomus eugenii Cano) y por el pulgón verde (Myzus persicae Sulzer) que en algunos casos significan la pérdida total de la cosecha (21).

Se ha tratado de establecer programas que den solución a esta serie de problemas; sin embargo, aún existe carencia - de variedades resistentes al ataque de plagas y enfermedades, así como cultivares con un rango amplio de adaptación a las - diferentes condiciones prevalecientes en el país [21].

Si se toman en cuenta todas estas limitaciones es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para mejorar genéticamente este cultivo; para esto, puede considerarse de una - gran utilidad al cultivo de tejidos. De esta manera fueron - realizados algunos estudios con líneas celulares en Nicotiana sylvestris y Capsicum annuum por Dix y Street, seleccionándolas en medios de cultivo conteniendo cloruro de sodio y observaron que eran capaces de crecer en un medio líquido que contenía 1 y 2% de esa sal. Las líneas celulares resistentes retuvieron su carácter aún después de varios subcultivos en medio carente de sal, con lo que demostraron tener estabilidad genética del carácter seleccionado [5]. Estos mismo investigadores en 1976 aislaron líneas celulares tolerantes al -- frío de las especies citadas anteriormente, y algunas de las células sobrevivientes mostraron resistencia a temperaturas de -3 y 5°C [6]. Estos trabajos se llevaron a cabo debido a la - problemática del cultivo ante la salinidad y las bajas temperaturas; la regeneración de plantas en estos experimentos no se llevo a cabo, por lo que es importante establecer sistemas que permitan obtener plantas a partir de células y tejidos de Chile y así poder aplicar esta tecnología a programas de mejoramiento genético.

Al conjunto de técnicas que permiten el cultivo in vitro de células, tejidos y órganos en forma aséptica, incubados en medios sintéticos y mantenidos en condiciones controladas se le llama cultivo de tejidos. Este constituye una herramienta de alto potencial para el mejoramiento genético y micropropagación de especies de importancia económica; además de permitir el estudio de procesos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos a diferentes niveles de organización celular - [36].

Tomando en cuenta todo lo anterior, se llevo a cabo el presente trabajo para establecer un sistema de inducción de brotes adventicios o partes alreas a partir de diferentes tipos de explante de chile pasilla (Capsicum annuum L) variedad comercial Salvatierra, provenientes de cotiledones, hipocotilos, hojas de cuarenta y ochenta días de edad y frutos de diferentes tallas, para usos posteriores como micropropagación y conservación de germoplasma de esta variedad que presenta características afines a la región del Bajío.

OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo fue el determinar la fuente de explante de chile C. annuum, tipo pasilla, variedad comercial Salvatierra, cultivados in vitro, que presente una mayor inducción de brotes adventicios, al ser incubados en medios de cultivo sintéticos que contengan diferentes concentraciones de hormonas para de esta manera establecer una rela---

ción óptima entre la concentración de hormonas contenida en un medio de cultivo y la fuente de explante; de este modo también se podrá observar la influencia que tiene el tipo de tejido - utilizado, edad del mismo e influencia del medio ambiente en - la inducción de partes aéreas.

De esta manera, al establecerse un sistema óptimo para - la obtención de brotes a partir de explantes, podrá dársele - posteriores usos en micropropagación, conservación de germo-- plasma, etc.

ANTECEDENTES.

En género Capsicum pertenece a la familia Solanaceae, y - todas las especies excepto Capsicum anomalum de Japón son ori- ginarios del Nuevo Mundo.

Debido a la diversidad de formas, tamaños y colores que presenta ha sido difícil situarlo taxonómicamente dentro de - los cuatro géneros cultivables y una de las clasificaciones - más aceptadas en la actualidad es la propuesta por Smith y Hei - ser, aunque hay especies que no encajan completamente en las - tablas propuestas por ellos [15].

Las cinco especies cultivables son:

1.- Capsicum pubescens (16)

lóbulo de corola púrpura; semilla negra; hojas rugosas; hojas y tallo densamente pubescentes.

2.- Capsicum pendulum [16]

Lóbulos de corola blanca o blanco-verdoso, raramente púrpura; semillas de color brillante; hojas angostas; planta lisa o pubescente.

Corolas blanca con amarillo o algunas marcas en la garganta; anteras amarillas.

3.- Capsicum frutescens [16]

Corolas sin marcas en la garganta; anteras de azul brillante a púrpura.

Corola verde blanquecina (o amarillo - blanco), pedicelo solitario o frecuentemente apareado o varios en un nudo.

4.- Capsicum annum [16]

Corolas blanco claro o pardo; rara vez púrpura; pedicelo solitario, rara vez dos en un nudo [16].

5.- Capsicum chinense [2]

Las características para diferenciar a esta especie no son muy claras; Smith y Heiser y Mansfeld lo reconocen como una quinta especie de Capsicum, mientras Hazenbus lo considera como un sinónimo de C. annum, y Jacquin lo relaciona a C. frutescens [2].

Los frutos del género Capsicum tienen un alto contenido en vitamina C. Los frutos maduros contienen entre 150-180 mg/100 g y estando verde de 20 - 25 mg/100 g [16].

El sabor picante en los chiles está dado por la capsaicina ($C_{18}H_{27}NO_8$), que es un compuesto fenólico volátil. La capsaicina se encuentra en la placenta del fruto y esta determinada por un factor genético de dominancia simple. El número cromosómico de la especie es $n=12$ y se desconoce que exista poliploidia natural aunque si se ha inducido mediante el tratamiento con colchicina [16].

En México el chile se cultiva y usa como alimento en la dieta diaria de la población desde tiempos precolombinos. El maíz, el frijol, las calabazas y el chile fueron la base de la alimentación de las culturas que poblaron mesoamérica.

A esta región se le considera como uno de los principales centros de domesticación del género Capsicum, en particular de la especie C. annuum, que es la que más se cultiva en México. En el país se cultivan diferentes tipos que tienen forma, tamaño, color y sabor muy diversos [16].

Dada la gran diversidad de tipos de chiles cultivados y silvestres que hay en México y los múltiples usos que se les da a los frutos, ya sea como alimento directo o procesados en salsas, polvo o encurtido, la importancia económica de este cultivo es evidente. El chile se cultiva desde el nivel del mar en las costas del Golfo de México y del Pacífico, hasta los 2500 m en la meseta central, cubriendo diferentes características ecológicas. Sin embargo, se pueden diferenciar regiones especializadas en la producción comercial de ciertos tipos

de Chile, tales como la región del Golfo de México donde se -- cultivan serranos y jalapeños; la región del Bajío donde se -- cultivan anchos, mulatos y pasillas; la región de la Mesa Central donde se cultivan poblanos, mihuatecos y carricillos; la región del Pacífico Norte en donde se cultivan los chiles de -- exportación como dulce o bell, anaheim, caribe y fresco [21].

De las principales enfermedades a nivel nacional que ata -- can al cultivo de Chile están las virosis y la marchitez del -- Chile causada por Phytophthora capsici L., que disminuye los -- rendimientos de la cosecha hasta un 40%. Existen también los -- problemas causados por el ataque de plaga como el barrenillo -- del Chile Anthonomus eugeni Cano y por el pulgón verde Myzus persicae Sulzer, que en algunos casos es tan grave que lleva -- a la pérdida total de la cosecha [21].

En los últimos años, se ha venido desarrollando un pro -- grama nacional de investigación del Chile por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, en el cual se trabaja con los tipos de esta planta que tienen mayor importancia económica en México.

Una de las más importantes líneas en ese programa es la relacionada con la colección de germoplasma para conservar la variabilidad genética existente en el país, para su posterior uso en los programas de mejoramiento genético. Dentro del fitomejoramiento de este cultivo reviste especial interés la -- obtención de nuevas variedades o híbridos que sean más produc

tivos, que presenten mayor adaptabilidad a las diferentes condiciones ambientales de nuestro país, y que sean más resistentes a enfermedades y plagas. Se han utilizado en el INTA las técnicas tradicionales para estos fines. Sin embargo, con la técnica de cultivo de tejidos in vitro, se abren nuevas perspectivas para el mejoramiento genético de ese cultivo [21].

El material biológico utilizado en este proyecto fue obtenido por el CIAB (Centro de Investigaciones Agrícolas del Bajío), en Celaya, Gto. El nombre común es chile pasilla variedad comercial Salvatierra; el nombre científico es Capsicum annum var (ssp) longum. Se seleccionó esta variedad para el presente estudio por presentar características agronómicas y económicas favorables para su cultivo en la zona del Bajío tales como floración a los 65 días del trasplante, cosecha en verde a los 110 días y 162 días para cosecha de seco. Presenta un hábito erecto, con una altura promedio de 52.30 cm con un fotoperíodo de día corto. Los frutos verdes se utilizan como hortaliza y seco como condimento. Tiene un rendimiento de 15.94 toneladas por hectárea en verde y 2.12 toneladas por hectárea en seco, presenta resistencia a la marchitez del chile causada por Phytophthora capsici; con una incidencia máxima del 12% y se recomienda esta variedad a climas templados después de las heladas, en la costa del Pacífico en invierno, en general a una temperatura media menor a los 30 grados centígrados (Salinas, R., comunicación personal).

Caracteres morfológicos de la variedad:

a).- Raíz.- Pivotante, con un desarrollo longitudinal de 50.90 cm y una profundidad de 70 a 120 cm.

b).- Tallo.- [Subterráneo y/o aéreo]. El tallo es erecto con ramificación dicotómica; la primera bifurcación se tiene a una altura de 11 a 20 cm del suelo con un valor promedio de 16.8 cm. El grosor promedio del tallo es de 1.34 cm, con una variación de 1.1 a 1.9 cm las ramas secundarias presentan un grosor promedio de 0.72 cm con una variación de 0.5 a 1.2 cm.

c).- Hojas.- Las hojas son ovaladas y oblongas, color verde oscuro.

d).- Inflorescencia y flores.- Las flores son solitarias de color blanco con manchas púrpura o morada en la punta de los pétalos.

e).- Semilla.- La semilla es plana de color crema con un peso promedio de 1000 semillas de 9.17 g.

f).- Fruto.- El fruto es de forma elongada de 2 lóculos y cáliz envolvente, de color verde oscuro en fresco y café oscuro en seco; el pedicelo es de 3.5 cm promedio, el ancho del fruto es de 2.7 cm promedio y la longitud media del fruto es de 22 cm variando de 18 a 26 cm. El peso promedio es de 73 g, el grosor medio de cutícula es de 0.18 cm y el número promedio de semillas por fruto es de 182.

Las características de calidad de consumo son el tamaño de fruto grande, el grosor de la pared para secar bien y dar resistencia al fruto durante el manejo, embalse y transporte. Así como un alto contenido de capsaicina (Salinas, R., comunicación personal).

El cultivo de tejidos es un término amplio que se refiere al cultivo de células, tejidos u órganos, en medios sintéticos y en condiciones asepticas y controladas.

La regeneración de plantas a partir de células o tejidos es una etapa básica cuando se quiere utilizar el cultivo de tejidos como una técnica para el mejoramiento genético de cualquier especie vegetal. La inducción de diferenciación, la formación de órganos y la regeneración de plantas completas por cultivo de tejidos, está determinada principalmente por la constitución genética del material vegetal empleado y por las condiciones del medio ambiente como son el medio de cultivo, temperatura, presión osmótica, luz, etc. [26]

Pueden ser cultivados in vitro células individuales, tejidos (segmentos de tallo, de raíz, hoja, pecíolo, inflorescencias, etc.) y órganos. (Apices, meristemas, embriones, anteras, etc.). Estos pueden crecer y formar callos (que es una masa celular amorfa que no tiene diferenciación ni especialización bien definida) o alternativamente pueden formar órganos que no se encontraban presentes inicialmente (partes aéreas, raíces, flores, etc.) e inclusive pueden llegar a regenerar plantas

completas [25].

Los requerimientos nutricionales para lograr un buen crecimiento pueden variar según la especie o la fuente de explante utilizada, y éstos están dados por los medios de cultivo - que están constituidos por sales inorgánicas (macro y microelementos), vitaminas, reguladores de crecimiento y una fuente de carbón. El medio de cultivo más frecuentemente utilizado es el formulado por Murashige y Skoog [21] a través de los resultados de experimentos llevados a cabo con Nicotiana tabacum [23].

DIFERENCIACION Y MORFOGENESIS.

"Una célula totipotente es aquella que puede por divisiones sucesivas dar origen a un organismo multicelular completo" definió T.H. Morgan en 1901 In [7] y a partir de entonces podemos definir como diferenciación al cambio progresivo del tejido meristemático, estructuralmente simple, a tejidos complejos y combinaciones de datos en las plantas adultas. De acuerdo a las funciones celulares, de tejido u órganos de una planta podemos hablar de una especialización y de la misma manera de grado de diferenciación [7].

Morfogénesis es el fenómeno de formación de órganos de novo o embrioides a partir de células, tejidos u órganos. La inducción de morfogénesis depende del estado fisiológico de la planta donadora, del tipo de tejido, y del medio ambiente donde se incuba el material vegetal (medio de cultivo sintético y factores físicos como luz, temperatura, humedad). El primer --

Éxito en el cultivo de tejidos fue conseguido por White en --- 1934 In. (7) con la demostración del crecimiento ilimitado de segmentos de raíz de tomate. El mismo White plantea dos problemas principales para el cultivo de tejidos in vitro: a) es necesario escoger el material vegetal apropiado, y b) se requiere la formulación de un medio de cultivo satisfactorio. Durante el cultivo de las raíces encontró problemas relacionados - con la nutrición orgánica (7).

Existen algunos factores que influyen en la morfogéne--- sis in vitro como:

- a) Combinación, concentración y tipo de reguladores de crecimiento.
- b) Cambios en la proporción de macro y micronutrientes.
- c) Compuestos orgánicos: vitaminas, carbohidratos, etc.
- d) Luz: iluminación. irradiancia y fotoperiodo.
- e) temperatura
- f) pH
- g) Forma del recipiente usado en el cultivo.
- h) Intercambio gaseoso
- i) Estado fisiológico del explante
- j) Tipo de explante
- k) Genotipo

REGULADORES DE CRECIMIENTO

Existen algunas sustancias de bajo peso molecular que inducen las respuestas morfogenéticas en cultivos de células, tejididos u órganos, llamadas reguladoras de crecimiento. Estos compuestos incluyen a las auxinas, giberelinas y citocininas.

La definición de reguladores de crecimiento fue dada por el comité de científicos de las plantas en 1954 de la siguiente manera:

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos diferentes a los nutrientes que en pequeñas concentraciones - promueven, inhiben o modifican los procesos fisiológicos de - las plantas.

Las hormonas vegetales son compuestos producidos por las plantas, que en bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de las plantas.

El término regulador de crecimiento de acuerdo a la definición del Comité incluye sustancias naturales o sintéticas -- que pueden promover o inhibir el crecimiento o la división celular.

Flick y colaboradores plantearon que de los componentes del medio de cultivo, los que probablemente juegan el papel -- más importante en la formación de estructuras organizadas como tallos, hojas y raíces (morfogénesis) son los reguladores de - crecimiento (10).

Podemos llamar hormonas a las auxinas, giberelinas, citocininas, abscisinas y al etileno.

Auxina es el nombre genérico que se da a los compuestos que se caracterizan por su capacidad para inducir la elongación celular. Las auxinas son generalmente ácidos con un ciclo insaturado en sus derivados [29].

Muchos de los tejidos normales requieren de auxinas para su crecimiento en cultivo y los medios usados contienen algunas de estas auxinas como el ácido indolacético, ácido naftalenoacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético o ácido para-clorofenoxiacético [40].

Algunos autores opinan que las auxinas actúan específicamente en la fase G1, otros han llegado a la conclusión, de que no hay un sitio específico en la acción de las auxinas en el ciclo mitótico según [Lensel]. In [40] Esta contradicción puede ser debido a que en muchos cultivos la auxina no es solamente necesaria para la división celular sino también para la viabilidad de la célula.

Las citocininas son sustancias que inducen la división celular dentro del cultivo de tejidos vegetales. Skoog observó que los cultivos de tallo, células medulares y callos de tabaco, ocasionalmente formaban brotes. Estudios posteriores revelaron que una sustancia presente en el ADN calentado, inducía la división celular en explantes de tallo de plantas de tabaco

y aumentaba la formación de brotes. Esa sustancia (1-furfuriladenina) fue llamada cinetina y la clase de sustancias que inducen a la división celular fueron llamadas citocininas entre las que podemos citar a la benciladenina, isopenteniladenina, etc. (40)

El éxito de varias técnicas de cultivos in vitro de células, tejidos u órganos de plantas superiores depende de la regeneración de plantas completas a partir de ellas. Algunas especies como el tabaco y la zanahoria pueden ser completamente explotadas in vitro por su alta capacidad de regeneración.

Se ha llegado a determinar en los últimos años que a través de la regeneración de plantas en cultivos in vitro una gran reserva de variabilidad genética está disponible. En muchas especies cultivables la variabilidad genética ha sido reducida por cultivos extensivos de un número limitado de variedades cultivables. El cultivo in vitro probablemente genere nuevas fuentes para la selección de nuevas variedades de diferentes especies vegetales.

Los miembros de las solanáceas han sido utilizadas como modelos para estudios in vitro. La totipotencia fue primero demostrada en Nicotiana tabacum de cuyas células simples se regeneraron plantas completas in vitro (71).

El primer reporte sobre la formación de brotes in vitro fue dado por White en 1939 (7), quien observó la presencia de

callos de un híbrido de Nicotiana glauca y Nicotiana langsdorffii en medio de cultivo líquido. Nobecourt (7) reportó también en 1939 la inducción de raíces a partir de callos de zanahorias; y en 1944, Skoog (7) confirma estos reportes y plantea que las auxinas podían estimular la formación de raíces.

En 1957 Skoog y Miller (7), basados en el descubrimiento de la cinetina, llevaron a cabo estudios con Nicotiana tabacum utilizando diferentes combinaciones de auxina-citocinina en el medio de cultivo, y propusieron la existencia de un mecanismo básico regulador implicado en la organogénesis que involucra un balance entre ambos reguladores de crecimiento, y concluyeron que se requería de una concentración mayor de citocinina respecto a la concentración de auxina, para la formación de brotes, lo que les llevó a pensar que las interacciones cuantitativas entre ambos factores de crecimiento proveían un mecanismo común para la regulación de todos los procesos morfológicos en plantas. Tales estudios permitieron aumentar el número de especies que formaran órganos in vitro (7).

El aislamiento de explantes de tejidos de plantas superiores llevadas a cultivo requieren de un medio nutritivo consistente en una mezcla de sales inorgánicas, fuente de carbono (usualmente sacarosa) y vitaminas. Además se requiere la presencia de fitohormonas (auxinas y citocininas) para iniciar y mantener la división celular (6).

El explante es un pedazo de tejido u órgano el cual es extraído de la planta para propósitos de cultivo. El éxito del cultivo de explantes se ve afectado por un número de factores inherentes al explante como lo es el genotipo del explante, el tamaño del explante, su edad fisiológica y la fuente de tejidos u órganos de la planta [1].

En Nicotiana es posible inducir la regeneración de brotes a partir de tallo mediante combinaciones de auxinas y cito cininas en concentraciones de 11.4 micromolar de ácido indolacético y de 46.5 a 66.5 micromolar de cinetina [27].

Collin et al. plantea que las especies de petunia pueden también ser fácilmente manejadas in vitro. De cualquier forma casi toda la información de estas especies se refiere a la regeneración de plantas a partir de protoplastos [células sin pared celular]. Todas ellas se han cultivado en medio MS y se usa tallo u hojas para la regeneración de plantas. La regeneración de brotes ha sido evidente cuando se reduce la concentración de auxina y simultáneamente se incrementa la de citocinina [4].

Los tejidos que exhiben competencia morfológica en una taxa quizá no sean de igual manera competentes en otro taxa. -- Bulbos, hojas, tallos de inflorescencias, y ovarios de 20 especies de monocotiledóneas fueron usadas como fuentes de explante por Hyssey. Mientras que las plantas fueron obtenidas por -

explantes de cuatro especies de Liliaceae, sólo bulbos y tallos de inflorescencias fueron productivos en Iridaceae y Amarillidaceae. La variación en respuestas de explantes entre especies de la misma familia fue también observada, los explantes de Hyacinthus, Muscari, Ornithogallum y Scilla, de la familia Liliaceae produjeron plántulas y callos cuando se cultivaron, pero Tulipa no tuvo producción ni de callos ni de plántulas (18).

Kartha, y colaboradores cultivaron explantes de hoja de Lycopersicon esculentum en medio básico MS con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas y determinaron que las diferentes concentraciones de AIA con BA resultaron ser las más efectivas en la inducción de brotes a partir de los explantes. Se utilizaron también ANA/BA, cinetina y zeatina (19).

En 1978 Tran Than Van y asociados lograron regenerar brotes de algunas especies de Nicotiana utilizando numerosas combinaciones de reguladores de crecimiento. Hasta la fecha la inducción de brotes a partir de callos se ha reportado para 19 especies de Nicotiana. Estos brotes se han obtenido aproximadamente a las 3 semanas y han sido multiplicados cultivándolos en medio básico MS con 5 micromolar de BAP. La inducción de raíces en este género se ha obtenido en el medio MS diluido a la mitad de su concentración de sales minerales y suplementado con 25-75 micromolar de 3 - aminopiridina (34).

En los estudios hechos por Banerjee y Gupta se observó que el grado de determinación varía de un tipo de células a

otras. Las células con menor grado de determinación contienen un grado de habilidad morfogénica, los callos derivados de -- raíces de Nigella sativa produjeron solamente raíces; mientras que los callos derivados de tejido de tallo y hoja sólo produjeron brotes [3].

Gunay y Rao hicieron un estudio en el que trabajaron con explantes de cotiledón e hipocotilo de tres variedades de - - Capsicum de plántulas obtenidas in vitro y utilizando diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas, La regeneración de brotes del tallo fue lograda con el medio basal [MS] suplementado con el ácido indolacético y benziladenina. Los brotes de tallo regenerados después de un tiempo desarrollaron raíces en el mismo medio, y dieron origen a plantas completas que -- eventualmente se plantaron en suelo [4].¹¹

Como una regla general los explantes muy pequeños tienen un bajo rango de supervivencia. En cultivos con clavel hechos por Gukasyan et al, los brotes de 0.09 mm fueron incapaces de tener morfogénesis, de 0.2 tuvieron poco crecimiento, mientras que los segmentos de 0.35 mm produjeron el más alto número de brotes normales, y cuando se utilizaron explantes de más de 5 mm el crecimiento descendió probablemente por la presencia de tejido subapical [13].

Herman y Haas, trabajaron con explantes de hoja de Lycopersicon esculentum obteniendo brotes y hojas después de repetidos subcultivos. Determinaron que los brotes y formación de

hojas son derivadas de un tejido previamente diferenciado y no de los callos (17).

Wang y Ma examinaron explantes de Crysanthemum y determinaron que los tallos propicios para la inducción de brotes es entre 0.2 y 0.5 mm, para brotes meristemáticos entre 0.1 y 0.2 mm. Los explantes más largos de 0.5 a 1.55 mm de longitud produjeron bastantes brotes (37).

En otras especies de Solanáceas se ha tenido regeneración de plantas a través de organogénesis. En cada caso la inducción de callos se ha observado en una relación auxina: citoquinina menor a 1, mientras que para la regeneración de brotes la relación de auxina: citoquinina fue mayor a 1. Esto se observó en 38 de 42 especies de Solanáceas que se cultivaron en medio MS entre las cuales está Capsicum annuum: se utilizó para formación de brotes una concentración de 4.4 a 8.9 de BA y de 0 a 5.7 de ATA en el medio MS con explantes de cotiledón e hipocotilo (15).

Phillips y Hubstenberger usaron diferentes fuentes de explante de los cultivares California Wonder, Yolo Wonder, New Mexico 6-4 y Numex R. Naky inoculándolos en el medio MS suplementado con auxinas, citoquininas y combinaciones de ambas. El medio conteniendo 0.05 mg/l de ATA y de BA promovió la elongación de brotes y raíces de algunas fuentes de explantes. Concentraciones de 0.05 -4 mg/l de ATA con 10-50 mg/l de BA indujeron la formación de brotes adventicios. Mencionan también -

que la glucosa fue mejor que la sacarosa como fuente de carbono. Los discos de hoja de las plantas de invernadero regeneraron brotes a los 2 meses. Las condiciones de incubación, la fuente de carbono y los tratamientos con reguladores de crecimiento no fueron variables independientes desde el punto de vista estadístico (28).

Gunay y Rao trabajaron con explantes de hipocotilo y cotiledón de plántulas de tomate de cuatro semanas de edad que fueron cultivados en medio MS modificado y suplementado con AIA, ANA, BA y cinetina. Las combinaciones de AIA y BA; y AIA; cinetina indujeron regeneración de brotes. En los cultivos de cotiledón se observó formación de raíces en presencia de AIA. Los explantes de hipocotilo mostraron raíces, brotes y callos en presencia de AIA (14).

Los tejidos difieren en su grado de determinación y en su habilidad de morfogénesis. Takayama y Misawa examinaron la habilidad de diferentes explantes de Lilium auratum y Lilium - espaciosum para producir bulbos in vitro. Los explantes fueron obtenidos de hojas, pedúnculos, escamas de bulbo, pétalos, anteras, y de escamas de bulbo obtenidos en cultivo. Los explantes de estambre y anteras produjeron bulbos o raíces; los explantes de hoja no sobrevivieron a las condiciones de cultivo. El 53% de explantes de pedúnculo, el 75% de explantes de pétalo, y el 95% de explantes de escama de bulbo dieron lugar a bulbos. Los explantes provenientes de escamas de bulbo en cul-

tivo produjeron un 100% de bulbo (33).

Scorza y Janick realizaron estudios sobre la influencia de la edad del tejido y observaron que de las hojas jóvenes de Passiflora suberosa se produjeron flores en más altas frecuencias que en los explantes provenientes de hojas de más edad (32).

En papa (Solanum tuberosum) la inducción de brotes se observó en explantes de tallo o en callos cuando se substituyó el 2,4-D por 4.7 a 46.5 micromolar de cinetina,

Para jitomate el medio generalmente usado es el Murashige-Skoog en especies de Lycopersicon en particular con L. esculentum. Para la inducción de brotes en este caso la relación auxina: citocinina parece ser más importante que el tipo de reguladores utilizados (27).

Locy trabajó con 6 especies diferentes de tomate y observó que el crecimiento de callos era mayor en explantes de tallo que los de hipocotilo, particularmente en medios que contienen de 3 a 10 mg por litro de ácido indolacético. No observó un crecimiento apreciable en medios que contengan menos de 0.3 mg por litro de la auxina. La formación de partes aéreas se incrementó al aumentar la concentración de cinetina para todas las especies, y las concentraciones óptimas de ácido indolacético fueron de 3 a 10 mg por litro. La formación de brotes fue superior en hipocotilo que en tallos y se observó mejor res--

puesta en explantes jóvenes que maduros [22].

Se determinó la influencia del tipo de explante y el medio ambiente de la planta donadora en la capacidad de formar brotes de tallo en 8 genotipos de L. esculentum. Este estudio lo realizaron Franckenberger y colaboradores. Los genotipos se clasificaron de bajo a alto en función de la capacidad de formar brotes a partir de explantes y se observó que la respuesta en los ocho genotipos decrece su formación de brotes en el período comprendido de otoño a primavera en los cultivos en invernadero. Se evaluó también la capacidad de formación de brotes tomando explantes de plántulas cultivadas en invernadero e in vitro, así como comparación de explantes de hipocotilo y cotiledón, resultando de mejor calidad las plántulas cultivadas in vitro y los explantes de cotiledón [11].

Estudios realizados por Farì y Czako, utilizando explantes de hipocotilo de Capsicum annuum cultivados en medio MS -- con 2 mg por litro de benziladenina y 1 mg por litro de ATA -- observaron que los segmentos respondieron de una manera diferente en el medio de acuerdo a su localización; los explantes de la región apical del hipocotilo produjo solamente brotes. -- los segmentos intermedios formaron principalmente raíces y los segmentos de la sección basal desarrollaron callos. Los segmentos de hipocotilo que produjeron brotes fueron subsecuentemente enraizados y algunos de ellos desarrollaron plantas normales [9].

MATERIALES Y METODOS

El material biológico utilizado fue chile pasilla variedad comercial Salvatierra, y fue obtenido en el Centro de Investigaciones Agrícolas del Bajío (INIFAP) en Celaya, Gto.

Como fuente de explante se utilizaron plántulas obtenidas por germinación en medio de cultivo sintético y en condiciones asépticas, o de plantas obtenidas por siembra de semillas en suelo y mantenidas en invernadero. La semilla fue esterilizada de la siguiente manera: se lavó con agua destilada durante una hora, agitando con una varilla de vidrio y cambiando el agua continuamente hasta eliminar turbidez. Se esterilizaron 5 g de semilla de chile pasilla C. annuum variedad comercial Salvatierra en condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar.

Dentro de la campana de flujo las semillas fueron colocadas en etanol al 96% durante 1 minuto. Después de decantar el alcohol, las semillas se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralox) al 20% (v/v), que contiene 0.1% de Tween 20, y ahí permanecieron durante 20 minutos en agitación. Por último, las semillas se lavaron por filtración con 700 ml de agua estéril en un embudo Buchner previamente esterilizado.

Se inocularon aproximadamente 30 semillas por frasco conteniendo 40 ml del medio básico (MS) de Murashige-Skoog [20] -

[Tabla 1] previamente esterilizado a 120°C durante 20 min, y se incubaron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 25± 2°C e iluminación continua [lámparas fluorescentes luz de día; 1500 luxes].

Los tipos de explante con los que se trabajó fueron: cotiledón e hipocotilo provenientes de plántulas de 28 días de edad obtenidas a partir de semillas germinadas en condiciones asépticas y controladas; hojas verdaderas de plantas de 40 días obtenidas en condiciones asépticas y también de plantas de 40 y 80 días de edad mantenidas en invernadero, y explantes de fruto de 6, 12 y 25 cm de longitud de plantas de 125 días de edad.

Los explantes de cotiledón, hipocotilo y hoja de plantas de 40 días de edad provenientes de plantas asépticas no tuvieron que ser sometidas a ningún tratamiento de esterilización, pero las hojas de 40 y 80 días de plantas de invernadero al igual que los frutos tuvieron que ser sometidos a un proceso de esterilización el cual consistió en lavar las hojas o frutos con agua y detergente perfectamente hasta eliminar residuos de tierra o lodo; las hojas después se lavaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% (v/v) y 0.1% de Tween 20 durante 20 minutos, para después lavarse perfectamente con agua destilada estéril. Para esterilizar los frutos, éstos se sometieron a un tratamiento con hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 30% (v/v) y 0.1 de Tween 20 durante 30

Tabla 1. Constituyentes del medio básico de Murashige y Skoog (1962)

<u>Micronutrientes.</u>	mg/l
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
<u>Micronutrientes.</u>	
KI	0.83
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	8.6
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.25
Na_2EDTA	37.3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
<u>Constituyentes orgánicos.</u>	
Sacarosa	30,000
Inositol	100
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina. HCl	0.5
Tiamina. HCl	0.1
Glicina	2.0

minutos, después se lavaron también perfectamente con agua destilada estéril.

El tamaño de los explantes fue aproximadamente de 1 cm - de longitud en el caso de los hipocotilos y de 1 cm cuadrado - para los demás tipos de explante.

La inoculación de explantes se llevó a cabo en condiciones asépticas proporcionada por una campana de flujo laminar, - en frascos de 100 ml conteniendo 20 ml de medio MS con 6 diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Estas - concentraciones fueron:

Medio	ATA (mg/l)	BA (mg/l)	2iP (mg/l)
1	1	2	-
2	2.19	11.26	-
3	4.38	11.26	-
4	8.76	11.26	-
5	2.19	-	10.16
6	4.38	-	10.16

ATA: Acido indolacético

BA: Benciladenina

2iP: 2- isopenteniladenina

El medio 1 es el establecido por GUNAV y RAO (14). Los - medios 2-6 fueron seleccionados como medios inductores de brotes en segmentos de hipocotilo de chile en investigaciones an-

teriores realizadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato (12). Para cada medio se utilizaron 10 frascos conteniendo 2 explantes cada uno.

Después de haberse inoculado, se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con luz constante con lámparas fluorescentes -- luz de día (1500 luxes) y a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cuatro semanas. La evaluación se hizo de acuerdo al grado de formación de brotes en el explante de la siguiente manera:

Tipo de respuesta	Valor
- Necrosis de tejido o respuesta incipiente.	0
- Generación pobre de callo en los bordes del explante.	1
- Formación de callo e inducción pobre de brotes.	2
- Formación de brotes en mayor número y tamaño.	3
- Formación de brotes elongados bien diferenciados.	4

El diseño experimental aplicado para el desarrollo del experimento fue el de parcelas divididas empleando el tipo de explante como la parcela principal, los diferentes medios de cultivo (concentraciones de hormonas) correspondieron a la parcela chica analizándose la inducción de brotes para cada una -


de las interacciones en el experimento. Para este fin, el experimento se distribuyó en el invernadero como se muestra en la Tabla 2. Como se podrá observar, cada unidad experimental constó de cinco frascos con dos explantes cada uno con el objeto de eliminar la variabilidad en respuesta tanto en el tejido como en las condiciones de siembra de éstos explantes, tomando se una media para el análisis en el experimento; resultando ciento cincuenta frascos en cada repetición (5 frascos X 6 medios X 5 explantes). El tamaño global del experimento resultó de novecientos frascos (5 frascos X 6 medios X 5 explantes X 6 repeticiones). Es sumamente importante señalar que el explante de frutos no está considerado en el diseño debido a que pruebas experimentales mostraron que no se inducirla ningún tipo de respuesta en este tejido. Los datos obtenidos en el experimento se muestran en el Apéndice 1, donde se indican las medias obtenidas para cada unidad experimental.

RESULTADOS

La importancia de la presente investigación nos condujo a valorar nuestro trabajo de una forma real, poniendo énfasis en la reducción de la variabilidad inherente en el experimento a través del aumento de las observaciones por cada unidad experimental (Apéndice 1). Con los valores obtenidos se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey, (Apéndice II) con lo que se determinó está disticamente que hubo diferencias altamente significativas en

Tabla 2. Distribución del experimento en un diseño de parcelas divididas.

M E D I O S D E C U L T I V O

T I P O D E E X P L A N T E		6	4	2	5	3	
	<i>cotiledón</i>						
		4	5	2	3	6	1
	<i>hipocotilo</i>						
		5	1	3	4	2	6
<i>hoja 40 días i. v.</i>							
	6	2	1	3	5	4	
<i>hoja 40 días inv.</i>							
	2	3	5	6	1	4	
<i>hoja 80 días</i>							

el comportamiento de los diversos tipos de explantes; sin embargo, la respuesta fue sólo significativamente diferente respecto a los medios de cultivo [Tabla 3].

El tipo de explante en el que mayor respuesta se logró fue en el de hoja de 40 días de edad de plantas germinadas en condiciones asépticas, y el punto más alto de inducción de brotes fue en los explantes incubados en el medio 5 (2.19 mg/l de AIA + 10.16 mg/l de 2 iP). La inducción de brotes para explantes de hoja de 40 días de edad germinadas en invernadero tuvo su mayor respuesta en el mismo medio que la anterior, pero en menor proporción. Para hipocotilo, cotiledón y hoja de 80 días de edad no hubo diferencia significativa en la respuesta a los diferentes medios de cultivo, aunque se observó mayor respuesta en el medio 1 (1 mg/l de AIA + 2 mg/l de BA); observándose que el explante de hoja de 80 días de edad tuvo una respuesta muy pobre en comparación con los demás (Cuadro 1).

Analizando la interacción de medio de cultivo-explante, podemos observar que en el medio 1 (1 mg/l de AIA + 2 mg/l de BA) no hubo diferencia significativa en la respuesta de los diferentes explantes (Cuadro 2). Para los medios 2 (2.19 mg/l de AIA + 11.26 mg/l de BA), 3 (4.38 mg/l de AIA + 11.26 mg/l de BA), 4 (8.76 mg/l de AIA + 11.26 mg/l de BA) y 6 (4.38 mg/l de AIA + 10.16 mg/l de 2iP) la respuesta mayor la tuvieron los explantes de hoja de 40 días de edad y la menor respuesta se dio en los explantes de hoja de 80 días de edad. Para el medio 5 (2.19 mg/l de AIA + 10.16 mg/l de 2iP) los explantes que pre

Tabla 3

ANALISIS DE VARIANZA PARA PARCELAS DIVIDIDAS

Parcelas grandes: Tipo de explante				n = 6		
Parcelas chicas: Medio de cultivo				a = 5		
Variable analizada: Inducción de brotes				b = 6		
FUENTES	GRADOS	SUMAS	CUADRADOS	F _a	F _b	
DE	DE	DE				
VARIACION	LIBERTAD	CUADRADOS	MEDIOS	calculadas	tabuladas	
						0.05 0.01
Repeticiones	5	7.45221	1.490442		2.71	4.10
P. grandes	4	46.6034	11.65085	9.999293**	2.87	4.43
Error (a)	20	23.30335	1.165167			
P. chicas	5	1.978088	0.3956177	2.538434*	2.29	3.17
P.g.XP.ch.	20	6.434082	0.3217041	2.064176**	1.65	2.03
Error (b)	125	19.48138	0.1558511			
TOTALES	179	105.2525				

Promedio general: 1.706666

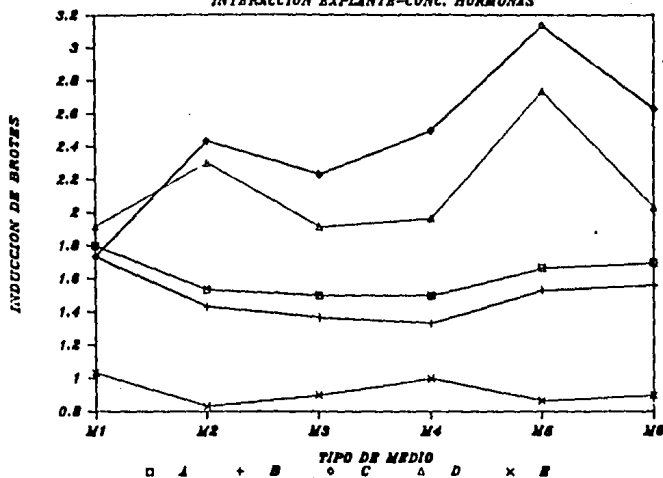
ns = no significativo

Coeficiente de variación (a): 63.24782 * = significativo

Coeficiente de variación (b): 23.13164 ** = altamente significativo

RESPUESTA EXPLANTE-MEDIO DE CULTIVO

INTERACCION EXPLANTE-CONC. HORMONAS



A.- EXPLANTE DE COTILEDON

B.- EXPLANTE DE HIPOCOTILO

C.- EXPLANTE DE HOJA DE 40 DIAS *In vitro*

D.- EXPLANTE DE HOJA DE 40 DIAS INVERNADERO

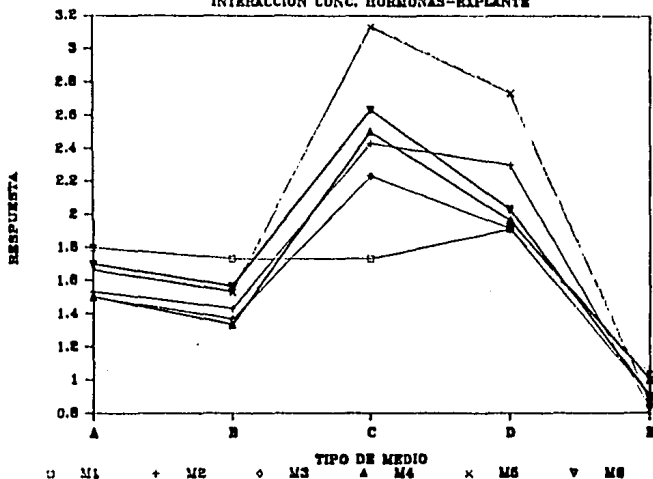
E.- EXPLANTE DE HOJA DE 80 DIAS

CUADRO 1

Respuesta de 5 diferentes fuentes de explante incubados en medio de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de hormonas.

RESPUESTA MEDIO DE CULTIVO-EXPLANTE

INTERACCION CONC. HORMONAS-EXPLANTE



M1. 1mg/l AIA y 2mg/l BA

M2. 2.19mg/l AIA y 11.26mg/l BA

M3. 4.38mg/l AIA y 11.26mg/l BA

M4. 8.76mg/l AIA y 11.26mg/l BA

M5. 2.19mg/l AIA y 10.16mg/l 2iP

M6. 4.38mg/l AIA y 10.16mg/l 2iP

A.- EXPLANTE DE COTILEDON

B.- EXPLANTE DE HIPOCOTILO

C.- EXPLANTE DE HOJA DE 40 DIAS

In vitro

D.- EXPLANTE DE HOJA DE 40 DIAS
INVERNADERO

E.- EXPLANTE DE HOJA DE 80 DIAS

CUADRO 2

Respuesta del explante para cada una de las concentraciones de hormonas.

sentaron mayor inducción de brotes fueron también los provenientes de hojas de 40 días de edad tanto de invernadero como in vitro, siendo significativamente más alta la respuesta en la interacción medio 5-explante de hoja de 40 días de edad provenientes tanto de in vitro como de invernadero.

Analizando estas respuestas (Apéndice 11), es fácil observar que el tipo de explante que mejor respuesta tuvo para todos los medios fue el de hoja de plantas de 40 días de edad obtenidas en condiciones asépticas (Figura 3) o en invernadero (Figura 4), y que incubadas en el medio 5 (2.19 mg/l de AIA + 10.16 mg/l de 2iP) fue donde tuvieron la mayor inducción de brotes. El grado de respuesta en la inducción de brotes de los explantes fue en forma decreciente para cotiledón (Figura 2), hipocotilo (Figura 1) y hojas de 80 días de edad (Figura 5). En el caso de los explantes de fruto de 6, 12 y 25 cm de longitud no se observó inducción de brotes y solo se formaron calllos en los bordes, apreciándose un cambio de coloración del explante de verde a café rojizo, que es el que toma el fruto en su maduración cuando se deja para secado en la planta (Figura 6).

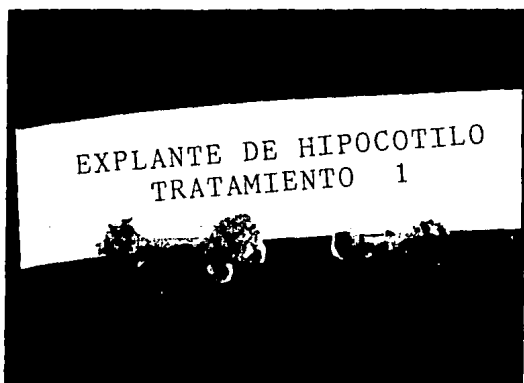


FIGURA 1.- Respuesta de segmento del hipocotilo de chile (*C. annuum*; tipo pasilla, var. - Salvatierra) en el medio 1 (1 mg/l AIA + 2 mg/l BA) a las 4 semanas de incubación.



FIGURA 2.- Respuesta de explante de cotiledón de chile (*C. annuum*; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el medio 1 (1 mg/l AIA + 2 mg/l BA) a las 4 semanas de incubación.



FIGURA 3.- Respuesta de explante de hoja de 40 días de edad, germinada in vitro de chile (*C. annum*; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el medio 5 (2.19 mg/l AIA + 10.16 mg/l 2iP) a las 4 semanas de incubación.

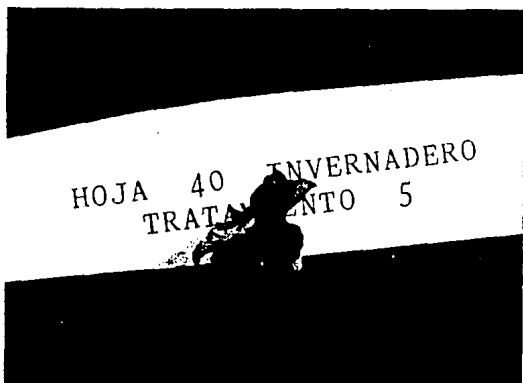


FIGURA 4.- Respuesta de explante de hoja de 40 días de edad, germinada en invernadero, de chile (*C. annum*; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el medio 5 (2.19 mg/l AIA + 10.16 mg/l 2iP) a las 4 semanas de incubación.

HOJA DE 80
TRATAMIENTO 1



FIGURA 5.- Respuesta de explante de hoja de 80 días de edad de chile (*C. annuum*; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el medio 1 (1 mg/l AIA + 2 mg/l GA) a las 4 semanas de incubación.



FIGURA 6.- Explante de fruto de chile *C. annuum*; tipo pasilla, var. Salvatierra) en el que se observó la baja respuesta que presentaron los explantes al incubarse en los 6 diferentes medios durante 4 semanas.

DISCUSION.

Dentro de la familia Solanáceae están incluidas varias especies de importancia económica tales como el jitomate, la papa, el tabaco y el chile. Las especies de esta familia han sido empleadas como modelos para estudios morfogénéticos pues presentan cierta facilidad para regenerar órganos in vitro.

La regeneración de estructuras organizadas, se ve afectada por los niveles endógenos de auxinas y citocininas de la planta, así como por la fuente de explante utilizado como se observó en el presente estudio.

Los explantes de chile de la variedad comercial Salvatierra, bajo las condiciones en que se realizó este trabajo, mostraron básicamente que para la inducción de brotes es necesario una proporción mayor de citocinina-auxina para los diferentes tipos de explante utilizados.

Los resultados en los que se determinó que la concentración óptima para inducción de brotes fue con 2.19 mg/l de AIA + 10.16 mg/l de 2iP, pueden ser comparados con los obtenidos por Phillips y Hubstenberg en 1985, quienes utilizaron varias fuentes de explante de C. annuum, y concluyeron que la relación adecuada para la inducción de brotes fue de una mayor concentración de citocinina con respecto a la de auxina (0.05-4 mg/l de AIA + 10-50 mg/l de BA) (28).

Dentro de los tipos de explante evaluados estuvieron explantes de hipocotilo y cotiledón de plántulas de 28 días de edad cultivadas in vitro, los cuales tuvieron su mejor respuesta a la concentración de 1 mg/l de AIA + 2 mg/l de BA, en el que el resultado es similar al obtenido por Gunay y Rao en 1976, cuando evaluaron la formación de brotes a partir de explantes de hipocotilo y cotiledón de 2 variedades de C. annuum, y una especie híbrida de C. frutescens, y tuvieron el índice más alto de inducción de brotes en el medio MS conteniendo 1 mg/l de AIA + 2 mg/l de BA. Sin embargo, para los explantes de hojas de 40 días de edad al aumentar la concentración de auxina en poco más del doble y la de citocinina cinco veces más, se obtuvo una respuesta mayor que en el medio utilizado por Gunay y Rao; probablemente por ser esta concentración hormonal similar a la requerida por la planta en esta edad y grado de diferenciación (15).

Fari y Czako en 1981 utilizaron explantes de hipocotilo de C. annuum en un estudio en el que observaron el tipo de respuesta respecto a la posición del explante dentro del hipocotilo. Al cortar el hipocotilo en tres segmentos de igual tamaño, se observó que en el explante apical se formaban brotes, mientras que en el segmento intermedio se producían callos y en el inferior solamente raíces; cuando se inocularon en el medio -- conteniendo 1 mg/l de AIA + 2 mg/l de BA descrito por Gunay y Rao. Esto concuerda con la respuesta observada en este estu---

dio, que aunque se probaron otras concentraciones, para hipocotilo fue la que dió mejores resultados (9).

Investigaciones realizadas en Lycopersicon esculentum -- por Kartha y colaboradores, demostraron que la inducción de brotes era mayor en medios que contenían una mayor proporción de citocinina-auxina o solamente citocinina. La relación de concentraciones descritas coinciden con las utilizadas en este trabajo, en la que para explantes de hoja de 40 días de edad la concentración óptima fue de 2.19 mg/l de AIA + 10.16 mg/l de 2iP, y para hipocotilo con 1 mg/l de AIA + 2 mg/l de BA (19).

Padmanabhan et al en 1974 concluyeron que la mayor inducción de brotes a partir de explante de hojas de tres líneas de jitomate (L. esculentum) se obtuvo en la combinación que contenía cantidades iguales de auxina-citocinina (4 mg/l de AIA + 4 mg/l de cinetina), lo cual difiere totalmente de los resultados obtenidos en este trabajo con C. annuum, probablemente debido a las diferencias entre especies (27).

En estudios realizados por Murashige y Nakano en 1967, lograron una inducción de brotes a partir de callos de Nicotiana tabacum reemplazando el 2,4-D por 11.4 micromolar de ácido indolacético y 9.3 micromolar de cinetina (25). Sacristan y Melchers en 1969 reportan resultados similares sólo que adicionando 22.8 micromolar de ácido indolacético y de 46.5 a 66.5 micromolar de cinetina. Estos resultados difieren de los obtenidos en este estudio pues la concentración de citocinina es -

mayor a la de auxina, debido probablemente a requerimientos -- diferentes en especies distintas (31).

Locy en 1983 evaluó la respuesta de explantes de hipocotilo y tallo de seis variedades de Lycopersicon esculentum, y observó que la inducción de brotes fue mayor en explantes de hipocotilo que en explante de tallo en todos los materiales evaluados; y esto fue a una concentración de 0.3-1 mg/l de ATA + 3 mg/l de cinetina; al igual que las concentraciones resultantes de mayor cantidad de citocinina que auxina observada en este trabajo con C. annuum (22).

De igual manera Colijn et al reportan que la inducción de brotes en especies de Petunia es mejor a concentraciones más altas de citocininas que de auxina, lo que concuerda con los requerimientos observados en este trabajo con Chile (4).

La edad del explante también afecta a la inducción de brotes, pues la mejor respuesta se observó en explantes de hoja de 40 días de edad. En explantes de hipocotilo y cotiledón la formación de brotes fue buena, pero en las hojas de 80 días de edad y de fruto la respuesta fue muy pobre, lo cual concuerda con los estudios hechos por Scorza y Janick en 1979, en que determinaron la influencia de la edad en tejidos de Passiflora suberosa y se observó que la inducción de brotes fue mejor en hojas jóvenes que en hojas de más edad, debido probablemente al alto grado de diferenciación que presentan estos tejidos (32).

Sobre la influencia que tiene el medio ambiente y los genotipos de la planta donadora Franckenberger y colaboradores - en 1981 hicieron estudios en 8 genotipos de L. esculentum, y - determinaron que las plantas cultivadas in vitro eran de mejor calidad que las cultivadas en invernadero. Esto se observó -- también en la respuesta dada por los explantes de hoja de plantas de 40 días de edad cultivadas en condiciones controladas y asépticas en comparación con las de invernadero en las que fue un poco menor la inducción de brotes, probablemente debido al daño físico sufrido durante el tratamiento de esterilización - [11].

CONCLUSIONES.

1.- Los explantes de hipocotilo, cotiledón y hojas presentaron diferente capacidad para formar brotes adventicios -- cuando se cultivaron in vitro. El tipo de explante que manifestó una mayor inducción de brotes fue el proveniente de hojas -- de plantas de 40 días de edad. Es conveniente recordar que en explantes de fruto no se obtuvo ninguna respuesta en los diferentes medios en relación a la inducción de brotes.

2.- Las condiciones de cultivo de las plantas utilizadas como fuente de explantes influyeron sobre la respuesta de tejidos foliares. Los explantes provenientes de plantas de 40 días de edad obtenidos en condiciones controladas y asépticas mostraron mejor respuesta que los de plantas de invernadero. Dentro de los explantes de hojas de 40 días de edad hubo diferencias en la respuesta entre las provenientes de invernadero e in vitro.

3.- La edad de las plantas donadoras influyó sobre la -- inducción de brotes en explantes foliares. Los explantes provenientes de hojas de 40 días de edad, fueron los que presentaron mayor inducción de brotes.

4.- El medio de cultivo en el que se obtuvo mayor inducción de brotes en explantes de hojas de 40 días, fue el 5 ---- (2.19 mg/l de ATA y 10.16 mg/l de 2iP).

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Conger B.V. 1981. Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press Inc. pp 14-16. N.Y.
- 2.- Heiser C.B. and Pickersgill B. 1969. Names for the cultivable Capsicum species. [Solanaceae] Agric. Bot. Taxon.--
18: 277-283.
- 3.- Banengee C.B. and Gupta S. 1976. Embryogenesis and differentiation in Nigella sativa leaf callus in vitro. Physiol. Plant. 38: 111.
- 4.- Colijn C.M., Kool A.J. and Nijkamp H.J.J. 1969. Induction of root and shoot formation from roots meristems of Petunia hybrida. Protoplasma 99: 335-340.
- 5.- Dix P.J. and Street H.E. 1975. Sodium chloride-resistant cultured cell lines from Nicotiana sylvestris and Capsicum annum. Plant Sci. Lett. 5: 231-237.
- 6.- Dix P.J. and Street H.E. 1976. Selection of plant cell lines with enhanced chilling resistance. Ann. Bot. 40: 903-910.
- 7.- Dodds J.H. and Roberts L.W. 1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University, pp 2-9.
- 8.- Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V. and Yamada Y. 1980. Handbook of plant cell culture; techniques for propaga--

tion and breeding. Vol. 1. Macmillan Publishing Co. pp 86-102.

9.- Fari M. and Czako M. 1981. Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants - cultivated in vitro. Scientia Horticulturæ, 15: 207-213.

10.- Flick C.E., Evans D.A. and Sharp W.R. 1983. Organogenesis. In: Handbook of plant cell culture, Vo. 1. (Evans D.E., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y. Eds.). Macmillan, New York. pp 13-23.

11.- Franckenberger A.E., Hasegawa P.M. and Tichelaar E.C. 1981. Influence of environment and development state on - shoot forming capacity of tomato genotypes. Z. Pflanzenphysiol. 102: 221-232.

12.- García Bautista M.A.R. 1986. Cultivo de tejidos de - chile (Capsicum annum): Influencia de reguladores de crecimiento sobre la morfogénesis en segmentos de hipocotilo. Tesis de Licenciatura. Escuela de Agronomía y Zootecnia, Universidad de Guanajuato. pp 18-27.

13.- Gukasyan M.V., Butenko R.G., Petoyan J.F. and Sevostyanova A.N. 1977. Morphogenesis of isolated pieces nemontant carnation artificial medium. Sov. Pflanzenphysiol. 24: 130.

14.- Gunay A.L. and Rao P.S. 1980, In vitro propagation - of hybrid tomato plants (Lycopersicon esculentum) using hypocotyl and cotyledon explants. Ann. Bot. 45: 205-207.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 15.- Gunay A.L. and Rao P.S. 1978. In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper -- (Capsicum). Plant Sci. Lett. 11: 365-372.
- 16.- Heiser C.B. jr. and Paul G. D. 1953. The cultivated Capsicum peppers. Economy Botany 7: 214-227.
- 17.- Herman E.B. and Haas G.J. 1978. Shoot formation in tissue cultures of Lycopersicon esculentum Mill. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 89: 467-470.
- 18.- Hussey G. 1975. Totipotency in tissue explants of some members of the Liliaceae, Iridiaceae and Amarillaceae. J. Exp. Bot. 26: 253.
- 19.- Kartha K.K., Gamborg O.L. Shyluk J. P. and Constabel F. 1976. Morphogenetic investigations on in vitro leaf culture of tomato and high frequency plant regeneration. Z. Pflanzenphysiol. 29: 292-301.
- 20.- Konstantinova T.N., Aksenova N.P. and Sergeera I. -- 1982. Reciprocal influence of stem explants with different types of morphogenesis, Z. Pflanzenphysiol. 29: 197-200.
- 21.- Laborde Cancino y Pozo Campodonico. 1982. Presente y pasado del chile en México. SARH-INIA, México, D.F., jun. 18-23.
- 22.- Locy R.D. 1983. Callus formation and organogenesis - by explants of six Lycopersicon spp. Can. J. Bot. 61: 1072-1079.

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

24.- Murashige T. and Nakano R. 1967. Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. Am. J. Bot. 54: 963-970.

25.- Niths S.P. and Nitsh C. 1956. Auxin dependent growth of excised Heliantus tuberosus tissue. Amer. J. Bot. 43: 481-493.

26.- Ochoa Alejo N. 1985. Establecimiento de cultivos in vitro: fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. (Villalobos Arambula V.M. Ed.). FOA, México, pp 64-71.

27.- Padmahabhan V., Paddock E.F. and Sharp W.R. 1974. - Plantlet formation from Lycopersicon esculentum leaf callus. - Can. J. Bot. 52: 1429-1432.

28.- Phillips G.C. and Hubstenberg J.F. 1985. Organogenesis in pepper tissues culture. Plant. Cell. Tissue Organ Culture re. 4: 261-269.

29.- Price C.A. 1970. Molecular approaches to plant physiology. Ed. Mac Graw Hill Book Co. 301-316.

30.- Reinert J. and Yeoman M.M. 1982. Plant cell and tissue culture a laboratory manual. Springer-Verlag. pp 3.

31.- Sacristan J. and Melchers G. 1969. The karyotypic -- analysis of plants regenerated from tumorous and other ca--llus cultures of tobacco. Molec. Gen. Genet. 105: 317-333.

32.- Scorza R. and Janick J. 1976. Tissue culture in Passiflora. In: Proceedings 24th congress American Society Horti--cultural Science, Tropical Region (Mayaguez, Puerto Rico) pp. 179-183. Am. Soc. Hort. Sci., Alexandria, Virginia.

33.- Takayama S. and Hisawa W. 1979. Differentiation in - Lilium bulb scale growth in vitro - effect of various cultural conditions. Physiol. Plant. 46: 184-190.

34.- Tran Than Van K. and Trinh H. 1978. Morphogenesis in thin cell layers: Concept, methodology and results. In: Frontiers of plant tissue culture (Thorpe T.A., Ed.) University of Calgary Press. pp 37-48.

35.- Vasil I.K. and Hildebrandt A.C. 1966. Variation of - morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I Cichorium - endiva. Am. J. Bot. 53: 860-869.

36.- Villalobos A.V.N. 1985. Historia del cultivo de te--jidos vegetales. (Villalobos Arambula V.N., Ed.) FAO, México. - pp. 1-12.

37.- Wang S. and Ma S.S. 1978. Clonal multiplication of - Chrysanthemum in vitro. J. Agric. Assoc. 101: 64-69.

38.- Willmer E.N. 1966. Cells and tissues in culture. Me--thods, biology and Physiology. Vol 13 Academic Press., pp 172-179.

APENDICE

APENDICE I.

Cotiledón.

	Replicas						
	I	II	III	IV	V	VI	
medio 1	0.8	1	2.4	2.4	2.2	2	M
medio 2	0.8	1.2	2.6	2.4	1.2	1	E
medio 3	0.8	1	2.4	2.2	1.2	1.2	D
medio 4	1	0.6	2.6	2.4	1.4	1	I
medio 5	0.4	0.6	2.6	2.4	1.8	2.2	A
medio 6	0.6	1	2	2.6	2	2	S

Hipocotilo

	I	II	III	IV	V	VI	
medio 1	1	1.2	2	2.6	1.8	1.8	M
medio 2	1	0.8	1.8	2	1.4	1.6	E
medio 3	1	1	2	1.4	1.4	1.4	D
medio 4	1.2	1	1	1.6	1.6	1.6	I
medio 5	1	1	2.6	1.4	1.4	1.8	A
medio 6	1.4	1	1.4	1.2	2.2	2.2	S

Hoja 40 días in vitro.

	I	II	III	IV	V	VI	
medio 1	2.8	2.6	1	1	1.2	1.8	M
medio 2	2.4	3	2.8	3.4	1.4	1.6	E
medio 3	2.6	2.6	2.6	2	1.8	1.8	D
medio 4	2.8	2.4	3	3.4	1.4	1.6	I
medio 5	3.4	3.2	3.2	3.4	2.6	3	A
medio 6	2.6	2.8	3	3.2	2.2	2	S

Hoja 40 días invernadero.

	I	II	III	IV	V	VI	
medio 1	1.6	2	1.6	1.6	2.3	2	M
medio 2	2	1.6	2.6	3	2	2.6	E
medio 3	2	1.6	2	2	1.6	2.3	D
medio 4	1.6	1.6	2.3	2	2	2.3	I
medio 5	3	2.3	2.6	2.3	2.6	3.6	A
medio 6	2.6	2	1.6	2	2	2	S

Hoja 80 días

	I	II	III	IV	V	VI	
medio 1	1	1.4	0.8	1	1	1	M
medio 2	0.8	0.8	0.6	1	1	0.6	E
medio 3	0.6	1	0.8	1	1	1	D
medio 4	0.8	1.4	1	0.8	1	1	I
medio 5	0.8	0.8	0.8	1	1	0.8	A
medio 6	0.8	1	0.8	1	0.8	1	S

APENDICE II.

Interacción entre tipo de explante y tipo de medio.

Prueba de Tukey

$$S_x = 0.1611681$$

$$q(6, 125) = 4.10$$

$$w = 0.660789$$

tipo de explante		media	
Cotiledón	medio 6	1.8 - w = 1.1392	a
	medio 5	1.666667	a
	medio 2	1.533333	a
	medio 4	1.5	a
	medio 3	1.5	a
Hipocotilo	medio 1	1.733333 - w = 1.072544	a
	medio 6	1.566667	a
	medio 5	1.533333	a
	medio 2	1.433333	a
	medio 3	1.366667	a
	medio 4	1.333333	a

Hoja 40 <u>in vitro</u>	medio 5	3.13334 - w = 2.472545	a
	medio 6	2.63333 - w = 1.972544	ab
	medio 4	2.5 - w = 1.839211	ab
	medio 2	2.43334 - w = 1.772545	b
	medio 3	2.23333 - w = 1.57	bc
	medio 1	1.73333	c
Hoja 40 invernadero	medio 5	2.73333 - w = 2.072544	a
	medio 2	2.3 - w = 1.639211	ab
	medio 6	2.03333	ab
	medio 4	1.96667	b
	medio 3	1.91667	b
	medio 1	1.91667	b
Hoja 80	medio 1	1.03333 - w = 0.372541	a
	medio 4	1	a
	medio 6	0.900001	a
	medio 3	0.900001	a
	medio 5	0.866668	a
	medio 2	0.833333	a

Estos resultados demuestran que en los explantes de hipocotilo, cotiledón y hoja de 80 días de edad, las diferentes concentraciones de hormonas tuvieron una respuesta en la que no hay una diferencia significativa; en el caso de los explantes de hoja de 40 días in vitro, el tratamiento óptimo fue el medio 5, mientras que los medio 6 y 4 fueron buenos, el medio-2 regular, y los medios 3 y 1 fueron malos.

Para las hojas de 40 días de invernadero, el tratamiento en -- que se tuvo una mejor respuesta fue el cinco y en los medios 3 y 1 se presentó la mas baja inducción de brotes.

Interacción entre medio de cultivo y tipo de explante.

Medio de cultivo media

Medio 1

hoja 40 inv.	1.916667 - w = 0.992745	a
cotiledón	1.8	a
hipocotilo	1.733333	a
hoja 40 <u>i</u> <u>v</u>	1.733333	a
hoja 80	1.033333	a

Medio 2

hoja 40 <u>i</u> <u>v</u>	2.433334 - w = 1.50941	a
hoja 40 inv.	2.3 - w = 1.37607	ab
cotiledón	1.533333 - w = 0.609408	abc
hipocotilo	1.433333	bc
hoja 80	0.833333	c

Medio 3

hoja 40 <u>i</u> <u>v</u>	2.233333 - w = 1.309411	a
hoja inv.	1.916667 - w = 0.992745	a
cotiledón	1.5 - w = 0.576078	ab
hipocotilo	1.366667	ab
hoja 80	0.900001	b

Medio 4

hoja 40 \underline{i} \underline{v} 2.5	- w = 1.567078	a
hoja 40 inv.	1.9666667 - w = 1.04274	ab
cotiledon	1.5 - w = 0.576078	bc
hipocotilo	1.3333333	bc
hoja 80	1	c

Medio 5

hoja 40 \underline{i} \underline{v} 3.133334	- w = 2.20741	a
hoja 40 inv.	2.733333 - w = 1.80941	a
cotiledon	1.666667 - w = 0.742745	b
hipocotilo	1.533333	b
hoja 80	0.866668	b

Medio 6

hoja 40 \underline{i} \underline{v} 2.633333	- w = 1.70941	a
hoja 40 inv.	2.033333 - w = 1.10941	ab
cotiledon	1.7 - w = 0.776078	bc
hipocotilo	1.566667	bc
hoja 80	0.900001	c

Analizando estos resultados es fácil observar que los --
 explantes de hoja de 40 días de edad, tanto in vitro como de --
 invernadero son los que tuvieron mayor respuesta en los dife--
 rentes medio de cultivo; y en el que se tuvo la inducción ópti--
 ma fue el medio 5, que de acuerdo a los resultados obtenidos --
 por la prueba de Tukey podemos observar claramente la separa--
 ción de valores entre estos explantes y los de cotiledón, hipo--
 cotilo y hojas de 80 días de edad.