

REVISTA ELECTRÓNICA MENSUAL

Debates

sobre **Innovación**

ISSN: 2594-0937

Jul-Sep 2024

VOL.8 NÚM.3

NÚMERO ESPECIAL
MEMORIAS CONGRESO CICA 2024



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



MEGI

MAESTRÍA EN ECONOMÍA, GESTIÓN
Y POLÍTICAS DE INNOVACIÓN



LALICS

LATIN AMERICAN NETWORK FOR ECONOMICS OF LEARNING,
INNOVATION AND COMPETENCE BUILDING SYSTEMS

DEBATES SOBRE INNOVACIÓN. Volumen 8, Número 3, jul-sep 2024, es una publicación trimestral de la Universidad Autónoma Metropolitana a través de la Unidad Xochimilco, División de Ciencias Sociales y Humanidades, Departamento de Producción Económica. Prolongación Canal de Miramontes 3855, Col. Ex-Hacienda San Juan de Dios, Alcaldía Tlalpan, C.P. 14387, Ciudad de México y Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México. Teléfono 55 54837200, ext.7279. Página electrónica de la revista <https://revistadebates.xoc.uam.mx/index.php/debinnovacion/issue/view/17> y dirección electrónica: noticiaslalics@gmail.com Editor responsable: Dra. Gabriela Dutrénit Bielous. Certificado de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo de Título No. 04-2022-101113015800-102. ISSN 2594-0937, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número: Mtra. Gloria Magdalena González Trejo, Departamento de Producción Económica, División de Ciencias Sociales y Humanidades, Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México. Fecha de última modificación: 30 de septiembre de 2024 Tamaño del archivo: 3.5 MB Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de la Universidad Autónoma Metropolitana.

INDUCCIÓN IN VITRO DE CALLOS A PARTIR DE DOS EXPLANTES DE *Capsicum annuum* L

Autor 1

Martínez-Camacho Adriana Paola

Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, Dirección Agroalimentaria, México

E-mail: a.martinez@utsoe.edu.mx

Autor 2

Calderón-Ruiz Alberto

Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, Dirección Agroalimentaria, México

E-mail: acalderonr@utsoe.edu.mx

Autor 3

Gaytán-Ruelas Marina

Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, Dirección Agroalimentaria, México

E-mail: mgaytanr@utsoe.edu.mx

Resumen

El chile jalapeño *Capsicum annuum* L. es un cultivo agrícola de gran demanda en las cocinas mexicanas, representa parte del grupo diverso del género *Capsicum spp.*, presentando variabilidad en frutos, tamaños, formas, sabores y pugencia. Sin embargo, la producción de esta solanácea se ha visto afectada por diversos factores bióticos y abióticos, como enfermedades, temperaturas extremas, sequía, y salinidad entre otros. La alta dependencia genotípica del chile y su naturaleza recalcitrante han desfavorecido para combatir los diferentes tipos de estrés. Las herramientas de la biotecnología como el cultivo de tejidos y las técnicas del ADN recombinante, pueden ayudar a complementar el fitomejoramiento tradicional y así poder acelerar la adquisición de características favorables en el cultivo de chile. Por otro lado, esta especie presenta, en general, una menor capacidad de regeneración y, como consecuencia, estas metodologías resultan más complicada que en otros miembros de la familia solanácea como el tomate (*Solanum lycopersicum*), o el tabaco (*Nicotiana tabacum*). Los estudios siguen avanzando para lograr la mejora de este cultivo y así darle un valor adicional. Para aunar, el presente trabajo se llevaron a cabo varias pruebas donde se sometieron a ensayo principalmente dos tipos de explantes: cotiledones e hipocótilos, ya antes reportados con éxito para otras variedades de *C. annuum* L. Además, estos dos explantes fueron sometidos a diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento AIA y BAP; con estas pruebas se comprobó que es posible la formación de brotes.

Palabras Clave: *Capsicum annuum* L, recalcitrante, cultivo de tejido.

ABSTRACT

The jalapeño peppers *Capsicum annuum* L. is an agricultural crop of great demand in Mexican kitchens, it represents part of the diverse group of the genus *Capsicum spp.* presenting variability in fruits, sizes, shapes, flavours and pugency.. However, the production of this solanaceae has been affected by various biotic and abiotic factors, such as diseases, extreme temperatures, drought, and salinity among others. The high genotypic dependence of chilli and its recalcitrant nature have disadvantaged it in combating different types of stresses. Biotechnology tools such as tissue culture and recombinant DNA techniques can help to complement traditional plant breeding and thus accelerate the acquisition of favourable traits in chilli cultivation. On the other hand, this species has, in general, a lower regeneration capacity and, as a consequence, these methodologies are more complicated than in other members of the Solanaceae family such as tomato (*Solanum lycopersicum*) or tobacco (*Nicotiana tabacum*). Studies continue to progress in order to improve this crop and thus give it additional value. In order to combine the present work, several tests were carried out where mainly two types of explants were tested: cotyledones and hypocotyls, already successfully reported before for other varieties of *C. annuum* L. In addition, these two explants were subjected to different concentrations of the growth regulators AIA and BAP; these tests proved that shoot formation.

Keywords: *Capsicum annuum* L, recalcitrant, tissue culture.

1. Introducción

El chile Jalapeño *Capsicum annuum* L. es uno de los cultivos hortícolas mundialmente más importantes (Guevara et al., 2021). Pertenece a la familia Solanaceae, originaria y supuestamente domesticada a partir de *C. annuum* L. var. *glabriusculum* en México (Martínez-Ispizua et al., 2021), esta especie es una rica fuente de fitoquímicos y nutrientes, como flavonoides, carotenoides y vitaminas que son importantes para la dieta humana (Morales-Soto et al., 2013). Además, su sabor y la acritud únicos se deben a la existencia de capsaicinoides, un grupo de alcaloides sintetizados exclusivamente en el fruto de esta especie vegetal (Martínez-Ispizua et al., 2021). *C. annuum* L. presenta raíces pivotantes, así como raíces adventicias como parte de su sistema radicular. Su tallo es de crecimiento erecto limitado. Su altura puede variar entre 50 cm y 1.5 m. Sus hojas son enteras (ovales o lanceoladas), además de glabras o pubescentes. Posee flores solitarias que aparecen en cada nudo y son de inserción axilar. Las flores presentan corola blanquecina. Su fecundación es principalmente autógama. Con respecto al fruto, es una baya semicartilaginosa y deprimida de color rojo cuando madura, aunque se comercializa verde, de forma y tamaño variables; es una planta herbácea anual (Maroto, 1983).

En el país, el consumo de este fruto representa una tradición cultural debido a su gran cantidad, amplia variedad y sabor picante. La pungencia de este fruto es causada por siete alcaloides o capsaicinoides, siendo la capsaicina y la dihidrocapsaicina las responsables del 90% del sabor pungente (Sánchez-Segura et al., 2015). Por su color, sabor y aroma el chile se ha convertido en un condimento popular en muchas partes del mundo. En los últimos años, esta hortaliza ha recibido gran atención en el mundo, debido al ataque de plagas y enfermedades que afectan los rendimientos. En México, la producción del cultivo es afectada por diversos organismos patógenos causantes de siniestros parciales o totales (González y Guigón, 2001). El comercio de materiales vegetales para el establecimiento de parcelas productivas, especialmente por semillas en el caso del chile, representa una ruta para que los patógenos se puedan propagar (Constable et al., 2019). Dentro de las alternativas para la obtención de material vegetal aséptico se consideran a las herramientas biotecnológicas, con el empleo de técnicas de cultivo de in vitro (Orlinska y Nowaczyk, 2015). Estas técnicas permiten la proliferación de células a partir de un explante (fragmento vegetal que puede ser meristemos, yemas axilares, hojas, raíces, anteras e incluso microsporas) en un medio de cultivo provisto de nutrientes, vitaminas, y en algunos casos también de hormonas (Venkataiah y col., 2016). Estos explantes, en condiciones apropiadas, inducirán a la formación de callos, que son masas amorfas o desorganizadas de células indiferenciadas. La importancia del callo radica en su funcionalidad de crecimiento irregular con potencial para formar órganos o embriones en las condiciones adecuadas (Rashmi y Trivedi, 2014). Sin embargo, los protocolos de regeneración de *C. annuum* L, particularmente por embriogénesis somática, que se han reportado a la fecha, están limitados para su aplicación por algunos problemas; principalmente por una baja eficiencia de los sistemas de regeneración, una baja reproducibilidad de los protocolos, un alto índice de callos deformados u oxidados, y una baja tasa de germinación y conversión de los embriones a plantas (o incapacidad de elongación). Tomando en cuenta la recalcitrancia del género *Capsicum* spp. a la regeneración de plantas in vitro y conociendo los avances que existen, se planteó establecer un protocolo de embriogénesis somática en *C. annuum* L. a partir de explantes: cotiledones e hipocótilos.

2. Metodología

Localización del proyecto

El desarrollo de este ensayo se realizó en laboratorio de biología de las instalaciones de la Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato ubicada en Carretera: Valle-Huanímaro km 1.2, Valle de Santiago, Guanajuato.

Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile jalapeño comercial.

Desinfestación superficial de las semillas y germinación

En tubos Falcon de 50 mL limpios, se colocaron un aproximado de 250 semillas. Se le agregaron 25 mL de etanol al 70% y se mantuvieron en agitación en vortex durante 3 min. Transcurrido este tiempo, se decantó el etanol y se le agregó 25 mL de hipoclorito de sodio al 1.08%, nuevamente se agitaron en vortex durante 3 min y se decantó el hipoclorito. Para los enjuagues, se utilizó agua destilada estéril; al decantar el hipoclorito de sodio, se le adiciono al tubo 25 mL de agua destilada estéril y se mantuvo en agitación durante un minuto, se decantó el agua y se repitió dos veces más este procedimiento, para obtener tres enjuagues. Todo este proceso se realizó bajo campana de flujo laminar. En seguida las semillas se colocaron bajo el flujo laminar de la campana, sobre sanitas estériles y así eliminar todo exceso de agua para posteriormente ponerlas a germinar.

Germinación de las semillas

Para la germinación se utilizaron cajas Petri de plástico de 9 cm de diámetro que contenían 25 mL de medio básico Murashige y Skoog (1962) al 50%, y se colocaron 20 semillas por caja. La incubación se llevó a cabo a 25°C en total oscuridad durante una semana o hasta que protrude la raíz. Trascorridas 72 hrs, las cajas fueron revisadas en busca de semillas contaminadas, en el caso de que se encontrara contaminación por bacteria, las semillas sin contaminación se cambiaron a una caja nueva con medio MS. Después de una semana en condiciones de oscuridad, se colocaron las cajas con las semillas a condiciones estándar de luz (16 hrs), durante dos semanas más.



Figura 1 Germinación de las semillas en medio MS

Corte de

Para la utilización del explante se eligieron hipocótilo (Borychowski et al., 2002) y cotiledones. De cada una de las plántulas de chile jalapeño se sacaron tres explantes; para el hipocótilo se realizó un corte por debajo de meristemo apical y hasta dos centímetros por debajo, el explante fue colocado con la parte apical dentro del medio MS adicionado con los reguladores de crecimiento, para así mantenerlo en constante contacto con los reguladores. Para los cotiledones, se realizó un corte horizontal en la parte basal del cotiledón, se colocó en el medio por la parte abaxial, y de igual forma la el corte, las cuales fueron mantenerlo en constante reguladores de crecimiento.

explante

parte basal donde se realizó colocadas en el medio para contacto con los



Figura 2 Corte de explantes: cotiledones e hipocótilo

Para su desarrollo, se les sometió a las condiciones estándar de fotoperiodo (16 hr de luz por 8 hr de oscuridad). Cada dos semanas se realizó el subcultivo hasta que se observó desarrollo.

Inducción utilizando dos reguladores de crecimiento BAP y AIA

se sometieron dos explantes cotiledones e hipocótilo de plántulas de tres semanas de edad aproximadamente, los cuales se sembraron en medio MS modificado con cuatro concentraciones de reguladores de crecimiento BAP (citocinina bencilaminopurina) y AIA (ácido indolacético) adicionando 1.7 mg/L de AgNO₃, estas se muestran en la tabla 1. Para obtener de forma directa brotes, cada unidad experimental consto de diez explantes con cinco repeticiones cada una. Los explantes fueron subcultivados cada dos semanas hasta pasar a la siguiente etapa de la regeneración. Donde se evaluó para este experimento: 1) Número de explantes con brotes (%) y número de brotes por explantes. 2) Número de explantes que formaron callo (%) y se clasifico como friable o no friable. 3) Número de explantes con presencia de compuestos fenólicos (%)

Tabla 1. Concentraciones de BAP y AIA para la producción de brotes

Explante	Concentraciones mg/L	
	BAP	AIA
Cotiledones	2	0
	2	1
	5	0
	5	1
	2	0
Hipocótilos	2	1
	5	0
	5	1

Análisis estadísticos

A las 4 semanas se contaron el número de explantes por repetición por tratamiento por tipo de explante que mostraron organogénesis, se realizó una prueba de Levene y después un ANOVA multifactorial en el software XLSTAT 2022. Addinsoft (2022). XLSTAT statistical and data analysis solution. <https://www.xlstat.com>

4. Resultados y discusiones

Se buscó optimizar la formación de brotes, con los datos obtenidos y midiendo las variables en la formación de callo, callo no friable, brotes, raíz y compuestos fenólicos, se realizó una prueba de de Levene tabla 2.

Tabla 2. Resumen de las pruebas de Levene para todas las variables dependientes:

Factor \ Variable	Concentración	Explante	Concentración*Explante
Callo	0.050	0.611	0.205
Callo no friable	0.002	0.413	0.023
Brotes	0.013	0.610	0.071
Raíz	0.142	0.007	0.000
Producción de fenoles	0.000	0.485	<0.0001

Los valores en negrita corresponden a las pruebas en las que la hipótesis nula no se acepta con un nivel de significación alfa = 0.05

Tabla 2. Cuadros medios del ANOVA bifactorial para las variables en la inducción.

Fuentes de variación	GL	Callo	Callo no friable	Brotes	Raíz	Compuestos fenólicos
Trat	3	33.09**	54**	49.6**	9.9 ^{ns}	15.63**
Trat*Rep	16	2.5 ^{ns}	5.41 ^{ns}	3.62 ^{ns}	3.42 ^{ns}	0.51 ^{ns}
Var	1	24.2**	3.6 ^{ns}	16.9 ^{ns}	62.5**	10.0*
Trat*Var	3	18.8**	12.0*	17.23 ^{ns}	9.9 ^{ns}	3.26 ^{ns}

Var*Rep	4	13.21**	3.6 ^{ns}	18.08*	2.68 ^{ns}	1.56 ^{ns}
Error	12	2.01	2.7	5.5	3.67	1.32

** Altamente significativo, * Significativo, ns No significativo, α 0.05.

En el análisis de varianza, se encontraron diferencias altamente significativas para todas las variables por lo que se procedió a realizar la comparación de medias (Tabla 3).

Tabla 3 Respuesta en la inducción de brotes

Explantos	Concentraciones $\mu\text{g/ml}$	Callo	Callo no friable	Brotes	Raíz	Compuestos fenólicos
Cotiledones	2BAP	3.2a	2.8b	5.6b	0a	1b
	2BAP+1AIA	4.2a	5.6a	4.2b	0a	4a
	5BAP	0.4b	0c	9.8a	0a	0bc
	5BAP+1AIA	1b	0c	7ab	0a	0.4c
Hipocótilos	BAP2	2c	5.8a	2c	1.8b	0a
	BAP2+1AIA	6.6a	3.4b	6.6ab	4a	1a
	5BAP	5.4b	1.4bc	8.4a	0c	0a
	5BAP+1AIA	1c	0.2c	4.4bc	4.2a	0a

- Valores del experimento donde se utilizaron dos tipos de explantes en 4 concentraciones de hormonas, con cinco repeticiones cada una y diez explantes por repetición.
- Las letras diferentes muestran diferencias estadísticas entre medias (Tukey: $p \leq 0.05$)

Los explantes tomados de cotiledón e hipocótilo de plántulas cultivadas asépticamente durante tres semanas, mostraron crecimiento celular, en los bordes cortados, a los 8 días de haber sido colocados en el medio de cultivo.

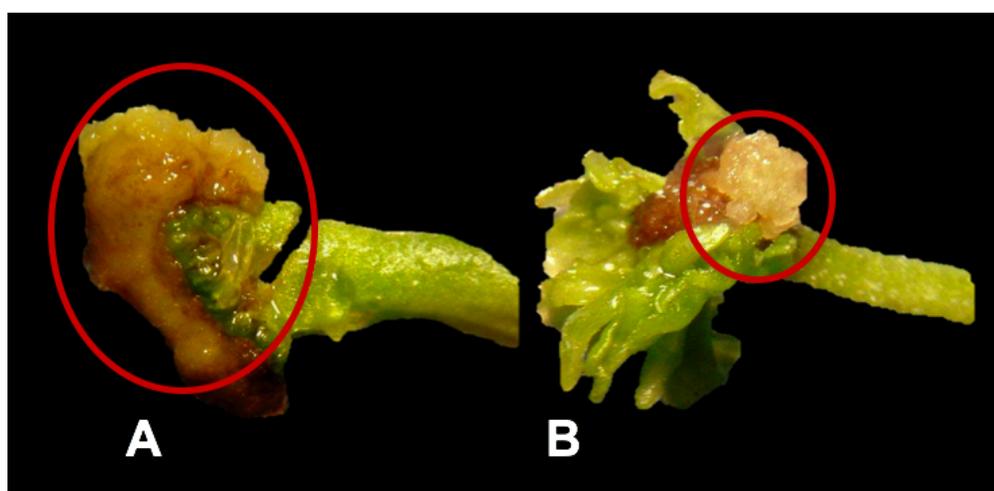


Figura 3 Formación de callo en los explantes de cotiledón (A) e hipocótilo (B).

El callo se presentó con un color blancuzco que se fue amarillando. De acuerdo a la comparación de medias, se observó que el mayor número de cotiledones con callo se formaron en los tratamientos con 2mg/L de BAP con o sin AIA, mientras que para los hipocótilos el tratamiento de BAP 2mg/L tuvo mayor formación de callo (Figura 4).

Con respecto a la formación de brotes, las primeras estructuras se presentaron a las 2 semanas, la mayor respuesta se observó en el tratamiento con 5 mg/L de BAP para ambos explantes, sin embargo, con este tratamiento en los cotiledones no se observó la presencia de callo, por lo que el porcentaje de la organogénesis directa fue de 100%.

Figura 4 Formación de brotes en cotiledones BAP (A) a 2 mg/L y (B) 5 mg/L.

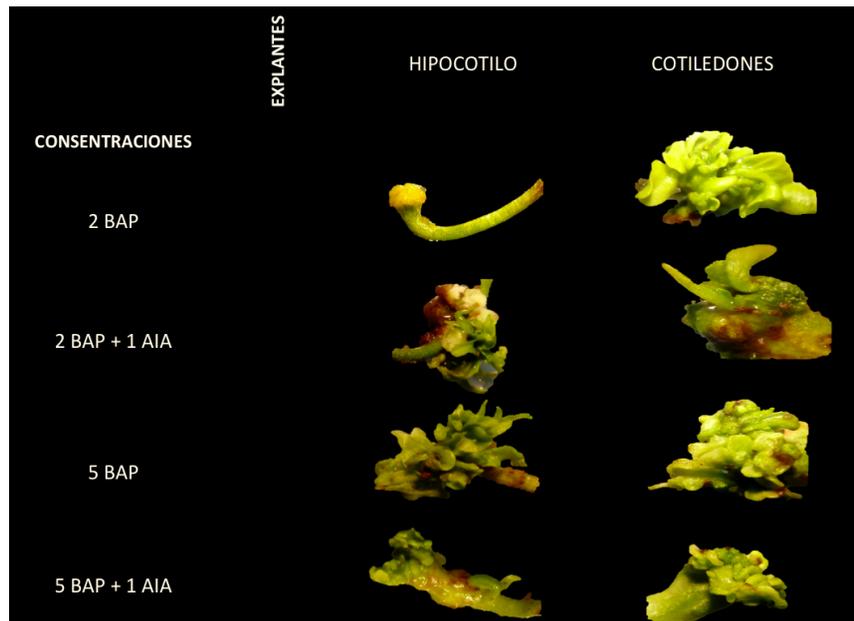


Figura 5 Respuesta de los explantes del genotipo Caloro

En los cuatro tratamientos, utilizando ambos explantes, cotiledones e hipocótilos, se observó la formación de diferentes estructuras callos o brotes en menor o mayor frecuencia, esta respuesta inicial coincide con las observaciones realizadas por algunos autores donde mencionan que la organogénesis se puede encontrar en la superficie de los cortes de *Capsicum*, independientemente de los reguladores de crecimiento aplicados (Dabauza y Peña, 2001; Gatz, 2002; Kothari *et al.*, 2010; Orłinska y Nowaczyk, 2015).

Para este experimento se observó que el efecto de las citocininas mejora la frecuencia de brotación en la variedad chile jalapeño (*C. annuum* L.), siendo el mejor tratamiento estadísticamente, BAP 5mg/L, a diferencia de lo encontrado por algunos otros autores como Swamy *et al.*, (2014) que halló que las citocininas por si solas no tenían un efecto significativo sobre el potencial de regeneración de los brotes en las plantas de *C. annuum* L., esto nos ayuda a confirmar la dependencia genotípica antes mencionada por Kothari *et al.* (2010) y Tata *et al.*, (2016), en la Figura 6 se muestran las respuestas de los explantes de cotiledón como de hipocótilo a los diferentes tratamientos, en la primera etapa de la regeneración.

Figura 6 Formación de raíz en hipocótilos en presencia de AIA



También se observó que en los hipocótilos se desarrolló raíz con mayor frecuencia en los tratamientos adicionados con 1 mg/L de AIA, mientras que en el tratamiento con 5 mg/L de BAP no se observó el desarrollo de raíz. Y con respecto a la formación de compuestos fenólicos el tratamiento con 2 mg/l de BAP y 1 mg/L de AIA ó fue el que presentó oxidación con mayor frecuencia.



Figura 7 Formación de compuestos fenólicos en cotiledon (A) e hipocótilo (B)

6. Conclusiones

Se logró el avance para el desarrollo de una metodología para la regeneración de *Capsicum annuum* L., donde a partir de explantes de cotiledones e hipocótilos se determinaron las condiciones para la emisión de callos y brotes.

De acuerdo a lo obtenido en estos experimentos y a las referencias previamente consultadas, la regeneración *in vitro* de la especie *Capsicum annuum* L., es sumamente dependiente de genotipo, del medio de cultivo incluyendo el tipo de explante a utilizar.

En este caso, el aumento de la concentración de AIA en el medio de inducción propicia una mayor formación de callo que en algunas ocasiones llega a ser un callo friable sin dar origen a ningún órgano, además de que al exceder la concentración de 1 mg/L, la presencia de compuestos fenólicos es más frecuente. Sin embargo, el genotipo utilizado requiere la presencia de ambas fitohormonas (citocininas y auxinas) en este caso BAP y AIA para la inducción de brotes.

Referencias

- Borychowski A, Niemirowicz-Szczytt K and Jedraszko M (2002). Plant regeneration from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) hypocotyl explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(3): 257-264. DOI:10.1007/s11738-002-0049-x
- Constable, F., Chambers, G., Penrose, L., Daly, A., Mackie, J., Davis, K., Rodoni, B., & Gibbs, M. (2019). Viroid-infected Tomato and Capsicum Seed Shipments to Australia. *Viruses*, 11(2), 98. <https://doi.org/10.3390/v11020098>
- Dabauza M, Peña L (2001). High efficiency organogenesis in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) tissues from different seedling explants. *Plant growth and Regeneration*, 33: 221-239. DOI:10.1023/A:1017585407870
- Gatz A (2002). Induction of shoot buds, multiplication and plantlet formation in seedling explants of bell pepper (*Capsicum annuum* L. CV. Bryza) *in vitro*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 71(3): 187-193. DOI:10.5586/asbp.2002.022
- González, Pablo Andrés y Guigón, César (2001). Estudio Regional de las Enfermedades del Chile (*Capsicum annuum*, L.) y su Comportamiento Temporal en el Sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19 (1),49- 56
- Guevara L., Domínguez-Anaya M. Á, Ortigosa A., González-Gordo S., Díaz C., Vicente F., et al. (2021). Identification of compounds with potential therapeutic uses from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits and their modulation by nitric oxide (NO). *Int. J. Mol. Sci.* 22:4476. DOI:10.3390/ijms22094476
- Kothari SL, Joshi A, Kachhwaha S, Ochoa-Alejo N (2010) Chilli peppers-A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28: 35–48. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.08.005
- Maroto, J. (1983). *Horticultura herbácea especial*. Madrid, España: Mundiprensa.
- Martínez-Ispizua E., Martínez-Cuenca M. R., Marsal J. I., Díez M. J., Soler S., Valcárcel J. V., et al. (2021). Bioactive compounds and antioxidant capacity of Valencian pepper landraces. *Molecules* 26 1–23. DOI: 10.3390/molecules26041031
- Morales-Soto A., Gómez-Caravaca A. M., García-Salas P., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2013). High-performance liquid chromatography coupled to diode array and electrospray time-of-flight mass spectrometry detectors for a comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in three pepper (*Capsicum annuum* L.) samples. *Food Res. Int.* 51 977–984. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.02.022
- Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Orlinska, M. y P. Nowaczyk (2015). «In vitro plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types». En: *Turkish Journal of Biology* 39.1, 60-68. doi:10.3906/biy-1403-89
- Rashmi, R. y M. Trivedi (2014). «Effect of various growth hormone concentration and combination on callus induction, nature of callus and callogenic response of *Nerium odorum*». En: *Applied biochemistry and biotechnology* 172.5, 2562-2570. DOI: 10.1007/s12010-013-0693-1
- Sánchez-Segura, L. Téllez-Medina D.I, Evangelista-Lozano, S., García-Armenta E., L. Alamilla-Beltrán, H. Hernández-Sánchez, A.R. Jiménez-Aparicio, G.F. Gutiérrez-López (2015) Morpho-structural description of epidermal tissues related to pungency of *Capsicum*

species, Journal of Food Engineering, Volume,152,Pages95-104,ISSN02608774.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.022>.

Swamy S, Krupakar A, Surendra CD and Koshy EP (2014). Direct regeneration protocols of five *Capsicum annuum* L. varieties. African Journal of Biotechnology, 13(2): 307-312. DOI:10.5897/AJB2013.12592

Tata SS, Taminara R, Kumar AO (2016). Applied concepts in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Special reference to in vitro and molecular studies. LAP Lambert Academic Publishing. Saarbrücken, Alemania.

Venkataiah, P., Bhanuprakash, P., Suman Kalyan, S., & Subhash, K. (2016). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. Journal, genetic engineering & biotechnology, 14(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.02.001>