



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

“REGENERACIÓN DE PLANTAS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jaqc.) A PARTIR DE CULTIVOS HIDROPÓNICOS *IN VITRO.*”

MARÍA JOSEFINA JIMAREZ MONTIEL

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis titulada "Regeneración de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) a partir de cultivos hidropónicos *in vitro*" realizada por la alumna María Josefina Jimarez Montiel bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dra. Alejandrina Robledo Paz

ASESOR

Dra. Libia Iris Trejo-Téllez

ASESOR

Dr. Víctor Manuel Ordaz Chaparro

ASESOR

M. C. Juan Celestino Molina Moreno

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril 2014

REGENERACIÓN DE PLANTAS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jaqc.) A PARTIR DE CULTIVOS HIDROPÓNICOS *in vitro*

María Josefina Jimarez Montiel M. C.

RESUMEN

Colegio de Posgraduados, 2014.

Una alternativa para mejorar la producción de plantas de chile habanero es el cultivo de tejidos; no obstante, las características de esta técnica, incrementan considerablemente el costo de las plantas regeneradas y limita su capacidad de adaptación a las condiciones de invernadero o campo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de mezclas de Perlita-Vermiculita (PV), Vermiculita-Perlita (VP), Fibra de coco-Tezontle (FT) y Perlita-Fibra de coco (PF), distintas concentraciones de los componentes del medio de cultivo (sales basales Murashige y Skoog (MS) y la solución nutritiva de Arnon y Hoagland y sacarosa), en la regeneración *in vitro* de plantas de chile habanero a partir de explantes de embriones e hipocótilos. Los explantes de embrión e hipocotilo no formaron brotes adventicios cuando se cultivaron en los medios de inducción en presencia de sustratos, pero sí lo hicieron, en agar como soporte. El mayor porcentaje de explantes de embrión que formaron brotes se observó en los medios constituidos por MS 25 y 100%, 7.5 y 15 g L⁻¹ de sacarosa y agar, el número más alto de brotes por explante (6) en el medios MS 100% con 15 g de sacarosa en VP. El análisis nutrimental de los explantes mostró que los algunos nutrientes, estuvieron más disponibles en sustratos. En el enraizamiento los valores más altos se obtuvieron en los tratamientos MS 50 y 100% en PT y VP. En cuanto al número de raíces la mejor respuesta (4.80 y 4.60) se obtuvo con la solución H en los sustratos VP y PT respectivamente. Las plantas provenientes de los medios H en agar, MS al 50 y 100% y en los sustratos VP y PT, mostraron los mejores resultados de supervivencia (100%) y crecimiento, durante siete semanas en condiciones de invernadero. Es factible utilizar soluciones diluidas y sustratos para regenerar *in vitro* plantas de chile habanero. El costo de las vitroplantas obtenidas en medios con sustratos fue menor que el de las obtenidas en medios que contenían agar.

Palabras clave: soluciones nutritivas, sustratos, embrión, hipocótilo, costos.

PLANT REGENERATION OF HABANERO PEPPER (*Capsicum chinense* Jacq.) BY IN VITRO HYDROPONIC CULTURES

María Josefina Jimarez Montiel, M. C.

SUMMARY

Colegio de Posgraduados, 2014

An alternative to improve the production of habanero plants is tissue culture, however, characteristic of this a technique can be greatly increases the cost of the regenerated plants and limit their capacity for adaptation to the greenhouse or field conditions. The objective of this study was to evaluate the effect of mixtures of Perlita-Vermiculite (PV), Vermiculite-Perlita (VP), Coco-Fiber-Tezontle (FT) and Perlita- Coco Fiber (PF), different concentrations of Murashige and Skoog (MS), the nutrient solution of Hoagland and Arnon (H) and different sucrose concentrations on *in vitro* habanero chilli pepper cv. Naranja regeneration from embryos and hypocotyls. The embryo and hypocotyl explants did not form adventitious shoots when they were cultured on induction media and substrates, but they did when the media had agar as a support. The highest percentage of embryo explants that formed shoots was obtained on MS media whit 25 and 100% plus 7.5 and 15 g L⁻¹ sucrose and agar, the highest number of shoots per explant (6) was obtained whit MS 100% media, 15 g L⁻¹ of sucrose and VP. The nutritional analysis of explants showed that some nutrients were more available in substrates. The highest rooting values were obtained in the MS 50 and 100% whit PT and VP treatments. Plants regenerated on H solution and agar, MS 50 and 100% media and in the VP and PT substrates showed the best survival (100%) and growth plant after seven weeks under greenhouse conditions. It is feasible to use dilute solutions and substrates to *in vitro* regeneration of habanero chili pepper plants. The cost of plants regenerated with substrates and low salts and sucrose concentration was lower than those obtained whit higher salts, sucrose levels and agar.

Keywords: nutrient solutions, substrates, explants, embryo, hypocotyl

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Posgraduados (COLPOS) por mi formación académica, así como por facilitar sus instalaciones y al personal, para llevar a cabo esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proporcionarme los medios económicos para realizar los estudios de maestría en el Posgrado Recursos Genéticos y Productividad-Producción de Semillas.

A la Dra. Alejandrina Robledo Paz por sus valiosos conocimientos, durante mi formación académica y la dirección de este trabajo, también por su comprensión, paciencia y amistad.

Al Laboratorio de Biotecnología de Semillas por facilitar las instalaciones y el equipo para la elaboración de este proyecto, en especial a la Sra. Silvia Antero por su valioso apoyo durante largas jornadas de trabajo.

A la Dra. Libia Iris Trejo Téllez por su valiosa aportación y asesoramiento en el manejo de los datos así como en el análisis nutrimental de tejido.

Al Dr. Victor M. Ordaz Chaparro, por sus conocimientos aportados y su apoyo en esta investigación, así como al Laboratorio de Física de Suelos y al personal que labora, por facilitar las instalaciones y el equipo, en la caracterización de los sustratos.

Al Dr. Juan Celestino Molina Moreno por sus correcciones y aportaciones durante este trabajo.

Al Dr. Carlos Trejo por facilitar la cámara de ambiente controlado, durante el desarrollo de la investigación.

Al personal del Posgrado de Producción de Semillas, administrativos y laboratoristas por las facilidades brindadas.

A mis amigas y amigos: Betza, Nora, Sandra, Luz, Angélica, Pilar, Olga, Marcelina, Aranzazu, Elizabeth, Mariana, Juan, Luis Antonio, Erwin, Alonso, Raúl y Álvaro, por su incondicional apoyo y valiosa amistad que hicieron muy agradables los momentos de estudio y trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Elodia Montiel Tentle y Daniel Jimarez Méndez

Por todo su cariño infinito, apoyo incondicional en mi formación como ser humano, así como en todos mis proyectos de vida, con mucho cariño.

A mi hermano y su familia:

Daniel Jimarez Méndez y Ana Luisa Martínez Carmona

Lupita y Marina

Por creer y confiar en mí en todo momento de mi vida con mucho cariño.

A mis amigas:

Angélica, Aracely, Giovanna, Paty y Naye.

Por hacer la vida más divertida las quiero mucho.

INDICE DE FIGURAS	1
INDICE DE CUADROS	4
1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo General	8
2.1. Objetivos Particulares	8
3. HIPOTESIS	9
3.1. Hipótesis General	9
3.2. Hipótesis Particulares	9
4. REVISIÓN DE LITERARURA	9
4.1. El género <i>Capsicum</i>	9
4.2. Descripción botánica de <i>Capsicum chinense</i> .	11
4.3. Taxonomía de <i>Capsicum chinense</i> Jaqc.	11
4.4. Distribución y origen	11
4.5. Importancia y producción de cultivo	12
4.6. Cultivo de tejidos vegetales	14
4.7. Regeneración <i>in vitro</i> de <i>Capsicum chinense</i>	15
4.8. Limitantes del cultivo de tejidos	16
4.9. Hidroponía	17
4.9.1. Soluciones nutritivas	18
4.9.1.1. Soluciones nutritivas <i>in vitro</i>	18
4.9.2. Sustratos	19
4.9.2.1 Propiedades físicas	19
4.9.2.1 Propiedades químicas	20
4.9.2. Fibra de coco	21

4.9.3. Vermiculita	21
4.9.4. Perlita	22
4.9.5 Tezontle	23
5. MATERIALES Y METODOS	23
5.1. Caracterización física de sustratos	23
5.1.1. Densidad aparente (Da)	23
5.1.2. Porosidad Total (Pt), Porosidad de aireación (Pai) y retención de humedad (Rh)	24
5.1.3 Curva de retención de agua	25
5.2. Regeneración de plantas de distintos explantes	26
5.2.1 Ensayo1. Regeneración de plantas de chile habanero a partir de explantes de embrión en sustratos <i>in vitro</i> .	26
5.2.1.1. Desinfestación e imbibición de las semillas	26
5.2.1.2. Medios de cultivo	26
5.2.1.3. Inducción de brotes a partir de explantes de embrión en sustratos <i>in vitro</i>	29
5.2.1.4. Desarrollo de brotes de explantes de embrión en sustratos	30
5.2.1.5 Enraizamiento <i>in vitro</i>	30
5.2.1.6 Aclimatación	31
5.3. Ensayo 2. Regeneración de plantas de chile habanero a partir de explantes de hipocótilo en sustratos <i>in vitro</i>	31
5.3.1. Desinfestación y germinación de semillas de chile habanero	31

5.3.2. Inducción de brotes a partir de explantes de hipocótilo en sustratos	32
5.3.3. Desarrollo de brotes a partir de explantes de hipocótilos en sustratos	32
5.4. Experimento Regeneración de plantas de plantas de chile habanero a apartir de explantes de embrión inducidos en agar	32
5.4.1. Inducción de brotes a partir de embriones de chile habanero en agar	32
5.4.2. Desarrollo de brotes en sustratos	34
5.4.2.1. Análisis nutrimental del tejido de explantes	34
5.4.3. Enraizamiento de brotes en sustratos <i>in vitro</i>	35
5.4.4. Aclimatación	35
6. RESULTADO Y DISCUSIÓN	36
6.1. Caracterización física de los sustratos y curvas de liberación de agua.	36
6.1.1. Densidad aparente (Da) y Porosidad	36
6.1.2. Curvas de liberación de agua	39
6.2. Ensayo 1. Regeneración de plantas de chile habanero a partir de explantes de embrión en sustratos <i>in vitro</i> .	41
6.2.1. Inducción de brotes a partir de embriones en sustratos <i>in vitro</i>	41
6.2.1.1. Supervivencia y formación de primordios de brote	41
6.2.3. Enraizamiento <i>in vitro</i>	51
6.2.4. Aclimatación de plantas regeneradas <i>in vitro</i>	52
6.3. Ensayo 2. Regeneración de plantas de chile habanero a partir de explantes de hipocótilos en sustratos <i>in vitro</i> .	54
6.3.1 Germinación de semillas de chile habanero en sustratos <i>in vitro</i>	54

6.3.2	Inducción de brotes a partir de explantes de hipocótilo	55
6.3.3	Desarrollo de brotes de explantes de hipocótilo	60
6.4.	Experimento: Regeneración de plantas de chile habanero a partir de explantes de embrión inducidos en agar <i>in vitro</i> .	61
6.4.1.	Inducción de brotes a partir de embriones de chile habanero en agar <i>in vitro</i>	61
6.4.1.1.	Supervivencia y formación de primordios de brote	61
6.4.2.	Desarrollo de explantes de embrión en sustratos <i>in vitro</i>	64
6.4.2.1	Crecimiento y peso seco acumulado de explantes de embrión en sustratos <i>in vitro</i>	64
6.4.2.2.	Análisis de tejido de explantes de embrión en sustratos <i>in vitro</i>	72
6.4.2.3.	Formación de brotes de explantes de embrión en sustratos <i>in vitro</i>	76
6.4.3.	Enraizamiento de brotes en sustrato <i>in vitro</i>	78
6.4.4.	Aclimatación de plantas regeneradas en sustratos en invernadero	82
6.4.4.1.	Crecimiento de plantas regeneradas en invernadero	84
6.5.	Costos de los medios en los diferentes sustratos	89
	7. CONCLUSIONES	95
	8. LITERATURA CITADA	96
	9. ANEXOS	108

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Protocolo para la regeneración <i>in vitro</i> de plántulas de chile habanero var. Naranja (<i>Capsicum chinense</i>)	27
Figura 2.	Protocolo para la regeneración de plantas <i>in vitro</i> con sustratos de chile habanero var Naranja (<i>Capsicum chinense</i>).	36
Figura 3.	Oxidación de los explantes en los tratamientos MS 50% y 30 (FT5) y 15 g L ⁻¹ de sacarosa (FT4), a los 30 días de cultivados.	45
Figura 4.	Explantes de embrión a los 30 días en agar con medio de desarrollo MS a 100 % con 30 (a) y 15 g L ⁻¹ (b); MS 50% con 15 (c) y 7.5 g de sacarosa L ⁻¹ (d); MS a 25 % con 7.5 (e) y 3.3 g L ⁻¹ (f); Arnon y Hoagland con 30 (g) y 15 g de sacarosa L ⁻¹ (h).	50
Figura 5.	Explantes de embrión a los 40 días en medio de inducción MS 25% con 3.3 g de sacarosa L ⁻¹ (D1 y D2) y MS 50% con 15g de sacarosa L ⁻¹ (E1 y E2) en sustrato PT.	51
Figura 6.	Explantes de embrión a los 40 días en medio de inducción de brotes en los tratamientos MS al 100% con 30 g de sacarosa L ⁻¹ (A) y MS al 50 % con 15 g de sacarosa L ⁻¹ (B) en el sustrato PF.	52
Figura 7.	Explantes de embrión a los 40 días, en medio de inducción de brotes MS 50 % con 15 g de sacarosa L ⁻¹ y MS 50 % con 15 g de sacarosa L ⁻¹ en sustrato FT.	53
Figura 8.	Enraizamiento de los brotes de chile habanero provenientes de explantes de embrión: Agar (A); Perlita-Tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP); MS 100 % con 15 g L ⁻¹ de sacarosa (2); MS 50 % con 7.5 g de sacarosa L ⁻¹ (4); MS 25 % con 3.3 g de sacarosa L ⁻¹ (6); Arnon y Hoagland con 15 g de sacarosa L ⁻¹ (8). Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).	54
Figura 9.	Porcentaje de sobrevivencia bajo condiciones de invernaderos de brotes enraizados en sustrato y agar.	55
Figura 10.	Plantas en invernadero provenientes de explantes de embrión inducidos con diferentes tratamientos: MS 25% en agar (A1) y en sustratos PT (A2); MS100% en agar (B1) y en sustrato VP (B2).	55

- Figura 11. Plántulas de chile habanero germinadas en sustratos y agar bajo condiciones *in vivo*: (a) plántulas en VP (b) Plántulas en PT (b). Desarrollo de las plántulas germinadas en los diferentes sustratos; Perlita-Tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP). 57
- Figura 12. Explantes de hipocótilo cultivados en medio Arnon y Hoagland: en agar (a), en sustrato VP (b). 60
- Figura 13. Formación de primordios de brote en los explantes de hipocotilo cultivados en los diferentes tratamientos: MS 50% con 7.5 g de sacarosa L⁻¹ en agar (a); MS al 100% con 30 g de sacarosa L⁻¹ en agar (b); MS al 25% con 7.5 g de sacarosa L⁻¹ en agar (c); MS al 25 % con 3.3 g L⁻¹ en el sustrato VP (d); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa en sustrato VP (e); MS al 50% con 7.5 g de sacarosa L⁻¹ en VP (f). 62
- Figura 14. Explantes de hipocótilo después de 30 días en medio de desarrollo en sustratos con: MS al 100 % y 15 g de sacarosa L⁻¹ en VP (a); MS al 100 % con 30 g de sacarosa L⁻¹ en VP (b); MS 50% con 7.5 g de sacarosa L⁻¹ en VP (c); MS 100% con 30 g de sacarosa L⁻¹ en PT (d) ;MS 25% con 15 g de sacarosa L⁻¹ en PT (e); MS 50% con 15 g de sacarosa L⁻¹ en VP (f); Arnon y Hoagland con 30 y (g) 15 g de sacarosa L⁻¹ en VP (h). 63
- Figura 15 Efecto de los medios en el porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de explantes que formaron primordios de brote después de 30 días de cultivo *in vitro* en agar; MS al 100% con 30 (1) y 15 g (2) de sacarosa L⁻¹; MS al 50 %, con 30 (3) y 15 g (4) de sacarosa L⁻¹; MS al 25 % con 30 (5) y 15 g (6) de sacarosa L⁻¹; solución de Arnon y Hoagland con 30 (7) y 15 g (8) de sacarosa L⁻¹. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$). 64
- Figura 16. Porcentajes de vitrificación de los explantes en los medios en agar(A): MS 100% con 30 g de sacarosa L⁻¹ (A1); MS 100% con 15 g de sacarosa L⁻¹ (A2);MS 50% con 15 g de sacarosa L⁻¹ (A3);MS 50% con 7.5 g de sacarosa L⁻¹ (A4); MS 25% con 7.5 g de sacarosaL⁻¹ (A5); MS 25 % con 3.3 g de sacarosa L⁻¹ (A6). 65
- Figura 17. Acumulación de peso seco de explantes de embrión de chile habanero en medio de desarrollo, en los periodos de 0 a 15 días, de 15 a 30 días y de 30 a 45 días (A), Perlita-Tenzontle (PT) y Vermiculita-Perlita (VP), saturados con los medio MS al 100% con 30 g de sacarosa L⁻¹ (a), MS al 100% con 15 g de sacarosa L⁻¹ (b), MS al 50% con 15 g de sacarosa L⁻¹ (c), MS al 50% con 7.5 g de sacarosa L⁻¹ (d), MS al 25% con 7.5 g de 68

sacarosa L⁻¹, (e); MS al 25 % con 3.3 g de sacarosa L⁻¹ (f); Arnon y Hoagland con 30 g de sacarosa L⁻¹ (g); Arnon y Hoagland con 15 g de sacarosa L⁻¹ (h).

- Figura 18. Porcentaje de oxidación de explantes en sustratos. Perlita-tezontle (PT) y Vermiculita-Perlita (VP); MS al 100 % con 30 g de sacarosa L⁻¹ (1); MS al 100 % con 15 g de sacarosa L⁻¹ (2); MS al 50 % con 15 g de sacarosa L⁻¹ (3); MS al 50 % con 7.5 g de sacarosa L⁻¹ (4); MS al 25 % con 7.5 g de sacarosa L⁻¹ (5). 71
- Figura 19 Explantes con brotes en los diferentes tratamientos :Agar (A); Perlita-Tezontle (PT), Perlita-Fibra de coco (PF); Fibra de coco-Tezontle (FT); MS al 100 % con 30 g de sacarosa L-1 (1); MS al 100 % con 15 g de sacarosa L-1 (2); MS al 50 % con 15 g de sacarosa L-1 (3); MS al 50 % con 7.5 g de sacarosa L-1 (4); MS al 25 % con 7.5 g de sacarosa L-1 (5); MS al 25 % con 3.3 g de sacarosa L-1 (6); Arnon y Hoagland con 30 g de sacarosa L-1 (7); Arnon y Hoagland con 15 g de sacarosa L-1 (8). 72
- Figura 20. Porcentaje de brotes enraizados *in vitro*: MS al 100% (1); MS al 50% (2); MS al 25% (3); Solución Arnon y Hoagland (4); Perlita-tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP) y agar (A). 81
- Figura 21. Supervivencia de las plantas regeneradas en los diferentes tratamientos después de 7 semanas de haber sido transferidas al invernadero Perlita-tezontle (PT); Vermiculita-perlita (VP) y agar (A) MS al 100% (1); MS al 50 % (2); MS al 25 % (3); solución de Arnon y Hoagland (4), con 15g sacarosa L⁻¹. 85
- Figura 22. Longitud de plantas obtenidas *in vitro* con los diferentes tratamientos crecidas en el invernadero durante 7 semanas: plántulas provenientes de agar (A), Perlita-Tezontle (PT), Vermiculita-Tezontle (VP); MS al 100% (a), MS al 50% (b), MS al 25% (c), Arnon y Hoagland (d). 88
- Figura 23. Formación de hojas de plantas obtenidas de *in vitro* con los diferentes tratamientos, aclimatadas en invernadero: plántulas provenientes de los sustratos de agar (A), perlita-tezontle (PT), vermiculita-tezontle (VP); medio MS al 100% (a), MS al 50% (b), MS al 25% (c), solución de Arnon y Hoagland (d). 89
- Figura 24. Diámetro de tallo de las plantas regeneradas *in vitro* en los diferentes tratamientos, aclimatadas en el invernadero durante siete semanas: sustratos, agar (A), Perlita-Tezontle (PT), vermiculita-tezontle (VP); medio MS al 100% (a), MS al 50% (b), MS al 25% (c), solución de Arnon y Hoagland (d). 90

Figura 25. Curvas de retención de agua de sustratos con proporción 1:1 112
(A, B); 2:1 (C,D); 3:1(E, D); 0 cm de columna de agua (Capacidad de campo), 10 cm (Agua fácilmente disponible), 50 cm (Agua de reserva), 100 cm (Agua difícilmente disponible) de columna de agua. Fibra de coco-Vermiculita (FV); Fibra de coco-Tezontle (FT); Perlita-Tezontle (PF); Vermiculita-Perlita (VP); Vermiculita-Tezontle (VT); Perlita-Tezontle (PT).

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Características físicas de partículas de tezontle de diferentes diámetros de la región de Texcoco estado de México (Ordaz, 2010).	24
Cuadro 2.	Componentes del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS), y la solución de Arnon y Hoagland (1940) (H).	29
Cuadro 3.	Medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas de la propagación <i>in vitro</i> de chile habanero.	30
Cuadro 4.	Denominación de tratamientos con sustratos y medios de cultivo.	31
Cuadro 5.	Valores de densidad aparente (Da), porcentaje total de poros (Pt), porosidad de aireación (Pai), porosidad de retención de humedad (Prh).	42
Cuadro 6	Valores de las curvas de retención de humedad para los diferentes sustratos	44
Cuadro 7.	Efecto de los sustratos en el porcentaje de sobrevivencia (SBRVV) y formación de primordios de brotes (PBRTS) de los explantes de semilla.	45
Cuadro 8.	Efecto de los medios en el porcentaje de sobrevivencia (SBRVV) y formación de primordios de brotes (PBRTS) de los explantes de semilla.	46
Cuadro. 9	Efecto de los medio de inducción y los sustratos en la sobrevivencia (SBRVV) y formación de primordios en explantes de embrión (EFPB) a los 30 días bajo condiciones <i>in vitro</i> .	48
Cuadro 10.	Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de semillas de chile habanero en los diferentes sustratos.	56
Cuadro 11.	Efecto de los sustratos en el porcentaje de sobrevivencia (SBRVV) y formación de primordios de brotes (PBRTS) de los explantes de semilla.	58
Cuadro 12	Efecto de los diferentes medios en la supervivencia y formación de primordios de brote de los explantes de hipocotilo de chile habanero.	59

Cuadro 13.	Efecto de los sustratos y los medios en el porcentaje de sobrevivencia (SBRVV) y formación de primordios de brote (PBRT) de explantes de hipocótilo a los 30 días de cultivo.	61
Cuadro 14.	Peso seco acumulado, crecimiento total y número de brotes de los explantes en sustratos.	70
Cuadro 15	Análisis de macronutrientes en los explantes en los diferentes tratamientos	75
Cuadro 16	Análisis de micronutrientes de los explantes en los diferentes tratamientos.	77
Cuadro 17.	Efecto de los sustratos en la formación de brotes en explantes de embrión.	78
Cuadro 18.	Efecto de los medios en la formación de brotes en explantes de embrión.	79
Cuadro 19.	Número de brotes por explantes de embrión de chile habanero en los diferentes tratamientos.	80
Cuadro 20.	Efecto de los sustratos en las variables número de raíz, número de hojas y longitud de planta regenerada.	82
Cuadro 21	Efecto de los medios en las variables número de raíz, número de hojas y longitud de planta regenerada.	83
Cuadro 22.	Efecto de los sustratos y los medios en las variables número de raíz (NR), longitud de raíz (LOGRZ) número de hojas (NH) y longitud de parte aérea de las plantas regeneradas (LOGPA).	87
Cuadro 23.	Longitud, número de hojas, diámetro de tallo de plantas regeneradas <i>in vitro</i> y aclimatadas en invernadero después de 7 semanas.	85
Cuadro 24.	Cuadro de costos en pesos de medio Murashige y Skoog (1962) (MS) y Arnon y Hoagland (H) (1940).	93
Cuadro 25.	Costo en pesos por litro del medio de desarrollo con las sales MS y la solución nutritiva Arnon y Hoagland, con agar y sustratos.	94
Cuadro 26	Costo (pesos) por litro del medio de enraizamientos en agar y sustratos.	95
Cuadro 27.	Costo en pesos aproximado de plantas regeneradas <i>in vitro</i> de	96

chile Habanero c.v. Naranja.

Cuadro 28.	Análisis de nutrimentos solubles de los diferentes sustratos.	111
Cuadro 29.	Análisis de Varianza procedimiento GL para porcentaje de supervivencia de explantes de embrión inducidos en sustratos.	113
Cuadro 30	Análisis de Varianza procedimiento GL para porcentaje de respuesta (formación de primordios de brote) de explantes de embrión de chile habanero, inducidos en sustratos.	113
Cuadro 31.	Análisis de varianza del porcentaje enraizamiento de brotes provenientes de explantes de embrión en sustratos.	113
Cuadro 32.	Análisis de varianza procedimiento GL para porcentaje de supervivencia de explantes de hipocótilo de chile habanero, cultivados en medio de inducción en sustratos.	114
Cuadro 33	Análisis de varianza procedimiento GL para porcentaje de explantes de hipocótilo que formaron primordios de brote en sustratos.	114
Cuadro 34.	Análisis estadístico de porcentaje de supervivencia (SBRVV) y formación de primordios de brotes (FPBRT) de explantes de embrión inducidos en agar.	114
Cuadro 35.	Análisis estadístico de número de brotes por explante de embrión cultivados en sustratos.	115
Cuadro 36.	Análisis estadístico de número de raíz de los brotes enraizados <i>in vitro</i> en sustrato.	115
Cuadro 37.	Análisis estadístico de longitud de raíz de los brotes enraizados <i>in vitro</i> en sustrato.	115
Cuadro 38.	Análisis estadístico de número de hojas de los brotes enraizados <i>in vitro</i> en sustrato.	116
Cuadro 39	Análisis estadístico de longitud de parte aérea de los brotes enraizados <i>in vitro</i> en sustrato	116
Cuadro 40.	Análisis estadístico de la longitud (LOG), diámetro de tallo (DMTR), número de hojas (NHJS), de plantas aclimatadas en invernadero enraizadas <i>in vitro</i> en sustrato	116

INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jaq.) es famoso por tener uno de los grados uno de los grados más pungentes de las especies del género *Capsicum*. Dicha característica es conferida por la producción de los compuestos conocidos como capsaicinoides los cuales se utilizan en la industria alimenticia (colorantes, saborizantes salsas y dulces), farmacéutica (pomadas y píldoras antioxidantes) y cosmética (champús, pastas y enjuagues bucales) (Nuez *et al.*, 1996)

En México, el cultivo del chile habanero se lleva a cabo principalmente en el sureste. El estado de Yucatán es el principal productor de chile habanero con una superficie sembrada de 445 ha y 423 ha cosechadas, con un volumen de producción de 5431 toneladas, seguido por los estados de Tabasco, Campeche y Quintana Roo (SIAP, 2013). La producción actual no alcanza a cubrir la demanda interna y la que se tiene por parte de los mercados externos, debido principalmente al bajo nivel de tecnología utilizada para su cultivo y a la falta de semilla de calidad (Borges, 2006).

El cultivo de tejidos es una herramienta útil en la multiplicación masiva de genotipos élite (vigorosos, alto rendimiento, libres de patógenos y enfermedades) ya que permite potencializar su capacidad de propagación (Robert *et al.*, 2004). Utilizando la técnica de cultivo de tejidos se han desarrollado protocolos para regenerar plantas de chile habanero (López-Puc *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007; Santana-Buzzy *et al.*, 2005; Sanatombia y Sharma, 2008; Valadez-Bustos *et al.*, 2009; Kehie *et al.*, 2012). Sin embargo la aplicación de esta técnica presenta algunas limitantes técnicas y económicas, entre las que se destaca el agente gelificante de los medios de cultivo, el cual puede llegar a representar el 70% del costo de producción (Fujiwara *et al.*, 1993 a; Ichimura y Oda, 1998).

Una opción de soporte para la propagación *in vitro* puede ser el uso de algunos materiales como los sustratos empleados en hidroponía (vermiculita, perlita, tezontle, fibra de coco, arena, turba y aserrín, entre otros). Al respecto Afreen-Zobayed *et al.* (2000) evaluaron la vermiculita y la pulpa de papel para enraizar microplantas de papa dulce (*Ipomoea batatas* L. (Lam.), cv. Beniazuma) obteniéndose altos porcentajes de

aclimatación y mayor acumulación de peso seco comparado con las microplantas que se enraizaron en agar.

Por otro lado, se ha observado que la concentración de sales basales del medio Murashige y Skoog (MS) que se utiliza comúnmente en cultivo de tejidos puede estar por encima de los requerimientos de los tejidos de algunas especies en estudio (Gonzales *et al.*, 2012; Raya-Montaño *et al.*, 2011).

De la misma forma, la concentración de sacarosa influye de manera sustancial en el metabolismo general de la planta bajo condiciones *in vitro* por ejemplo: en algunas especies (*Platycerium coronarium*, *Chenopodium rubrum* y *Solanum tuberosum*,) la presencia de azúcar en el medio de cultivo afecto de manera negativa el crecimiento y la fotosíntesis de las plántulas (Conner y Thomas, 1982; Schaéfer *et al.*, 1992; Kozai *et al.*, 1995; Kwan *et al.*, 1995;). Asimismo microplantas cultivadas en bajas concentraciones de sacarosa y con la solución hidropónica Arnon y Hoagland mostraron mejor enraizamiento y supervivencia en el invernadero (Barrales *et al.*, 2009).

Con base en lo anterior los objetivos de la presente investigación fueron:

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la concentración de los componentes del medio de cultivo (sales basales y sacarosa), así como de distintos sustratos como sustitutos del agar en la regeneración *in vitro* de plantas de chile habanero, su aclimatación en el invernadero y su costo

2.1 Objetivos particulares

Evaluar distintas concentraciones de sales nutritivas (Murashige y Skoog y Arnon Hoagland), concentraciones de sacarosa y sustratos (Perlita-Tezontle, Fibra de coco-Tezontle, Fibra de coco-Perlita) en la formación, desarrollo y enraizamiento *in vitro* de brotes adventicios de chile habanero.

Determinar el comportamiento en condiciones de invernadero de las plantas regeneradas en los diferentes medios.

Evaluar el costo de las plantas regeneradas con bajas concentraciones de los componentes de medio (sales basales y sacarosa) y sustratos y de aquellas obtenidas con la concentraciones convencionales de los componentes del medio (Sales basales y sacarosa) y agar.

HIPÓTESIS

Las bajas concentraciones de los componentes del medio de cultivo (sales basales y sacarosa) y el uso de sustratos como soporte, permitirán la formación, desarrollo y enraizamiento de brotes adventicios de chile habanero a bajo costo y favorecerá la aclimatación de las plantas regeneradas en condiciones de invernadero.

3.1 Hipótesis específicas

Bajas concentraciones de los componentes del medio de cultivo (sales basales y sacarosa) y el uso se sustratos como soporte, permitirán la formación, desarrollo y enraizamiento de brotes adventicios, su desarrollo y enraizamiento.

Las plantas regeneradas en bajas concentraciones de los componentes del medio de cultivo (sales basales y sacarosa) y sustratos tendrán un mejor comportamiento en condiciones de invernadero que las plantas provenientes de los medios convencionales en agar.

El costo de las plantas regeneradas con bajas concentraciones de sales sacarosa y sustrato será significativamente menor que el de aquellas obtenidas en las concentraciones convencionales y agar.

REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 El género *Capsicum*.

El chile fue uno de los primeros cultivos domesticados en Mesoamérica y se ha convertido en un ingrediente casi obligado en la comida mexicana (Barreiro, 1998). México tiene la mayor variedad genética de *Capsicum*, esta riqueza genética se debe en gran parte a la diversidad de climas y suelos, pero también a las prácticas culturales ancestrales (Latournerie-Moreno *et al.*, 2002).

El chile pertenece a la familia de las Solanáceas dentro de la cual el género *Capsicum* es un grupo muy representativo con alrededor de 200 variedades cultivadas, con frutos que varían mucho en tamaño, forma, sabor y calor sensorial (Nuez *et al.*, 1996). El nombre científico del género deriva del griego; según algunos autores del Kapso (picar) o de Kapsakes (cápsula) (Muñoz, 2000).

La taxonomía dentro del género *Capsicum* es compleja, debido a la gran variación de formas existentes en las especies cultivadas y a la diversidad de criterios utilizados en la clasificación (Nuez *et al.*, 1996).

El género se caracteriza por poseer una composición química muy diversa puesto que el color intenso es dado por la presencia de diversos tipos de carotenoides, algunos precursores de la vitamina A, los cuales también juegan un rol muy importante en la salud humana puesto que muchos de estos tienen función antioxidante y reducen los efectos de los radicales libres, previniendo algunos desórdenes de tipo vascular, de la vista y algunos tipos de cáncer (Deepaa *et al.*, 2007).

El chile es también fuente de ácido ascórbico (vitamina C), así como de los compuestos llamados capsaicinoides que dan el sabor característico del fruto, los cuales son producidos en glándulas presentes en la placenta del fruto. En recientes estudios se ha identificado alrededor de 136 compuestos de tipo isoprenos volátiles que son responsables del sabor (Pino *et al.*, 2007).

Los capsaicinoides tienen un alto valor farmacéutico puesto que algunos de ellos han sido utilizados para el tratamiento de ciertos desórdenes reumáticos y neuralgias. Así

mismo se destaca su actividad anti-bacterial en ciertos grupos de bacterias (Brito-Argáez *et al.*, 2009; Deepaa *et al.*, 2007), actividad antifúngica de *Capsicum chinense* sobre *Candida albicans in vitro* con células endoteliales de bovino (Anaya-López *et al.*, 2006). De la misma manera, se ha demostrado que los capsaicinoides de *C. annuum* tiene una capacidad potencial para regular la respuesta inmune vía secreción de anticuerpos en células intestinales B inmunodependientes de intestino (Yamaguchia *et al.*, 2010)

El género *Capsicum* comprende cinco especies importantes económicamente, de las cuales en México se producen cuatro: *Capsicum annuum*, que comprende las variedades NuMex, Chile Jalapeño y Bell entre otras, *Capsicum frutescens* variedad Tabasco, *Capsicum chinense*, variedades Habanero y Scotch Bonnet y *Capsicum pubescens* variedades Rocoto y Manzano (Pino *et al.*, 2007).

4.2 Descripción botánica de *Capsicum chinense*.

El hábito de crecimiento de estas plantas es determinado y se comporta como semi-perenne, su ramificación es erecta, con tres o cinco ramas primarias y de nueve a trece secundarias; sus hojas son grandes, verde oscuro de 10 a 15 cm de largo y ancho, respectivamente (Navarrete *et al.*, 2002). Tiene raíz pivotante y un sistema radical que varía de 1 a 2 m de acuerdo al tipo de suelo. Sus frutos son bayas huecas con tres o cuatro lóbulos y las semillas se alojan en la placenta. Presentan en promedio seis frutos por axila; estos tienen un tamaño entre 2 a 6 cm; son de color verde en estado inmaduro y amarillos, anaranjados y rojos en estado maduro (Navarrete *et al.* 2002).

4.3 Taxonomía de *Capsicum chinense* Jacq.

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

Especie: *Capsicum chinense* Jacq. (Plants database, 2011)

4.4 Distribución y origen

En México, *Capsicum chinense*, se cultiva principalmente en Yucatán, Quintana Roo, Campeche y parte de Tabasco, es característico por su sabor fuertemente picante (Navarrete *et al.*, 2002; Ayala, 2004).

El centro de origen de esta especie está ubicada en la región del Amazonas (Trujillo, 2005). Gonzales *et al.*,(2006) menciona que de las tierras bajas de la cuenca Amazónica, se dispersó a Perú durante la época prehispánica, su distribución también se dirigió hacia la cuenca del Orinoco (ubicada actualmente en territorios de Colombia y Venezuela) hacia Guyana Francesa y las Antillas del Caribe; estos mismos autores sugieren que la introducción prehispánica del chile habanero en el Caribe se debió a migraciones indígenas de agricultores y alfareros procedentes de Sudamérica, pertenecientes a grupos arahuacos (originarios de Puerto Rico) que viajaron por las Antillas menores hasta llegar a Puerto Rico, La Española (República Dominicana y Haití), Jamaica y Cuba entre los años 250 y 1000 d.C.

Se cree que probablemente el *C. chinense* fue introducido a la península de Yucatán desde Cuba, ya que se tenía mayor comercio con la isla, lo que podría explicar su nombre popular de habanero (López, 2009; Long-Solís, 2004).

4.5 Importancia y producción del cultivo

El chile habanero es considerado uno de los más pungentes (200,000 a 500,000 unidades “Scoville”), por sus altos contenidos de capsaicina, lo que ha generado una creciente demanda en Estados Unidos, Japón, China, Tailandia, Inglaterra, Canadá, Cuba y Panamá. Sin embargo, los únicos países exportadores son Belice y México (Ramírez *et al.*, 2005).

La superficie de siembra de esta especie en México durante el 2004 fue de 955.59 ha, con una producción de 5,183.17 toneladas (Aceves *et al.*, 2008), para el 2009, la península de Yucatán sumó 445 ha sembradas y 423 ha cosechadas con un total de 5,431 toneladas de producción. También se produce en otros estados con mucho menor superficie de siembra , como en Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila,

Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (SIAP, 2013).

El estado de Yucatán en el 2009 ocupó el 78.8% del total del área sembrada en la península de Yucatán, pero sus rendimientos fueron menores con respecto al estado de Quintana Roo (71.78 t ha^{-1}), debido a la alta tecnología de producción en invernadero con la que este estado cuenta actualmente (26 hectáreas) (SIAP, 2013).

El 50% de los productores del estado de Yucatán producen con tecnología baja, el 30% con tecnología media y solo el 20%, tiene tecnología alta, lo que pone en desventaja el rendimiento por hectárea. La tecnología baja consiste en riegos eventuales de auxilio, no hay control de malezas y no se aplican fertilizantes, su rendimiento promedio es de 5 t ha^{-1} ; La tecnología media consiste en con riegos parciales en periodos críticos, fertilización y control de malezas, con un rendimiento de 5 a 15 t ha^{-1} y la tecnología alta con riegos constantes, labores culturales, control de plagas y fertilización, con un rendimiento de 15 a 40 t ha^{-1} (Rincones, 2009).

El 90% de la producción se comercializa como fruto fresco y el 10% restante se dirige a la elaboración de salsas, pastas y deshidratados (SAGARPA, 2004). El principal proveedor de este fruto, en la central de abastos de México D.F., es Yucatán, pero la mayor comercialización se realiza en el Mercado de Oxkutzcab del municipio que lleva el mismo nombre en el estado de Yucatán y en algunos casos es vendida a comercializadores nacionales (Rincones, 2009).

Estados Unidos es el destino principal del chile procesado, el mercado está dirigido para consumo interno de grupos étnicos, industria de condimentos, especias, la industria de alcaloides y extractos usados como base de pinturas de alta resistencia a la corrosión (Rincones, 2009).

La producción actual de chile habanero no cubre muchas veces la demanda local necesaria para la producción de salsas y condimentos (Borges, 2006) y ante la creciente demanda de este fruto resulta imperante establecer nuevas técnicas en la

producción de este fruto con el objetivo de mantener o mejorar sus características genéticas de importancia comercial.

El cultivo de tejidos es considerado una herramienta útil en la multiplicación masiva de genotipos élite (vigorosos, alto rendimiento, libres de patógenos y enfermedades, etc.), de Chile y otros cultivos (Robert *et al.*, 2004). Esta técnica se basa en la capacidad que tienen las células vegetales de reproducir nuevos individuos idénticos a la planta madre.

4.6 Cultivo de tejidos vegetales

Se le llama cultivo de tejidos vegetales al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un órgano completo (hoja, raíz, tallo, antera, fruto etc.) o fracción del mismo, bajo condiciones artificiales, asépticas y controladas, para regenerar plantas, tejidos u órganos (Rojas *et al.*, 2001; Abdelnour-Esquivel *et al.*, 1994).

El objetivo de esta técnica es obtener plantas idénticas a la planta madre (clones) libres de virus y enfermedades y la producción masiva en espacios reducidos en corto tiempo (Rojas *et al.*, 2004).

Entre los componentes principales de esta técnica se pueden mencionar los siguientes (Rojas *et al.*, 2004):

- El explante es el tejido, órgano o embrión vegetal provenientes de una planta madre con características deseables (Rojas *et al.*, 2004).
- Morfogénesis es la ruta que sigue el explante bajo estímulos químicos (reguladores de crecimiento) y físicos (luz y temperatura) para dar lugar a una o más plantas. Existen dos rutas para que ocurra la morfogénesis: la organogénesis y la embriogénesis somática. **La organogénesis** se refiere a la generación de órganos (vástagos o raíces) directa del explante (organogénesis directa); **Embriogénesis somática** consiste en la generación de embriones a partir de células de órganos (embriones diploides) o gametos (embriones haploides) directamente del explante

(embriogénesis directa) o con la formación previa de callo (embriogénesis indirecta) (Rojas *et al.*, 2004).

- Medio de cultivo es el conjunto de elementos nutritivos (macro y micronutrientes), fuente de carbono (sacarosa, glucosa, fructosa, etc.), de consistencia sólida a líquida (agentes gelificantes), vitaminas, aminoácidos, antioxidantes, reguladores de crecimiento (Rojas *et al.*, 2004).
- Condiciones físicas: de luz y temperatura (22 a 28 °C) en las cuales se cultivan las células, tejidos u órganos, para su óptimo desarrollo (Rojas *et al.*, 2004).

4.7 Regeneración *in vitro* de *Capsicum chinense*.

Utilizando la técnica de cultivo *in vitro* conocida como micropropagación, se han logrado desarrollar distintos protocolos para la obtención de plantas de *Capsicum chinense*.

Santana-Buzzy *et al.* (2005) utilizaron como explantes, nudos y segmentos nodales para evaluar el efecto de la edad del explante (25-30 días de edad), dos concentraciones de sales basales (100 y 50%), tres concentraciones de bencil amino purina (BAP) (0.35, 0.43 y 0.69 mg L⁻¹), cinetina (0.34, 19.89 y 31.78 mg L⁻¹) y thidiazurón (TDZ) (0, 0.024, 0.050, 0.070, y 0.099 mg L⁻¹), en la formación de brotes adventicios. Ellos encontraron que la mayor formación de brotes se obtuvo con los nudos de plántulas de 25 días de edad (7-8 brotes por explante) con 3.4µM de TDZ, las plantas obtenidas en este tratamiento fueron más vigorosas y presentaron una morfología normal.

Por otro lado, Sanatombi y Sharma (2007) emplearon explantes de hojas, cotiledones e hipocótilos de las variedades Umorok y Chienpgi de *Capsicum chinense* para evaluar el efecto de seis diferentes concentraciones de bencil aminopurina (BAP) y ácido indol acético (AIA), en la formación de brotes, en la fase de enraizamiento se evaluaron dos concentraciones de ácido naftalacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético AIA, sobre la longitud y el número de raíces de las plántulas obtenidas. El

explante de hoja de la variedad Umorok, tuvo la mejor respuesta en el tratamiento (10.7 ± 1.92 brotes por explante) con las concentraciones de 1.9 mg L^{-1} de BAP y 0.19 mg L^{-1} de AIA. En cuanto al enraizamiento el mejor tratamiento en la variedad Umorok fue 0.09 mg L^{-1} de ANA en número de raíz (73.0 ± 1.45 raíces por planta) y en longitud la concentración fue 0.04 mg L^{-1} de IBA ($7.1 \pm 0.44 \text{ cm}$).

Los mismos autores desarrollaron un protocolo para *C. chinense* cv. Umorok evaluando diferentes concentraciones de BAP ($0.5 - 2 \text{ mg L}^{-1}$), cinetina ($0.4 - 1.9 \text{ mg L}^{-1}$) y zeatina (Z) ($0.8 - 3.2 \text{ mg L}^{-1}$) en combinación con 0.09 mg L^{-1} de AIA, se utilizaron como explantes meristemos apicales. Se obtuvieron alrededor de 15 plantas por planta madre, en el medio enriquecido con $91.2 \text{ }\mu\text{M}$ de Z o 0.7 mg L^{-1} de BAP con 0.1 mg L^{-1} de cinetina (Sanatombi y Sharma ,2008)

Del mismo modo Valadez-Bustos *et al.* (2009) observó la mejor respuesta en cuanto a la formación de brotes en los explantes de hipocótilo (14.6 brotes por explante) en un medio MS adicionado con 0.02 mg L^{-1} de AIA y 0.5 mg L^{-1} de BAP. Las plantas obtenidas tuvieron un 95% de supervivencia en la etapa de aclimatación.

De igual forma Kehie *et al.* (2012) desarrollaron una metodología a partir de segmentos nodales utilizando diferentes concentraciones de TDZ (0.04 a 0.7 mg L^{-1}) y BAP (0.1 a 1.6 mg L^{-1}). Ellos observaron la mayor formación de brotes (13 ± 0.70 brotes por explante) a una concentración de 0.4 mg L^{-1} de TDZ, seguido del tratamiento con BAP a 0.8 mg L^{-1} y (10 ± 0.37 brotes). También se evaluaron el enraizamiento de las plántulas a diferentes concentraciones de AIA (0.03 a 0.1 mg L^{-1}), la mayor formación y elongación de raíces (0.53 a 4.29 cm), se observó a la concentración de 0.1 mg L^{-1} de ANA.

Aunque los protocolos antes mencionados son eficientes en cuanto a la regeneración de plantas, la técnica de propagación *in vitro* presenta algunas limitantes económicas y técnicas.

4.8 Limitantes del cultivo de tejidos

Las limitantes de esta técnica se reflejan en el costo y la calidad de las plantas regeneradas. Por ejemplo el agar que se utiliza como soporte en los medios de cultivo, tiene inconvenientes económicos (alto costo) y técnicos (reduce la concentración de oxígeno e inhabilita la difusión de los nutrimentos del medio), que afecta la diferenciación y el desarrollo de los tejidos, además de reducir la sobrevivencia en la fase de aclimatación. (Fujiwara *et al.*, 1993; Ichimura y Oda, 1998).

Por otro lado, las altas concentraciones de sacarosa y sales basales en los medios de cultivo y la baja concentración de CO₂ en el ambiente dentro del recipiente de cultivo son algunos de los factores que limitan la fotosíntesis de las plantas cultivadas *in vitro* (Fujiwara y Kozai, 1995; Jeong *et al.*, 1995).

Algunas de las alteraciones que se han encontrado en las plántulas obtenidas *in vitro* son, estomas siempre abiertos, tasas altas de transpiración (Zobayed *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2003), diferentes perfiles (síntesis y depositación) de cera epicuticular (Correll y Weathers, 2001), actividad diferencial de enzimas relacionadas con la fotosíntesis, aumento en la relación C/N (Premkumar *et al.*, 2001; Aragón *et al.*, 2005), células epidérmicas irregulares, abundantes espacios intercelulares, cambium colapsado, raíces sin ramificación y sin pelos radicales (Paz, 2004). Asimismo, en especies C₄ no se observa la típica anatomía Kranz en las hojas (Rodríguez *et al.*, 2003). Dichas diferencias pueden variar dependiendo de la especie cultivada.

Para hacer más eficiente esta técnica se han desarrollado algunas modificaciones tal es el caso de los sistemas autotróficos o mixotróficos en los que se va eliminando o reduciendo las concentraciones de sacarosa y al mismo tiempo incrementando la concentración de CO₂ en los envases, se han obtenido excelentes resultados en cuanto a la actividad fotosintética reflejada en la acumulación de peso seco, alargamiento de brotes y aclimatación de plantas bajo condiciones de invernadero (Fujiwara y Kozai, 1995).

Por otro lado algunos componentes (soluciones nutritivas y sustratos) de la hidroponía resultan ser una alternativa para hacer más eficiente la propagación. Dado que se ha observado que los requerimientos nutricionales para cada especie son diferentes, las soluciones nutritivas se pueden ajustar a dichos requerimientos así como los sustratos pueden proporcionar un adecuado balance oxígeno-agua.

4.9 Hidroponía

La hidroponía se define como la ciencia del cultivo de plantas sin uso de suelo, en un medio inerte (sustrato), al que se le agrega una solución nutritiva que contiene todos los elementos esenciales requeridos por la planta para su crecimiento normal (Bordado, 2005).

4.9.1 Soluciones nutritivas

En los cultivos hidropónicos todos los elementos esenciales se suministran a las plantas disolviendo las sales fertilizantes en agua. La elección de las sales dependerá de proporción relativa de iones que se deben añadir y el grado de solubilidad de las sales (Resh, 200).

La selección de la concentración de una solución nutritiva debe ser tal que el agua y los iones totales sean absorbidos por la planta en la misma proporción en la cual están presentes en la solución (Juárez *et al.*, 2006).

La solución de Steiner es una de las soluciones más utilizadas en los cultivos hidropónicos y que se distingue por sus relaciones mutuas entre aniones y cationes, expresadas en por ciento del total de $\text{mM}\cdot\text{L}^{-1}$. Las relaciones mutuas entre los iones en la Solución Nutritiva Universal de Steiner en porcentaje del total de $\text{mM}\cdot\text{L}^{-1}$ es de 60:5:35 para NO_3^- : H_2PO_4^- : SO_4^{2-} y 35:45:20 para K^+ : Ca^{2+} : Mg^{2+} (Juarez, *et al.*, 2006).

Hoagland y Arnon (1950) formularon dos soluciones nutritivas las cuales han sido ampliamente utilizadas y el término "Solución de Hoagland", modificada por Jhonson *et al.* (1957), contiene iones amonio como también de nitrato dando como resultado una

mejor solución buffer. Plantas de muchas especies han sido exitosamente desarrolladas en esta solución de Hoagland modificada (Juarez *et al.*, 2006).

4.9.2 Soluciones hidropónicas *in vitro*

Barrales (2009), evaluó el efecto de la solución Arnon & Hoagland en conjunto con bajas concentraciones de sacarosa (1.5%) en el enraizamiento de brotes adventicios de chile habanero y observó que las plántulas tuvieron valores más altos en cuanto a tamaño de planta, número de hojas, número de raíces y acumulación de peso seco, en comparación con la plántulas enraizadas en el medio de Murashige y Skoog con 3% de sacarosa.

En *Laelia anceps* se evaluó el uso de medios líquidos (Medio de Murashige y Skoog (MS) y solución de Steiner) con ayuda de soportes físicos (fibra de coco y Promix) en la reproducción *in vitro*. Los tratamientos que incluyeron fibra de coco y Promix, permitieron que las plantas duraran la totalidad del periodo experimental (60 días) con una contaminación de 35%, ambos medios fueron igualmente eficientes en la promoción del crecimiento de plántulas. Por otra parte la acumulación nutrimental en el follaje de los explantes fue mayor en el medio contenido Promix (Sánchez, 2009).

4.9.2. Sustratos

Sustrato se considera a todo material sólido distinto al suelo *in situ*, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular, dando soporte para la planta. De acuerdo a sus propiedades se pueden clasificar en: químicamente inertes (arena granítica o silícea, grava, perlita, lana de roca entre otros); químicamente activos (turba, corteza de pino, vermiculita, fibra de coco, entre otros) (Bordado, 2005).

La importancia de un sustrato radica en sus propiedades e indicadores ya que debe ser suficientemente denso y firme para sostener en su sitio las plantas, retener la humedad para el buen aprovechamiento del agua, poroso para facilitar el drene del agua en exceso y la entrada de oxígeno a las raíces. Las características idóneas de un sustrato

dependerán de las necesidades de cada especie con respecto a condiciones climáticas, sistema y programas de riego y fertilización (Urrestarazu, 2004).

4.9.3 Propiedades físicas

Entre las propiedades físicas más importantes son: porosidad, la granulometría, retención de agua y aireación, y la densidad aparente.

La porosidad es el volumen total del medio que no está ocupado por partículas sólidas, por lo tanto, lo estará por aire o agua en cierta proporción (Bordado, 2005). La porosidad del sustrato y particularmente su distribución entre la porosidad del aire y retención de humedad son las propiedades que más influyen en el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Cabrera, 1999).

La densidad aparente nos permite conocer la cantidad de sustrato contenido al comparar un volumen determinado. También puede servir como indicador del grado de compactación, ya que la densidad aparente aumenta con la compresión (Ansorena, 1994). Los valores de densidad aparente se prefieren bajos ($0.7-0.1 \text{ g cm}^{-3}$) para garantizar un mayor porcentaje de porosidad total.

La granulometría, se refiere al tamaño de partícula, es un factor importante puesto que, el tamaño de los gránulos o fibras condicionan el comportamiento del sustrato, debido a que varían su densidad aparente y su comportamiento hídrico a causa de su porosidad (Bordado, 2005).

4.9.3 Propiedades químicas

Las propiedades químicas de los sustratos caracterizan las transferencias de material entre el sustrato y la solución del sustrato: reacciones de disolución e hidrólisis de los constituyentes minerales (química), reacciones de intercambio de iones (físico-química) y reacciones de biodegradación de la materia orgánica (bioquímica).

La capacidad de intercambio de cationes es una de las propiedades químicas de los sustratos y se define como la suma de cationes que pueden ser adsorbidos por unidad de peso (o volumen) del sustrato. Dichos cationes pueden ser retenidos frente al efecto

lixiviante del agua y disponibles para la planta (Urrestarazu, 2004). Esta propiedad la proporcionan algunas partículas inorgánicas y orgánicas cargadas negativamente en su superficie. Las cargas negativas generan fuerza de atracción hacia los elementos cargados positivamente, sin reaccionar químicamente (Bunt, 1998; Anicua, 2008). El valor óptimo de la capacidad de intercambio catiónico de los sustratos depende estrechamente de la frecuencia del riego (Urrestarazu, 2004).

Entre otras características que se deben considerar de un sustrato es la buena estabilidad química que evite cualquier liberación de elementos que puede generar problemas de salinidad o fitotoxicidad o inducir precipitados indeseables en la solución (Castilla, 2004).

Entre los sustratos más utilizados en la hidroponía se encuentran la fibra de coco, el tezontle, la vermiculita y la perlita en forma pura o en mezclas para mejorar sus características fisicoquímicas (Abad *et al.*, 2003).

4.9.4 Fibra de coco

La fibra de coco es un residuo orgánico industrial, se genera después de que el mesocarpo fibroso del fruto del coco (*Cocos nucifera*) ha sido procesado para extraer las fibras más largas. Es un material ligero y presenta una porosidad total muy elevada por encima del 93% (volumen), retiene cantidades aceptables de agua, tiene buena aireación y está relacionada con el tamaño de la partícula, se contrae muy poco cuando pierde agua, su pH oscila entre 4.6 y 6.25. La conductividad eléctrica dependiendo del origen varía entre 0.39 dS m⁻¹ y 6.77 dS m⁻¹. La capacidad de intercambio catiónico se encuentra entre 31 meq 100 g⁻¹ y 97 meq 100 g⁻¹ (Abad *et al.*, 2003).

4.9.5 Vermiculita

La vermiculita es una arcilla o una roca compuesta (mineral) por filosilicatos hidratados. Su capacidad de intercambio de iones positivos es de 90 a 150 meq 100 g⁻¹, lo que también le proporciona una excelente cualidad para la agricultura por su gran intercambio catiónico, puede adsorber 5 veces su peso en agua y tiene una elevada aireación. Es un material estéril como consecuencia a su rápido secado tras la

incineración en un horno a 800 °C. EL pH es neutro y puede llegar a presentar reacciones alcalinas (Abad et al., 2003).

Muchas vermiculitas contienen del 5 al 8% de potasio y del 9 al 12% de magnesio asimilable. No absorben Cl^- , SO_4^{2-} ni NO_3^- , pero puede llegar a absorber cantidades importantes de PO_4^{3-} (Abad et al., 2003).

4.9.6 Perlita

Es material silíceo de origen volcánico extraído de ríos de lava, es estéril, absorbe tres o cuatro veces su peso en agua, siendo esencialmente neutra con un pH de 6.0 a 8.0, aunque sin capacidad tampón. No tiene capacidad de intercambio iónico y no contiene nutrmentos minerales. Es más útil para incrementar la aireación de las mezclas (Resh, 2001).

4.9.7 Tezontle

El tezontle es una roca de origen volcánico, proveniente de lava que al ser expelida y enfriarse de golpe, forma fragmentos porosos, redondeados o irregulares, está constituida principalmente, por silicatos de aluminio (Bures, 1997), se considera un material relativamente pesado (densidad aparente $> 0.4 \text{ g cm}^3$) como sustrato, tiene elevada capacidad de aireación y poca capacidad de retención de agua fácilmente disponible, por lo que en muchas ocasiones se utiliza en conjunto con materiales orgánicos o materiales con una elevada retención de agua (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características físicas de partículas de tezontle de diferentes diámetros de la región de Texcoco estado de México (Ordaz, 2010)

Tamaño de partícula (mm \varnothing)	Da (g cm ³)	Ch Carga constante (cm min ⁻¹)	Pt (%)	Pai (%)	Para (%)
Sin cribas	1.04	1.6	55	34	21
>6.8	0.84	2.9	55	34	21
6.8-4.8	0.82	1.4	59	45	14
4.8-3.4	0.82	3.3	59	45	14
3.4-2.0	0.83	1.5	59	39	20
2.0-1.0	0.85	1.7	59	23	36
1.0-0.5	0.96	1.5	59	7	52
0.5-0.25	1.11	1.3	59	7	53
<0.25	1.54	0.1	45	2	43

Densidad aparente (Da); Conductividad hidráulica (Ch); Porosidad total (Pt); Porosidad de aireación (Pai);: porosidad de retención de agua (Para)

0:50,30:70,10:90) en el enraizamiento en brotes de papa dulce (*Ipomoea batatas*). Se observó en los brotes enraizados en la mezcla de vermiculita con pulpa de papel en una proporción 30:70, que el peso fresco de la parte aérea y las raíces de los brotes enraizados fue 2.7 veces mayor que el tratamiento control (agar), en cuanto al peso seco de las hojas, el tallo y la raíz fue al menos dos veces mayor comparado con el control, lo que se reflejó en la tasa fotosintética neta que fue de 15.3 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ H}^{-1}$ comparada con 9.8 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ h}^{-1}$ de las plántulas en el tratamiento control. En la fase de aclimatación no se observaron mayores diferencias en cuanto a la sobrevivencia a la aclimatación entre los tratamientos (90-100%) con excepción del tratamiento control (73%).

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Caracterización física de sustratos

Se evaluaron las propiedades físicas y químicas de 18 sustratos elaborados a partir de mezclas de: perlita-fibra de coco (PF), fibra de coco-vermiculita (FV), vermiculita-perlita (VP), perlita-tezontle (PT), fibra de coco-tezontle (FT), vermiculita-tezontle (VT) en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3.

El tamaño de partícula de la perlita, el tezontle y la fibra de coco fue de 0.5 a 1 mm de diámetro, para obtener la granulometría requerida se utilizó una criba con las dimensiones respectivas. En el caso de la vermiculita se utilizó la denominada comercialmente grado uno.

5.1.1 Densidad aparente (Da)

La Da se determinó aplicando la fórmula masa sobre volumen. Para determinar esta característica se utilizaron permeámetros con perforaciones en la parte inferior. En primer lugar se determinó el volumen de los permeámetros, para ello, se pesó el recipiente con la cinta adhesiva que cubría las perforaciones, posteriormente, se llenó con agua y se pesó nuevamente, al peso obtenido se le restó el peso del permeámetro sin agua y el valor obtenido se tomó como el volumen del permeámetro. La masa se determinó saturando los sustratos con agua en recipientes de 1000 mL, una vez saturadas los sustratos se colocaron en los permeámetros hasta llenarlos y se dejó drenar el agua retirando la cinta adhesiva de las perforaciones. Una vez drenadas por completo, las muestras se pusieron en charolas de aluminio dentro de una estufa a una temperatura constante de 70 °C por aproximadamente 24 h y se pesó nuevamente. El peso se obtuvo restando el peso de la charola y la diferencia se tomó como la masa del sustrato. El valor de la densidad aparente se obtuvo utilizando la siguiente fórmula.

$DA = \text{peso seco de la muestra} / \text{volumen del permeámetro}$

5.1.2 Porosidad total (Pt), porosidad de aireación (Pai) y retención de humedad (Rh)

Se siguió el mismo procedimiento que para la determinación de la Da con respecto a los permeámetros. En este caso se tomó el peso de los sustratos saturados y drenados. Con las diferencias de estos datos se obtuvo el volumen de aire y con la diferencia del peso saturado y el peso del sustrato seco se calculó el volumen de poros.

Para obtener los porcentajes de Pt, Pai y Rh, se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Porosidad total (\%)} = \% Pt = (\text{volumen total de poros} / Vp) * 100$$

$$\text{Porosidad de aireación (\%)} = \% Pai = (Vai / Vp) * 100$$

$$\text{Porosidad de aireación (\%)} = \% Pai = (Vai / Vp) * 100$$

$$\text{Retención de humedad (\%)} = \% Rh = \% Pt - \% Pai$$

5.1.3 Curva de retención de agua

Para determinar esta característica se utilizó el método propuesto por De Boodt *et al.* (1974) y Ansorena (1994), que se basa en aplicar tensiones de 0 a 100 cm a los sustratos saturados los cuales se colocaron en embudos. En las curvas de retención de humedad se consideraron los siguientes parámetros (Burés, 1997):

Agua difícilmente disponible (ADD): Es el agua, en tanto por ciento en volumen, que queda retenida en el sustrato tras aplicar una tensión de 100 cm de columna de agua.

Agua de reserva (AR): es el porcentaje en volumen de agua que se libera entre 50 y 100 cm de columna de agua de tensión sobre el sustrato.

Agua fácilmente disponible (AFD): Es el porcentaje en volumen de agua que se libera entre 10 y 50 cm de tensión en columna de agua sobre el sustrato.

Agua no disponible (AND) es el porcentaje en volumen de agua que se libera al aplicar una tensión de 0-10 cm de columna de agua.

5.2 Regeneración de plantas de distintos explantes.

En esta sección se describe la metodología seguida en tres ensayos (embriones, hipocótilos y embriones obtenidos a partir de dos tipos de remojo), de los cuales se generó información para establecer un experimento con explantes de embrión (Figura 1).

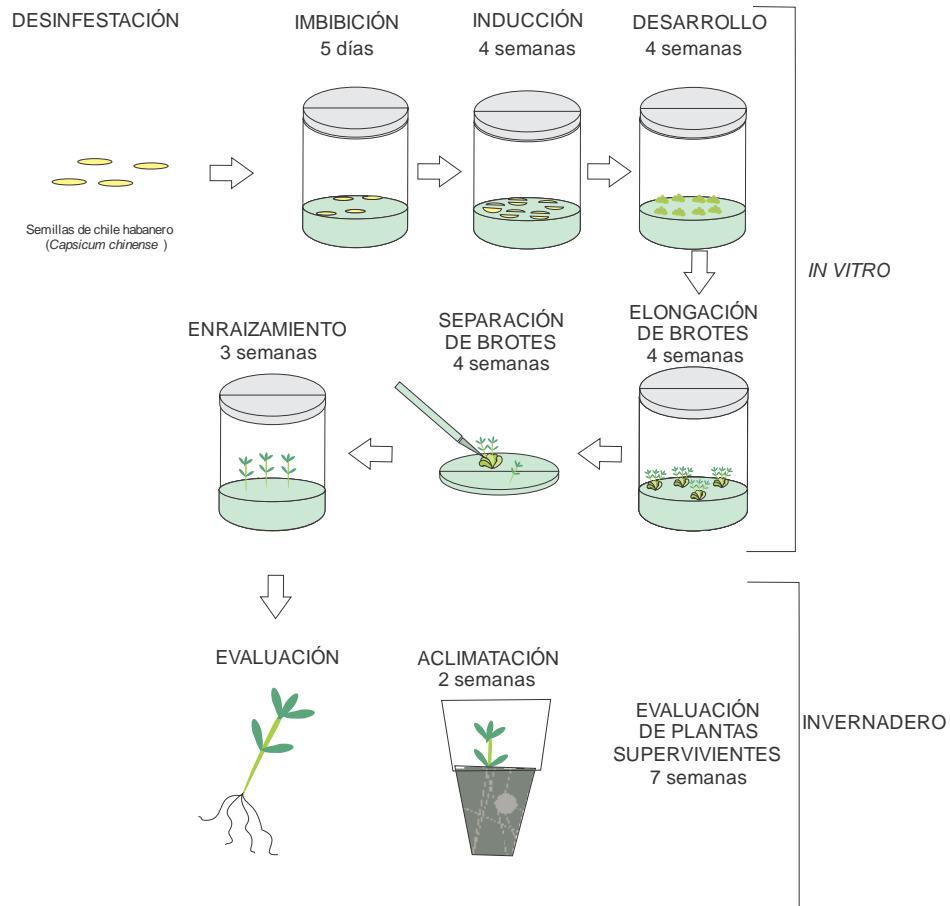


Figura 1. Protocolo para la regeneración in vitro de plántulas de chile habanero var. Naranja (*Capsicum chinense*)

Las concentraciones de los reguladores de crecimiento en las etapas de inducción, desarrollo y enraizamiento *in vitro* están basadas en el protocolo establecido por Valadez-Bustos *et al.* (2009) para chile habanero.

5.2.1. Ensayo I. Explantes de embrión en sustratos bajo condiciones *in vitro*

5.2.1.1. Desinfestación e imbibición de las semillas

Semillas de chile habanero, var. Naranja se desinfestaron con una solución de fungicida Daconil (Clorotaloniltetracloroisotalonitrilo al 75%) a una concentración de 1 g L⁻¹ durante 5 min; posteriormente se les agregó una de hipoclorito de sodio al 1.8 % de cloro activo y 1.0 mL L⁻¹ de jabón líquido durante 20 min, después se efectuaron cuatro enjuagues con agua destilada estéril en condiciones de asepsia (Figura 1).

Las semillas desinfestadas se colocaron en frascos de vidrio de 150 mL con 30 mL de cada sustrato (esterilizado en autoclave durante 40 min): Fibra de coco-Tezontle (FT), Perlita-Fibra de coco (PF), Perlita-Tezontle (PT) y Vermiculita-Perlita (VP) en proporción 3:1 por presentar mejor balance en sus características físicas. Los sustratos se saturaron con 30 ± 5 mL del medio Murashige y Skoog, (1962) (MS) al 50 % mas 10 g L⁻¹ de sacarosa (Cuadro 2). Los recipientes con los medios y sustratos fueron esterilizados a 121°C en autoclave durante 20 min. Las semillas permanecieron en los medios anteriores durante cuatro días, para reblandecer la testa y facilitar el manejo posterior (Figura 1).

5.2.1.2 Medios de cultivo.

Para las diferentes fases de la regeneración de plantas (inducción, desarrollo y enraizamiento) se elaboraron los medios a diferentes concentraciones de las sales basales Murashige y Skoog (MS) y la solución nutritiva Arnon y Hoagland (1940) (H) (Cuadro 2) suplementados con distintas concentraciones de sales, sacarosa y reguladores de crecimiento (Cuadro 3).

Cuadro 2. Componentes del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS), y la solución de Arnon y Hoagland (1940) (H).

Componentes	Concentración (mg L⁻¹)	
	MS	H
Sales minerales		
KNO ₃	1900	1010
NH ₄ NO ₃	1650	--
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	--
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370	490
KH ₂ PO ₄	170	--
Fe SO ₄ ·7 H ₂ O	27.8	3
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	17	--
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	8.6	0.22
H ₃ BO ₃	6.3	2.86
KI	0.83	--
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.09
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	--
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.025	0.08
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3	--
NH ₄ H ₂ PO ₄	--	230
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	--	706
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	--	1.81
Vitaminas		
Glicina	2	--
Mio-inositol	100.0	--
Ácido nicotínico	0.5	--
Piridoxina	0.5	--
Tiamina	1.0	--

Cuadro 3. Medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas de la propagación *in vitro* de chile habanero.

Medio	Sales	Sacarosa g L ⁻¹	Inducción mg L ⁻¹	Desarrollo mg L ⁻¹	Enraizamiento mg L ⁻¹
1	MS 100%	30			
2	MS 100%	15			
3	MS 50%	15			
4	MS 50%	7.5	4.0 BAP 0.3 AIA	1.0 AG ₃ 4.0 AgNO ₃	1.0 AIB 2.0 AgNO ₃
5	MS25%	7.5	2.0 AgNO ₃		
6	MS25%	3.7			
7	H	30			
8	H	15			

MS Murashige y Skoog, (1962), H Arnon y Hoagland, BAP N₆.bencil aminopurina, (AIA) ácido indolacético, AgNO₃ nitrato de plata, ácido giberélico AG₃.

Cuadro 4. Denominación de tratamientos con sustratos y medios de cultivo

Denominación de tratamiento	Sustrato	Medio de cultivo y concentración	Concentración de sacarosa (g L ⁻¹)
A1	Agar	MS 100%	30
A2		MS 100%	15
A3		MS 50%	15
A4		MS 50%	7.5
A5		MS 25%	7.5
A6		MS 25%	3.7
A7		H	30
A8		H	15
PT1	PT (perlita-tezontle)	MS 100%	30
PT2		MS 100%	15
PT3		MS 50%	15
PT4		MS 50%	7.5
PT5		MS 25%	7.5
PT6		MS 25%	3.7
PT7		H	30
PT8		H	15
FT1	FT (fibra de coco-tezontle)	MS 100%	30
FT2		MS 100%	15
FT3		MS 50%	15
FT4		MS 50%	7.5
FT5		MS 25%	7.5
FT6		MS 25%	3.7
FT7		H	30
FT8		H	15
PF1	PF (perlita-fibra de coco)	MS 100%	30
PF2		MS 100%	15
PF3		MS 50%	15
PF4		MS 50%	1.5
PF5		MS 25%	7.5
PF6		MS 25%	3.7
PF7		H	30
PF8		H	15

(MS) Murashige y Skoog, (1962), (H) Arnon & Hoagland (1940); Agar (A); Perlita-Tezontle (PF); Perlita-Fibra de coco (PF).

5.2.1.3 Inducción de brotes a partir de embrión en sustratos *in vitro*

Para inducir la formación de brotes adventicios, las semillas previamente embebidas, fueron seccionadas en dos partes. Las fracciones se colocaron en cuatro sustratos saturados (FT, PF PT y agar) con 30 ± 5 mL de los medios de cultivo para inducción ,

integrados por sales basales MS (25, 50 y 100%) y la solución Arnon y Hoagland adicionados con BAP, AIA y AgNO_3 cada uno con dos niveles de sacarosa (Cuadro 3 y 4). La duración de esta etapa fue de cuatro semanas aproximadamente al cabo de las cuales se contabilizó el porcentaje supervivencia de los explantes y el porcentaje de explantes que formaron brotes (Figura 1).

En la evaluación de supervivencia, se consideró explante vivo al que presento coloración verde y turgencia. Para evaluar la variable porcentaje de explantes que formaron brotes, se consideró la formación de primordios de brotes (protuberancias) en el explante como síntoma temprano de la organogénesis.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con treinta y dos tratamientos resultado de la combinación factorial de tres factores: ocho medios de cultivo (MS al 25, 50 y 100 % y Arnon y Hoagland con dos niveles de sacarosa) y cuatro sustratos (PT, FC VP y agar). Cada tratamiento estuvo conformado de 5 repeticiones y la unidad experimental consistió en un frasco con 5 semillas divididas en dos.

5.2.4 Desarrollo de brotes de explantes de embrion en sustratos

Sólo los explantes que formaron brotes en los distintos tratamientos con agar se transfirieron a los medios de cultivo de desarrollo descritos en el Cuadro 3, ya que los explantes inducidos en los sustratos tuvieron escasa o nula respuesta. Los explantes fueron seccionados y subcultivados a medio de desarrollo fresco, cada cuatro semanas, para favorecer la elongación de los brotes (Figura 1).

5.2.5 Enraizamiento *in vitro*

Los brotes de aproximadamente que alcanzaron un longitud de 2 cm, fueron disectados del explante y colocados en tres sustratos PT, VP y agar (dada la poca respuesta en los sustratos FT y PF en la etapa de inducción) saturados con los medios MS (25, 50 y 100%) y la solución Arnon y Hoagland adicionados con ácido indolbutírico (AIB), nitrato de planta (Ag NO_3) y 15 g L^{-1} de sacarosa para inducir el sistema radical (Cuadro 3). Después de tres semanas, se evaluó el porcentaje de brotes enraizados en cada tratamiento (Figura 1).

Se utilizó un diseño factorial completamente al azar con dos factores: ocho medios de cultivo (MS 25, 50 y 100% y Arnon y Hoagland con dos niveles de sacarosa) y sustratos (VP, PT y agar). Cada tratamiento constó de 3 repeticiones y la unidad experimental fue un frasco con dos brotes.

En todas las etapas, los cultivos fueron incubados en un cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C y 16 h de luz proporcionada por lámparas de luz blanca fría fluorescente (intensidad lumínica = $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

5.2.6 Aclimatación

Las plantas regeneradas (brotes enraizados) fueron transferidas al invernadero una vez que se observó la formación de al menos tres raíces. Las raíces de las microplantas se lavaron con agua corriente para eliminar los residuos del sustrato o agar; enseguida, se sumergieron en una solución de fungicida (Daconil 1 g L^{-1}) y se transfirieron a recipientes de poliestireno de 250 ml que contenían peatmoss previamente saturado a capacidad de campo. Se colocó una bolsa de polietileno sobre los recipientes, la cual se retiró 15 días después. En esta etapa, se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas regeneradas, provenientes de los distintos tratamientos, después de 30 días se retiró la bolsa de polietileno (Figura1).

5.3 Ensayo 2. Regeneración de plantas de chile habanero a partir de explantes de hipocótilo en sustratos *in vitro*

5.3.1. Desinfestación y germinación de semillas de chile habanero en sustratos *in vitro*

Las semillas desinfestadas y embebidas fueron colocadas en sustratos en sustratos PT y VP como se describió en la sección 5.2.1. En esta etapa se calculó el porcentaje de germinación de las semillas en cada sustrato.

5.3.2. Inducción de brotes a partir de explantes de hipocótilo en sustratos *in vitro*

Las plántulas de 10 de días de edad fueron disectadas en la zona cercana a los cotiledones (hipocotilo), se obtuvieron fragmentos de 2 cm aproximadamente.

Posteriormente, éstos se colocaron de forma invertida a su posición original en la planta dentro de recipientes que contenían los distintos sustratos (PT, VP y agar) saturados con los medios de inducción (Cuadros 3 y 4). Durante las cuatro semanas posteriores al establecimiento de los explantes se contabilizó el porcentaje de supervivencia de los explantes y el porcentaje de explantes que formaron primordios de brote.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 24 tratamientos resultado de la combinación de dos factores de estudio; ocho medios de cultivo (25, 50 y 100% MS y Arnon y Hoagland con dos niveles de sacarosa cada uno) y sustratos (PT, VP y agar). Cada tratamiento constó de cinco repeticiones considerando como unidad experimental un frasco con cinco explantes de hipocótilo.

5.3.3 Desarrollo de brotes a partir de explantes de hipocótilo en sustratos

Los explantes de hipocótilo fueron transferidos a frascos que contenían, tres sustratos (PT, VP y agar) saturados con los ocho medios de desarrollo (Cuadro 3). Los explantes se colocaron en la posición que originalmente tenían en la planta de tal forma que la zona en la que se formaron primordios de brote o brotes adventicios quedo alejada del medio de cultivo. La duración de esta etapa fue de nueve semanas, durante las cuales se contabilizó el porcentaje de supervivencia de los explantes y el porcentaje de explantes que formaron primordios de brotes o brotes.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 24 tratamientos resultado de la combinación factorial de dos factores; ocho medios de cultivo (25, 50 y 100% MS y Arnon y Hoagland con diferentes con dos niveles de sacarosa) y sustratos (PT, VP y agar). Cada tratamiento constó de tres repeticiones y la unidad experimental consistió de un frasco con cinco explantes.

5.4 Experimento

5.4.1 inducción de brotes a partir de embriones en agar

Derivado de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores se seleccionó a los embriones como explantes y se determinó llevar a cabo la fase de inducción en agar, mientras que la fase de desarrollo de los brotes y enraizamiento en sustratos (Figura 2).

Se evaluó la supervivencia de los explantes, así como la formación de primordios de brotes. Del mismo modo que en los explantes de semilla se consideró al explante vivo aquel que tuviera las características de color verde y turgencia y nuevamente se consideró la formación de primordios de brote (protuberancias) como señal de dediferenciación celular. La evaluación de esta variable se llevó a cabo a los 30 días de que los explantes permanecieron en medio de inducción y durante el cambio a medio de desarrollo.

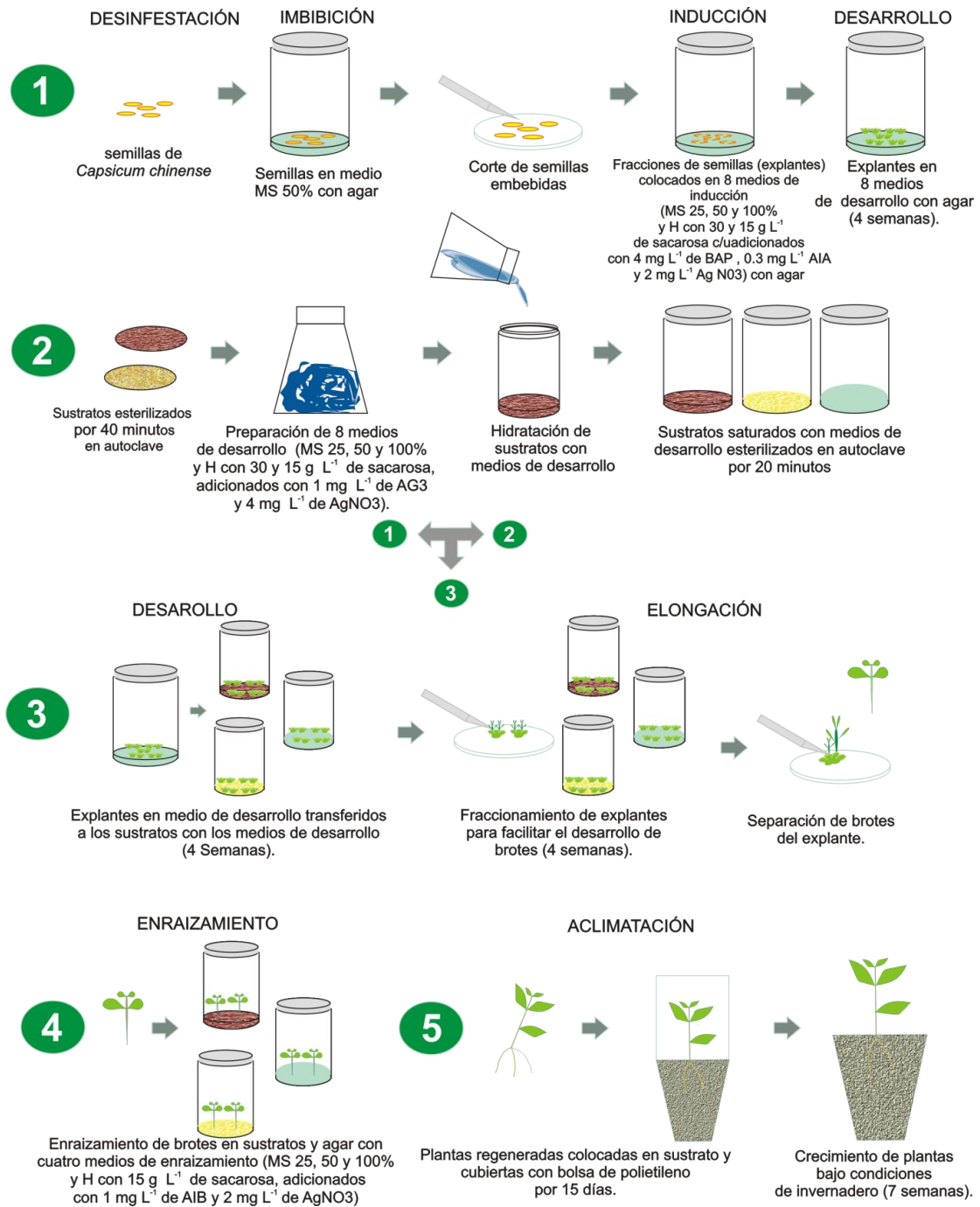


Figura 2. Protocolo para la regeneración de plantas *in vitro* con sustratos de chile habanero var Naranja (*Capsicum chinense*)

Las semillas fueron desinfestadas y embebidas por siete días de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 5.2.1. Posteriormente las semillas fueron fraccionadas en dos partes y colocadas en los medios de inducción con agar, durante 4

semanas aproximadamente (Figura 2). Después de 30 días de cultivados los explantes en los medios de inducción gelificados con agar. Se evaluó porcentaje de sobrevivencia, de explantes con primordios de brote y de explantes con vitrificados.

Para el análisis estadístico de las variables, supervivencia y explantes con brotes, se utilizó un diseño experimental completamente al azar: se consideraron tratamientos a los ocho medios de cultivo (MS 25, 50, 100 % y Arnold y Hoagland con dos niveles de sacarosa). La unidad experimental fue un frasco con cinco explantes (semilla fraccionada en dos) y 5 repeticiones.

5.4.2 Desarrollo de brotes adventicios

Los explantes fueron transferidos a medios de desarrollo con agar en los que permanecieron por cuatro semanas, después fueron transferidos a los sustratos (PT y VP) saturados con los diferentes medios de desarrollo (Cuadro 3). Los explantes se subcultivaron por tres ocasiones (cada cuatro semanas) a los medios de desarrollo. En cada cambio de medio se evaluó el tamaño de los explantes, peso seco y número de brotes (Figura 2).

Para las variables tamaño de explante, peso seco y número de brotes, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 24 tratamientos resultado de la combinación de dos factores; soluciones nutritivas (MS 25, 50 y 100% y Arnon y Hoagland con dos niveles de sacarosa) y sustratos (PT, VP y agar). La unidad experimental fue un frasco con dos explantes y con un mínimo de cinco repeticiones.

5.4.2.1 Análisis nutrimental del tejido de explantes

Los explantes de los diferentes tratamientos se colocaron en una estufa a 70°C durante 24 hrs, luego estos fueron triturados en mortero para poder determinar las concentraciones de macro y micro nutrimentos (P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B, siguiendo el procedimiento descrito por Alcántar y Sandoval (1999).

5.4.3 Enraizamiento *in vitro*

Los brotes de 1.5 a 2.0 cm de longitud fueron separados del explante y colocados en los sustratos saturados con los medios que contenían los medios de cultivo con sales basales de MS (25, 50 y 100%) y Arnon y Hoagland adicionados con 1 mg L⁻¹ AIB, 2 mg L⁻¹ de Ag NO₃ y 15 g L⁻¹ de sacarosa para inducir el sistema radical, durante tres semanas aproximadamente (Cuadro 3 y Figura 2). En esta etapa se evaluó el porcentaje de brotes que formaron raíces de cada tratamiento.

5.4.4 Aclimatación

Las plantas regeneradas, que lograron formar raíces fueron aclimatadas siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.6. Antes de colocarlas en los recipientes se evaluó: el número de hojas y raíces, la longitud de las raíces y del tallo. Las plantas se regaron con agua corriente periódicamente y se fertilizaron con fertilizante soluble “Miracle-Gro”[®] cada dos semanas, al 50 % de la concentración recomendada por el fabricante.

Después de haber retirado la bolsa de polietileno que cubría las plantas se evaluó la longitud de planta, número de hojas y diámetro de tallo. También se determinó el porcentaje de supervivencia de las plantas regeneradas a los 90 días de ser transferidas a condiciones de invernadero (Figura 2).

Para las variables de crecimiento, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 12 tratamientos; plántulas provenientes de los tratamientos con soluciones nutritivas (MS 25, 50 y 100% y Arnon y Hoagland) y sustratos (PT, VP y agar). Se consideraron como unidades experimentales las plantas provenientes de cada tratamiento con cinco repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización física de los sustratos y curvas de liberación de agua

De la combinación de cuatro materiales (fibra de coco, vermiculita, perlita y tezontle), en tres proporciones (1:1, 2:1 y 3:1) se obtuvieron 18 sustratos.

En el Cuadro 5 se reportan los valores de D_a , P_t , P_{ai} y P_{rh} , y en el Cuadro 6 se muestra el comportamiento de los sustratos en la retención de agua, en estos se puede observar que los valores para las distintas variables evaluadas difieren de acuerdo al tipo de material y a la proporción que guardan en la mezcla. Este comportamiento está relacionado con el tipo de poros inter e intra partículas y con la superficie específica que aumenta o disminuye las fuerzas de adhesión. Las partículas de mayor tamaño tienen menor superficie y menor porosidad entre sí mismas, en contraste con las partículas pequeñas que tienen mayor superficie específica con menor porosidad dentro de la misma (Bures, 1997; Handreck y Blanck 1994; Bunt, 1998).

6.1.1 Densidad aparente (D_a) y Porosidad

Todos los sustratos tuvieron valores de D_a menores a 0.7 g cm^{-3} (Cuadro 5), valor óptimo según de acuerdo a Abad *et al.* (1993), lo que significa que los sustratos obtenidos son ligeros y tienen un menor grado de compactación, lo que favorece el desarrollo del sistema radical, ya que aumenta el horizonte de exploración de las raíces en plantas completas (Ansorena, 1994; Hillel, 2004).

Los valores más bajos de D_a se presentaron en sustratos sin tezontle, como es el caso PF en proporción 1:1 y FV en las proporciones 1:1 y 2:1 con un valor de 0.11 g cm^{-3} seguidos de los sustratos VP en las proporciones 1:1 y 2:1 con valores de 0.13 y 0.12 g cm^{-3} , los valores del resto de los sustratos se encontró en un intervalo de 0.2 a 0.58 g cm^{-3} (Cuadro 5).

La disposición de oxígeno en el sistema radical de plantas completas, es necesaria puesto que las raíces son capaces de absorber más selectivamente los iones de la solución. Las condiciones de anegación (inundación) dificultan la absorción activa de los nutrientes minerales, presentando deficiencias de macro y micronutrientes

en los tejidos vegetales (Pardos, 2004). Un ejemplo es el calcio el cual es absorbido por los ápices radiculares, si las zonas apicales que están en incremento sufren una deficiencia de oxígeno, una escases de calcio aparece en los brotes. Debido a que el calcio no se mueve rápidamente desde las partes más viejas a las más jóvenes, lo que produce desórdenes como quemadura de puntas y pudrición apical (falta referencia).

Las condiciones de anoxia por efecto de inundación, ocasionan un aumento en la concentración de etileno en las plantas, lo que da lugar a síntomas morfológicos y fisiológicos característicos de situaciones de estrés (Lafitte, 2001).

De tal forma que, en los sustratos el balance entre el agua y el oxígeno se determina por la porosidad total, considerada la porción no solida del volumen del sustrato. La capacidad de retención de agua de un medio es el volumen de agua que se retiene después del riego y el drenaje. La cantidad de agua retenida por el medio particular es dependiente de la distribución y el tamaño de partícula y la altura del recipiente. El volumen del medio ocupado por aire a este nivel de humedad es la denominada capacidad de aireación (Baixaulis *et al.*, 2002)

Los sustratos que presentaron un mayor porcentaje de porosidad total fueron aquellos con fibra de coco, PF y FV en la proporción 2:1 con 95 y 89 % de poros respectivamente, seguido de VT en la proporción 3:1 con 87 % de poros valores ubicados dentro del intervalo optimo (> 85 %) según Abad *et al.*, (1993) (Cuadro 5)

La proporción de los materiales determinó el porcentaje de aireación en el caso de los sustratos PF, FV, FT PT y VP, puesto que las proporciones 1:1 y 3:1 (Cuadro 5) estuvieron, dentro del intervalo optimo (10-30%) sugerido por Abad *et al.*, (1993) no así en el sustrato VT donde la proporción 1:1 fue la única que se ubicó dentro del intervalo optimo (Cuadro 5).

La Porosidad de retención de humedad en los sustratos FV, FT, PT y VP en la proporción 3:1, fue la que presento valores considerados óptimos dentro del intervalo (56.98, 57.55, 56.20 y 55.75) (Abad *et al.*, 1993) (Cuadro 5).

Los sustratos complementados con perlita (PF y VP) tuvieron valores similares en Da a los reportados por Anicua *et al* (2009) de 0.22 y 0.15 g cm⁻³ en perlita sin mezclar en la granulometría de 0.5 y 1 mm. En Pt de los sustratos obtenidos se encontró dentro del intervalo de 69- 95 % que comparados con los obtenidos por Anicua *et al*. (2009) de 83-85%, son relativamente más bajos para el mismo diámetro de partícula. Bures (1997) reportó un Pt de 95.47% en perlita, sin embargo en la Prh los valores aumentaron de 31 a 62.4% en comparación con lo reportado por Anicua *et al*. (2009). El mismo autor menciona que este comportamiento está en función del tamaño, forma y arreglo de las partículas individuales de la perlita.

En el caso de los sustratos compuestos por tezontle (PT, FT y VT) los valores de Da fueron los más altos de 0.11 a 0.49 g cm⁻³ (Cuadro 4 y 14) dentro del intervalo óptimo sugerido por Abad *et al*. (1993) pero por debajo de los obtenidos por Ordaz (2010) (0.96 g cm⁻³) en tezontle a la misma granulometría (0.5-1 mm). En Pt el intervalo que presentaron los sustratos PT, FT Y VT fue de 70 a 87 %, los valores Pai fueron de 13 a 47 % y la Prh de 21 a 57%, que comparados con los obtenidos por Ordaz (2010) (Pt de 56%, Pai de 7% y Prh de 52%), resultaron ser más altos como resultado de la mezcla con otros materiales.

Los sustratos compuestos con fibra de coco (PF, FV y FT) tuvieron valores más altos de Da de 0.11 a 0.55 g cm³ que los valores obtenidos por Quesada *et al*. (2005) de (0.053 g cm³). Por otro lado la Pt de los sustratos (PF, FV y FT) presentaron valores de 69 a 95% menores comparados con 84.44% de fibra de coco sin mezclar .Los valores de Pai de los sustratos estuvieron en el intervalo de 19.83 a 59.48% por debajo de lo observado (84.42 %); así mismo los valores de Prh estuvieron en 21 a 57 % menor que los valores inferiores a los de fibra de coco sin mezclar 61 % (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores de densidad aparente (Da), porcentaje total de poros (Pt), porosidad de aireación (Pai), porosidad de retención de humedad (Prh).

Sustratos	Proporción	Da g cm ⁻³	Pt %	Pai %	Prh%
Valores óptimos ^a		< 0.7	>85	10-30	55-70
PF	1:1	0.11	80	27.36	52.02
	2:1	0.21	95	59.48	52.86
	3:1	0.21	73	19.83	35.35
FV	1:1	0.11	80	22.72	56.90
	2:1	0.11	89	55.44	32.86
	3:1	0.20	78	21.04	56.98
FT	1:1	0.55	76	26.09	49.65
	2:1	0.42	69	47.90	21.22
	3:1	0.44	82	23.96	57.55
PT	1:1	0.49	68	23.75	43.68
	2:1	0.43	69	44.43	23.77
	3:1	0.47	70	13.71	56.20
VT	1:1	0.58	74	18.95	54.81
	2:1	0.54	81	44.24	36.32
	3:1	0.48	287	39.31	39.31
VP	1:1	0.13	86	23.35	62.41
	2:1	0.12	82	50.10	31.20
	3:1	0.20	69	13.31	55.75

^a Valores óptimos reportados por Abad et al. (1993); (PF) perlita-fibra de coco; (FV) fibra de coco-vermiculita; (FT) fibra de coco-tezontle; (PT) perlita-tezontle; (VT) vermiculita-tezontle; (VP) vermiculita-perlita.

6.1.2 Curvas de retención de agua

Para la selección de sustratos se consideró solo la propiedad AFD (agua fácilmente disponible) dado que las condiciones en las que estarían los cultivos serían a saturación constante, debido a las características del cultivo *in vitro*, el drenaje no es factible de tal forma que los sustratos con capacidad de retención de agua muy elevados no fueron considerados por la poca disposición de oxígeno en el microambiente que conforman el sustrato en conjunto con el medio de cultivo.

Los valores de las curvas de liberación de agua, para ADF (Cuadro 6 y Figura 54), fueron irregulares. Los valores de PF en las tres proporciones (1:1, 2:1 y 3:1) estuvieron en el intervalo de 21 a 42.1 % donde la proporción 2:1 fue la que tuvo el porcentaje más alto saliéndose del intervalo óptimo sugerido por Ansorena *et al.* (1994), sin embargo, la proporción 3:1 se encontró dentro de los valores óptimos, así como PT y VP en la misma proporción (24.4 y 25.5%). Estos datos son similares a los obtenidos por Anicua *et al.* (1993) para perlita del mismo tamaño de partícula.

Por otro lado en cuanto a AFD los sustratos FT PT en las proporciones 3:1 y VP en sus tres proporciones los valores (Anexo-Figura 54 y Cuadro 6) se encontraron dentro del intervalo óptimo sugerido por Ansorena *et al.* (1994) y similares a los que reporta Ordaz (2010) de 24.6% de AFD para la granulometría de 0.25 a 0.5 mm.

Los sustratos con valores dentro del intervalo óptimo para AFD fueron PF 1:1 y 2:1 (21 y 24.6 %), FT y FV en la proporción 3:1 (22.8 y 21.0 %) y mayores a los reportados por Castorena (2010) para fibra de coco sola a una granulometría 0.5 a 1 mm (3.5 a 11.6.) (Cuadro 6 y Figura 54).

Se seleccionaron solo los sustratos PF, FT, PT y VP en la proporción 3:1 dado que presentaban los valores más altos de Prh % y los valores de AFD (24.6, 22.8, 24.4 y 25.2 %) dentro de los valores óptimos sugeridos por Ansorena *et al.* (1994) los cuales permitirían una mayor disposición de medio nutritivo y oxígeno para los tejidos.

Cuadro 6. Valores de las curvas de retención de humedad para los diferentes sustratos.

Sustrato	Proporción	AND (%)	AFD (%)	AR (%)	ADD (%)
Valores Óptimos ^α			20-30	4-10	20
PF	1:1	15.7	21.0	10.6	32.6
	2:1	3.5	42.1	10.9	38.5
	3:1	18.0	24.6	9.9	20.5
FT	1:1	30.7	15.6	5.6	28.1
	2:1	46.6	11.6	7.9	22.9
	3:1	22.2	22.8	7.6	25.4
FV	1:1	37.5	11.8	4.5	22.2
	2:1	22.6	14.7	4.6	27.1
	3:1	33.7	21.0	0.4	26.9
PT	1:1	34.7	11.7	4.4	17.3
	2:1	51.2	6.7	2.8	8.3
	3:1	18.8	24.4	2.2	24.5
VT	1:1	24.1	24.2	5.4	20.2
	2:1	33.5	22.3	0.6	24.6
	3:1	22.7	27.8	4.2	32.4
VP	1:1	46.7	7.3	3.2	28.7
	2:1	35.2	11.5	2.3	33.0
	3:1	25.9	25.5	0.6	40.0

^αValores óptimos reportados por Ansorena *et al.* (1994); (AND) agua no disponible; (AFD) Agua fácilmente disponible; (AR) agua de reserva; (ADD) agua difícilmente disponible; (PF) perlita-fibra de coco; (FV) fibra de coco-vermiculita; (FT) fibra de coco-tezontle; (PT) perlita-tezontle; (VT) vermiculita-tezontle; (VP) vermiculita-perlita.

Ensayo I. Regeneración de plantas de chile habanero a partir explantes de embrión en sustratos *in vitro*

6.2.1 Inducción de brotes a partir de embriones en sustratos *in vitro*

6.2.1.1. Supervivencia y formación de primordios de brote

De acuerdo al análisis estadístico el factor sustrato tuvo efecto significativo tanto en la supervivencia como en la formación de primordios de brote. Los mejores sustratos para la supervivencia fueron el agar y PT (85.8 y 80.0% respectivamente) mientras que para la formación de brotes el mejor sustrato fue el agar (45.8%)(Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de los sustratos en el porcentaje de supervivencia y formación de primordios de brotes de los explantes de semilla.

Sustrato	% Supervivencia	% Explantes que formaron primordios de brotes
A	85.83 ^a	45.83a
PT	80.83 ^a	9.16b
PF	61.66b	1.66c
FT	61.66b	3.33bc

A: Agar; PT: Perlita-Tezontle; PF: Perlita-Fibra de coco; FT: Fibra de coco-Tezontle. Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Por otro lado, los explantes que permanecieron en los tratamientos con FT presentaron diferentes grados de oxidación como consecuencia de la liberación de compuestos oxidativos (polifenoles) resultado de la descomposición de lignina, celulosa, y pectina que constituyen a la fibra de coco (Mwaikambo *et al.*, 2002) (Figura 3).

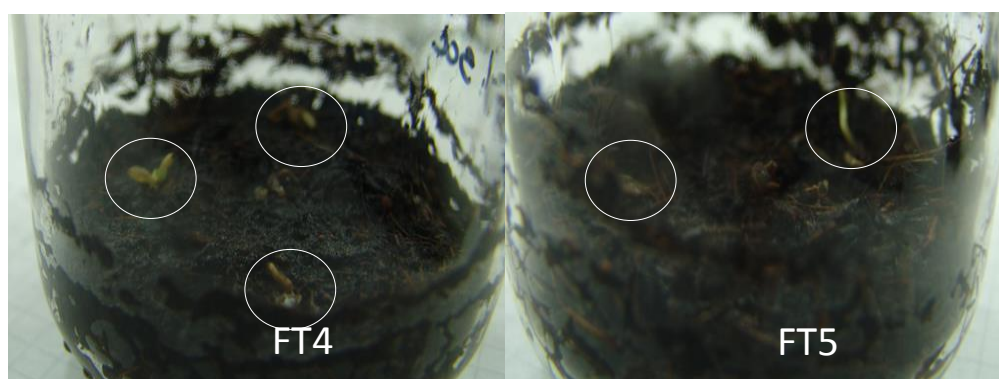


Figura 3 . Oxidación de los explantes en los tratamientos en fibra de coco tezontle con, MS 50% y 30 (FT5) y 15 g L⁻¹ de sacarosa (FT4), después de los 30 días de cultivo.

La lignina libre de su unión con la celulosa durante la descomposición de los residuos está sujeta a una hidrólisis (desdoblamiento) oxidativo con la formación de unidades estructurales primarias. Posteriormente las cadenas de las unidades constituidas de lignina son oxidadas, ocurriendo una dimetilación y los resultantes polifenoles son convertidos en quinonas que parecen reaccionar con compuestos que contienen nitrógeno para formar polímeros coloreados (oscuros) (Stevenson, 1982).

Los medios afectaron de forma significativa la supervivencia y la formación de primordios de brotes de los explantes de embrión, el mayor porcentaje de supervivencia se observó en los medios MS al 50% con 15 g L⁻¹ de sacarosa (77.50 %) seguido del medio MS al 100% y Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (75%). Los explantes que tuvieron mayor porcentaje de formación de primordios de brote estuvieron en los medios MS al 50% y MS al 25% con 15 g L⁻¹ de sacarosa (21.66%) seguidos de los medios MS al 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa y Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de los medios en el porcentaje de supervivencia (SPRVV) y formación de primordios de brotes (PBRTS) de los explantes de semilla.

Medio	% Supervivencia	% Explantes con primordios de brote
1	71.66ab	11.66ab
2	75.00ab	16.66 ab
3	77.50^a	21.66 a
4	67.50ab	5.00 b
5	74.16ab	15.00 ab
6	74.16ab	21.66 a
7	67.50b	16.66 ab
8	75.00ab	11.66 ab

MS 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS 50 % con 7.5 L⁻¹g de sacarosa (4); MS 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5); MS 25% con 3.7 g L⁻¹ de sacarosa (6); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8). Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Las bajas concentraciones de los componentes de los medios (sales basales y sacarosa) en el medio MS y la solución nutritiva Arnon y Hoagland, pueden mantener vivos los tejidos de chile habanero al menos durante 30 días. Un efecto similar se observó en brotes apicales de plátano cv Dwarf Cavendish, donde el medio MS al 50% permitió el crecimiento y la conservación en óptimas condiciones de los tejidos durante ocho meses (Tokoporo *et al.*, 2013). Del mismo modo, las baja concentración de sacarosa, en lilis (*Lilium longiflorum* Thunb), mostro una mayor acumulación de peso

seco y tasa de supervivencia (100 y 90%) en los protocormos desarrollados a partir de las plantas regeneradas en medios suplementados con 20 g L⁻¹ de sacarosa (Nhut *et al.*, 2002).

En la formación de primordios es factible utilizar concentraciones intermedias y bajas (50 y 25%) de los componentes (sales y sacarosa) de los medios MS y la solución nutritiva de Arnon y Hoagland, no así para su desarrollo

La combinación de sustratos y medios, tuvo un efecto significativo en el porcentaje de supervivencia y formación de primordios de brote de explantes de embrión. Los tratamientos en agar, con el medio MS al 100% con 15 g L⁻¹ de sacarosa presentó el mayor porcentaje de supervivencia (100%) seguido de MS al 25% con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa y Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (90%) (Cuadro 9).

Del mismo modo los tratamientos conformados con agar tuvieron una mejor respuesta en el porcentaje de explantes que formaron primordios de brote. El mayor porcentaje de explantes con primordios de brote se presentó en medio Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa seguido en agar seguido de MS al 25% con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa.

Cuadro 9. Efecto de los medio de inducción y los sustratos en la supervivencia (SBRVV) y formación de primordios en explantes de embrión (EFPB) a los 30 días bajo condiciones *in vitro*.

Sustratos	Medios								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	SPRVV %	80.00abc	100.00a	76.66abcd	83.33ab	90.00ab	83.33ab	90.00ab	83.33ab
	EFPB%	40.00bcd	46.66ab	40.00bcd	20.00edf	60.00ab	46.66abc	66.66a	46.66abc
PT	SPRVV%	86.66ab	86.66ab	86.66ab	80.00abc	86.66ab	80.00abc	70.00bcd	70.00bcd
	EFPB%	0	0	33.33cde	0	0	40.00bcd	0	0
FT	SPRVV%	53.33cde	63.33bcde	63.33bcde	53.33cde	70.00bcde	70.00bcde	53.33cde	66.66bcde
	EFPB	6.66f	6.66f	0	0	0	0	0	0
PF	SPRVV%	66.66bcde	50.00de	83.33ab	50.00de	80.00abc	63.33bcde	46.66e	80.00abc
	EFPB%	0	13.33ef	13.33ef	0	0	0	0	0

Agar (A); Perlita-Tezontle (PT), Perlita-Fibra de coco (PF); Fibra de coco-Tezontle (FT); MS 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS 50 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5); MS 25% con 3.3 g L⁻¹ de sacarosa (6); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8). Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Los explantes que formaron primordios de brotes en el tratamiento A5 (MS 25% con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa), desarrollaron en promedio uno a dos brotes acompañados de hojas que se consideraron como brotes en potencia, no obstante solo se consideraron aquellos que lograron sobresalir al follaje. Al mismo tiempo, se observó que parte del follaje así como algunos brotes presentaron vitrificación (Figura 4-c y d), que se considera un desorden fisiológico y morfológico que se presenta ocasionalmente en las plantas cultivadas *in vitro*. Las características de las plantas vitrificadas son, tallos y hojas a menudo gruesas, rígidas y fácilmente rompibles, así como la disminución de la concentración de clorofila (Phan y Letouze, 1983; Frank *et al.*, 2004). Las plantas vitrificadas tienen bajo contenido proteico, bajas concentraciones de compuestos fenólicos (compuestos de pared celular) y un aumento en el contenido

de agua, así como una alteración de la composición iónica celular (Kevers y Gaspar, 1986; Bottcher *et al.*, 1988; Perry *et al.*, 1999). En muchos casos el tejido en empalizada de las hojas vitrificadas tiene un mesófilo esponjoso y vacuolado con grandes espacios intercelulares (Vieitez *et al.*, 1985).

Los brotes formados en el tratamiento A7 (Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa fueron escasos (1 a 2 b), sin formación de follaje pero con mayor cantidad de raíz, comparado con los explantes que se encontraban en los otros tratamientos en agar (Figura 4 g y h).

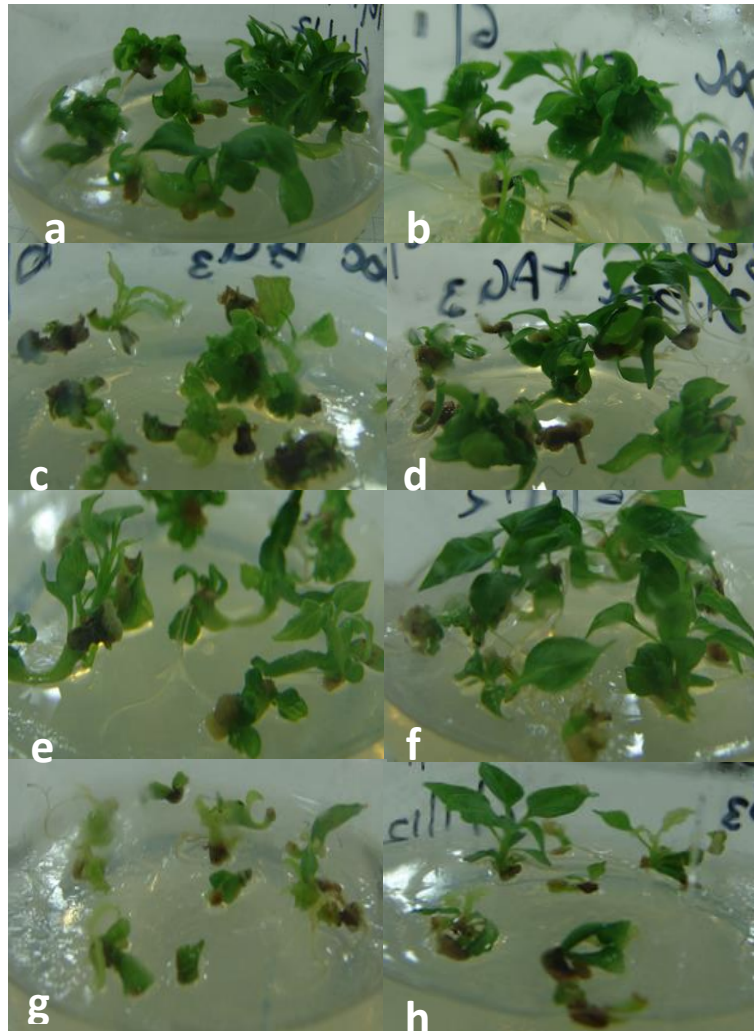


Figura 4. Explantes de embrión a los 30 días en agar con medio de desarrollo MS a 100 % con 30 (a) y 15 g L⁻¹ de sacarosa (b); MS 50% con 15 (c) y 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (d); MS a 25 % con 7.5 (e) y 3.3 g L⁻¹ de sacarosa (f); Arnon y Hoagland con 30 (g) y 15 g L⁻¹ de sacarosa (h).

La respuesta escasa en cuanto a la formación de brotes en los sustratos, puede atribuirse también a la posición en la que fueron colocados los explantes ya que estos estuvieron parcialmente sumergidos en el sustrato de tal forma que el tejido no tuvo suficiente contacto con el medio.

Los explantes en los tratamientos PT6 (MS al 25% con 3.3 g L⁻¹ de sacarosa) y PT3 (MS al 50% con 15 g L⁻¹ de sacarosa) formaron primordios de brote, pero estos no se desarrollaron ni sobrevivieron al siguiente cambio de medio. Lo anterior se puede

atribuir a la poca disposición de medio por efecto del bajo porcentaje de poros de retención de humedad y AFD del sustrato PT además de que los tejidos colocados no contaban con órganos, ni los mecanismos para poder disponer del medio incluido en los poros del sustrato. Por otro lado el crecimiento de los explantes provocó su alargamiento y la pérdida de contacto de los sustratos saturados con los medios de inducción de brotes

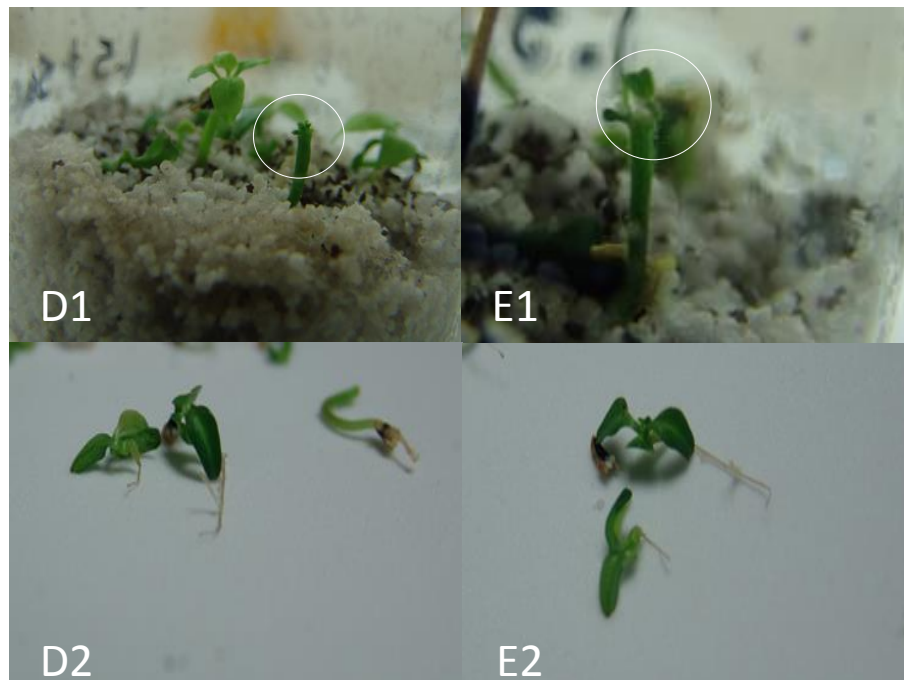


Figura 5. Explantes de embrión a los 40 días en medio de inducción MS 25% con 15 g L⁻¹ de sacarosa (D1 y D2) y MS 50% con 30 g L⁻¹ de sacarosa (E1 y E2) en sustrato PT (Perlita-Tezontle).

Los explantes que permanecieron en el sustrato PF de todos los tratamientos se observaron verdes, turgentes y con abundante raíz, pero sin indicios de formación de brotes, este efecto se puede atribuir de igual forma, que en el caso del sustrato PT, a las características físicas de los sustratos (Figura 6).

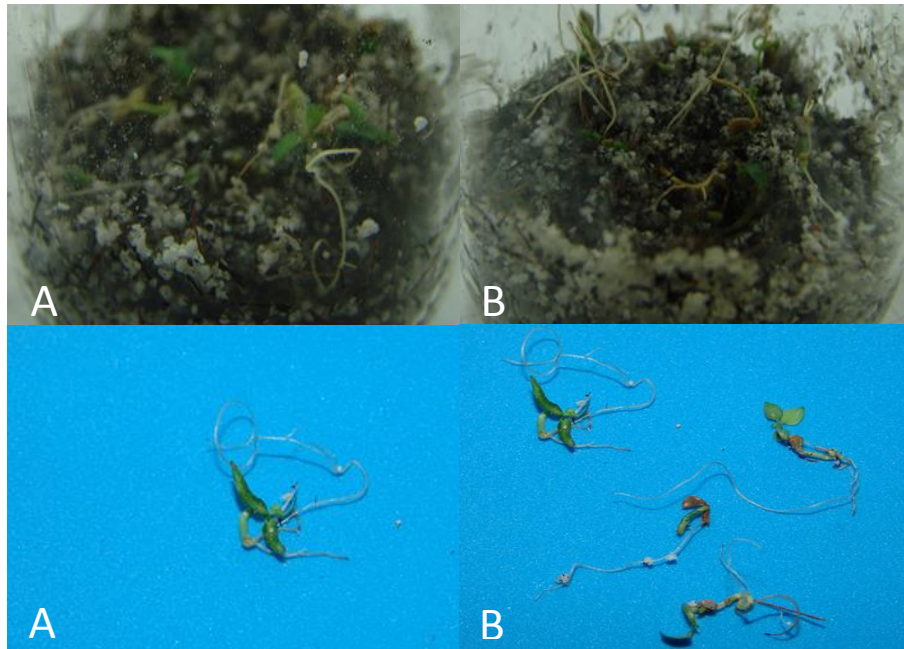


Figura 6. Explantes de embrión a los 40 días en medio de inducción de brotes en los tratamientos MS al 100% con 30 g L^{-1} de sacarosa (A) y MS al 50 % con 15 g d L^{-1} e sacarosa (B) en el sustrato PF.

Los explantes cultivados en los sustratos FT no mostraron primordios de brote, su crecimiento fue escaso y se observó la formación de raíces cortas y oxidadas (Figura 7).

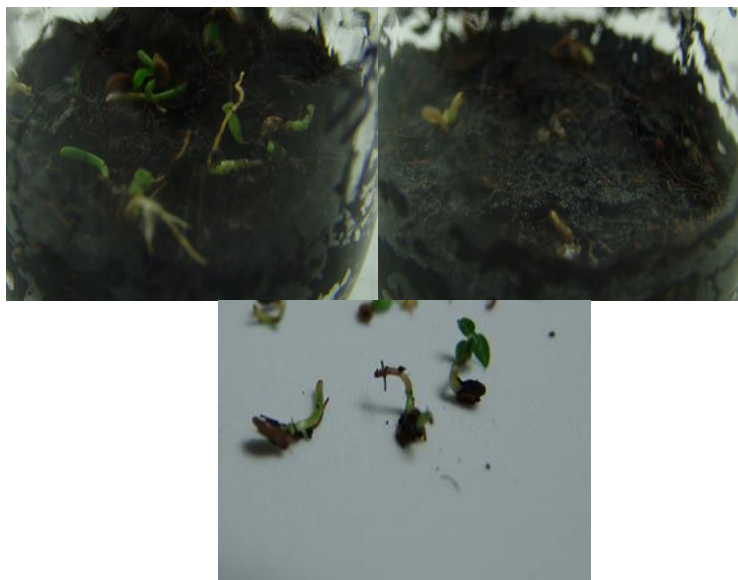


Figura 7. Explantes de embrión a los 40 días en medio de inducción de brotes MS 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa y MS 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa en sustrato FT.

6.2.3 Enraizamiento *in vitro*.

Dada la poca respuesta de los explantes en los sustratos, la etapa de enraizamiento se llevó a cabo con los brotes formados en agar. En esta fase se remplazaron los sustratos compuestos con fibra de coco (FT y PF) por el sustrato VP, dado que este sustrato se ha sido utilizado con éxito para el enraizamiento *in vitro* de brotes de nogal (Jay-Allemand *et al.*, 1992), *Haworthia* (Dethier, 1993), *Eucalyptus calmodulensis* (Kirdmanee *et al.*, 1995) y papa dulce (*Ipomoea batatas* L.) (Afreen-Zobayed *et al.*, 2000).

Los sustratos y la combinación de sustrato y los medios no tuvieron efecto significativo en el enraizamiento de brotes provenientes de explantes de embrión. Los mejores tratamientos fueron, A6, A8, PT2, PT6 y VP8 con 100% brotes enraizados (Figura 8).

El comportamiento de las plantas provenientes de los tratamientos que incluían la solución nutritiva Arnon y Hoagland coincide con lo observado por Barrales *et al.* (2009) en el enraizamiento de brotes de chile habanero bajo condiciones *in vitro* quienes utilizaron esta misma solución en agar.

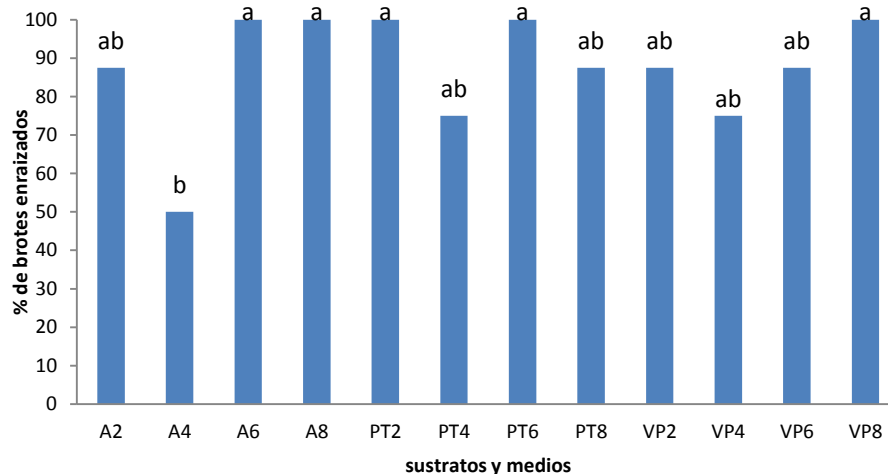


Figura 8. Enraizamiento de los brotes de chile habanero provenientes de explantes de embrión: Agar (A); Perlita-Tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP); MS al 100 % (2); MS al 50 % (4); MS al 25 % (6); Arnon y Hoagland (8), adicionados con 15 g L⁻¹ de sacarosa. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

6.2.4 Aclimatación de plantas regeneradas *in vitro*.

Los brotes enraizados en sustrato tuvieron el mayor porcentaje de supervivencia (95%), comparado con los brotes enraizados en agar (75%), bajo condiciones de invernadero (Figura 9). Al mismo tiempo se observó que las plantas provenientes de sustratos mostraron mayor desarrollo en hojas y altura de planta como se puede observar en la Figura 10.

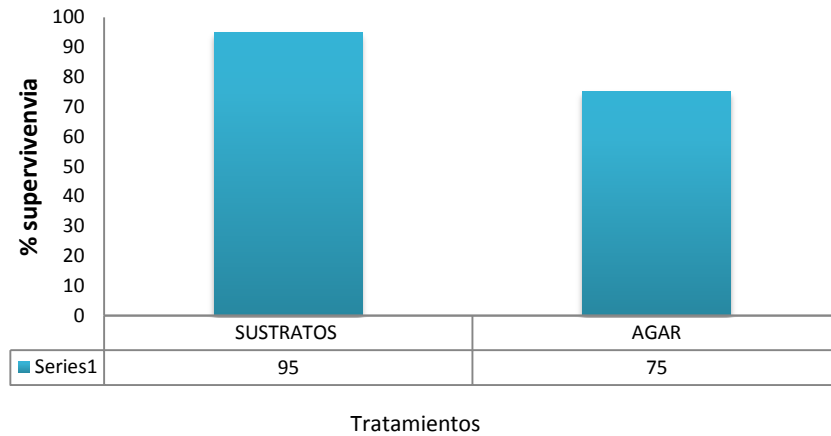


Figura 9. Porcentaje de supervivencia de las plantas regeneradas bajo condiciones de invernaderos de brotes enraizados en sustrato y agar.



Figura 10. Plantas regeneradas en invernadero provenientes de explantes de embrión inducidos con diferentes tratamientos: MS 25% en agar (A1) y en sustratos PT (A2); MS100% en agar (B1) y en sustrato VP (B2).

6.3. Ensayo 2: Regeneración de plantas de chile habanero a partir de hipocótilos en sustratos *in vitro*.

6.3.1. Germinación de semillas de chile habanero en sustratos *in vitro*

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo uno con embriones, en esta fase se utilizaron explantes de hipocótilos, dado que este tejido tiene un alto potencial en la formación de brotes adventicios en chile habanero (Valadez *et al.* 2009).

Para obtener los hipocótilos, las semillas se pusieron a germinar en los distintos sustratos en estudio y agar. El mayor porcentaje de germinación *in vitro* de las semillas se observó en el sustrato PT (70%), seguido de VP (67%) (Cuadro 10). Una respuesta similar se observó en la germinación de semillas de *Zinna* spp., en el sustrato compuesto por perlita tezontle en proporción 1:1.

Cuadro 10. Porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de chile habanero en los diferentes sustratos.

Sustrato	% De germinación
PT	70
VT	67
A	43

Agar (A); Perlita-Tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP).

Como se puede observar en la Figura 18 las plántulas germinadas en los sustratos PT y VP desarrollaron raíces cortas y gruesas, mientras que en el agar las raíces fueron largas y delgadas (Figura 11).

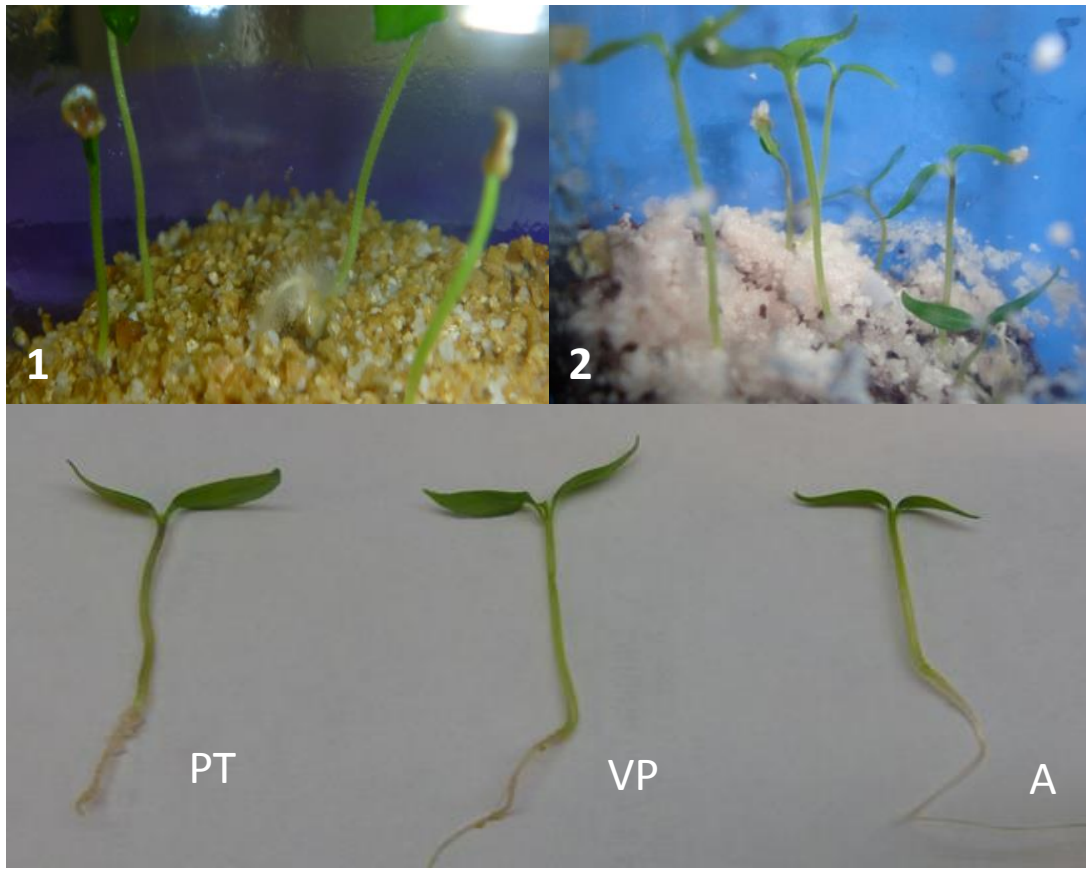


Figura 11. Plántulas de chile habanero germinadas en sustratos y agar bajo condiciones *in vitro*: (1) plántulas en VP (b) Plántulas en PT (2). Desarrollo de las plántulas germinadas en los diferentes sustratos; PT: Perlita-tezontle; VP: vermiculita-perlita .

6.3.2. Inducción brotes a partir de hipocótilos

6.3.2.1. Supervivencia y formación de primordios de brotes en sustratos.

De acuerdo al análisis estadístico los sustratos y el medio de cultivo, así como la combinación de los dos factores no tuvieron efecto significativo en la supervivencia, pero si en la formación de primordios de brote en los explantes de hipocótilo de chile habanero.

Los sustratos (PT y VP) mostraron ser tan eficientes como el agar para mantener los explantes vivos de hipocótilo y se puede suponer que estos le permitieron obtener los nutrimentos necesarios (Cuadro 11). En tanto el sustrato VP se observó mayor

porcentaje de explantes con primordios de brote. En el caso de los explantes crecidos en agar la respuesta fue menor dado que, en algunos tratamientos (MS al 25% con 30 y 15 g L⁻¹ de sacarosa) se observó solo formación de raíz, del mismo modo los explantes cultivados en los diferentes tratamientos que incluían al sustrato PT tuvieron escasa o nula respuesta (Cuadro 11)

Cuadro 11. Efecto de los sustratos en el porcentaje de supervivencia (SPRVV) y formación de primordios de brotes (PBRTS) de los explantes de semilla.

Sustrato	% SPRVV	% PBRTS
A	99.50 a	39.16 b
PT	99.00 a	10.83 b
VP	98.50 a	67.50 a

Agar (A); Perlita-Tezontle (PT), Perlita-Fibra de coco (PF); Fibra de coco-Tezontle (FT). Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Los medios MS al 50 % con 15 y 7.3 g L⁻¹ de sacarosa (64.44 y 55.55%) (Cuadro 12). Esto señala que las bajas concentraciones de los componentes del medio MS (sales basales y sacarosa) y la solución de Hoagland pueden ser utilizadas para inducir primordios de brote en explantes de hipocótilo. Sin embargo la concentración de los componentes del medio (sales y sacarosa) es insuficiente para que dichos primordios continúen su desarrollo.

Los explantes que permanecieron en el medio Arnon y Hoagland con agar mostraron pigmentación marrón y hojas cloróticas, lo que se puede considerar síntoma de deficiencia nutrimental (Figura 12). En gramíneas, la deficiencia de fósforo (P) se manifiesta como una coloración rojo púrpura debido a la acumulación de antocianinas (Salinas y Sanz, 1981); mientras que, la clorosis puede ser un síntoma de deficiencia de hierro (Snowball *et al.*, 1991)

Cuadro 12. Efecto de los diferentes medios en la supervivencia y formación de primordios de brote de los explantes de hipocotilo de chile habanero.

Medio	% SPRVV	%PBRT
1	99.33 a	20.00d
2	98.66 a	2.61b
3	98.66 a	55.55ab
4	100.00 a	64.44a
5	98.66 a	35.55cd
6	98.66 a	37.77bcd
7	98.66 a	40.00bc
8	99.33 a	37.77bcd

MS 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS 50 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5); MS 25% con 3.7 g L⁻¹ de sacarosa (6); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8). Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Una respuesta similar se observó en la regeneración de soya (*Glycine max* L. Merr) a partir de explantes de hipocotilo donde la mitad de la concentración de los medio de cultivo adicionados con 1 y 2 mg L⁻¹ de TDZ fue la que disparó la mayor formación de brotes (Kaneda *et al.*, 1997.)

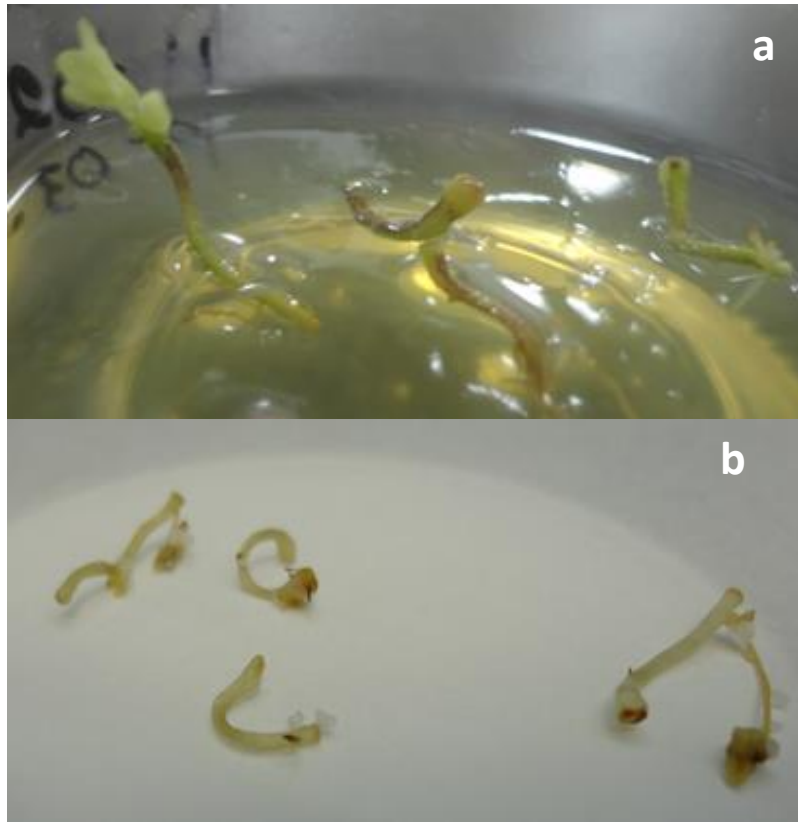


Figura 12. Explantes de hipocótilo cultivados en medio Arnon y Hoagland: en agar (a), en sustrato VP (b).

Los tratamientos (combinación de sustrato y medio) no tuvieron efecto significativo en la supervivencia de explantes de hipocotilo pero en la formación de primordios de brotes sí. Los porcentajes de supervivencia de los explantes en los diferentes tratamientos estuvieron en el intervalo de 98 a 100 %. Los mayores porcentajes en la formación de primordios de brote en los explantes de hipocótilo se observaron en el sustrato VP con los medios, MS al 50% con 15 y 7.5 g L⁻¹ de sacarosa, MS al 25% con 7.5 y 3.3 g L⁻¹ de sacarosa y los medios Arnon y Hoagland con 30 y 15 g L⁻¹ de sacarosa en sustrato VP. (Cuadro 13 y Figura 13- d, e y f).

Los explantes de hipocótilo que permanecieron en el tratamiento MS al 25 % con 3.3 g L⁻¹ de sacarosa no formaron primordios de brote en su lugar formaron raíces (Figura 13-c)

Cuadro 13. Efecto de los sustratos y los medios en el porcentaje de supervivencia (SPRVV) y formación de primordios de brote (PBRT) de explantes de hipocótilo a los 30 días de cultivo.

Sustratos		Medios							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	SPRVV	98.00a	98.00a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a
	PBRT	60.00ab	60.00ab	60.00ab	80.00 a	0	20.00bc	13.33 c	20.00bc
PT	SPRVV	100.00a	98.00 a	100.00a	100.00a	98.00 a	98.00 a	98.00 a	100.00a
	PBRT	0	0	20.00bc	26.67bc	20.00bc	0	0	20.00bc
VP	SPRVV	100.00a	100.00a	96.00 a	100.00a	98.00 a	98.00 a	98.00 a	98.00 a
	PBRT	0	6.67 c	93.33 a	86.67 a	86.67 a	93.00 a	86.67 a	93.33 a

Agar (A); Perlita-Tezontle (PT), Perlita-Fibra de coco (PF); Fibra de coco-Tezontle (FT); MS al 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS al 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS al 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS al 50 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS al 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5); MS al 25 % con 3.3 g L⁻¹ de sacarosa (6); Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8). Porcentajes con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$)

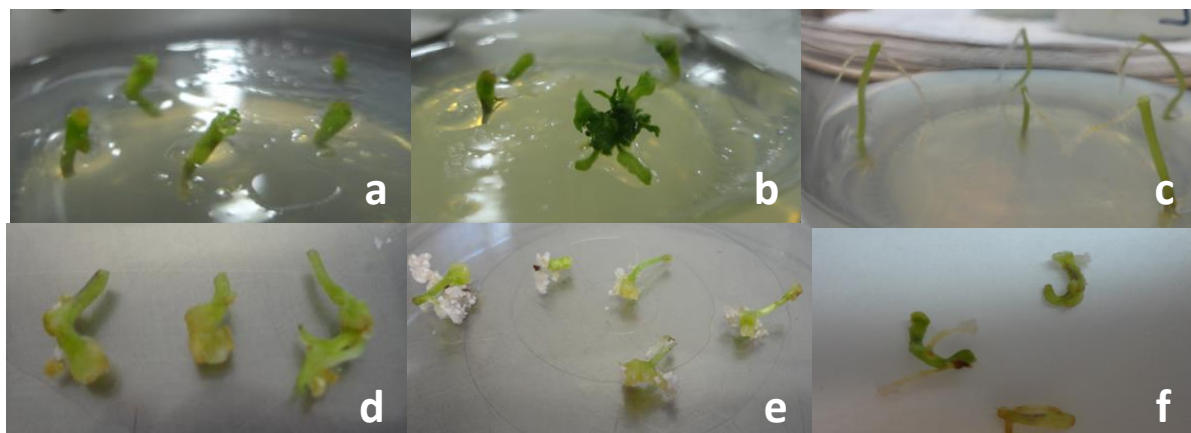


Figura 13. Formación de primordios de brote en los explantes de hipocótilo cultivados en los diferentes tratamientos: MS 50% con 7.5 g L^{-1} de sacarosa en agar (a); MS al 100% con 30 g L^{-1} de sacarosa en agar (b); MS al 25% con 7.5 g L^{-1} de sacarosa en agar (c); MS al 25 % con 3.7 g L^{-1} de sacarosa en el sustrato VP (d); Arnon y Hoagland con 15 g L^{-1} de sacarosa en sustrato VP (e); MS al 50% con 7.5 g L^{-1} de sacarosa en VP (f).

6.3.3 Desarrollo de brotes de explantes de hipocotilo

EL desarrollo de los primordios de brote fue deficiente cuando los explantes se cultivaron en los diferentes medios de desarrollo con sustratos. Los explantes mostraron necrosis en la zona en donde se habían formado los primordios de brotes (Figura 14). Lo anterior pudo deberse a que en la fase de inducción los explantes se mantuvieron sumergidos en el sustrato y el contacto constante con el medio promovió la formación de primordios de brote, pero en la fase de desarrollo los explantes fueron colocados de manera que la zona en la que se formaron los primordios de brote no tuvo contacto suficiente con el medio, lo que ocasiono que estos, ya no se desarrollaran.

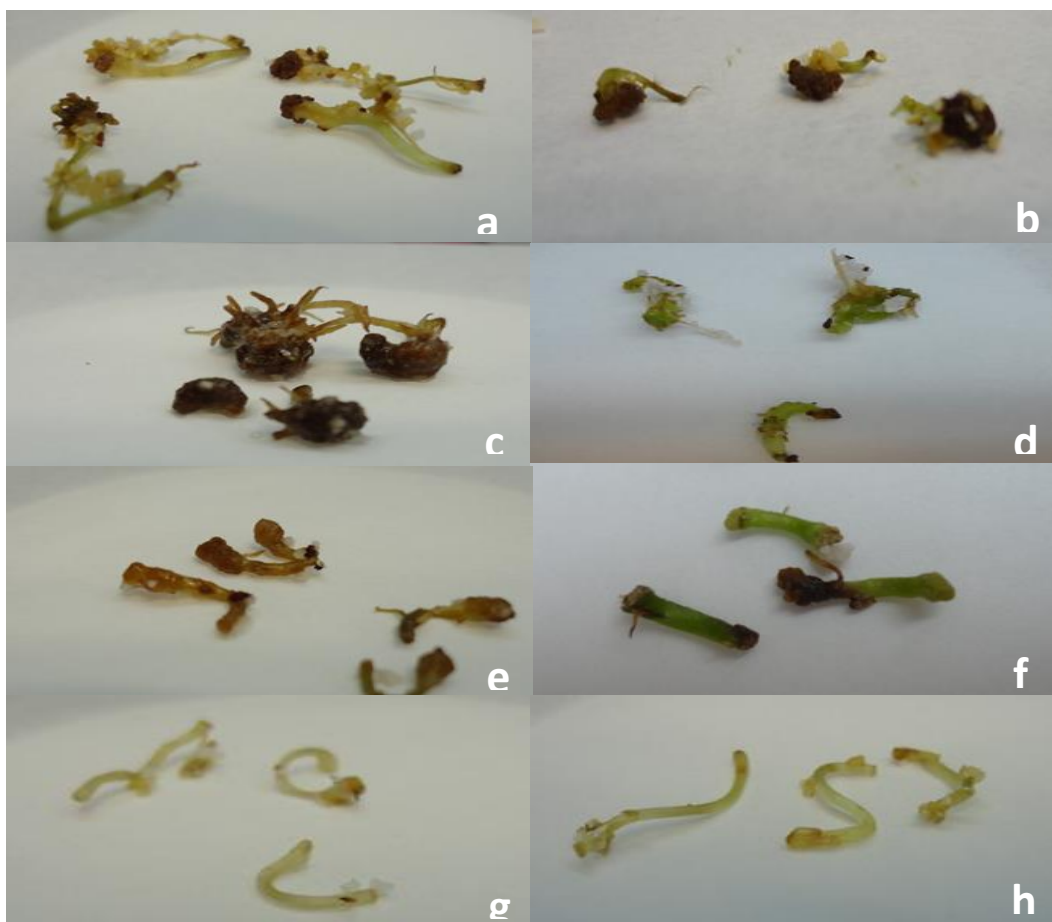


Figura 14. Explantes de hipocótilo después de 30 días en medio de desarrollo en sustratos con: MS al 100 % y 15 g L⁻¹ de sacarosa en VP (a); MS al 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa en VP (b); MS 50% con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa en VP (c); MS 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa en PT (d) ;MS 25% con 15 g L⁻¹ de sacarosa en PT (e) ; MS 50% con 15 g L⁻¹ de sacarosa en VP (f); Arnon y Hoagland con 30 y (g) 15 g L⁻¹ de sacarosa en VP (h).

6.4 Experimento: Regeneración de plantas de chile habanero a partir de explantes de embrión inducidos en agar *in vitro*

6.4.1 Inducción de brotes a partir de embriones en agar

6.4.1.1. Supervivencia y formación de primordios de brote.

Derivado de los resultados de los ensayos anteriores, en este experimento la inducción de brotes solo se hizo en presencia de agar. Los medios tuvieron efecto significativo en la supervivencia y la formación de primordios de brote de los explantes en agar. El

efecto de los medios en la supervivencia de los explantes fue muy similar tanto en los ensayos como el experimento, de tal forma que se confirma que la supervivencia de los explantes no se ve afectada por las bajas concentraciones de sales.

En la formación de primordios los explantes en los medios conformados por las sales basales MS mostraron porcentajes alto (71.80 a 81.81%), el mejor tratamiento fue MS al 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa, por otro lado los porcentajes más bajos se observaron en los medios conformados por la solución nutritiva Arnon y Hoagland (Figura 15). Puesto que los medios diluidos de sales de MS se comportaron de forma similar en cuanto a la formación de primordios de brote, se puede inferir que, está no se vio afectado considerablemente por las bajas concentraciones de los componentes de los medios de cultivo (sales basales y sacarosa)

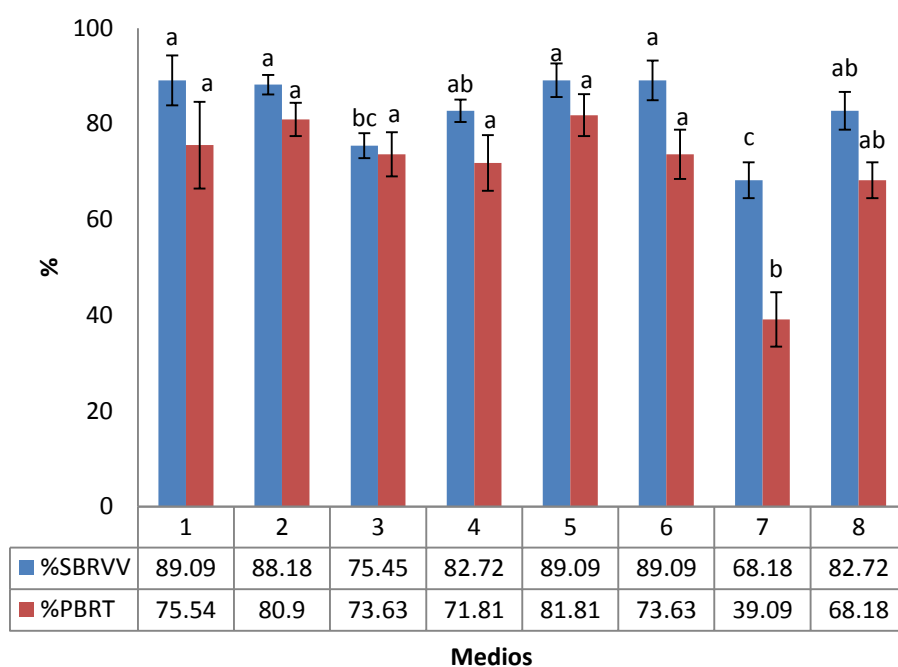


Figura 15. Efecto de los medios en el porcentaje de supervivencia y porcentaje de explantes que formaron primordios de brote después de 30 días de cultivo *in vitro* en agar; MS al 100% con 30 (1) y 15 g (2) L⁻¹ de sacarosa; MS al 50 %, con 30 (3) y 15 g L⁻¹ de sacarosa(4); MS al 25 % con 30 (5) y 15 g (6) L⁻¹ de sacarosa; solución de Arnon y Hoagland con 30 (7) y 15 g (8) L⁻¹ de sacarosa. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Del mismo modo en *Digitalis obscura* se observó, que la formación de brotes se afectó con la reducción de la concentración de sales del medio MS (50 y 25%) y algunos macro nutrientes como el NH y el NO₃, aunque el tamaño final de los brotes sí. Asimismo la reducción a la mitad o una cuarta parte del nitrato de amonio, aumento la capacidad de formación de brotes y redujo la vitrificación en el tejido (Lapeña *et al.*, 1992).

Por otro lado, a menor concentración de sales basales MS y sacarosa, mayor fue porcentaje de vitrificación (100%); tal es el caso de los explantes cultivados en medio MS al 25 % con 3.7 g L⁻¹ de sacaros (100 % de vitrificación) seguido de los explantes en MS al 50 % con 7. g L⁻¹ de sacarosa (71% de vitrificación) y MS al 25% con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (68% 5de vitrificación) y el menor porcentaje se observó en los medios MS al 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa (30%)(Figura 16).

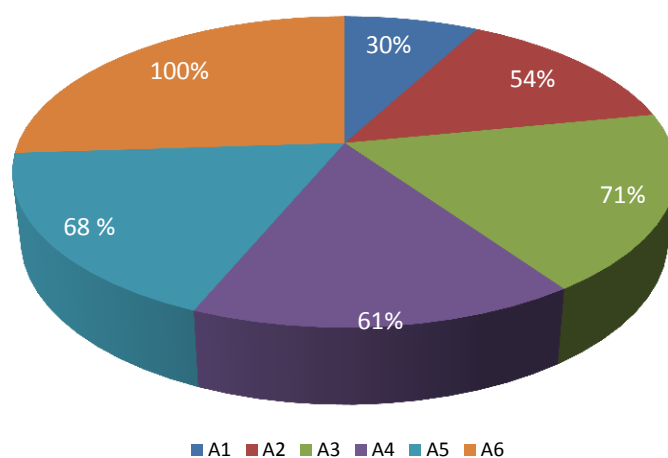


Figura 16. Porcentajes de vitrificación de los explantes en los medios en agar(A): MS 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa (A1); MS 100% con 15 g L⁻¹ de sacarosa (A2);MS 50% con 30 g L⁻¹ de sacarosa (A3);MS 50% con 15 g L⁻¹ de sacarosa (A4); MS 25% con 30 g L⁻¹de sacarosa(A5); MS 25 % con 15 g L⁻¹ (A6).

El fenómeno de la hiperhidricidad o vitrificación se manifiesta como la malformación de hojas y tallos que presentan aspecto vítreo. Otras alteraciones son el cierre estomático dificultado, anomalías en tejidos vasculares y epidérmicos, afección de fotosíntesis, lo que resulta en plantas que no se adaptan al trasplante *ex vitro* (Ziv, 1991; Ziv, 2005). La hiperhidricidad se ha relacionado con la deficiencia de

lignificación, que reduce la síntesis de celulosa, cambiando la extensibilidad de la pared celular (pared celular fragmentada) y afecta la turgencia, cambios en el potencial hídrico y un aumento en la disposición de agua lo que da como resultado un tejido hiperhidratado (Gaspar *et al.*, 1987).

La alta o baja concentración de algunos elementos del medio de cultivo como los compuestos nitrogenados y el calcio se han relacionado con el fenómeno de vitrificación. El calcio participa en la polimerización de la tubulina en los microtúbulos asociada con la actividad de la β -1,3-glucano sintasa que promueve la formación de calosa (Delmer, 1987; Dencso, 1987). Se ha observado en brotes de clavel (*Dianthus caryophyllus*) hiperhidratados, que la adición de calcio aumenta la actividad de las peroxidasas de la pared celular, enzimas relacionadas con la lignificación, causando la desorientación y la deposición de la microfibrillas de calosa en el mesófilo, así como en las células de la epidermis y de células guarda (Kevers *et al.*, 1986). Por tanto, la hipolignificación, la desorientación y la deposición de calosa en vez de celulosa pueden contribuir a la hiperhidratación de tejidos así como inactividad estomática y el fenómeno de la vitrificación. Sin embargo, en algunas especies como la cereza amarga (*Prunus avium*), no se encontró correlación entre la acumulación de calcio y hojas vítreas, con una alta actividad de la enzima fosfatasa ácida (Borkowska *et al.*, 1987). Asimismo, en especies leñosas se ha probado que con altas concentraciones de calcio se reduce la vitrificación (Kreutmeier *et al.*, 1984).

6.4.2 Desarrollo de explantes

6.4.2.1 Crecimiento de explantes en sustrato y peso seco acumulado.

Para determinar el efecto, de los medios y los sustratos sobre el crecimiento y el desarrollo de los explantes, se evaluó la acumulación de peso seco de los explantes como una medida de la actividad fotosintética y la productividad. En este sentido, la intercepción de la radiación solar incidente, asegura las máximas tasas de crecimiento del cultivo (Jarma *et al.*, 2010). De tal forma que los tejidos que lograron crecer y acumular un mayor peso seco en los tratamientos, pueden ser considerados eficientes en la captación de luz y su transformación.

En algunos tratamientos conformados con el sustrato PT y VP se observó una reducción del diámetro de explante, este fenómeno se puede atribuir al proceso de adaptación de los explantes al sustrato, que dio como resultado, la defoliación del mismo. Los explantes de los tratamientos A4 y A6 también presentaron reducción en el diámetro de los mismos por efecto de la vitrificación del tejido que ocasiono oxidación y redujo el tamaño del mismo (Cuadro 14).

Las acumulación de pesos seco fue diversa para los explantes de los diferentes tratamientos debido a las bajas concentraciones de los componentes del medio (sales basales y sacarosa) así como los sustratos (Figura 17).

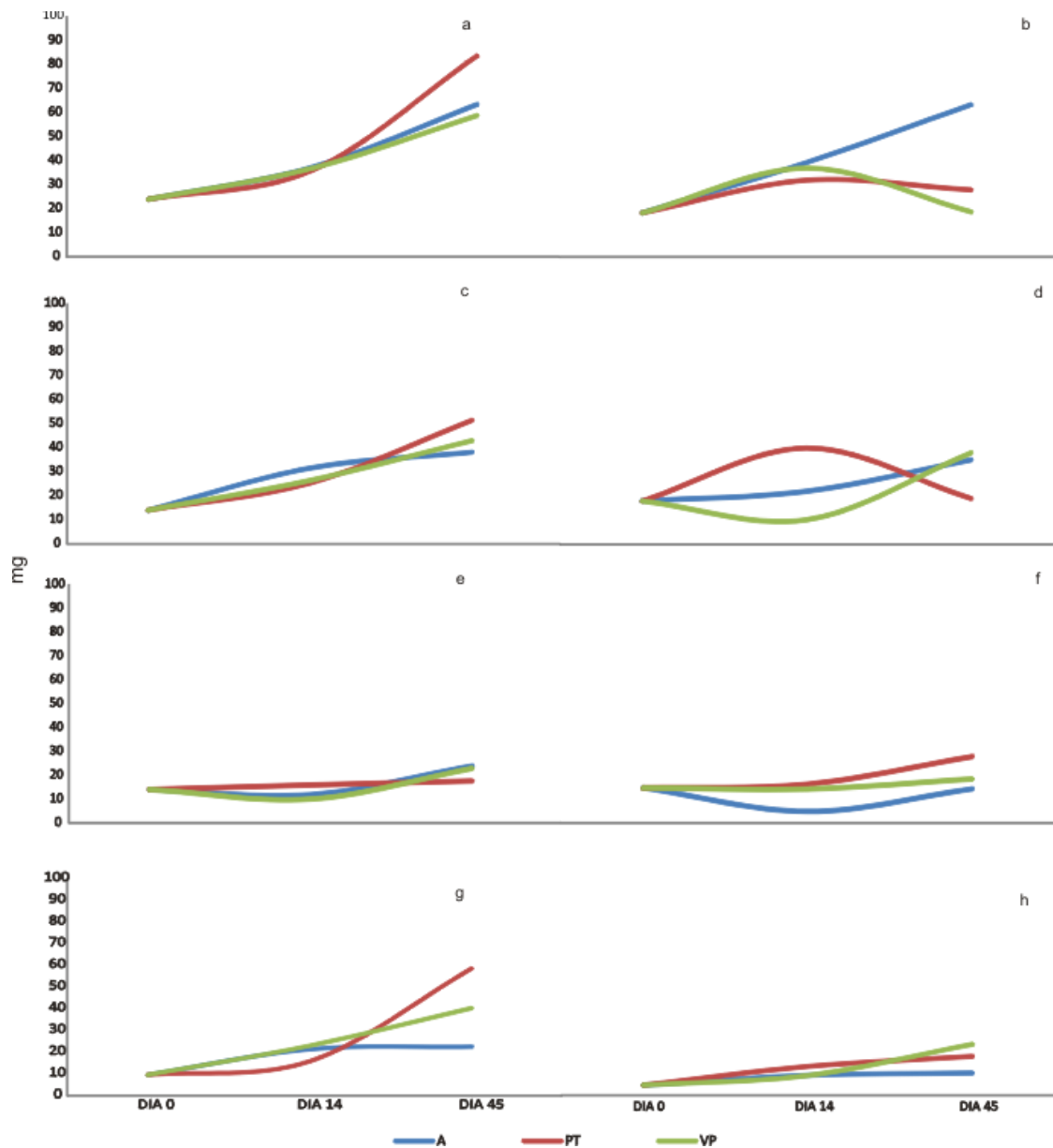


Figura 17. Acumulación de peso seco de explantes de embrión de chile habanero en medio de desarrollo, en los periodos de 0 a 15 días, de 15 a 30 días y de 30 a 45 días (A), Perlita-Tenzontle (PT) y Vermiculita-Perlita (VP), saturados con los medio MS al 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa (a), MS al 100% con 15 g L⁻¹ de sacarosa (b), MS al 50% con 15 g L⁻¹ de sacarosa (c), MS al 50% con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (d), MS al 25% con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa, (e); MS al 25 % con 3.3 g L⁻¹ de sacarosa (f); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (g); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (h).

El mayor valor de peso seco acumulado se observó en los explantes que se mantuvieron en el tratamiento PT1 (MS100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa en el sustrato PT) por arriba de los tratamientos con A y VP. En los explantes en PT1 también se observó un mayor porcentaje de oxidación (85%), mayor defoliación y una menor competencia entre los brotes diferenciados, esta condición les dio mayor oportunidad de crecimiento y actividad fotosintética, lo que se reflejó en mayor peso seco acumulado y número de brotes. Los explantes en los sustratos de VP y A tuvieron valores muy similares en la acumulación de peso seco. Los explantes de mayor diámetro estuvieron en agar (3.79 cm), pero, la diferenciación de los brotes fue más lenta (30 días después que en sustrato). (Cuadro 14 y Figura 17-a).

Los explantes en el medio MS al 100% con 1.5 g L⁻¹ de sacarosa en agar, presentaron una acumulación de peso seco exponencial (Figura 17-b). Por el contrario los explantes crecidos en ese mismo medio pero en los sustratos después del día 14 mostraron una reducción del mismo (Cuadro 14).

En el medio MS al 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa en el sustrato PT, se observaron valores más altos en cuanto a la acumulación de peso seco de los explantes donde hay una tendencia al aumento en la productividad. Un comportamiento similar se observó en los explantes cultivados en VP, en la concentración 7.5 g de sacarosa L⁻¹ en agar se observa un crecimiento paulatino (Figura 17-c) (Figura 19 y Cuadro 14). Los explantes en PT saturado con el medio MS al 50% con 7.5 g de sacarosa L⁻¹, no acumularon peso seco, ni incrementaron su diámetro, pero sí mostraron mayor porcentaje de oxidación (Cuadro 14, Figura 17 y 19), es decir estos explantes no tuvieron la capacidad de adaptarse a las condiciones en sustrato.

Los valores más bajos para la acumulación de peso seco y diámetro de explantes, así como la formación de brotes (Cuadro 8) se presentó en los explantes mantenidos en los tratamientos A5, PT5 y (Cuadro 14 y Figura 17-e y f). Los explantes que estuvieron en los medios a base de la solución nutritiva de Arnon y Hoagland mostraron mayor acumulación de peso seco en la concentración 30 g de sacarosa L⁻¹ en el sustrato PT (58.55 mg) seguido de los explantes en sustrato VP (40.3 mg). Por el contrario se observó un decremento en el diámetro de los explantes en PT. Los

explantes en los sustratos con la solución nutritiva Arnon y Hoagland 30 y 15 g de sacarosa L⁻¹, mostraron un ligero aumento de peso seco comparado con los que se mantuvieron en agar (Figura 38-h), (Cuadro 8). El mayor crecimiento de explantes se observa mayor en los tratamientos A2 y A1 con un crecimiento total de 4 y 3.79 cm en promedio. También se observó un ligero crecimiento en los explantes provenientes de los tratamientos A8, PT8 y VP (Cuadro 14).

Cuadro 14. Peso seco acumulado y crecimiento total de los explantes en sustratos

Tratamiento	Peso seco acumulado (mg)	Crecimiento total (cm)
A1	39.43	3.79
PT1	59.69	-1
VP1	34.84	1.81
A2	45.03	4
PT2	9.55	-0.52
VP2	0.44	-0.76
A3	24.15	1.43
PT3	37.4	-0.34
VP3	28.96	0.73
A4	17.2	-3
PT4	1.13	-1.2
VP4	20.05	0.32
A5	8.8	0.02
PT5	3.51	-0.61
VP5	8.8	0
A6	-0.45	-0.2
PT6	13.12	-1.19
VP6	3.7	0.04
A7	12.9	-0.61
PT7	58.55	0.2
VP7	40.07	-0.59
A8	5.65	0.6
PT8	13.37	0.1
VP8	19.02	0.62

Agar (A); Perlita-Tezontle (PT), Perlita-Fibra de coco (PF); Fibra de coco-Tezontle (FT); MS al 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS al 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS al 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS al 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS al 25 % con 30g L⁻¹ de sacarosa (5); MS al 25 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (6); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8).

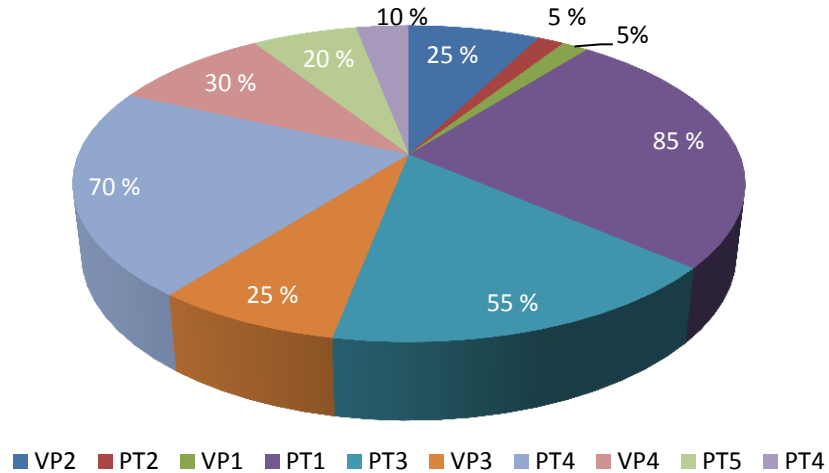


Figura 18. Porcentaje de oxidación de explantes en sustratos. Perlita-tezontle (PT) y Vermiculita-Perlita (VP); MS al 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS al 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS al 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS al 50 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS al 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5).

El fenómeno de la oxidación se observó particularmente en los explantes que presentaron síntomas de hiperhidricidad o vitrificación durante la etapa de inducción (en agar) y que posteriormente fueron transferidos a medio de desarrollo en sustratos. Este cambio generó cambios en el metabolismo de los tejidos y posiblemente estrés, debido a que las disposición de agua, nutrientes y oxígeno fue diferente en el agar, que en sustratos.

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación por radicales libres o también conocidos como especies de oxígeno reactivo o intermediarios de oxígeno reactivo (ROS) como O₂, H₂O₂ y HO. el O₂ puede reaccionar con el óxido nítrico para formar su radical (NO[•]) dióxido de nitrógeno (NO₂⁻), peróxido nítrico (ONOO⁻), nitrosil catión (NO⁺) de diferentes componentes celulares (Turrens, 2003, Valderrama *et al.*, 2007). En el caso particular de los tejidos cultivados *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo de agente desinfectante aplicados durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, la composición del medio de cultivo (volumen y calidad de frasco).(George 1996; Tabiyeh *et al.*, 2006; Van Staden *et al.*, 2006; Abdelwahd *et al.*, 2008) y en este

caso la diferencia entre los sustratos y el agar. La oxidación también se ha relacionado con el desencadenamiento de desórdenes fisiológicos, morfológicos epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como la recalcitrancia, hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (Cassells y Curry 2011; Van Staden *et al.* 2006).

Por otro lado los brotes formados en los explantes que se mantuvieron en los diferentes sustratos (PT y VP) desarrollaron más rápido (al día 60 de cultivados), comparado con los que se mantuvieron en agar (Figura 18)

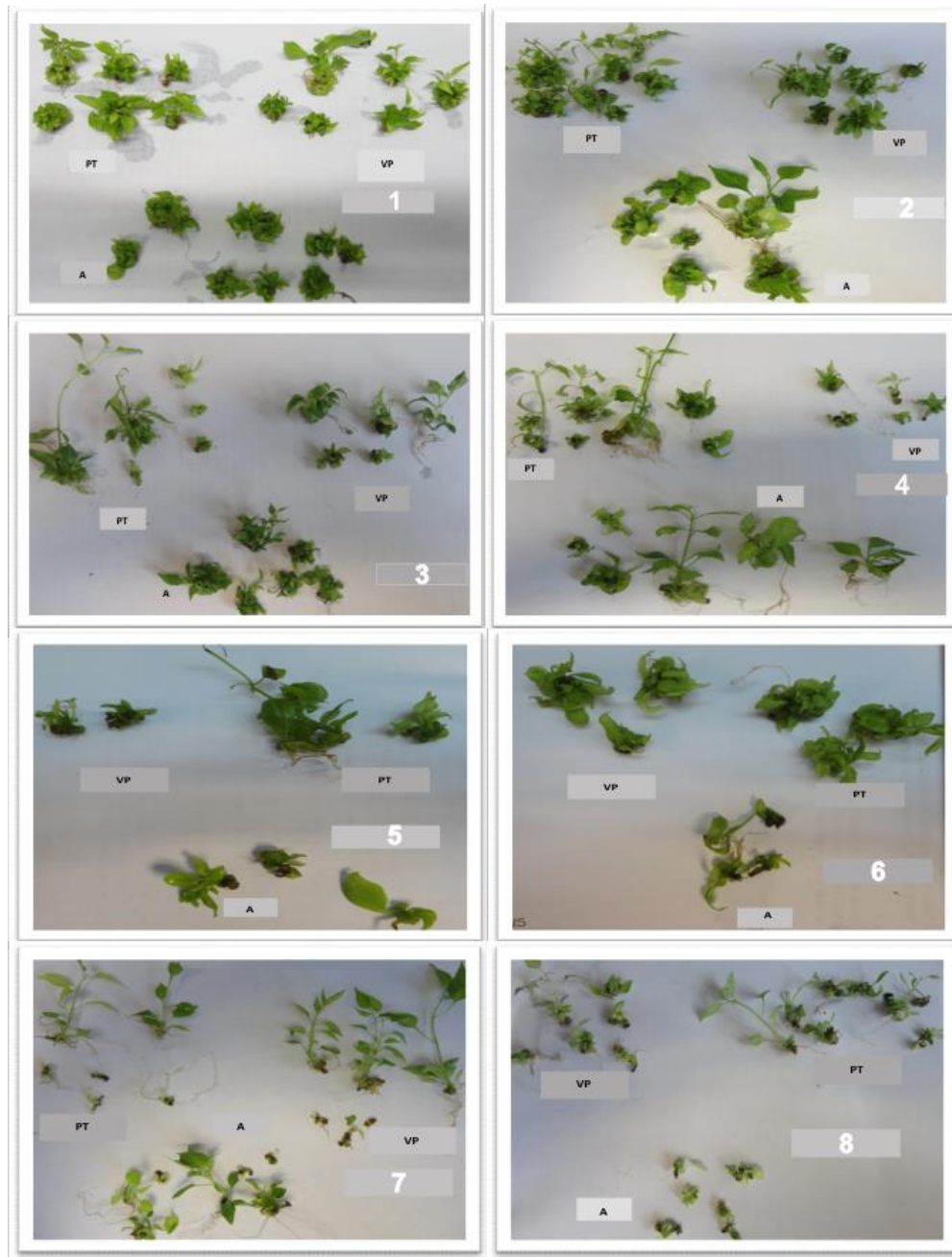


Figura 20. Explantes con brotes en los diferentes tratamientos :Agar (A); Perlita-Tezontle (PT), Perlita-Fibra de coco (PF); Fibra de coco-Tezontle (FT); MS al 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS al 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS al 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS al 50 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS al 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5); MS al 25 % con 3.7 g L⁻¹ de sacarosa (6); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8).

6.4.2.2 Análisis de tejido de explantes de embrión en sustratos *in vitro*

El análisis de tejido de los explantes de embrión de chile habanero se efectuó para determinar si los diferentes tratamientos afectaron la concentración de los macro y micronutrientes en los tejidos se vio afectada por los diferentes tratamientos. Para comparar la concentración de los nutrientes se consideraron, los valores de deficiencia, normal y alto, de cada elemento para *Capsicum annum* determinados por Weir *et al.*, (1993) y Hanlon *et al.*, (2000).

Para el calcio, los explantes del tratamiento PT7 se encuentran dentro del intervalo normal y los tratamientos PT2, PT4, PV5 se ubican en el intervalo de deficiencia de este nutriente. Para el potasio, los explantes de todos los tratamientos mostraron deficiencia de este elemento (Cuadro 15).

La concentración de magnesio, se ubicó dentro de los intervalos considerados deficientes, en los explantes de los tratamientos A1, A2, A4, A5, A6, A8, PT1, PT3, PT4, PT5, PT7 y PV6 (Cuadro 15), pero se observaron altas concentraciones de este elemento en los tratamientos VP1, VP3, VP4 y VP8, este fenómeno se puede relacionar con el contenido de magnesio de la vermiculita (9 a 12%)(Abad *et al.*, 2003).

En cuanto al fósforo los explantes de la mayoría de los tratamientos se ubicaron dentro del intervalo normal a excepción de los tratamientos PT7, PT8 y VP8 con concentraciones por arriba del intervalo alto, mientras que en el tratamiento PT se observó deficiencia (Cuadro 15). A si mismo los explantes de la mayor parte de los tratamientos mostraron concentraciones de azufre dentro del intervalo normal, no así para algunos tratamientos PT7, VP7 y A8 (Cuadro 15).En tanto que el sodio se acumuló por arriba del intervalo normal en los explantes de todos los tratamientos (Cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis de macronutrientes en los explantes de embrión de chile habanero cv Naranja cultivados en los diferentes tratamientos

	(%)					
	Ca	K	Mg	P	S	Na
α Deficiente	0.9-1	2	0.25	0.25		
α Normal	1.5-2.0	3.5-4.5	0.25-0.4	0.3-0.4	0.3-0.6	0.1
α Alto	5.0-6.0	4.5-5.5	0.4-0.6	0.4-0.6		
A1	0.61	1.38	0.28	0.33	0.32	0.20
PT1	0.74	1.39	0.46	0.28	0.51	0.42
VP1	0.69	0.98	1.86	0.25	0.42	0.36
A2	0.67	1.53	0.49	0.65	0.50	0.27
PT2	0.92	1.04	0.62	0.33	0.49	0.51
VP2	0.81	0.95	2.08	0.44	0.45	0.58
A3	0.49	1.57	0.27	0.35	0.43	0.33
PT3	0.60	0.75	0.38	0.17	0.32	0.45
VP3	0.72	1.51	1.88	0.37	0.49	0.52
A4	0.67	1.65	0.43	0.61	0.59	0.31
PT4	0.94	1.51	0.44	0.30	0.50	1.05
VP4	0.64	1.21	1.59	0.41	0.44	0.52
A5	0.52	1.44	0.32	0.42	0.51	0.31
PT5	0.85	1.25	0.55	0.33	0.43	0.78
PV5	0.97	0.77	1.28	0.37	0.58	0.53
A6	0.52	1.22	0.24	0.42	0.53	0.35
PT6	0.85	0.86	1.56	0.28	0.52	0.60
PV6	0.46	1.33	0.31	0.31	0.33	0.35
A7	0.94	1.36	0.13	0.37	0.35	0.22
PT7	2.59	1.30	0.55	0.72	0.23	0.16
VP7	0.37	1.24	0.09	0.28	0.09	0.07
A8	0.45	0.65	0.26	0.23	0.17	0.24
PT8	0.83	1.26	1.26	0.61	0.56	0.50
VP8	-	0.83	1.48	1.41	0.53	0.40

α Intervalos de contenido de nutrientes tejido foliar de pimiento (*Capsicum annum*) descrito por Weir *et al.* (1993) y Hanlon *et al.* (2000). Perlita-tezontle (PT); Vermiculita-perlita (VP) y agar (A) MS al 100 al % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS al 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS al 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS al 50 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS 25 al % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5); MS al 25 % con 3.7 g L⁻¹ de sacarosa (6); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8).

En relación al caso del boro y cobre las concentraciones tendieron a ser más altas en los explantes que se mantuvieron en sustrato, con excepción de los tratamientos VP7 y VP8 (Cuadro 16).

El fierro en la mayoría los tratamientos, se observa dentro de los intervalos, con una tendencia a mayor contenido en los tejidos de algunos tratamientos conformados con el sustrato PT (PT1, PT2, PT3, PT4, PT5 y PT8) (Cuadro 16).

El manganeso estuvo dentro de los intervalos deficientes y normales en los explantes provenientes de los tratamientos conformados con la solución H por otro lado se observa una tendencia a la alta concentración en algunos explantes mantenidos en agar y MS (A1, A2, A3, A3, A4, 45 y A7), sin embargo en estos mismos tratamientos pero en sustratos, las concentraciones de este elemento se observan dentro de los intervalos normal a alto (Cuadro 16). El molibdeno solo se detecta en los tejidos de explantes provenientes de los tratamientos PT1, VP1, A2, PT2, A4, A7, A8 y VP8, con altas concentraciones de este elemento (Cuadro 16).

Los explantes en los tratamientos A6, A5 y A3 que presentaron mayor porcentaje de vitrificación mostraron deficiencias en calcio, potasio, magnesio y cobre, pero también se observaron concentraciones por arriba del intervalo óptimo como es el caso de manganeso y el zinc.

Cuadro 16. . Análisis de micronutrientes en los explantes de embrión de chile habanero cv Naranja cultivados en los diferentes tratamientos.

	B	Cu	Fe	ppm		Zn
				Mn	Mo	
αDeficiente		5-10	100-250	25		20
αNormal	40-60	15-20	200-300	80-120	0.4	40-50
αAlto	60-100	20-40	300-500	140-200	0.6	60-100
A1	78.13	2.69	149.861	249.72	Nd	104.31
PT1	155.35	15.93	177.532	127.70	6.285	56.66
VP1	149.46	43.21	142.15	161.58	8.109	70.78
A2	116.25	3.80	236.66	334.72	7.914	187.50
PT2	209.033	46.77	237.135	66.10	0.772	83.56
VP2	352.43	59.58	112.737	147.21	Nd	105.10
A3	132.047	5.51	218.741	218.49	Nd	122.65
PT3	146.63	46.21	298.041	46.53	Nd	50.27
VP3	143.626	49.98	177.492	205.52	Nd	67.38
A4	130.903	3.46	254.967	321.52	2.519	192.45
PT4	805.48	27.48	257.305	88.68	Nd	219.89
VP4	158.314	59.22	1286.24	142.82	Nd	109.39
A5	103.13	3.21	191.568	238.02	Nd	146.67
PT5	402.123	30.31	266.361	87.31	Nd	118.18
PV5	294.83	68.63	109.07	129.07	Nd	91.61
A6	105.811	3.47	211.134	217.28	Nd	147.18
PT6	262.976	57.13	172.69	127.44	Nd	139.59
PV6	259.87	4.87	242.495	167.31	Nd	91.80
A7	134.77	13.34	758.39	69.04	6.35	87.53
PT7	195.066	13.59	288.24	77.97	Nd	63.16
VP7	99.48	11.97	145.69	13.51	Nd	38.18
A8	159.35	12.84	114.31	30.83	3.85	52.49
PT8	189.613	28.81	603.51	201.43 SE	Nd	127.74
VP8	118.267	35.88	103.824	128.52	22.67	68.42

α Intervalos de contenido de nutrientes en análisis foliar de pimiento (*Capsicum annum*) descrito por Weir *et al.* (1993) y Hanlon *et al.* (2000); no detectado (Nd); Perlita-tezontle (PT); Vermiculita-perlita(VP) y agar (A) MS 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); M 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS 50 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5); MS 25 % con 3.7 g L⁻¹ de sacarosa (6); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8).

Los explantes de los tratamiento conformado con la solución de Arnon y Hoagland con 30 y 15 g L⁻¹ de sacarosa en agar que presentaron brotes cloróticos así como pigmentación marrón en algunas áreas, mostraron deficiencias de calcio, potasio, magnesio. Por el contrario se observaron altas concentraciones de sodio, boro, fierro y molibdeno, los elementos que se encontraron dentro de los intervalos óptimos fueron el fósforo, el azufre el cobre y el manganeso (Cuadro 15 y 16).

Las deficiencias de algunos nutrientes en los explantes de tratamientos que incluían sustratos (PT y VP) pueden ser atribuidas al pH de los mismos dado que para ambos este se ubicó por arriba de 7 (Cuadro 16) y en el que estos elementos se encuentran poco disponibles para la planta (Cuadro 16)

6.4.2.3 Formación de brotes de explantes de embrión en sustratos

De acuerdo al análisis estadístico, los sustratos, el medio, la combinación de sustrato con el medio tuvo efecto significativo en el número de brotes por explante. La mejor respuesta en la formación de brotes se observó en el sustrato VP (Cuadro 17).

Cuadro 17. Efecto de los sustratos en la formación de brotes en explantes de embrión.

Sustrato	Numero de brotes
A	2.70 ab
PT	2.04 b
VP	3.16 a

Agar (A); Perlita-Tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP)

El medio uno (MS al 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa) tuvo el mejor efecto en desarrollo de brotes seguido de los medios MS al 100 y 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa, lo anterior sugiere que la concentración de los componentes del medio (sales y sacarosa), influyen en el desarrollo de los brotes (Cuadro 18).

Cuadro 18. Efecto de los medios en la formación de brotes en explantes de embrión de chile habanero cv. Naranja.

Medio	Numero de brotes
1	4.66 a
2	3.22 ab
3	3.66 ab
4	1.22 c
5	1.44 c
6	2.55 bc
7	1.55 c
8	2.78 bc

MS al 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS al 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS al 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS al 50 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS al 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5); MS al 25 % con 3.7 g L⁻¹ de sacarosa (6); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8).

El mayor número de brotes se obtuvo en el tratamiento VP2, seguido de A1. Dado que no hubo diferencias en la formación de brotes en VP con respecto al agar, es factible el uso del sustrato VP, en la etapa de desarrollo de los explantes de embrión de chile habanero (Cuadro 19).

Cuadro 19. Número de brotes por explantes de embrión de chile habanero en los diferentes tratamientos

Sustratos	Medios							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	5.66ab	2.00dc	3.33abcd	1.33 dc	1.00 dc	3.33abcd	1.33dc	3.66 abc
PT	4.00abc	1.33dc	4.00abc	0	1.00dc	2.00dc	4.33 abc	2.66 bcd
VP	4.33 ab	6.33a	3.66abc	2.33bcd	2.33bcd	2.33bcd	1.33 dc	2.00 dc

Perlita-tezontle (PT); Vermiculita-perlita(VP) y agar (A); MS al 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa (1); MS al 100 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (2); MS al 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa (3); MS al 50 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (4); MS al 25 % con 7.5 g L⁻¹ de sacarosa (5); MS al 25 % con 3.7 g L⁻¹ de sacarosa (6); Arnon y Hoagland con 30 g L⁻¹ de sacarosa (7); Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa (8).

El número de brotes formados por explante en los tratamientos con MS al 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa en agar fue inferior comparado con lo obtenido en el cultivar Naranja de chile habanero por Valadez Bustos *et al.* (2009), posiblemente debido a que las semillas de la variedad utilizada en el presente investigación tenían una una baja viabilidad (75%).

6.4.5 Enraizamiento de brotes en sustratos *in vitro*.

Las raíces son los órganos involucrados en la absorción de agua y mineral, sus atributos morfológicos y fisiológicos permiten el buen desarrollo de la planta. Asimismo, señales químicas provenientes de la raíz, tanto de naturaleza hormonal como mineral, regulan las relaciones hídricas y el metabolismo de las hojas y de los tallos (Vinicio, 2002).

La formación de raíces determinó en la primera etapa de la aclimatación de las vitroplantas a condiciones *ex-vitro*. Los tratamientos en los que se observó 100% de brotes enraizados, fueron PTi, PTii y VPi (Figura 20). Respuesta similar se observó en el enraizamiento de brotes de *Haworthia*, (Dethier, 1993) *Eucalyptus camaldulensis* (Kirdmanee *et al.*, 1995) *Ipomoea batatas* (Afreen-Zobayed *et al.* 2000) y *Laelia anceps*

(Sánchez, 2009) donde el mayor porcentaje de brotes enraizados se obtuvo en los tratamientos con sustrato bajo condiciones *in vitro*.

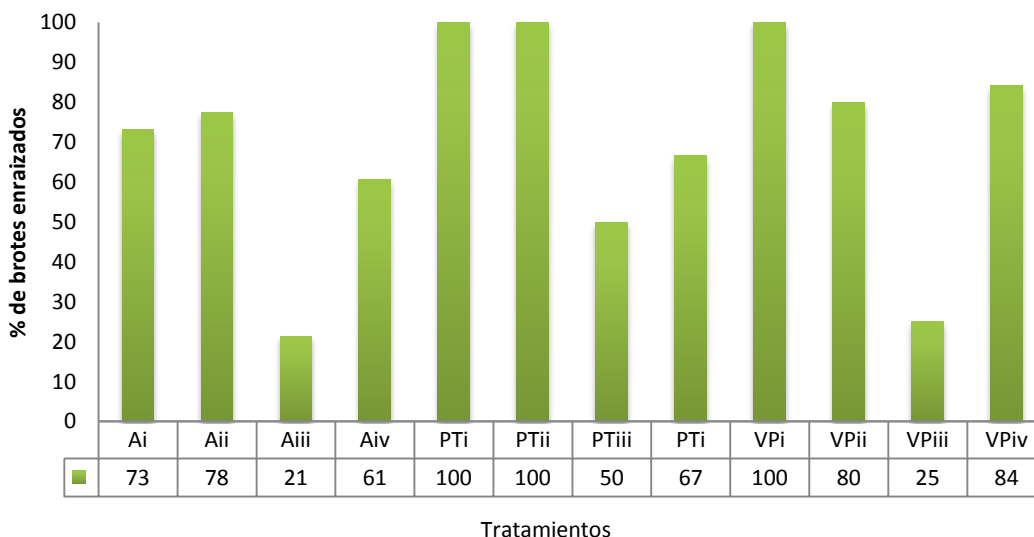


Figura 20. Porcentaje de brotes enraizados *in vitro*: MS al 100% (i); MS al 50% (ii); MS al 25% (iii); Solución Arnon y Hoagland (iv), adicionados con 15 g L⁻¹ de sacarosa Perlita-tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP) y agar (A)

En esta fase del experimento, los brotes enraizados mostraron un comportamiento heterogéneo tanto en la formación de raíces, longitud de las mismas, el número de hojas y longitud de parte aérea, por efecto de los diferentes tratamientos. Los brotes crecidos en sustratos lograron formar un mayor número de raíces; sin embargo la longitud de estas fue inferior comparada con los medios en agar. Del mismo modo el número de hojas fue ligeramente menor en los brotes enraizados en sustratos debido a la defoliación, por el contrario la longitud de la parte aérea se vio favorecida por los sustratos (Cuadro 20, 21 y 22) .

En *Solanum tuberosum* Nhut *et al.*, (2006) utilizaron un sistema hidropónico para la producción de microtubérculos *in vitro*, que consistía en soportes de papel filtro o algodón, las sales del medio MS a la mitad de su concentración y 8 g L⁻¹ de sacarosa. Ellos encontraron que el medio que contenía agar como material de soporte promovió el mayor porcentaje de formación de microtubérculos, pero el diámetro, peso fresco y uniformidad de estos fue mayor en el sistema hidropónico.

De acuerdo con el análisis estadístico los sustratos tuvieron efecto significativo en la formación de hojas y la longitud de raíz. El agar favoreció la formación de hojas y el alargamiento de las raíces de los brotes enraizados *in vitro* (Cuadro 20). El número de raíces y la longitud de la parte aérea no mostraron diferencias significativas entre los diferentes sustratos y el agar, lo que podría indicar que VP y PT puede ser una alternativa en la etapa de enraizamiento de brotes *in vitro*.

Cuadro 20. Efecto de los sustratos en las variables número de raíz, número de hojas y longitud de las plantas regeneradas *in vitro* de chile habanero cv Naranja.

Sustrato	Número de raíz	Número de hojas	Longitud de parte aérea (cm)	Longitud de raíz (cm)
A	2.55 a	7.20^a	1.93 a	6.78^a
PT	2.75 ^a	4.00c	2.13 a	1.06c
VP	3.40 ^a	5.30b	2.01a	2.88b

Valores con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Los medios tuvieron efecto significativo en número de raíz, longitud de raíz y la longitud de la parte aérea de las plantas regeneradas. El medio Arnon y Hoagland indujo el número más alto de raíces (Cuadro 21). Lo anterior se confirma lo observado por Barrales (2009) en el enraizamiento de brotes de chile habanero cv Naranja al utilizarla solución de Arnon y Hoagland.

Cuadro 21. Efecto de los medios de cultivo en el número y longitud de raíz, número de hojas y longitud de parte aérea de planta regenerada *in vitro* de chile habanero cv Naranja.

Medio	Número de Raíz	Número de Hojas	Longitud de	
			parte aérea (cm)	Longitud de raíz (cm)
MS al 100%	3.20b	6.20 ^a	2.80a	3.36ab
MS al 50%	1.46c	5.06 ^a	1.81bc	2.61b
MS al 25%	2.33bc	5.40 ^a	1.40c	4.23a
Arnon y Hoagland	4.60^a	5.46 ^a	2.03b	4.09a

Valores con la misma letra dentro de columna son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

La combinación de medios y sustratos tuvo efecto significativo en todas las variables, la solución nutritiva Arnon y Hoagland en sustratos bajo condiciones *in vitro* tuvo un efecto favorable en la formación de raíz. El mayor número de raíces se observó en los brotes de los tratamientos VPiv (Arnon y Hoagland en Vermiculita-Perlita) con 4.8 raíces y PTiv (Arnon y Hoagland en Perlita-Vermiculita), estos brotes formaron 4.6 raíces en promedio, seguido de los brotes en los tratamientos Aiv (Arnon y Hoagland en agar), PTi (MS100 % en perlita-tezontle) y VPi (MS 100% en vermiculita-perlita). El efecto en conjunto de sustratos y medios tiene ventaja sobre los tratamietnos medios en agar, esto se puede atribuir a las características físicas de los sustratos como es la densidad aparente (Da) ya que al ser el sustrato ligero no representa una barrera para la formación de las raíces (Cuadro 21).

Cuadro 22. Efecto de los medio y sustratos en las variables número de raíz (NR), longitud de raíz (LOGRZ) número de hojas (NH) y longitud de parte aérea de las plantas regeneradas (LOGPA).

sustratos	variable	Medios			
		i	ii	iii	iv
A	NR	1.60 de	2.00 cde	2.20bcde	4.40 abc
	LOGRZ	6.50 ab	6.90ab	7.35 a	6.40ab
	NH	7.20ab	6.80ab	8.00a	6.80ab
	LOGPA (cm)	2.12bcd	1.58 cd	1.60 cd	2.42bc
PT	NR	4.00abcd	0	2.40abcde	4.60 ab
		2.48 cd	0	0.36 d	1.40 d
	NH	5.40abc	3.00c	3.80bc	4.00bc
	LOGPA (cm)	3.63 a	1.53cd	1.24 d	2.14bcd
VP	NR	4.00abcd	2.40abcde	2.40 abcde	4.80 a
	LOGRZ	1.10 d	0.94d	5.00 abc	4.48 bc
	NH	6.00abc	5.40abc	4.40bc	5.60abc
	LOG (cm)	2.80ab	2.34bc	1.48cd	1.53cd

MS al 100% (I); MS al 50% (II); MS al 25% (III); Solución Arnon y Hoagland (IV), con 15 g L⁻¹ de sacarosa.; Perlita-tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP) y agar (A). Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Las plantas regeneradas que formaron las raíces más largas se observaron en los tratamientos en agar con los medios MS al 25 % y MS al 50 % (7.35 y 6.9 cm) (Cuadro 21) Lo anterior posiblemente porque las raíces deben aumentar su área de exploración para disponer de los nutrimentos fuertemente retenidos por el agar. Por otro lado, las bajas concentraciones de los componentes del medio (sales basales y sacarosa) favorecieron el alargamiento de las raíces, lo que confirma la recomendación de Orellana (1998) utilizar medios de cultivo simples y de ser posible en estado líquido.

El número de hojas de los brotes enraizados fue mayor en los brotes provenientes de agar en los medios MS al 25% con 8 hojas en promedio por planta regenerada seguido del medio MS al 100% con 7.20 hojas en promedio. Los valores inferiores de número

de hojas en los tratamientos conformados con sustratos fue resultado de la defoliación de los brotes durante el proceso de adaptación al sustrato en la fase de enraizamiento *in vitro* (Cuadro 21).

La longitud de la parte área de las plantas regeneradas fue mayor en los sustratos (PT y VP) saturados con los medios MS al 100% y Arnon Hoagland con valores de 3.63 y 2.8 cm de longitud (Cuadro 21).

6.4.5 Aclimatación de plantas regeneradas en sustratos en invernadero

Después de siete semanas de haber sido transferidas al invernadero. Se observó 100% de sobrevivencia de las plantas provenientes de los tratamientos conformados por la solución nutritiva Arnon y Hoagland en agar, MS al 50% en los sustratos PT y VP, así como MS al 100% en el sustrato VP (Figura 21).

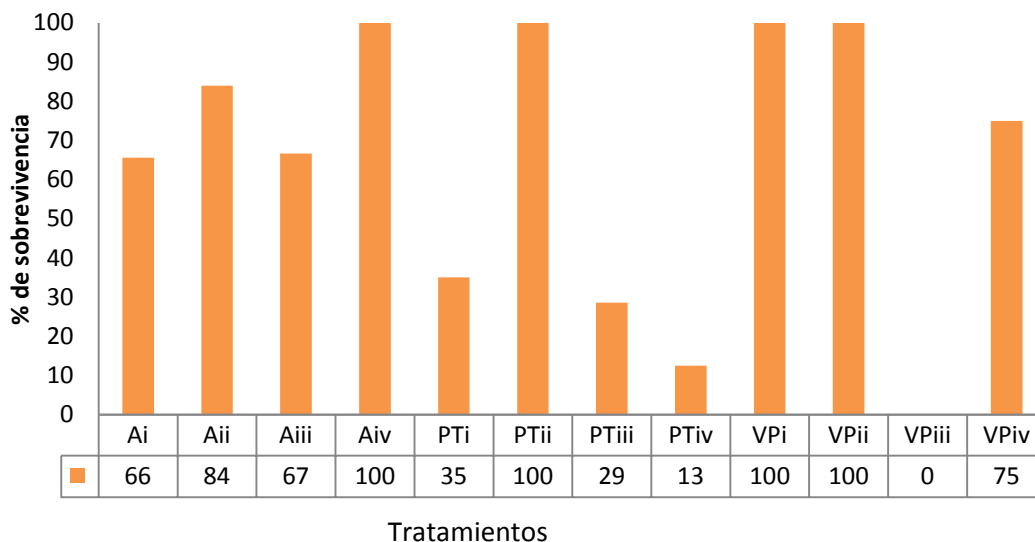


Figura 21. Supervivencia de las plantas regeneradas en los diferentes tratamientos después de 7 semanas de haber sido transferidas al invernadero Perlita-Tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP) y agar (A) MS al 100% (i); MS al 50 % (ii); MS al 25 % (iii); solución de Arnon y Hoagland (iv), con 15 g L⁻¹ sacarosa.

El porcentaje de supervivencia fue similar al obtenido por Valadez-Bustos *et al.* (2009) quienes enraizaron en agar brotes de embrión de chile habanero cv Naranja. Esto

significa que es posible utilizar PT y VP en conjunto con la solución nutritiva de Arnon y Hoagland para promover alta supervivencia de las plantas regeneradas *in vitro*.

Los altos porcentajes de supervivencia de las plantas regeneradas con el protocolo desarrollado en la presente investigación a las condiciones de invernadero muestran una alternativa para la propagación de plantas de chile habanero. Lo anterior se explica por el hecho de que el proceso de aclimataciones es crucial para el éxito de la micropropagación al evitar una pérdida importante de material al momento de transferirse las plantas al invernadero (Lamhanedi *et al.*, 2003).

6.4.5.1 Crecimiento de plantas en invernadero

Una eficiente aclimatación permite que las plantas regeneradas alcancen un crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, con mayor intensidad de luz y en sustratos (Lamhanedi *et al.*, 2003). Las plantas provenientes de los diferentes tratamientos *in vitro* mostraron diferencias significativas en su crecimiento (Número de hojas, longitud de tallo y diámetro de tallo) durante las siete semanas que permanecieron en condiciones de invernadero. Las plantas que lograron mayor longitud de tallo fueron aquellas provenientes del tratamiento VPii seguido de los tratamientos PTii, VPi y VPiv. El mayor número de hojas lo mostraron los tratamientos VPii, VP1 y PTi. Las plantas que lograron engrosar en mayor proporción el tallo, fueron las provenientes del tratamiento VPii seguido de los tratamientos VPi y Aii (Cuadro 22). De tal forma que el tratamiento VPii (MS al 50% en sustrato VP) generó plantas con mayor longitud, número de hojas y diámetro de tallo durante las 7 semanas de evaluación. (Cuadro22).

Cuadro 22. Longitud, número de hojas, diámetro de tallo de plantas regeneradas in vitro y aclimatadas en invernadero después de 7 semanas.

Tratamiento	Longitud de tallo	Número de hojas	Diámetro de tallo
Ai	2.40 f	7.85 dc	1.53 abc
Aii	2.71e	7.28 dc	1.73ab
Aiii	1.40f	7.00 d	0.79d
Aiv	4.60d	10.50 bc	1.28bc
PTi	5.75c	9.40 bc	1.05c
PTii	6.21b	15.00a	1.30bc
PTiii	5.00c	16.5 a	1.57 abc
PTiv	3.00f	4.00 e	0.91d
VPi	6.64e	13.14ab	1.75ab
VPii	6.98a	16.14 a	1.92^a
VPiv	6.15b	5.14 d	1.01c

MS al 100% (I); MS al 50% (II); MS al 25% (III); Solución Arnon y Hoagland (IV), con 15 g de sacarosa L⁻¹.; Perlita-tezontle (PT); Vermiculita-Perlita (VP) y agar (A). Porcentajes con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Las plantas regeneradas provenientes de los medio MS al 100, 50% y la solución nutritiva Arnon y Hoagland en los sustratos VP y PT, crecieron (longitud) a mayor velocidad que las plantas provenientes de agar (Figura 22). En tanto que aquellas provenientes del medio MS 25% y cualquiera de los tres sustratos por el contrario con las provenientes del medio MS al 25% y en cualquiera de los tres sustratos (agar, PT y VP) tuvieron un comportamiento muy similar entre sí.

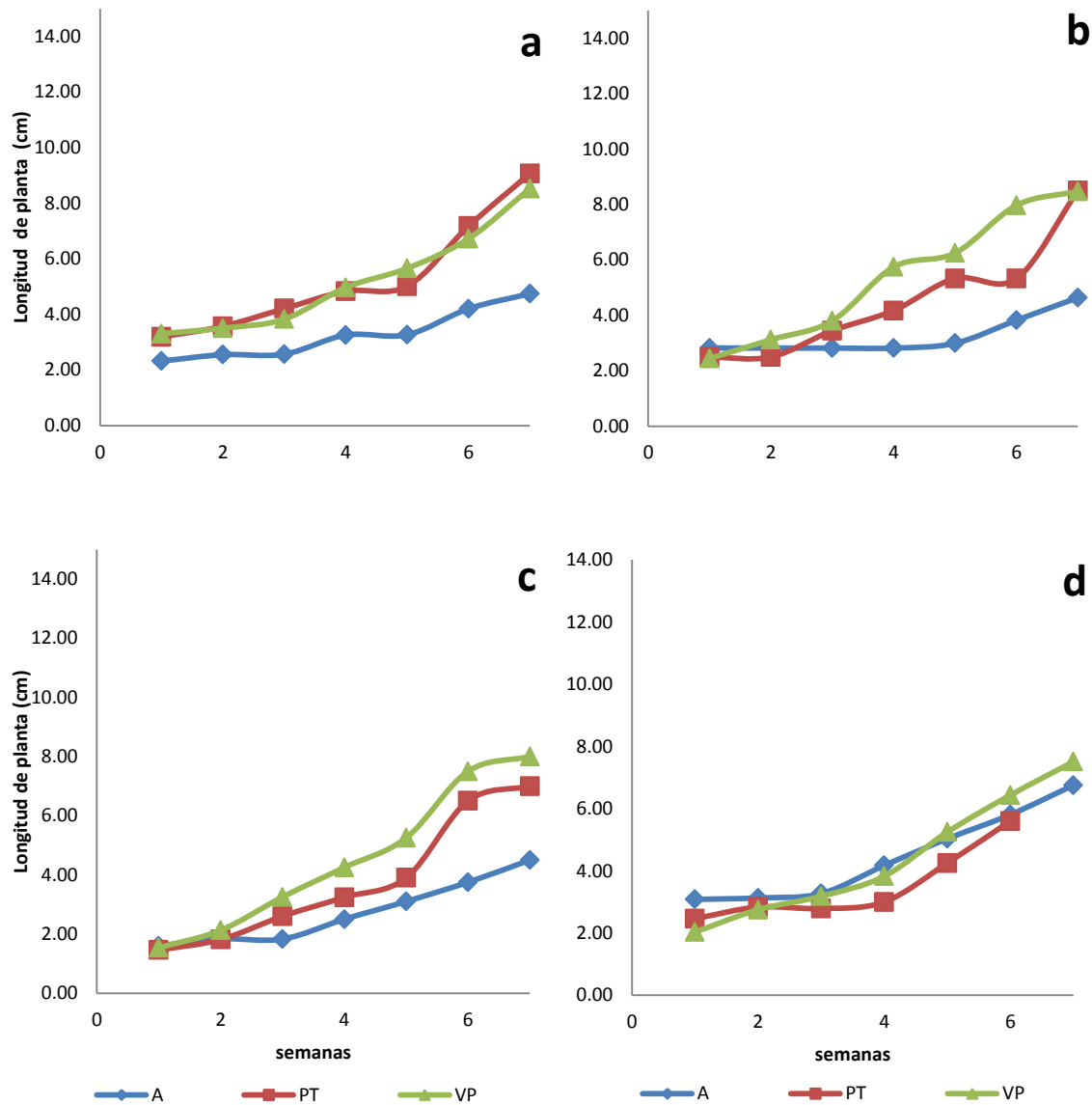


Figura 22. Longitud de plantas regeneradas *in vitro* en los diferentes tratamientos crecidas en el invernadero durante 7 semanas: plántulas provenientes de agar (A), Perlita-Tezontle (PT), Vermiculita-Tezontle (VP); MS al 100% (a), MS al 50% (b), MS al 25% (c), Arnon y Hoagland (d) con 15 g L^{-1} de sacarosa.

La formación de hojas con respecto al tiempo en algunos tratamientos se observó constante tal es el caso de las plantas obtenidas de los tratamientos MS al 100% en los tres sustratos (A, VP y PT) y MS 50% aunque en la semana 6 se observa un decremento en las hojas pero se recupera en la semana siete (Figura 23-b). Por otro lado, en las plantas provenientes del medio MS 25% en sustrato VP, se observa un

efecto negativo en la formación de hojas entre la semana dos y tres con un ligero aumento en las siguientes semanas(Figura 23-c).

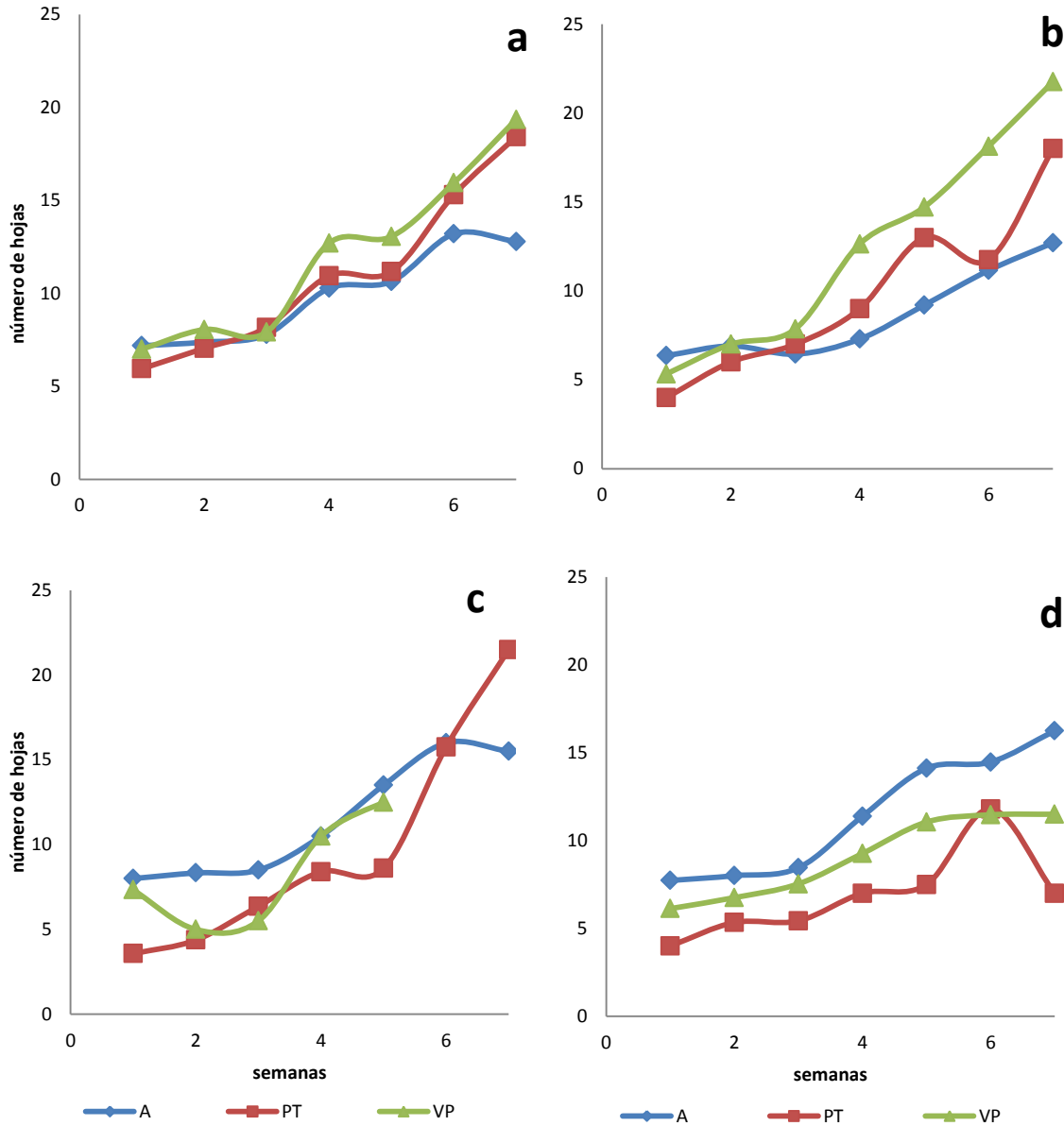


Figura 23. Numero de hojas de las plantas obtenidas de *in vitro* con los diferentes tratamientos y aclimatadas en invernadero: agar (A), perlita-tezontle (PT), vermiculita-tezontle (VP); medio MS al 100% (a), MS al 50% (b), MS al 25% (c), solución de Arnon y Hoagland (d), con 15 g L⁻¹ de sacarosa.

El diámetro de tallo está relacionado con las funciones de soporte, conducción de agua, nutrimentos y la translocación de los productos de la fotosíntesis hacia toda la planta,

de tal forma que el buen desarrollo de los tallo favorecerá el establecimiento de las vitroplantas. El aumento en el diámetro del tallo fue similar en las plantas provenientes de los tratamientos con sales basales MS al 100 % en los tres sustratos (A, PT y VP) (Figura 24-a). Algo similar se observó en las plantas provenientes de la solución nutritiva de Arnon y Hoagland en los tres sustratos (A, PT y VP), aunque estas plantas mostraron diámetros menores (Figura 24-d).

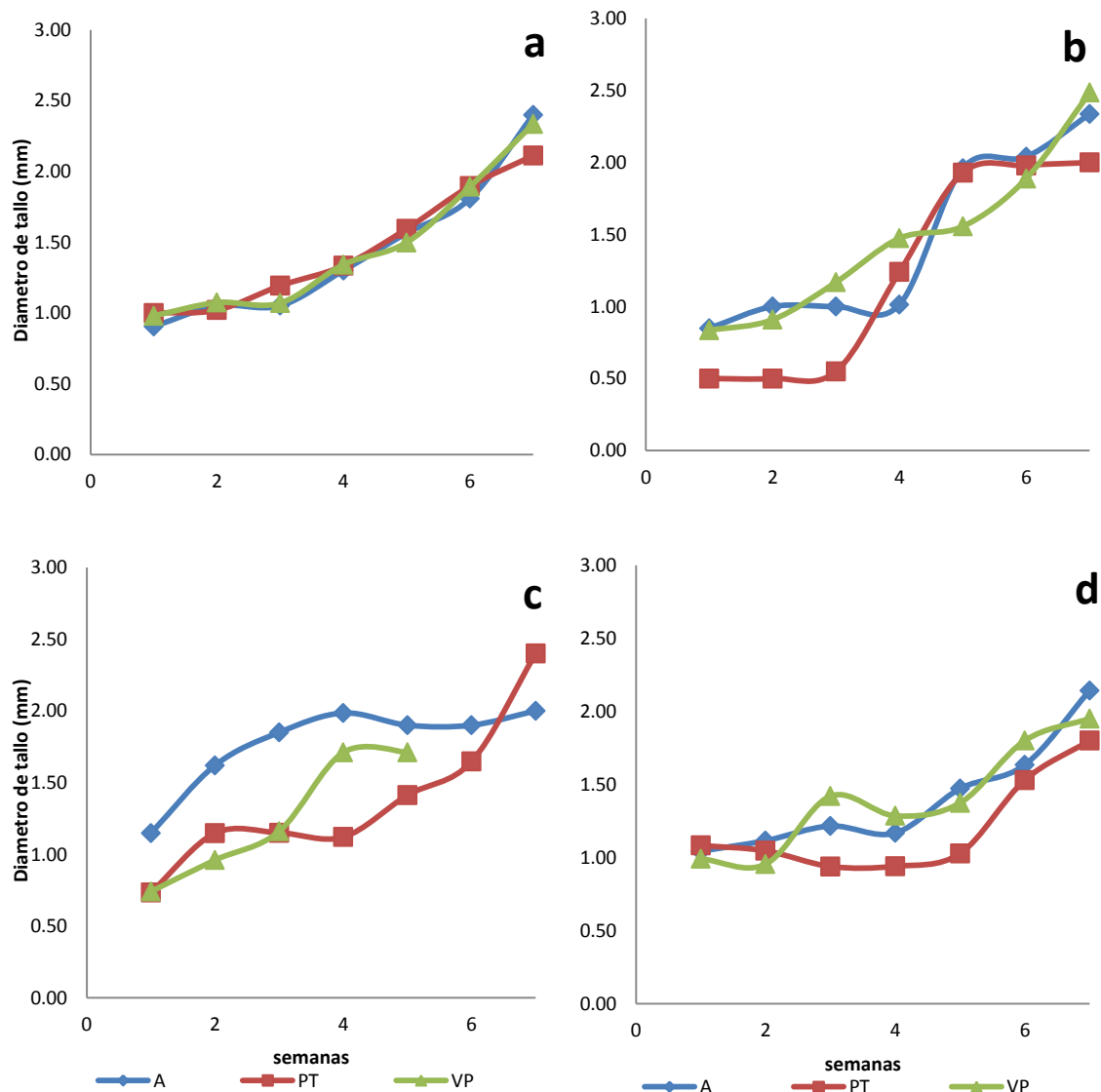


Figura 24. Diámetro de tallo de las plantas regeneradas *in vitro* en los diferentes tratamientos, aclimatadas en el invernadero durante siete semanas: sustratos, agar (A), Perlita-Tezontle (PT), Vermiculita-Tezontle (VP); medio MS al 100% (a), MS al 50% (b), MS al 25% (c), solución de Arnon y Hoagland (d).

6.5 Costos de los medios de cultivo y las plantas regeneradas

En este apartado se presenta los costos de las plantas regeneradas siguiendo el protocolo desarrollado en la presente investigación.

Cabe señalar que para muchas de las variables evaluadas en el presente protocolo de regeneración *in vitro* de plantas de chile habanero cv. Naranja (número de brotes por explante, supervivencia, longitud de planta, número de hojas por planta y diámetro de tallo) la combinación de medio MS al 100% con la concentración de 15 g L⁻¹ de sacarosa en VP mostro el mejor resultado en cuanto a número de brotes por explante y MS al 100 y 50 % con 15 g L⁻¹ de sacarosa en PT y VP tuvieron los mejores porcentaje de enraizamiento. Para el número de raíz la solución nutritiva con 15 g L⁻¹ de sacarosa y el sustrato VP mostraron los mejores resultados, mientras que para longitud de raíz MS al 50% con 15 g L⁻¹ de sacarosa en VP tubos buenos resultados en el número de raíces. Así los costos se calcularon considerando los medios y los sustratos mencionados.

La diferencia en cuanto a costos entre usar el medio MS en agar contra el medio Arnon y Hoagland es de alrededor de 34%. El agar representa 70% del costo del medio de cultivo a diferencia de los sustratos los sustratos los cuales constituyen del 13 al 17% del mismo (Cuadro 23).

En los cuadros 24 y 25 se muestra el costo de los diferentes medios con sustratos y agar que tuvieron mejor respuesta en las fases de desarrollo y enraizamiento durante la regeneración.

Por otro lado el medio de desarrollo MS al 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa en agar comprado con sustratos muestra un ahorro de 82 %. Del mismo modo la comparación con el medio MS al 50% con 15 g L⁻¹ de sacarosa con sustratos representa 90% de ahorro. El uso del medio Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa muestra un ahorro de 30% en agar y con sustratos de 80% (Cuadro 24)

Para el medio de enraizamiento el medio MS al 50% el ahorro es de 66% con agar y de 84% con sustratos. Por otro lado con el medio Arnon y Hoagland en agar el costo se reduce en 77.71 % pero con sustratos es de 90 % (Cuadro 25).

Cuadro 24. Cuadro de costos en pesos de medio Murashige y Skoog (1962) (MS) y Arnon y Hoagland (H) (1940)

Sales minerales	mg L-1 de medio MS	mg L-1 de medio H	Costo por g (pesos)	Costo por L (pesos) MS	Costo por L (pesos) H
KNO ₃	1900	1010	4.9	9.31	4.94
NH ₄ NO ₃	1650	--	1.57	2.60	--
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	--	1.79	0.79	--
MgSO ₄ 7 H ₂ O	370	490	2.54	0.94	1.24
KH ₂ PO ₄	170	--	2.17	0.37	--
Fe SO ₄ 7 H ₂ O	27.8	3.0	1.79	0.05	0.00537
MnSO ₄ 4 H ₂ O	17	--	4.1	0.07	--
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8.6	0.22	2.21	0.019	0.000486
H ₃ BO ₃	6.3	2.86	1.26	0.008	0.0036
KI	0.83	--	12.04	0.01	--
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.09	8.0	0.002	0.00072
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	--	80.0	0.002	--
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.025	0.08	24.0	0.0006	0.00192
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.3	--	5.09	0.19	--
NH ₄ H ₂ PO ₄		230	2.038	--	0.468
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O		706	1.06	--	0.7486
MnCl ₂ 4 H ₂ O		1.81	1.12	--	0.002072
Glicina	2.0	-	5.05	0.010	
Mio-inositol	100.0	-	7.57	0.757	
Acido nicotínico	0.5	-	38.0	0.019	
Piridoxina	0.5	-	22.0	0.011	
Tiamina	1.0	-	13.0	0.013	
Sacarosa	30000	-	0.02	0.6	0.6
Agar	7000	-	4.21	69.44	69.44
			Total	85.21	77.45

Cuadro 24. Costo en pesos por litro del medio de desarrollo con las sales MS y la solución nutritiva Arnon y Hoagland, con agar y sustratos.

Componentes	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
MS al 100%	16.0	-	16.0	-	16.0	-	-	-	-
MS al 50%	-	8.0	-	8.0	-	8.0	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	8.0	8.0	8.0
A	69.44	69.44	-	-	-	-	69.44	-	-
PT	-	-	3.51	3.51	-	-	-	3.51	-
VP	-	-	-	-	3.02	3.02	-	-	3.02
AG₃	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926	0.926
AgNO₃	0.291	0.291	0.291	0.291	0.291	0.291	0.291	0.291	0.291
Total	86.65	78.65	20.72	12.72	22.37	12.23	78.65	12.72	12.23

MS al 100% con agar (M1); MS al 50% con agar (M2); MS al 100% con PT (M3); MS al 50% con PT (M4); MS al 100% con VP (M5); MS al 50% con VP (M6); Arnon y Hoagland con agar (M7); Arnon y Hoagland con agar (M8); Arnon y Hoagland con agar (M9); nitrato de plata (AgNO₃); ácido giberélico (AG₃) con 15 g L⁻¹ de sacarosa.

Cuadro 26. Costo en pesos por litro del medio de enraizamientos en agar y sustratos.

Componentes	M1	M 2	M 3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
MS	16.0	-	16.0	-	16.0	-	-	-	-
MS al 50%	-	8.0	-	8.0	-	8.0	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	8.0	8.0	8.0
A	69.44	69.44	-	-	-	-	69.44	-	-
PT	-	-	3.51	3.51	-	-	-	3.51	-
VP	-	-	-	-	3.02	3.02	-	-	3.02
AIB	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261	0.261
AgNO₃	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145	0.145
Total en pesos	84.84	77.84	19.91	11.91	19.42	11.42	77.84	11.91	11.42

MS al 100% con agar (M1); MS al 50% con agar (M2); MS al 100% con PT (M3); MS al 50% con PT (M4); MS al 100% con VP (M5); MS al 50% con VP (M6); Arnon y Hoagland con agar (M7); Arnon y Hoagland con agar (M8); Arnon y Hoagland con agar (M9); ácido indolbutírico (AIB); nitrato de plata (AgNO₃).

Considerando los resultados de este trabajo es posible proponer el siguiente protocolo para la regeneración *in vitro* a bajo costo de plantas de chile habanero cv Naranja. Para la etapa de inducción de brotes se podría utilizar el medio MS 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa con agar, los medios MS 100 %, MS 50% o Arnon y Hoagland con 15 g L⁻¹ de sacarosa con los sustratos VP o PT para las etapas de desarrollo y enraizamiento La proyección del costo por planta regenerada usando el protocolo antes descrito se muestra en el (Cuadro 26).

El uso de sustratos reduce significativamente el costo de las plantas regeneradas (a más de la mitad) comparado con el agar. Asimismo, utilizar la mitad de la concentración de sales del medio MS y de sacarosa (15 g L⁻¹) podría contribuir a la reducción del costo.

Cuadro 27. Costo en pesos aproximado por plantas de chile habanero c.v. Naranja, regeneradas *in vitro*.

	Sustratos y medios	Medio desarrollo (90 ml)	Medio enraizamiento (30 ml)	Total	Núm. de brotes	Costo unitario por planta
Medio inducción 30ml (MS en agar) costo \$ 2.57	MSA	2.59	2.54	7.7	6	1.28
	MSPT	0.62	0.59	3.78	6	0.63
	MSVP	0.67	0.58	3.82	6	0.63
	HA	2.35	2.33	7.25	6	1.20
	HPT	0.38	0.35	3.30	6	0.55
	HVP	0.36	0.34	3.27	6	0.54

(MS) Sales Basales MS; (H) solución nutritiva Arnon y Hoagland; (A) agar; (PT) Perlita-Tezontle; (VP) Vermiculita-Perlita.

CONCLUSIONES

-La sustitución del agar por los sustratos en los medios de inducción, no permitió la formación de brotes adventicios a partir de explantes de hipocotilo de chile Habanero del cv. Naranja.

-El uso de las sales de Murashige y Skoog al 50 y 100% con 15 g de sacarosa L⁻¹ permitió obtener los valores más altos en cuanto al porcentaje de explantes de embrión que formaron brotes y el número de brotes por explante, respectivamente.

-El desarrollo de los brotes adventicios se vio afectado positivamente por las sales de MS al 50%, la solución de Hoagland y el uso de sustratos.

-La mayor de frecuencia de enraizamiento de los brotes adventicios y del número de raíces ocurrió al cultivarlos en soluciones diluidas (MS 50% y Arnon y Hoagland con 15 g de sacarosa L⁻¹) y sustrato (VP).

-Las vitroplantas provenientes de los tratamientos en los que se utilizaron sustratos como soporte, mostraron los valores más altos de supervivencia, longitud y número de hojas cuando se crecieron en invernadero.

-Es factible utilizar soluciones diluidas y sustratos para regenerar *in vitro* plantas de chile Habanero.

-El costo de las vitroplantas obtenidas en medios con sustratos fue significativamente menor que el de las obtenidas en medios que contenían agar.

LITERATURA CITADA

- Abad B., M. Noguera, P. Murray y C. Carrión B. 2003. Los sustratos en los cultivos sin suelo, *In: Urrestarazu Gavilan, M. (eds.) Tratado de cultivo sin suelo. Mundi-Prensa. Barcelona, España. 914p*
- Abdelnour-Esquivel, A., and E. Vincent J. 1994. Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica. 38 p.
- Abdelwahd, R, N. Hakam, M. Labhilili and S. UduPA. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of fababean. *African Journal of Biotechnology* 7: 997-1002.
- Acevez, N., L. A., J. F. Juarez L., D. J. Palma L., R. Lopez L., B. Rivera H., J. A. Rincon R., R. Morales C., R. Hernandez A. y A. Martinez S. 2008. Estudio para determinar zonas de alta potencialidad del cultivo del chile habanero (*Capsicum chinense* jacq.) en el estado de Tabasco. INIFAP, SAGARPA, Colegio de Posgraduados, DEIDRUS-TAB, Secretaria de Desarrollo Forestal y Pesca. 32 pp.
- Afreen-Zobayed, F., S. M. A. Zobayed, C. Kubota, T. Kozai and O. Hasegawa. 2000. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant Science*. 157:225-231.
- Anaya-Lopez, J. L., J. E. Lopez Meza, V. M. Baizabal-Aguirre, H. Cano-Camacho and A. Ochoa- Zarzosa. 2006. Fungal and cytotoxic activity of a *capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotechnology Letter*. 14:1101- 1112.
- Anicua S, R. 2008. Caracterización física y micro morfología de materiales orgánicos e inorgánicos para la generación de mezclas de sustratos en la producción de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Tesis de doctorado. Colegio de posgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 198pp
- Anicua S, R., M del C. Gutiérrez C., P. Sanchez G., C. Ortiz S., V. H. Volke H. y J. E. Rubiños P. 2009. Tamaño de partícula

y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y zeolita. Agricultura Técnica en México. 35:147-156.

Ansorena, M. J. 1994. Sustratos, Propiedades y Caracterización. Mundi Prensa, Madrid. 172 p.

Ayala V., H. 2004. Los Chiles de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Agronomía. Leik, Guatemala. Guatemala 250 p.

Alcantar G., G y M. Sandoval V. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Publicación Especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México.37-66p

Barrales L., A. 2009. Luz, sacarosa, nutrimentos y recipientes en el enraizamiento *in vitro*, y aclimatación de *Capsicum chinense* Jacq Tesis de Maestría. Colegio de posgraduados, Texcoco, México. 92p

Barreiro, P. M. 1998. El chile verde y su trascendencia cultural. Claridades Agropecuarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F. 56:3-17

Base de datos PLANTS, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (<http://plants.usda.gov/java/nameSearch>)

Baixauli S., C. y J.M. Aguilar O. 2002. Cultivos Sin Suelo de Hortalizas, Aspectos Practicos y Experiencias. Generalitat Valenciana Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. 16-18p

Brack E., A. 2003. Perú: 10mil años de domesticación. Editorial Bruño. Lima, Perú.16p

Brito-Argáez L., F. Moguel-Salazar, F. Zamudio, T. González-Estrada and I. Islas-Flores. 2009. Characterization of a *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity. Asian Journal of Biochemistry 4:77-87.

- Borges, G. L. 2006. Predicción de potasio por las raíces del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Tesis Doctorado. Centro de investigación científica de Yucatán (CICY). Mérida, Yucatán. 8pp
- Bordado, J. L. 2005. Hidroponía, 1a. ed. Albatros. Buenos Aires, Argentina. 190 pp
- Bottcher, I., K. Zeglauer and H. Goring. 1988. Inducting and reversion of vitrification of plants cultured in vitro. *Plant Physiology*. 66: 94–98.
- Borkowska, B. and L. Michaleczuk. 1987. The physiological disorders of sour cherry cultures: necrosis and vitrification. *Acta Horticulturae*. 212:235-237
- Bures, S. 1977. Sustratos. Ediciones Agrotécnicas S. L., Madrid, España.341p.
- Bunt, A.C. 1998. Media and mixes for container- grown plants. Unwin Hyman Ltd. London 148 p.
- Castilla, P. N. 2004. Invernaderos de Plástico: Tecnología y Manejo. Mundi-Prensa. Madrid, España. 681p.
- Castorena G., M. C. 2010. (En línea) Caracterización física de sustratos. Primer curso nacional de sustratos. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México <http://www.cm.colpos.mx/montecillo/images/SUSTRATOS/03.pdf>
- Cassells, A. and R Curry. 2001. Oxidativestress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissueand Organ Culture*.64: 145-157.
- Conner, A.J. and Thomas, M.B. 1982. Re-establishing plantlets from tissue culture: a review. *International Plant Propagators Society* 31: 342-357.
- Correll, M. J. and P. J. Weather. 2001. Effects of light, CO2 and humidity on carnation growth, hyperhydration and cuticular wax development in a mist reactor. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37: 405-413.
- De Boodt M., O. Verdonck, and I. Cappaert. 1974. Method for measuring the water release curve of organic substrates. *Acta Horticulturae* 37:2054-2062.

- Dethier R., S. M. 1993. Optimization of plant regeneration and rooting from leaf explants of five rare *Haworthia*. *Scientia Horticulturae* 56: 157-161
- Delmer D. 1987. Cellulose biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*.138:259-290
- Dencso, I. 1987. Factors influencing vitrification of carnation and conifers. *Acta Horticultura*. 212:167-176
- Duong-Tan N., H. Nguyen-Thi-Dieu, L. Bui-Van; J. Da-Silva T., S. Fukai, M. Tanaka. 2002. The changes in shoot regeneration potential of protocorm-like bodies derived from *Lilium longiflorum* young stem explants exposed to medium volume, pH, light intensity and sucrose concentration pretreatment. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 77: 79-82
- Frank, T., C. Kavers, T. Gaspar, J. Dommès, C. Deby, R. Greimess, S. Didier and G. D. Duspont. 2004. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiology Biochemistry*. 42:519–527.
- Fujiwara, K., P. Kozai and I. Watanabe. 1988. Development of photo autotrophic tissue culture system for shoot and/or plantlets at rooting and acclimatization stage. *Acta Horticultura*. 230: 153–158.
- Fujiwara, K. and T. Kozai. 1995. Physical microenvironment and its effects. *In: Aitken-Christe, J., Kozai, T., Smith, M.L. (eds.), Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.319–367 pp
- Fujiwara K., C. Yamauchi and T. Kozai. 1993. Effects of culture media components on the oxygen diffusion coefficient in liquid and gelled media. *Japan Plant Cell Tissue Culture and Meeting, Kyoto*. 40 p.
- Gaspar, T., C. Kevers and P. Debergh. 1987. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. *In: Bonga, J. M.; D. J. Durzan, (eds). Cell and Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff Publishing. Dordrecht Holland. 1:152-166.

- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture; part 2 in Practice. 2ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.
- González, M., N. Mogollon, G. Alvarado, A. Giménez y T. Capote. 2012. Efecto del medio de cultivo in vitro y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento de cocuy (*Agave cocui* Trelease) Bioagro. 24(1):39-44.
- González, E.T., P.L. Gutiérrez y F.M. Contreras. 2006. (en línea) Disponible: El chile habanero de Yucatán. Ciencia y desarrollo. El conocimiento a tu alcance. <http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/revista/195/Articulos/Chilehabanero/Habanero02.html> (revisado 09 de julio2013)
- Hanlon, E. A. and G. J. Hochumuth. 2000. Bell Pepper. *In*: Ray C., C. (eds) Reference Sufficiency Ranges for Plants Analysis in the Southern Region of the United States. Southern Cooperative Series Bulletin. 394:55
- Handreck, K. A. and N. D. Black. 1984. Growing media for ornamental plants and turf. Kensington New South Wales University Press Australia.401 p.
- Hillel, D. 2004. Introduction to Environmental Soil Physics.Elsevier Science. USA.485pp
- Ichimura K. and M. Oda. 1998. Stimulation of root growth of several vegetables by extracts from a commercial preparation of agar. Journal Japan Society Horticultural Science. 67:341–346.
- Jarma, A. J., V. Degiovanni and R.A. Montoya. 2010. Índices fisiotécnicos, fases de crecimiento y etapas de desarrollo de la planta de arroz *In*: Producción de Ecoeficiente del arroz en América Latina. (eds) Degiovanni B., V., C. P. Martínez R., F. Motta O. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 487p.
- Jay-Allemand, C., P. Capelli and D. Cornu. 1992. Root development of in vitro hybrid walnut microcutting in a vermivulite-containing gelrite medium. Scientia Horticulturae 51:335-342.

- Juarez Hernandez, M.J., Baca Castillo, Gustavo, A. Lorenzo. 2006. Propuesta para la formulación de soluciones nutritivas en estudios de nutrición vegetal. *Interciencia* 31:246-253.
- Kaneda, Y., Y. Tabei, S. Nishimura, K. Harada, T. Akihama, and K. Kitamura. 1997. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans (*Glycine max* L. Merr). *Plant Cell Reports*.17:8-12
- Kehie, M., S. Kumaria and P. Tandon. 2012. *In vitro* plantlet regeneration from nodal segment and shoot tips of *Capsicum chinense* Jaqc. cv Naga king chili. *Biotechnology*. 2:31-35.
- Kevers, C., and T. Gaspar. 1986. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extra cellular space, air volume and ion levels. *Physiology plantarum*. 24:647–653.
- Kirdmanee, C., Y. Kitaya y T. Kozai. 1995. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of Eucalyptus plantlets in vitro and ex vitro, *In Vitro Cell. Developmetal Biology Plantarum*. 31: 144–149.
- Kreutmeier, C. K. Gebhardt, L. Paul. 1984. The effect of MgSO₄ and CaCl₂ on regeneration of shoot tip cultures of *Prunus cerasus* in vitro. *Gartenbauwissenschaft Journal* 49:204-212
- Kozai, T., K. Watanabe and B. R. Jeong. 1995. Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* in response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. *Horticultural Science*. 64:1-9.
- Kwa, S. H., Y. C. Wee, T. M Lim and P. P Kumar. 1995. Establishment and physiological analyses of phototrophic callus of the fern. *Platyserium coronarium* (Koenig) under CO₂ enrichment. *Journal Experimental Bototanical*. 46:1535-1542.

- Lafitte, H. R. 2001. Estréses abióticos que afectan al maíz. *In*. Paliwal, R. L, G. Grana, H. Renée Lafitte y A. D. Violic (eds) El Maíz en Los Trópicos, Mejoramiento y producción. Organización de las Naciones Unidas y La Alimentación. Roma. 323p
- Lamhanedi, M., H Chamberland, F.M Tremblay. 2003. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. *Physiology Plantarum*.118: 554–561
- Latournerie-Moreno L., J. L. Chávez-Servia, M. Pérez-Perez, G. Castañon-Nájera, S. A. Rodríguez-Herrera, L. M. Arias-Reyes y P. Ramírez-Vallejo. 2002. Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25:25-33.
- Lapeña, L., P. Perez-Bermudez and J. Segura. 1992. Factors Affecting shoots proliferation and vitrification in *Digitalis obscura* cultures. *In Vitro Cellular Develomental Biology*. 28: 121-124.
- Lamhanedi, M., H. Chamberland and F.M. Tremblay. 2003. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. *Physiology Plant*. 118: 554–561.
- López-Puc, G., A. Canto-Flick, F. Barredo-Pool, P. Zapata-Castillo, M.C. Montalvo-Peniche, F. Barahona-Perez and N. Santana-Buzzy. 2006. Direct somatic embryogénesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Horto Science* 41(7):1645-1650.
- Long-Solís, J. 2004. La ruta del chile habanero. *Cuadernos de Nutrición*: 27; 77-81.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*. 15:473-497.
- Mwaikambo, L. and M. Ansell. 2002. Chemical modification of hemp, sisal jute and kapok fibers by alkalization. *Journal of Applied Polimer Science*. 84:12: 2223

- Navarrete, R. J., M. J. Soria, J. A. Trejo, J. M. Tun, R. Terán. 2002. Paquete Tecnológico para, La Producción de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2 Conkal, Yucatán. 3 pp.
- Nuez, F., R. Gil-Ortega, J. Costa. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajies. Mundi Prensa. México, D.F.
- Nhut D. T., N. H. Nguyen, D. T. T. Thuy. 2006. A novel *in vitro* hydroponic culture system for potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuber production. *Scientia Horticulturae* 110: 230-234.
- Ordaz C., V. M. 2010. (en línea) Caracterización física de sustratos. Primer curso nacional de sustratos. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México <http://www.cm.colpos.mx/montecillo/images/SUSTRATOS/02.pdf>
- Orellana P. A. 1998. Propagación vía organogénesis. *In: Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología*. Pérez-Ponce J. N. (ed.). Editorial. Cuba. 151-178 pp.
- Pardos, J. A. 2004. Respuesta de las plantas al anegamiento del suelo. *Investigación Agraria, Sistema y Recursos Forestales*. Fuera de serie 101-107.
- Paz R. Da. S. 2004. Sacarosa y contenedores en el enraizamiento *in vitro* y a climatización *ex vitro* de vid. Tesis de Doctorado. Montecillo, Texcoco. Edo de México. Colegio de Postgraduados. 30-78pp.
- Perry, P. L., K. Ueno and K. Shetty. 1999. Reversion to hyperhydration by addition of antibiotics to remove *Pseudomonas* in unhyperhydrated oregano tissue culture. *Process Biochemistry*. 34: 717–723.
- Phan, C.T., R. Letouze. 1983. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and hydroxycinnamate CoA ligase activity. *Plant Science Letter*. 36:323–327.
- Pino, J., M. González, L. Ceballos, A. R. Centurion-Yah., J. Trujillo-Aguirre, L. Latournerie-Moreno and E. Sauri-Duch. 2007. Characterization of total

capsaicinoids, colour and volatile compounds of habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatán. Food Chemistry 104:1682-1686.

Premkumar A., J. A. Mercado and M. A. Quesada. 2001. Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. Journal of Plant Physiology 158:835-840.

Quesada R., G. y C. Méndez S. 2005. Evaluación de sustratos para almacigo de hortalizas. Agronomía Mesoamericana 16: 171-183.

Ramírez, J., G., S. Góngora, L. A. Pérez, M. R. Dzib, E. R., C. Leyva y I. R. Islas. 2005. Síntesis de oportunidades e información estratégica para fijar prioridades de investigación y transferencia de tecnología en Chile habanero (*Capsicum chinense*, Jacq). *In*: Estudio Estratégico de la Cadena Agroindustrial: Chile Habanero. INIFAP, SAGARPA, ASERCA, CIATEJ, UNACH, CICY, OTTRAS. Mérida, Yucatán, México. 23 p. Rincones, C.C. I. 2009. Plan rector. Sistema producto chile de Yucatán. Secretaria de Fomento Agropecuario y Pesquero. SAGARPA. Comité Estatal Sistema Producto Chile del Estado de Yucatán A.C. Mérida Yucatán 76 p

Raya-Montañón Y. A., G. Carrillo-Castañeda, M. E. Pedraza-Santos, T. Corona-Torres, J. A. Carrillo-Salazar y G. Alcántar-González. 2011. Propagación *in vitro* de *Laelia halbigiana*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3: 539-553.

Rincones, C.C. I. 2009. Plan Rector. Sistema producto chile de Yucatán. Secretaria de Fomento agropecuario y pesquero. SAGARPA. Comité estatal sistema producto chile del estado de Yucatán A.C. Mérida Yucatán. 76p.

Robert M., L. M. Arce y A. Eastmond. 2004. Biotecnología vegetal *In*: Biotecnología Alimentaria. Gracia Garibay, Quintero Ramírez, López Munguía (eds). Limusa México.72-103 pp.

Rodríguez R., M. Cid, D. Pina, J. L. González-Olmedo and Y. Desjardins. 2003. Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultivated

in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant*. 39: 657-662.

Rojas G., S., J. García L. y M. Alarcón R. 2001. Propagación asexual de plantas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Colombia. 55p.

Resh H.M. 2001. Cultivos hidropónicos. Mundi –Prensa. Madrid, España.

Rodríguez-Canché, L. G., L. Cardoso-Vigueros, J. Carvajal-León and S. de la C. Poot D. 2010. Production of Seedlings of Habanero Pepper *Capsicum chinense* with Vermicompost Generated from Sewage Sludge. *Compost Science & Utilization*. 18:42-46.

Santana-Buzzy, N., A. Canto-Flick, F. Barahona-Perez, M.C. Montalvo-Peniche, P.Y. Zapata-Castillo, A. Solis-Ruiz, A. Zaldivar-Colli, O. Guitierrez-Alonso and M. L. Miranda-Ham. 2005. Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis. *Horto Science* 40:1829-1831.

Sanatombia K. and G. J. Sharma. 2007. Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants. *Scientia Horticulture*. 113:96-99.

Sanatombia K. and G. J. Sharma. 2008. *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explant. *Biologia Plantarum*. 52:141-145.

Sanatombia K. and G. J. Sharma. 2008. *In vitro* propagation of *Capsicum chinense* Jacq. *Biology Plantarum*. 52:517-520.

Sanchez, M. M. 2009. Evaluación de medios de cultivo para la reproducción in vitro de *Laelia anceps*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo. De México.

Salinas J.G., J. I. Sanz. 1981. Síntomas de deficiencia de macronutrientes y nutrientes secundarios en pastos tropicales. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 10pp.

- SchaEfer, C.; H. Simper,; B. Hofmann. 1992. Glucose feeding results in coordinated changes of chlorophyll content, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase activity and photosynthetic potential in photoautotrophic suspension cultured cells of *Chenopodium rubrum*. Plant Cell Environ. 15:343-350.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2009 http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=306:chile-habanero-de-la-peninsula-de-yucatan&catid=72:infogramas&Itemid=422
consultado el 9 de junio de 2012 15:30 pm
- Stevenson, F. 1982. Humus chemistry: génesis, composition, reactions. New York: Wiley. 442 p
- Snowball, K. and A. D. Robson. 1991. Carencias y toxicidades nutricionales que afectan al trigo: una guía para su identificación en el campo. CIMMYT, México, D.F. 66p.
- Tokoporo, G. L., A. A. Elhassan and M. A. Ali. 2013. Effect of nutrient medium concentration and temperature on short- term in vitro conservation of shoot tip explants of banana. Jonares 1:37-40.
- Turrens, J. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. Journal of Physiology 552: 335-344.
- Trujillo, A. J. 2005. Descripción varietal del chile habanero (*Capsicum chinense*). In: H.P. Torres, C.C. Franco (eds), seminario de chile habanero. Fundación produce Yucatán A.C. Memoria. México 14-19 p.
- Urrestarazu, G. M. 2004. Manual de cultivo sin suelo. Mundi-Prensa.Universidad de Almería España. 112p
- Valadez-Bustos Ma. G., G. A. Aguado-Santacruz, G. Carrillo-Castañeda, V. H. Aguilar-Rincón, E. Espitia-Rangel, S. Montes-Hernandez, and A. Robledo-Paz. 2009. *In vitro* propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper

- (*Capsicum spp.*) plants from commercially important genotypes. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*.45:650-658.
- Valderrama, R., F.Corpas, A. Carreras, A. Fernández Ocaña, M Chaki, F Luque. M .Gómez Rodríguez, P. Colmenero-Varea, L. Del Río and J. Barroso. 2007. Nitrosative stress in plants. *FEEBS. Letters* 581: 453-4618.
- Van S., J, C. Fennell and N. Taylor. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*.725: 55-62.
- Vieitez, A.M., A. Balleston, M.C. San-Jose, E. Vieitez. 1985. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. *Physiology Plantarum*. 65, 177–184.
- Vinicio G., M. 2002. Aspectos básicos de la nutrición mineral de las plantas absorción foliar de sustancias útiles en la aplicación de agroquímicos al follaje. *In*. Melendez, G. y E. Molina. *Fertilización Foliar: Principios y Aplicaciones* Universiada de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronomicas. Costa Rica. 10p.
- Weir, R.G. and G.C. Cresswell (eds). 1993. *Análisis Foliar Chiles Dulces y Picantes*. Inkata Press, Australia
- Yamaguchia M., N. Yahagia, H. Katoa, F. Takano and T.Ohtaa. 2010. Capsicum extract and its constituents modulated the production of immunoglobulins in Peyer's patch cells ex vivo. *Journal of Functional Foods* 2:255-262.
- Zapata-Castillo, P.Y., F. Adriana-Canto, G. Lopez-Puc, A. Solis-Ruiz, F. Barahona-Perez and N. Santana-Buzzy. 2007. Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*C. chinense* Jacq.) From Cell Suspensions. *Hort Science* 42:329–333
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants.*Plant Cellular, Tissue and Organ Culture*. 81:277-285.
- Ziv, M. 1991 Quality of micropropagated plants-vitrification. *Tissue Culture Association*. 27:64-69

Zobayed S., M. A., F. Afreen-Zobayed, C. Kubota and T. Kozai. 1999. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plantarum*.35:183-188.

ANEXOS

Cuadro 28. Análisis de nutrimentos solubles de sustratos de los diferentes sustratos.

	pH	C.E. ds/m	Nt %	Ppm									
				B	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
P			0.3										
F	5.5	0.25	1	1.77	116.87	0.15	1.27	98.07	87.78	0.27	274.05	6.95	0.231
F			0.5					100.7					
T	6.19	0.39	4	1.38	134.95	0.02	4.49	6	151.09	1.24	147.82	5.83	0.141
P			0.1										
T	7.71	0.10	8	0.27	31.89	0.04	3.33	0.92	18.07	0.12	51.49	0.03	ND
V	7.71		0.1										
P	5	0.22	1	0.76	78.91	0.16	24.20	5.84	86.89	0.69	184.55	0.31	

Perlita Fibra de coco (PF), fibra de coco-tezontle (FT), perlita-tezontle (PT), vermiculita-perlita (VP).

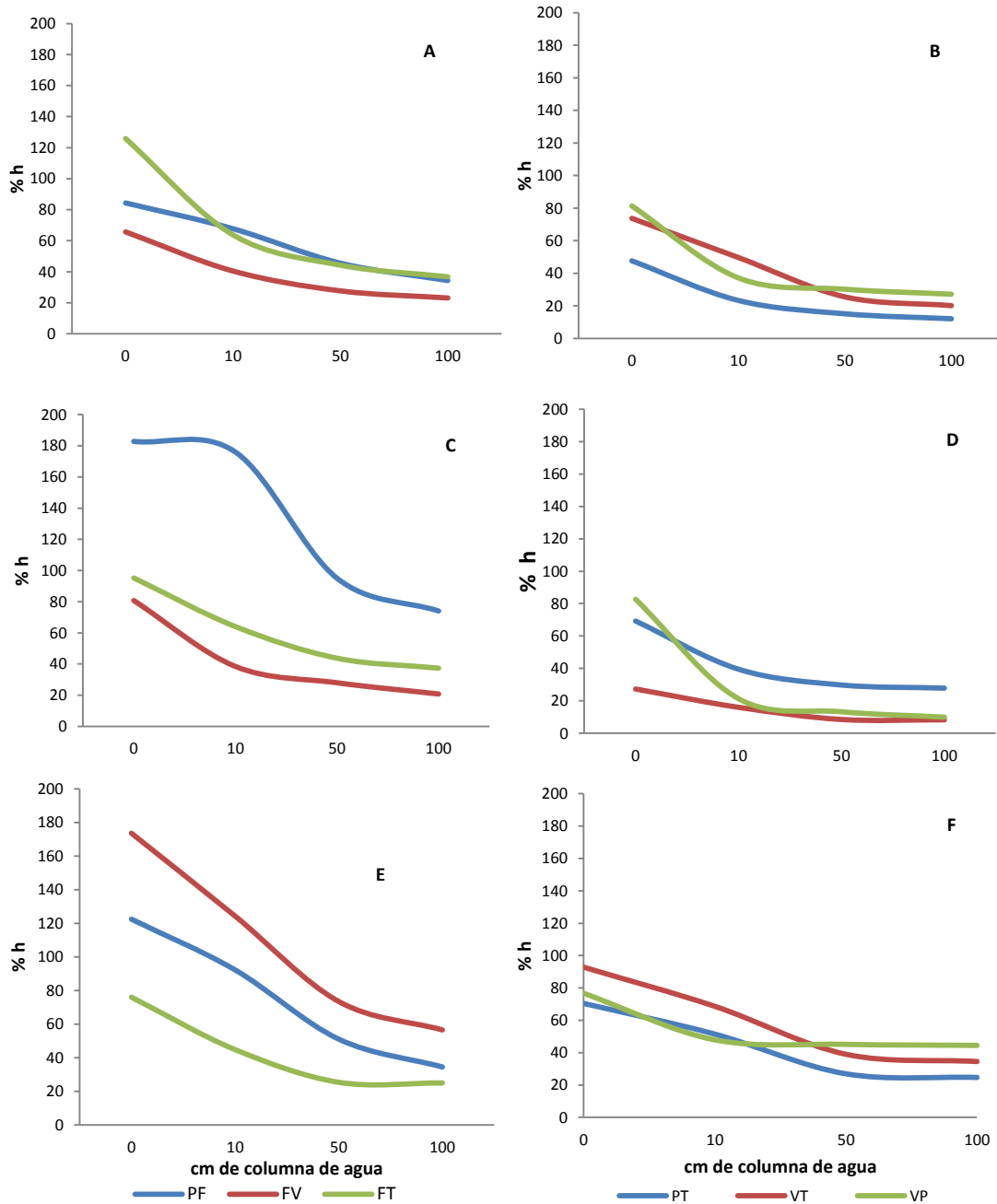


Figura 25. Curvas de retención de agua de sustratos con proporción 1:1 (A, B); 2:1 (C,D); 3:1(E, D); 0 cm de columna de agua (Capacidad de campo), 10 cm (Agua fácilmente disponible), 50 cm (Agua de reserva), 100 cm (Agua difícilmente disponible) de columna de agua. Fibra de coco-vermiculita (FV); fibra de coco-tezontle (FT); perlita-tezontle (PF); vermiculita-perlita (VP); vermiculita-tezontle (VT); perlita-tezontle (PT).

Cuadro 29. Análisis de Varianza procedimiento GL para porcentaje de supervivencia de explantes de embrión inducidos en sustratos.

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
S	3	11566.66	3855.55	52.88	<.001	*	
M	7	1500.00	214.28	2.94	0.0099	*	
S*M	21	6066.66	288.88	3.96	<.001	*	

Sustrato (S), medio (M), combinación S*Mc (sustrato* medio), M*Sc (medio*sacarosa); significativo (*), no significativo (NS).

Cuadro 30. Análisis de Varianza procedimiento GL para porcentaje de respuesta (formación de primordios de brote) de explantes de embrión de chile habanero, inducidos en sustratos

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
S	3	31166.66	10388.88	166.22	<.001	*	
M	7	2600.00	371.42	5.94	<.001	*	
S*M	21	8633.33	411.11	6.58	<.001	*	

Sustrato (S), medio (M), combinación S*Mc (sustrato* medio); significativo (*), no significativo (NS).

Cuadro 31. Análisis de varianza del porcentaje enraizamiento de brotes provenientes de explantes de embrión en sustratos.

	FV	GL	SC	CM	FC	SIG
S	2	0.125	0.065	0.45	NS	
M	3	2.833	0.944	6.80	*	
M*S	6	1.041	0.173	1.25	NS	

Sustrato (S), medio (M), combinación S*M (sustrato* medio); significativo (*), no significativo (NS).

Cuadro 32. Análisis de varianza para porcentaje de supervivencia de explantes de hipocotilo de chile habanero, cultivados en medio de inducción en sustratos.

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
S		2	20.00	10.00	1.10	0.33	NS
M		3	6.66	2.22	0.24	0.86	NS
S*M		6	73.33	12.22	1.35	0.24	NS

Sustrato (S), medio (M), combinación S*M (sustrato* medio); significativo (*), no significativo (NS).

Cuadro 33. Análisis de varianza procedimiento GL para porcentaje de explantes de hipocotilo que formaron primordios de brote en sustratos.

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
S		2	38533.33	19266.66	115.60	0.001	*
M		7	14216.66	2030.95	12.19	0.017	*
S*M		14	39600.00	2828.57	16.97	0.001	*

Sustrato (S), medio (M), combinación S*Mc (sustrato* medio); significativo (*), no significativo (NS).

Cuadro 34. Análisis estadístico de porcentaje de supervivencia (SBRVV) y formación de primordios de brotes (FPBRT) de explantes de embrión inducidos en agar.

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
SBRVV		7	63.12	9.01	18.20	0.001	*
FPBRT		7	4562.50	651.78	12.69	0.001	*

Medio (M); Significativo (*), no significativo (NS).

Cuadro 35. Análisis estadístico de número de brotes por explante de embrión cultivados en sustratos.

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
S		2	15.36	7.68	6.83	0.002	*
M		7	91.27	13.03	11.59	0.001	*
S*M		14	53.97	3.85	3.43	0.007	*

Sustrato (S), medio (M), combinación S*Mc (sustrato* medio); significativo (*), no significativo (NS)

Cuadro 36. Análisis estadístico de número de raíz de los brotes enraizados *in vitro* en sustrato.

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
S		2	7.90	3.95	3.02	0.0582	Ns
M		3	80.33	26.77	20.47	0.001	*
S*M		6	28.36	4.72	3.61	0.004	*

Medio (M), sustrato (S), combinación sustrato y sacarosa (S*M); significativo (*), no significativo (NS).

Cuadro 37. Análisis estadístico de longitud de raíz de los brotes enraizados *in vitro* en sustrato

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
S		2	342.36	171.18	119.00	0.001	*
M		3	25.14	8.38	5.87	0.017	*
S*M		6	66.43	11.07	7.75	0.001	*

Medio (M), sustrato (S), combinación sustrato y sacarosa (S*M); significativo (*), no significativo (NS).

Cuadro 38. Análisis estadístico de número de hojas de los brotes enraizados *in vitro* en sustrato

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
S		2	100.23	50.11	18.50	0.001	*
M		3	10.26	3.42	1.26	0.2974	Ns
S*M		6	16.43	2.73	1.01	0.4292	Ns

Medio (M), sustrato (S), combinación sustrato y sacarosa (S*M); significativo (*), no significativo (NS).

Cuadro 39. Análisis estadístico de longitud de parte aérea de los brotes enraizados *in vitro* en sustrato.

	FV	GL	SC	CM	FV	Pr>F	SIG
S		2	0.424	0.21	0.92	0.4069	Ns
M		3	16.00	5.33	23.01	0.001	*
S*M		6	9.76	1.62	7.02	0.001	*

Medio (M), sustrato (S), combinación sustrato y sacarosa (S*M); significativo (*), no significativo (NS)

Cuadro 40. Análisis estadístico de la longitud (LOG), diámetro de tallo (DMTR), número de hojas (NHJS), de plantas aclimatadas en invernadero enraizadas *in vitro* en sustrato.

	FV	GL	SC	CM	FC	SIG
LOG		7	5.589	0.798	6.40	*
DMTR		8	242.13	30.26	639.63	*
NHJS		7	743.91	106.27	19.81	*

Tratamientos *in vitro* de los cuales provienen las plantas aclimatadas en invernadero (T); significativo (*), no significativo (NS).